

SEPARAÇÃO DE CÉLULAS CHO UTILIZANDO HIDROCICLONES

Rodrigo Coelho Ventura Pinto

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

Profa. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

Prof. Aldo Tonso, D.Sc.

Profa. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr., Dr. Ing.

Profa. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

ABRIL DE 2007

PINTO, RODRIGO COELHO VENTURA

Separação de Células CHO Utilizando
Hidrociclones

VIII, 100 P. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
D.Sc.,Engenharia Química, 2007)

Tese - Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Hidrociclones

2. Separação de células animais

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

“Uma lição central da ciência, é que, para compreender assuntos complexos (e mesmo alguns simples), devemos tentar libertar a nossa mente de dogmas e garantir a liberdade de publicar, contradizer e de experimentar. Argumentos de autoridade são inaceitáveis”

Carl Sagan (1934-1996)

AGRADECIMENTOS

Agradecer nem sempre é fácil, há momentos em que se torna impossível expressar em palavras o que sentimos. Por isso, em algumas poucas palavras agradeço...

Aos meus pais, que mais uma vez depositaram tanta confiança e dedicação eterna para que eu tivesse a chance de completar mais uma etapa da minha vida. Por seus esforços, apoio e afeto, obrigado.

Aos meus orientadores, Leda Castilho e Ricardo Medronho, tutores inigualáveis e, principalmente, amigos.

Ao meu irmão, que entre todos os desentendimentos a gente acaba se entendendo.

A minha irmã, cunhado e sobrinhos, a quem sempre prometo que vou visitar.

À Flávia e ao Pedro Henrique que acompanharam pessoalmente esta jornada. Até mesmo ao Fundão, eles foram em dias ensolarados. Vocês dois vão estar sempre no meu coração, assim como a sua família.

A uma amiga muito especial, que há muito tempo me ajuda, me dá conselhos, me dá trabalho e que me dá muitas alegrias. Maíra você é única.

Aos amigos do LECC, atuais e todos que já passaram por lá e com os quais tive o grande prazer de trabalhar.

Aos velhos amigos André e Bissoli. Sempre inseparáveis e prontos para o que der e vier.

Aos amigos microbiologistas, Caê e Rana, Leandro, Bauer, Lindinha, Amaro, Ruback, Bernardo (hemérito), Celso, Rachel, Ramon, Dani, Pedinho e Rachel, Volotão e Aline, Juliana, Fé e Danilo, Cla, Pri, Ivy, Melissa, Elisa e tantos outros que apesar de não serem citados, são sempre lembrados.

Aos amigos do laboratório de Bioprocessos.

Ao Programa de Engenharia Química, seus funcionários, professores e alunos.

Ao Setor de microscopia do IMPPG, sempre dispostos a ajudar.

Ao Laboratório de Cultivos Celulares (Argentina, Santa Fé).

Ao Centro de Inmunología Molecular (Cuba, Argentina), pelo apoio. Amigos do outro lado do mundo.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

SEPARAÇÃO DE CÉLULAS CHO UTILIZANDO HIDROCICLONES

Rodrigo Coelho Ventura Pinto

Abril/2007

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Programa: Engenharia Química

No presente trabalho, estudou-se o uso de hidrociclones na separação de células animais da linhagem CHO (*Chinese hamster ovary*). Empregaram-se diferentes técnicas para avaliar os efeitos do uso dos hidrociclones sobre a viabilidade de células CHO.K1 e CHO rhGM-CSF cultivadas a baixas concentrações de soro fetal bovino. Na primeira fase do trabalho, foi possível determinar modelos matemáticos para descrever o desempenho dos hidrociclones em função de três variáveis (queda pressão, diâmetro de *overflow* e *underflow*). Foram verificadas altas eficiências, geralmente acima de 97%. As configurações que apresentaram melhor desempenho foram testadas quanto à capacidade de se manter a viabilidade da cultura, tendo sido constatadas baixas quedas na viabilidade celular (cerca de 5%). Testes específicos para identificar células apoptóticas indicam que o hidrociclone não induziu apoptose nas culturas observadas. Na segunda parte do trabalho, os hidrociclones foram usados em biorreatores agitados em perfusão para promover a retenção celular. Apesar de não ter sido possível alcançar altas densidades celulares em biorreatores de pequena escala, foi possível constatar que as culturas apresentaram crescimento significativo, indicando que seria possível alcançar densidades celulares maiores. Durante os experimentos foram mantidas altas viabilidades celulares e a produtividade da cultura, além de não ser constatada a indução de apoptose. Na fase final, o hidrociclone foi empregado em um biorreator de escala industrial. Assim como observado anteriormente, o equipamento promoveu altas eficiências de separação, sem influenciar o metabolismo e viabilidade da cultura.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

SEPARATION OF CHO CELLS USING HYDROCYCLONES

Rodrigo Coelho Ventura Pinto

April/2007

Advisors: Leda dos Reis Castilho
Ricardo de Andrade Medronho

Department: Chemical Engineering

In the present work, hydrocyclones were investigated for the separation of Chinese hamster ovary cells. Different techniques were used to assess the influence of hydrocyclones on cell viability of the parental CHO.K1 cell line and of a recombinant CHO cell line producing recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (CHO-GMCSF). In the first part of this work, a fractional factorial experimental design was used to evaluate hydrocyclone performance as a function of three variables (pressure drop, overflow and underflow diameter). High separation efficiencies (over 97%) were obtained, and mathematical models to predict hydrocyclone performance were determined based on the experimental data. The hydrocyclone configurations that showed best results were further tested to verify their capacity to maintain high cell viability. Low viability drops were observed. Specific tests to identify apoptotic cells gave evidence that the device did not induce apoptosis in cells separated with the hydrocyclones. In the second part of the present work, hydrocyclones were used as retention devices in small-scale stirred-tank bioreactors operating in perfusion mode. The cultures presented significant cell growth, indicating that it would be feasible to achieve higher cell densities. During the whole culture time, high cell viability and productivity were maintained, and no induction of apoptosis was observed. The final part of this work consisted of testing the hydrocyclone in an industrial large-scale bioreactor. The results showed high cell separation efficiencies with no influence on cell culture viability and metabolism.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR	6
2.1.1. Apoptose x necrose.....	10
2.1.2. Apoptose no cultivo de células animais.....	11
2.1.3. Métodos de detecção de morte celular	16
2.2. PROCESSOS DE CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS	22
2.2.1. Sistemas de cultivo.....	22
2.2.2. Modos de operação.....	25
2.3. DISPOSITIVOS DE RETENÇÃO CELULAR	29
2.3.1. Hidrociclones	40
3. OBJETIVOS	44
3.1. OBJETIVO GERAL	44
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES	45
4.1.1. Meio de cultivo suplementado com 5% v/v de soro.....	45
4.1.2. Meio de cultivo suplementado com 0,2 e 1% v/v de soro	45
4.1.3. Solução de tripsina-EDTA	45
4.1.4. Meio de congelamento	45
4.1.5. Solução de cristal violeta para coloração de núcleos.....	46
4.1.6. Solução de azul de trypan para coloração de células.....	46
4.2. LINHAGEM CELULAR	46
4.2.1. Criopreservação.....	46
4.2.2. Descongelamento	47
4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	47
4.3.1. Determinação da concentração celular.....	47
4.3.2. Determinação de células não viáveis por exclusão de azul de trypan.....	48
4.3.3. Dosagem da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante da cultura	48
4.3.4. Determinação da morte por apoptose e necrose.....	49
4.3.5. Determinação da distribuição de tamanho das células CHO.K1	49
4.3.6. Determinação da concentração de glicose e lactato.....	49
4.3.7. Citometria de fluxo.....	49
4.3.8. ELISA competitivo para dosagem de GM-CSF	50
4.4. CRESCIMENTO CELULAR	51
4.4.1. Propagação em monocamada.....	51
4.4.2. Propagação em suspensão.....	52

4.5. ADAPTAÇÃO AO CULTIVO EM SUSPENSÃO	52
4.6. ADAPTAÇÃO AO MEIO COM 1% DE SORO	53
4.7. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS COM HIDROCICLONES	53
4.7.1. <i>Testes em batelada</i>	54
4.7.2. <i>Testes em perfusão</i>	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. ADAPTAÇÃO AO CULTIVO EM SUSPENSÃO E EM BAIXOS NÍVEIS DE SORO	58
5.2. ESTUDO DE VARIÁVEIS GEOMÉTRICAS E OPERACIONAIS NA SEPARAÇÃO DE CÉLULAS CHO POR HIDROCICLONES	61
5.3. TESTE DA EFICIÊNCIA TOTAL DE SEPARAÇÃO	67
5.4. INFLUÊNCIA DA SEPARAÇÃO EM HIDROCICLONE SOBRE O CRESCIMENTO E MORTE CELULAR 67	
5.5. CULTIVO EM BIORRETORES EM PERFUSÃO	73
5.5.1. <i>Cultivo em biorreator de pequena escala</i>	73
5.5.2. <i>Biorreator de grande escala</i>	77
5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. INTRODUÇÃO

Biofármacos são proteínas de uso clínico/terapêutico, produzidos por processos biotecnológicos que se baseiam normalmente em sistemas de cultivo *in vitro*, porém também podem ser utilizados sistemas *in vivo* através do emprego de animais e plantas transgênicas (HOUDEBINE, 2002; VALDÉZ, 2003). O primeiro biofármaco aprovado para comercialização utilizando técnicas de DNA recombinante surgiu em 1982 (insulina humana), produzido em sistema de cultivo utilizando a bactéria *Escherichia coli*. No entanto, sistemas empregando microorganismos não são capazes de produzir proteínas complexas devido à ausência de mecanismos pós-traducionais de modificação e montagem da proteína (LUBINIECKI, 1998). Em 1986, o ativador do plasminogênio tecidual humano (tPA) tornou-se a primeira proteína terapêutica produzida por células animais recombinantes a obter aprovação para a sua comercialização. Atualmente, dentre todos os biofármacos recombinantes produzidos em larga escala, 70% são por células animais e inúmeros outros estão em fase de pesquisa. Assim como o tPA, essas proteínas são expressas em linhagens celulares contínuas, capazes de se dividir infinitas vezes (WURM, 2004).

A síntese e a montagem de uma proteína consistem de diferentes etapas que resultam em uma molécula formada majoritariamente por uma porção peptídica ou por várias subunidades peptídicas que se juntam para formar a proteína. Em glicoproteínas, durante a síntese da cadeia peptídica, ocorre a glicosilação no interior do retículo endoplasmático rugoso e do Golgi. Esta etapa consiste na adição de cadeias secundárias de oligossacarídeos. Esta segunda porção da proteína, de natureza glicídica, é de grande importância para a molécula, uma vez que o conjunto de carboidratos irá influenciar na carga da molécula, na sua conformação e, principalmente, na sua atividade biológica, estabilidade e antigenicidade. Uma vez que organismos procariotos não possuem compartimentos intracelulares, como o Golgi e o retículo endoplasmático, nem as enzimas responsáveis pela glicosilação, glicoproteínas heterólogas, expressas a partir de genes de mamíferos, são geralmente formadas com enovelamento incorreto, alta antigenicidade (o sistema imune produz uma resposta frente à proteína estranha e a neutraliza) e baixa ou nenhuma atividade biológica. Assim, a capacidade das células de mamíferos de executarem a glicosilação de forma compatível com as aplicações de uso em humanos criou um campo de especial interesse na indústria biotecnológica (FUSSENEGGER *et al.*, 1999).

Atualmente, existem inúmeras linhagens celulares, bem caracterizadas, armazenadas em bancos de células, que vêm sendo utilizadas em processos biotecnológicos para produção de proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e vacinas. No entanto, mesmo entre células animais, existem diferentes padrões de glicosilação (RAJU *et al.*, 2000) e a sua escolha deve seguir critérios que dependerão do biofármaco a ser produzido. Existem três principais linhagens celulares utilizadas atualmente na produção não somente de proteínas terapêuticas mas, também, de vacinas e de anticorpos utilizados no tratamento de doenças como o câncer e em ensaios diagnósticos (Tabela 1). A linhagem CHO (*chinese hamster ovary*) é utilizada com muita frequência para a produção de biofármacos, como a eritropoetina (EPO), tPA. Esta linhagem é considerada como o principal e mais bem caracterizado sistema de produção de proteínas recombinantes terapêuticas (LUBINIECKI, 1998; CHU e ROBINSON, 2001; ANDERSEN e KRUMMEN, 2002). Outra importante linhagem amplamente utilizada na produção de biofármacos é a BHK-21 (*baby hamster kidney*). Importantes fatores de coagulação humana sanguínea recombinantes são expressos em células desta linhagem (LUBINIECKI, 1998; CHU e ROBINSON, 2001). Esta linhagem também é empregada na expressão de partículas virais para a produção de vacinas veterinárias, como a vacina contra a febre aftosa e raiva (KALLEL *et al.*, 2003; KRETZMER, 2002), duas doenças de grande impacto econômico. As células derivadas de mielomas murinos SP2/0 e NS0, também conhecidas como hibridomas, são importantes sistemas utilizados na produção de imunobiológicos no tratamento de alguns tipos de linfomas e na profilaxia da rejeição de órgãos transplantados (CHU e ROBINSON, 2001).

A forma como as células são cultivadas é o principal fator, dentre muitos, que influencia a qualidade final do produto, uma vez que as condições de cultivo alteram o padrão de glicosilação das glicoproteínas (FUSSENEGGER *et al.*, 1999, RAJU *et al.*, 2000). Muito antes de se cogitar o uso de células animais para a produção de biofármacos, o maior avanço que possibilitou o cultivo em larga escala foi alcançado por Earle e Eagle, que analisaram exaustivamente as necessidades nutricionais de células *in vitro*. Em 1955, estes dois pesquisadores reportaram um meio quimicamente definido conhecido como MEM de Eagle (Meio Essencial Mínimo de Eagle), que substituiu os fluidos biológicos utilizados até então (EAGLE, 1955). Atualmente, existem inúmeros tipos diferentes de meios utilizados para diversas linhagens celulares

Tabela 1- Biofármacos produzidos por células animais (adaptado de CASTILHO e MEDRONHO, 2002; KRETZMER, 2002 e WALSH, 2003).

Produto	Proteína	Célula	Aplicação
Activase/Actylise	tPA	CHO	Isquemia aguda
Aranesp	EPO	CHO	Anemia
Avonex	β -Interferon	CHO	Esclerose múltipla
BeneFix	Fator IX	CHO	Hemofilia B
Cerezyme	Glucocerebrosidade	CHO	Doença de Gaucher
Daclizumab/Zenapax	AM/CD25	SP2/0	Profilaxia da rejeição de órgãos
Enbrel/Etanercept	TNFR/hIgG1 (proteína de fusão)	CHO	Artrite reumatóide
Epogen/Procrit	EPO	CHO	Anemia
Epogin/Recormon	EPO	CHO	Anemia
GenHevac B Pasteur	HBsAg	CHO	Hepatite B
Gonal-F	FSH	CHO	Infertilidade feminina
Granocyte	G-CSF	CHO	Neutropenia
HB Gamma	HBsAg	CHO	Hepatite B
Heloxate/NexGen	Fator VIII	BHK	Hemofilia A
Herceptin/Trastuzumab	AM/HER2	CHO	Câncer de mama metastático
Infliximab/Remicade	AM/TFN α	n.d.	Doença de Crohn
Kogenate	Fator VIII	BHK	Hemofilia A
Myoscint	AM/miosina	n.d.	Diagnóstico <i>in-vivo</i> por imagem do coração
Neorecormon	EPO	CHO	Anemia
Nespo	EPO	CHO	Anemia
Novo Seven	Fator VIIa	BHK	Hemofilia A e B
Ovitrelle/Ovidrelle	Coriogonadotropina α	CHO	Infertilidade feminina
Palivizumab/Synagis	AM/Proteína F do RSV	NS0	Profilaxia do vírus sincicial respiratório
Panorex	AM/Antígeno de superfície	n.d.	Câncer colorretal
Prosta Scint	AM/PSMA	n.d.	Câncer da próstata
Pulmozyme	DNase	CHO	Fibrose cística
Puregon	FSH	n.d.	Infertilidade feminina
Rebif	Interferon β	CHO	Esclerose múltipla
Recombinate	Fator VIII	CHO	Hemofilia A
Refacto	Fator anti-hemofílico	CHO	Hemofilia A
ReoPro	AM/Plaqueta IIb/IIIa	n.d.	Isquemia cardíaca
Rituxan	AM/CD20	CHO	Linfoma de células B
Simulect/Basiliximab	AM/IL2R α	Mieloma murino	Prevenção da rejeição de órgãos transplantados
Thyrogen	TSH	CHO	Deteção e tratamento de câncer da tireóide
TNKase/Tenecteplase	tPA	CHO	Infarto agudo do miocárdio
Verluma	AM/ Antígeno de superfície	n.d.	Câncer de pulmão
Wellferon	Interferon α -N1	Linfoblastoide humano	Hepatite C
Xigris	Proteína C ativa	Linhagem humana	Septicemia severa

n.d. (Informação não disponível); tPA (ativador do plasminogênio humano); EPO (eritropoetina); AM (anticorpo monoclonal); TNFR (receptor de fator de necrose tumoral); hIgG1 (imunoglobulina G1 humana); FSH (hormônio folículo estimulante); G-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos); HBsAg (antígeno de superfície do vírus da hepatite B); HER2 (receptor 2 de fator de crescimento epitelial humano); TFN α (fator de necrose tumoral alfa); PSMA (antígeno específico da membrana da próstata); TSH (hormônio tireóide estimulante).

e condições de cultivo. Além do conjunto de nutrientes disponíveis, outros fatores são significativos para o cultivo de células animais. A produção de metabólitos celulares, como amônia e lactato, pode exercer fortes efeitos inibitórios sobre a proliferação celular. O nível de tolerância a esses subprodutos do metabolismo é dependente do tipo de linhagem celular, tornando necessário um acompanhamento diferenciado dependendo da célula utilizada (LAO e TOTH, 1997). Fatores ambientais como pressão osmótica, pH e temperatura também devem ser controlados.

Em processos biotecnológicos é muito importante manter as células vivas e produtivas. Por isso, um preciso monitoramento e controle das condições da cultura devem ser realizados. O cultivo em escala comercial pode ser conduzido utilizando diferentes tecnologias: garrafas rotatórias, microcarregadores, suspensão e biorreatores de fibras ocas (Tabela 2). Entretanto, tratando-se de produtos que necessitam ser produzidos em grande quantidade, o cultivo em suspensão é, em geral o mais efetivo (LUBINIECKI, 1998). Esses sistemas apresentam concentração homogênea de células, nutrientes, metabólitos e produto, facilitando o monitoramento e controle da cultura (CASTILHO e MEDRONHO, 2002). Outro fator que deve ser levado em consideração é o modo de operação de processos de cultivo celular. Em sistemas em batelada e batelada alimentada, as células estão sujeitas a condições ambientais que variam ao longo do tempo, enquanto em processos contínuos (simples ou em perfusão), pode-se operar sob condições estáveis (estado estacionário). Isto tem conseqüências sobre a proliferação e morte celular, assim como sobre a produtividade do processo.

Tabela 2- Tecnologias utilizadas na produção de biofármacos (LUBINIECKI, 1998).

• Garrafas rotatórias	EPO, hGH, HBsAg
• Microcarregadores	Glucocerebrosidase
• Suspensão	tPA, FVIII, FIX, IFN- α , AMs
• Suspensão em perfusão	FVIII, AMs
• Fibra oca	AM para diagnóstico <i>in vivo</i>

hGH (hormônio do Crescimento Humano); FVIII (fator VIII); FIX (fator IX); IFN-a (interferon alfa).

Os processos de cultivo contínuo com reciclo celular, conhecidos como processos em perfusão, apresentam diversas vantagens sobre processos em batelada e batelada alimentada, devido à sua capacidade de fornecer altas concentrações celulares ($> 10^7$ células/mL), à possibilidade de operação em estado estacionário, ao melhor controle sobre a fisiologia celular e às altas produtividades obtidas. Entretanto, devido ao relativamente alto conteúdo de proteínas na maioria das culturas celulares, assim como ao reduzido tamanho e densidade e à elevada sensibilidade das células animais,

dificuldades relacionadas ao equipamento de retenção celular costumam limitar a duração dos processos em perfusão. Diferentes tipos de equipamentos têm sido utilizados para reter as células no interior de biorreatores operando em perfusão, principalmente aqueles baseados na separação por sedimentação gravitacional, em campo centrífugo (centrífugas) e por filtração (*spin-filters*, filtros de fluxo tangencial). No entanto, os mesmos apresentam inúmeras limitações, como colmatação do meio filtrante, entupimento dos dutos das centrífugas, tempo de residência prolongado em condições desfavoráveis, dificuldade de implementação em sistemas de grande escala e/ou alto custo (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

Nos últimos anos, vem sendo observado um aumento significativo no número de biofármacos recombinantes registrados e na demanda pelos mesmos. Isto vem levando à necessidade de aumento da capacidade produtiva (BUTLER, 2005). Este aumento pode ser obtido através da construção de novas e maiores plantas, o que demanda grandes investimentos, ou do aumento da produtividade dos processos, visando obter mais produtos em uma mesma escala de produção. O uso de hidrociclones como equipamento de retenção celular em processos produtivos operando em perfusão por longos períodos de tempo tornaria possível alcançar altas densidades celulares, aumentando-se, assim, a produtividade e reduzindo-se os custos. Hidrociclones são dispositivos extremamente simples, sem partes móveis e de grande estabilidade operacional, ideal para a aplicação nos processos biotecnológicos empregados na indústria biofarmacêutica.

O presente trabalho propõe estudar um hidrociclone, recentemente desenvolvido para a separação de células animais. Este dispositivo será avaliado quanto à sua capacidade de separar células com elevadas eficiências e quanto aos efeitos observados sobre a viabilidade celular sejam alcançadas. Como tensões cisalhantes, geralmente observadas em hidrociclones, e altas concentrações celulares *in vitro* são capazes de induzir fenômenos de morte celular (BORN *et al.*, 1992; BIERAU *et al.*, 1998; AL-RUBEAI e SINGH, 1998; CHISTI, 2001), a indução destes fenômenos, como a apoptose (morte celular programada) e necrose (lise celular) na cultura será analisada durante a operação com o hidrociclone. Serão determinadas, também, as condições que proporcionam uma maximização da eficiência de separação, aliada a uma minimização da morte celular, de modo a conjugar as condições necessárias para qualificar este equipamento como dispositivo adequado de separação para uso em processos contínuos de cultivo de células em perfusão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proliferação e morte celular

Células animais se reproduzem executando uma seqüência ordenada de eventos que visam duplicar o seu conteúdo e, em seguida, as células se dividem. Este ciclo de duplicação de material celular e divisão, conhecido como ciclo celular, é o mecanismo essencial segundo o qual todos os seres vivos eucariontes se reproduzem. A função básica essencial do ciclo é a correta duplicação de seu material genético (DNA – ácido desoxirribonucleico) contido nos seus cromossomos e, em seguida, a segregação precisa das cópias em duas células filha geneticamente idênticas.

O processo de duplicação define duas importantes fases do ciclo celular. Na fase S (Síntese), onde ocorre a duplicação do DNA. Em células de mamíferos, esta fase requer cerca de 10-12 horas e ocupa metade do ciclo celular. Após a fase S, a segregação dos cromossomos e a divisão celular ocorrem na fase M (Mitose), a qual requer menos de uma hora em uma célula de mamífero. A fase M envolve uma série de eventos, que se inicia com a divisão do núcleo ou mitose, onde as fitas de DNA duplicadas são condensadas em cromossomos mais compactos necessários para o fenômeno de segregação. O envelope nuclear se rompe e cada cópia cromossomal se liga aos microtúbulos do fuso mitótico (sistema de microfilamentos polimerizados que realiza o deslocamento das cópias dos cromossomos para as células filha). Os cromossomos são, então, alinhados e posicionados para, em seguida, serem separados pelo fuso mitótico e deslocados para lados opostos, onde irão recuperar a forma mais relaxada e formar dois novos núcleos. A etapa final deste processo, conhecida como citocinese, consiste na divisão completa em duas células pela separação do citoplasma. Esta sucessão de eventos descritos que ocorre na mitose é dividida em seis etapas: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese (Figura 1) (GRIFFITHS, 1984; ALBERTS *et al.*, 2002).

A divisão celular consiste, também, na duplicação da massa protéica e de suas organelas, o que leva um período de tempo maior para ser executado do que a replicação do DNA. Para que a célula possa crescer e duplicar o seu conteúdo com segurança, existem duas fases extras no ciclo celular: a fase G₁ (*Gap*), entre a fase M e a fase S, e a fase G₂, entre a fase S e a mitose. Desta forma, o ciclo celular é dividido em quatro fases seqüenciais: G₁, S, G₂ e M (Figura 2). A etapa do ciclo que consiste das

fases G_1 , S e G_2 é denominada de intérfase. Em uma célula humana proliferativa típica mantida em cultura, a intérfase pode durar 23 horas de um ciclo de 24 horas, necessitando somente de 1 hora para a fase M (GRIFFITHS *et al.*, 1984; ALBERTS *et al.*, 2002).

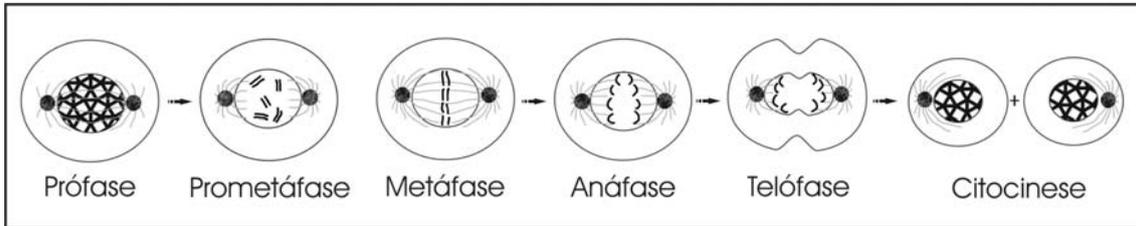


Figura 1- Os processos de divisão nuclear presentes na fase M duram menos de uma hora. Esta fase pode ser dividida em 6 etapas distintas, de acordo com o grau de progressão da divisão nuclear (prófase, prometáfase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese). Adaptado de Alberts et al. (2002).

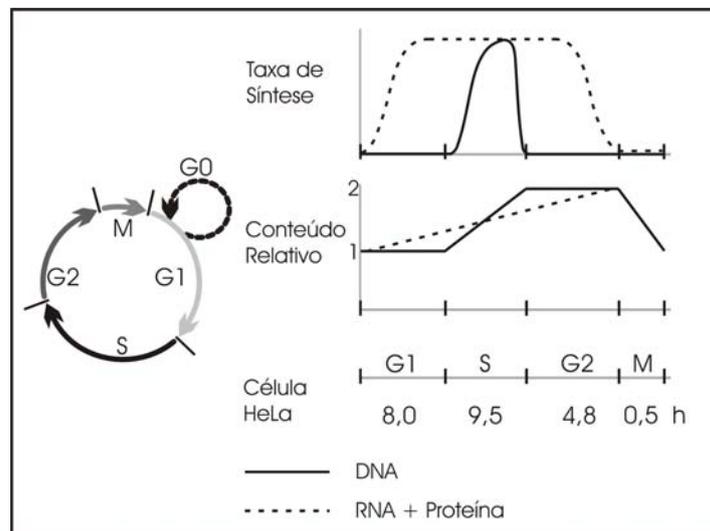


Figura 2- As fases do ciclo celular, correlacionadas com a síntese e concentração de macromoléculas na célula, assim como sua duração média no caso da linhagem tumoral HeLa (adaptado de Griffiths, 1984).

As duas fases G servem principalmente como intervalos para que a célula possa crescer, porém importantes fenômenos regulatórios ocorrem em G_1 e G_2 . Nestas fases, a célula monitora o ambiente intra e extracelular para se assegurar de que as condições são adequadas e de que ela está preparada para seguir para a próxima fase. A fase G_1 varia muito o seu tempo de duração dependendo das condições extracelulares e de sinais externos. Se as condições não são favoráveis ao seu desenvolvimento, a célula atrasa o seu progresso por G_1 entrando, até mesmo, em uma fase quiescente G_0 , onde pode permanecer por tempo indefinido antes de reassumir a sua proliferação. Se o ambiente extracelular for favorável e houver fatores de crescimento presentes, a célula em G_1 e G_0 progride até um ponto onde não há retorno, conhecido como ponto de restrição. Após a

transposição deste ponto, a célula está fadada a replicar o seu DNA mesmo que o ambiente passe a ser desfavorável para o seu desenvolvimento (GRIFFITHS *et al.*, 1984; ALBERTS *et al.*, 2002).

O controle do ciclo celular é efetuado por uma família de proteínas conhecidas como quinases ciclina-dependentes ou CDKs (*cyclin-dependent kinases*). A atividade dessas quinases varia conforme a célula progride no seu ciclo. As alterações na atividade dessas proteínas levam a mudanças cíclicas na fosforilação de proteínas intracelulares que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular (replicação do DNA, mitose e citocinese). Por sua vez, as mudanças cíclicas que ocorrem na atividade das CDKs são controladas por outras proteínas, as ciclinas. Assim como seu nome sugere, CDKs são dependentes das ciclinas para a sua devida atividade (a não ser que elas estejam ligadas a uma ciclina específica, as CDKs não apresentam atividade quinásica). Diferentemente dos níveis constantes das CDKs, as ciclinas apresentam ciclos de síntese e degradação que irão alterar o seu nível intracelular, que resultará no estabelecimento e ativação cíclicos dos complexos ciclina-CDKs. Esta ativação, por sua vez, aciona os eventos do ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2002).

Quando células de tecidos normais de mamíferos são cultivadas *in vitro* em condições normais, elas ocasionalmente param de se dividir após um determinado número de ciclos. Fibroblastos humanos, por exemplo, param de se dividir permanentemente após 25-30 ciclos, um processo denominado senescência celular replicativa. Este fenômeno é resultado de mudanças na estrutura dos telômeros (seqüências repetitivas de DNA associadas a proteínas nas extremidades dos cromossomos). Quando ocorre a divisão celular, as seqüências teloméricas não são replicadas da mesma forma que o restante do DNA. Essas seqüências são sintetizadas por enzimas denominadas de telomerasas, que são responsáveis, também, pela adição de proteínas que protegem as extremidades do cromossomo. Fibroblastos e muitas outras células somáticas humanas são deficientes de telomerase, logo seus telômeros encurtam à medida que os ciclos celulares são completados e suas proteínas protetoras são deterioradas. Com a extremidade exposta, os cromossomos estão sujeitos a danos que acabam retendo o ciclo celular em uma determinada fase ou induzindo mecanismos de morte celular (ALBERTS *et al.*, 2002). Células de roedores apresentam atividade da telomerase e isto, se aliado a outros fatores mutacionais, permite que as mesmas se proliferem indefinidamente *in vitro* sem apresentar senescência replicativa. Estes tipos de células são descritas como contínuas ou imortalizadas, podendo-se citar como

exemplos as linhagens CHO e BHK. Células humanas também podem ser cultivadas indefinidamente, como no caso de células tumorigênicas que são imortalizadas com a aquisição da capacidade de expressar a telomerase. Um exemplo é a linhagem HeLa, derivada de adeno-carcinoma do cérvix humano (DOYLE e GRIFFITHS, 1998).

Apesar do emprego de linhagens celulares imortalizadas ter permitido o estabelecimento de diferentes tecnologias de cultivo celular para a produção em larga escala de biofármacos, o crescimento dessas células pode acabar resultando em aspectos negativos, como no caso dos cultivos realizados em batelada. O cultivo é realizado com o objetivo de que cultura atinja uma elevada concentração de células. Entretanto, com o aumento da concentração celular, nutrientes essenciais se exaurem, resultando em condições nutricionais sub-ótimas, gerando o acúmulo de metabólitos tóxicos, resultando na morte celular e no término do processo de produção (FUSSENEGGER e BAILEY, 1999). Na maioria dos processos em que a fase produtora não está relacionada ao crescimento celular, a produtividade máxima é alcançada em um período onde a proliferação celular diminui, porém altas concentrações e viabilidades celulares são mantidas. Uma alternativa para levar em consideração este fato foi o desenvolvimento de condições de cultivo citoestáticas, nas quais as células são mantidas em condições viáveis, porém não proliferativas, de modo a prolongar a fase produtora e obter uma maior produtividade específica de proteínas heterólogas (SUZUKI e OLLIS, 1989 e 1990; FUSSENEGGER e BAILEY, 1999). Nestes trabalhos, os métodos utilizados para controlar a proliferação celular consistiam de aditivos químicos que paralisavam o ciclo celular, normalmente na fase G1, aumentando desta forma a produtividade específica. No entanto, efeitos indesejados, como citotoxicidade, foram observados paralelamente, resultando em queda da viabilidade celular e incapacidade de cultivos prolongados em estado não proliferativo (SUZUKI e OLLIS, 1990; AL-RUBEAI *et al.*, 1992). A privação de determinados nutrientes e fatores de crescimento também é capaz de paralisar a proliferação, porém, neste caso, são observadas uma queda na viabilidade celular e a ativação do mecanismo de morte celular programada, a apoptose (MERCILLE e MASSIE, 1994a e 1994b; SINGH *et al.*, 1994; FUSSENEGGER e BAILEY, 1999). Atualmente, tem-se desenvolvido um novo campo no controle bioquímico de culturas celulares, baseado na prevenção dos mecanismos de morte celular, impedindo-se a morte celular ao invés de inibir-se o crescimento celular, como forma de prolongar o período de produção da cultura. Isto pode ser alcançado expressando ou inibindo genes de proteínas que controlam e regulam os processos

apoptóticos (AL-RUBEAI *et al.*, 1998; FUSSENEGGER *et al.*, 1999; FUSSENEGGER e BAILEY, 1999).

2.1.1. Apoptose x necrose

O processo de morte celular pode ocorrer por dois caminhos, a necrose ou apoptose. A necrose é considerada como uma morte acidental, consistindo de um processo não fisiológico, no qual são observadas mudanças na morfologia e função mitocondrial e na habilidade da membrana plasmática de regular a pressão osmótica no interior da célula. Inicialmente, ocorre um aumento no volume citoplasmático por conta da entrada de líquido na célula, seguido pela ruptura da membrana e de organelas intracelulares permitindo, assim, o extravasamento de lisossomos e material citoplasmático, finalizando com a fragmentação aleatória do núcleo (AL-RUBEAI, 1998). Os danos à membrana envolvem, inicialmente, alterações no sistema de transporte iônico, seguidas de um aumento da permeabilidade e ruptura da membrana, gerando, na maioria dos casos, uma tumefação celular (BUJA *et al.*, 1993) (Figura 3).

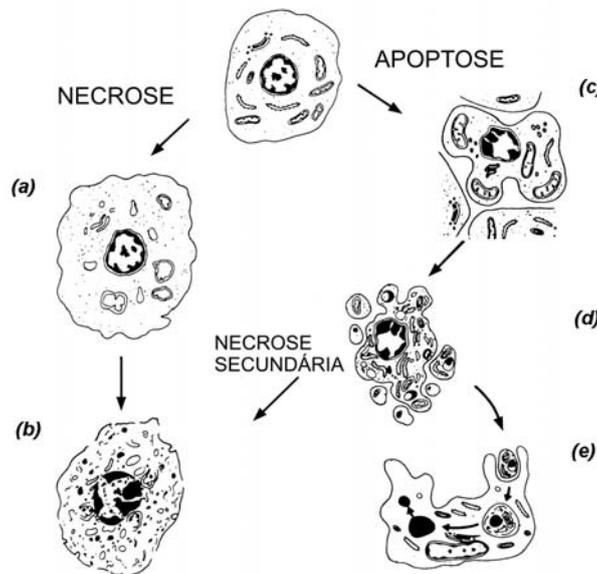


Figura 3- Sequência de transformações morfológicas durante a apoptose e necrose. Na necrose, há o entumescimento celular (a), seguido da lise e extravasamento do material intracelular (b). Na apoptose, é observada a condensação da cromatina próxima à parede nuclear (c), seguida da e formação de corpos apoptóticos (d) que, em um organismo (*in-vivo*), seriam fagocitados por células especializadas (e). Em condições de cultivo *in vitro*, ocorre o fenômeno de necrose secundária nos estágios finais da apoptose (IMM, 2005).

A apoptose, um mecanismo de morte programada da célula, é caracterizada por uma série de alterações morfológicas, que levam a um processo de autodestruição celular resultando no empacotamento do conteúdo celular em vesículas (corpos

apoptóticos) que, quando *in-vivo*, serão posteriormente fagocitados por células especializadas. A sucessão de acontecimentos se dá após um determinado estímulo que dispara uma cascata de sinalização intracelular ativando enzimas (caspases) que irão mediar as alterações morfológicas e fisiológicas da célula. Em geral, a apoptose se diferencia da necrose por não ocorrer extravasamento de material citoplasmático, por apresentar uma fragmentação do DNA controlada e uniforme, além de mudanças que ocorrem na cromatina. No entanto, em cultura *in-vitro*, o processo apoptótico acaba migrando para o que pode ser chamado de necrose secundária, onde, devido à ausência de células fagocíticas profissionais, a célula apoptótica e os corpos apoptóticos acabam extravasando o seu conteúdo, tal como ocorre na necrose (Figura 3) (AL-RUBEAI, 1998).

2.1.2. Apoptose no cultivo de células animais

Durante o cultivo *in-vitro* de linhagens de células animais, qualquer alteração nas condições ambientais ótimas do meio de cultivo resulta rapidamente em perda de viabilidade. Este fenômeno é mais frequente em linhagens que exibem uma alta susceptibilidade à apoptose (SINGH e AL-RUBEAI, 1998). Qualquer agente ou condição que altere o metabolismo celular é capaz de ativar o processo de morte celular programada. Células mantidas sob altos níveis de estresse morrem normalmente por necrose, em grande parte porque não há tempo de se processar uma resposta ao estímulo, ocorrendo a morte instantânea (altos níveis de toxinas, grandes alterações do pH e altas taxas de agitação). Em níveis intermediários de estresse, a célula pode ser danificada mas não morrer, tendo tempo de ativar seus mecanismos de morte programada. Morrendo de forma controlada, por apoptose, a célula é capaz de controlar o seu fim. Em níveis baixos de estresse ambiental, as células podem produzir proteínas de choque térmico (HSP – *heat shock proteins*) que permitem a sua sobrevivência até que o estímulo termine ou seja eliminado. Entretanto, uma vez que o limiar de resistência é ultrapassado e a sobrevivência se torna impossível, a célula acaba ativando as vias apoptóticas (COTTER e AL-RUBEAI, 1995).

Células em cultura estão constantemente expostas a mudanças nas condições ambientais. Existe um grande número de fatores que influenciam a qualidade de uma cultura celular, incluindo um fornecimento adequado de nutrientes, pH, tensões cisalhantes, acúmulo de metabólitos e disponibilidade de oxigênio. Estudos já

mostraram que diversas alterações nas condições de cultivo, como a falta de nutrientes, aumento da pressão osmótica, manutenção da cultura em suspensão, presença de soro fetal bovino, entre outras, podem induzir ou inibir os mecanismos apoptóticos (SINGH *et al.*, 1994; MEREDITH e SHWARTZ, 1997; ZANGHI *et al.*, 1999; KIM e LEE, 2002).

Outro fator que deve ser levado em consideração é o modo de operação do processo. Sistemas em batelada, batelada alimentada, contínuo e em perfusão apresentam diferentes padrões de progressão da cultura. Desta forma, as células estarão submetidas a diferentes condições ambientais de acordo com o tempo decorrido e apresentarão diferentes padrões de proliferação e morte, de acordo com o processo pelo qual são cultivadas.

2.1.2.1. Limitação de nutrientes e fatores de crescimento

As células sobrevivem e proliferam mediante a adição de quantidades adequadas de nutrientes e fatores de crescimento. O ambiente extracelular deve prover as células com esses requerimentos essenciais para a sua sobrevivência e, quando essas necessidades deixam de ser supridas, as células acabam morrendo. O suprimento de fatores de crescimento e nutrientes é considerado como o fator mais significativo que influencia a atividade biológica das células. A falta ou o seu esgotamento devido ao consumo desses fatores pode levar não somente ao bloqueio da proliferação, mas também à morte por apoptose.

Nas células, o controle da proliferação e da apoptose é realizado por um mecanismo integrado de sinais que ativam ou previnem um desses processos mas que, também, influenciam outros aspectos da atividade celular. Por exemplo, a presença de mitógenos que induzem a proliferação e fatores de sobrevivência que inibem a apoptose são necessários para a manutenção da viabilidade celular (AL-RUBEAI, 1998). É importante, porém, distinguir entre mitógenos e fatores de sobrevivência. O fator de crescimento IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) é um potente fator de sobrevivência, porém um fraco mitógeno. Inúmeras citocinas são bons fatores mitogênicos, mas fatores de sobrevivência fracos (não inibem a apoptose, mas promovem a divisão celular). Desta forma, torna-se possível desacoplar os efeitos de indução do crescimento e de inibição da apoptose. O fator M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) em baixas concentrações promove a sobrevivência celular, mas somente em altas concentrações promove a proliferação. Desta forma, o correto balanço dos fatores de crescimento e

sobrevivência é provavelmente uma importante consideração na manutenção da alta viabilidade em culturas de células (COTTER e AL-RUBEAI, 1995).

O soro animal, principalmente o proveniente de feto bovino, exerce papel importante no crescimento e sobrevivência de células de mamíferos. O soro contém fatores de crescimento, proteínas, lipídios e outros nutrientes para as células. A remoção do soro foi associada à indução da apoptose em muitas linhagens celulares, como hibridomas e CHO (ZANGHI *et al.*, 1999) e plasmocitomas (SINGH *et al.*, 1994). Na linhagem CHO, a indução da apoptose se deve provavelmente à exaustão de nutrientes devido ao seu consumo acelerado em condições de ausência de soro. Por outro lado, quando soro ou plasma está presente em concentrações muito altas, a morte por apoptose também é induzida, porém este fenômeno pode ser prevenido, adicionando-se componentes tiol, como L-cisteína e L-triptofano (AL-RUBEAI, 1998). O mecanismo através do qual a remoção de fatores de crescimento induz a apoptose parece envolver a expressão do protooncogene *c-myc*. Fibroblastos que expressam *c-myc* crescem em meio suplementado com soro mas sofrem apoptose se o soro for removido. Foi observado, também, que quando crescidas em meio sem fatores de crescimento e com diminuição da expressão do gene *c-myc*, são aprisionadas na fase G₀. Isso sugere que o gene *c-myc* pode ativar um programa de regulação que leva tanto à proliferação quanto à apoptose (AL-RUBEAI, 1998).

Quando as células são privadas de fontes de energia como glutamina e glicose, a apoptose pode ser induzida. A influência da glutamina é melhor observada em linhagens hematopoiéticas (hibridomas e plasmacitomas), induzindo a apoptose quando esse componente é eliminado do meio de cultura (SINGH *et al.*, 1994 e MARCILLE e MASSIE, 1994a). SANFELIU e STEPHANOPOULOS (1999) demonstraram que a falta de glutamina é o principal ativador da morte por apoptose em uma linhagem de CHO expressando interferon- γ , sendo que este fenômeno podia ser atenuado com a super-expressão do gene *bcl-2* (gene anti-apoptótico que participa da via de sinalização em resposta a estímulos apoptóticos). A função desses componentes nas vias apoptóticas ainda não é conhecida por completo, mas tanto os níveis de glutamina quanto de glicose regulam o crescimento celular e as vias catabólicas, sendo que a ausência desses componentes pode impedir a síntese de DNA e manter a cultura na fase G₁, induzindo a apoptose. No entanto, isto não explica por que células nas fases S, G₂ e M também sofrem apoptose. Sugere-se que a apoptose pode ser induzida quando a energia necessária para a síntese do ATP utilizado na biossíntese do material celular é

reduzida a níveis críticos, resultando na ativação de proteínas reguladoras que promovem a apoptose (AL-RUBEAI, 1998).

A ligação entre a indução da apoptose e o esgotamento da glutamina durante culturas em batelada de hibridomas levou a estudos mostrando que a apoptose é induzida na escassez de qualquer fator, não somente dos essenciais. A falta de qualquer aminoácido pode induzir o fenômeno (SIMPSON *et al.*, 1998), prevenindo a síntese de moléculas envolvidas na regulação da morte. No entanto, este fenômeno é mais fortemente observado para os aminoácidos essenciais. Existem duas prováveis explicações para que isso ocorra. Segundo uma delas, a redução da concentração intracelular de aminoácidos pode levar à exaustão de moléculas de RNA transportador, resultando no colapso da tradução (síntese protéica). Segundo a outra, a transcrição e a tradução podem ser comprometidas pela queda nos níveis intracelulares de ATP. No entanto, não são todos os aminoácidos que contribuem para o requerimento energético da célula, mas a ausência de qualquer aminoácido resulta na indução da apoptose. Experimentos com hepatócitos de ratos mostram que a síntese de proteínas é inibida ao nível da iniciação da cadeia peptídica, levando a crer que a função de precursores protéicos seria o fator mais significativo da falta de aminoácidos para a morte por apoptose na cultura (SINGH e AL-RUBEAI, 1998).

2.1.2.2. *Nível de oxigênio dissolvido*

O aparente envolvimento de radicais livres nos processos apoptóticos despertou o interesse de vários grupos de pesquisa. Radicais livres são altamente reativos, podendo interagir com DNA e proteínas, alterando as funções celulares. A formação de radicais livres ocorre em todas as células, como consequência do metabolismo celular. O peróxido de hidrogênio foi demonstrado como um fator de indução da apoptose, enquanto antioxidantes como catalase e superóxido dismutase protegem as células. Anteriormente, acreditava-se que a proteína *bcl-2* atuava como um antioxidante (Tilly e Tilly, 1995), porém sabe-se hoje que condições anóxicas podem induzir a apoptose (MERCILLE e MASSIE, 1994a) e que a superexpressão de *bcl-2* atua como fator anti-apoptótico também em condições limitantes de oxigênio. Os efeitos de proteção do *bcl-2* em condições anóxicas já foram demonstrados para duas linhagens celulares industrialmente importantes. Em uma linhagem derivada do linfoma de Burkitt transfectada com o gene *bcl-2*, a resistência a condições anóxicas aumentou, sendo possível observar a manutenção da viabilidade celular por um período maior do que as

células controle (SINGH *et al.*, 1997). No hibridoma TB/C3, a super-expressão deste gene também conferiu à cultura uma maior viabilidade e integridade quando exposta a condições anóxicas (SIMPSON *et al.*, 1997).

2.1.2.3. *Susceptibilidade a tensões hidrodinâmicas*

Células animais não possuem parede celular e são, portanto, altamente suscetíveis aos efeitos de tensões cisalhantes. As células respondem ao estresse hidrodinâmico em questão de minutos, alterando o seu metabolismo e a expressão de genes (NOLLERT *et al.*, 1991). Em níveis subletais de tensões cisalhantes, ocorre inicialmente um aumento no transporte passivo transmembranar junto com danos em receptores de superfície. A membrana plasmática é geralmente o principal sítio de danos causados pelas tensões cisalhantes, perdendo a sua capacidade de mediar o transporte de íons e moléculas, de modo que a célula deixa de ser capaz de se manter viável (AL-RUBEAI *et al.*, 1995a). Foi demonstrado que a susceptibilidade de algumas linhagens celulares aos efeitos das tensões hidrodinâmicas está relacionada ao tamanho celular e ao ciclo celular, sendo células na fase S e G₂ mais facilmente destruídas, enquanto células de menor tamanho seriam mais resistentes. Foi observado, também, que essa destruição era dependente da intensidade das tensões cisalhantes e do tempo de exposição às mesmas. A observação morfológica das células levou a crer que a apoptose respondia por grande parte da morte celular (AL-RUBEAI *et al.*, 1995a e 1995b).

O ambiente hidrodinâmico de um biorreator do tipo tanque agitado pode ser altamente estressante para células animais. Este fato provém da alta energia introduzida para manter as células em suspensão e a homogeneidade do sistema. Além disso, o borbulhamento de gás resulta em danos às células devido a interações com as bolhas, principalmente na região da interface do meio líquido com a camada superior gasosa no topo do biorreator. Enquanto o conhecimento dos efeitos das condições hidrodinâmicas levou ao aperfeiçoamento dos reatores e estratégias de operação, de modo a reduzir o estresse hidrodinâmico, um compromisso ainda existe entre a necessidade de prover bons níveis de mistura e aeração e a susceptibilidade das células às tensões cisalhantes. Certamente, se tal situação resulta na indução da apoptose, a supressão deste mecanismo de morte celular permitiria a operação do reator a níveis maiores de agitação e borbulhamento, permitindo uma melhor aeração e transferência de massa com um menor impacto na viabilidade celular (SINGH e AL-RUBEAI, 1998).

A exposição de culturas de hibridomas a altos níveis de agitação resultou em uma elevação da taxa de morte celular por apoptose e em perda da viabilidade celular (AL-RUBEAI *et al.*, 1994). No entanto, níveis extremos de tensões cisalhantes podem resultar na completa fragmentação da célula. Em contraste, é relatado que baixos níveis de tensão cisalhante suprimem a resposta apoptótica. A indução da apoptose em células endoteliais na presença do indutor apoptótico TNF- α (*Fator de necrose tumoral- α*) ou mediante a retirada de fatores de crescimento pode ser evitada através de baixos níveis de tensões cisalhantes (45 dyn/cm²). Se este fato for observado durante o cultivo de linhagens de células animais de importância industrial, será possível identificar um nível ótimo de tensão que forneça tanto condições de transferência de massa ótimas como um método prático de inibir a apoptose (SINGH e AL-RUBEAI, 1998).

2.1.2.4. Osmolaridade

A osmolaridade do meio de cultura exerce grande influência sobre o cultivo de células animais. Entre outros métodos, a utilização de condições hiperosmóticas por intermédio de sais, CO₂ e meios concentrados é uma opção de baixo custo que se pode lançar mão para aumentar a produtividade celular. Culturas de hibridomas, por exemplo, têm a sua produtividade melhorada com o aumento da osmolaridade (OH *et al.*, 1993). No entanto, este método não é comum devido ao conhecido efeito negativo que há sobre o crescimento celular. A queda no crescimento celular em condições hiperosmóticas é, provavelmente, devido à morte por apoptose, como pode ser notado em diversas linhagens celulares (KIM *et al.*, 2002). Assim, a super-expressão de genes anti-apoptóticos (*bcl-2*) aliada a condições hiperosmóticas é uma estratégia interessante para limitar os níveis de morte celular e aumentar a produtividade da cultura (KIM *et al.*, 2002).

2.1.3. Métodos de detecção de morte celular

Atualmente, muitos métodos estão disponíveis para a determinação da morte por apoptose em cultura de células e tecidos. Esses métodos baseiam-se essencialmente nas mudanças que ocorrem nas células apoptóticas. Durante a apoptose ocorre a fragmentação do DNA, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, acidificação do citoplasma, liberação de citocromo C da mitocôndria, exposição de fosfolipídios intracelulares, ativação e quebra de proteínas, entre outros fenômenos.

Esses fenômenos apoptóticos podem ser detectados por métodos diretos ou indiretos, analisando populações celulares como um todo ou individualmente, que sejam representativas de uma população.

Dentre as principais características abordadas nos métodos, estão:

- Fragmentação do DNA
- Mudanças morfológicas
- Alterações na assimetria de membrana
- Ativação de proteínas apoptóticas
- Liberação de citocromo C no citoplasma

2.1.3.1. Fragmentação do DNA

Durante o processo controlado de morte celular *in vivo*, o DNA é inicialmente clivado em fragmentos de 300 a 500 kb, posteriormente, esses fragmentos são reduzidos a 180-200 pares de bases (BROWN *et al.*, 1993). Este fenômeno ocorre simultaneamente com manifestações de mudanças morfológicas, como a condensação da cromatina. Os fragmentos são então denominados de fragmentos de baixa massa molar (LMW-DNA, *Low Molecular Weight DNA*), que são capazes de passar pelos poros do núcleo e alcançar o citoplasma, e fragmentos de alta massa molar (HMW-DNA, *High Molecular Weight DNA*), que permanecem no núcleo. A principal enzima envolvida nesse processo é uma DNase ativada por caspase (CAD – *Caspase Activated DNase*) (NAGATA, 2000). A fragmentação do DNA se dá justamente nos segmentos da dupla fita entre as histonas, chamados de seqüências ligantes, resultando nos fragmentos de baixa massa molar (AL-RUBEAI, 1998).

Eletroforese em gel de agarose (padrão em escada)

Os fragmentos de DNA podem ser visualizados em ensaios eletroforéticos em gel de agarose com um padrão de bandas característico, como uma escada, onde o tamanho das bandas é aproximadamente de múltiplos dos menores fragmentos nucleossomais. Em contraste à apoptose, os fragmentos de DNA gerados durante a necrose são de tamanhos irregulares, resultando em um borrão na faixa de corrida da amostra. Apesar do padrão em gel de eletroforese ser considerado uma indicação bioquímica da apoptose, em alguns casos, as características morfológicas clássicas da apoptose podem se manifestar sem a fragmentação do DNA (AL-RUBEAI, 1998; NAGATA, 2000).

TUNEL (*Terminal deoxynucleotidil transferase x-dUTP Nick End Labeling*)

Neste tipo de teste, os fragmentos de DNA são detectados lançando-se mão de uma marcação, onde uma enzima incorpora nucleotídeos modificados à extremidade 3'-OH dos fragmentos de DNA, que são especificamente visualizados ou detectados. A enzima, deoxinucleotidil transferase, é responsável pela polimerização da extremidade 3'-OH sem a necessidade de uma fita complementar. Durante a polimerização, os nucleotídeos são adicionados à fita de DNA. Dentre os nucleotídeos, existe um especialmente marcado (x-dUTP) com um fluorocromo, enzima ou antígeno. Desta forma, diferentes tipos de leitura da amostra podem ser realizados.

Quando o deoxinucleotídeo está associado a um fluorocromo, a leitura pode ser feita em um microscópio de fluorescência, onde as células apoptóticas apresentam uma intensa fluorescência no núcleo e, em estágios avançados, pode ser visualizada a fragmentação do núcleo. A leitura pode ser quantificada com o auxílio de um hemocitômetro no caso da observação ao microscópio óptico ou por citometria de fluxo (TINTO *et al.*, 2001). Deoxinucleotídeos marcados com peroxidase podem ser quantificados em testes cromogênicos que utilizam o substrato da enzima. Métodos indiretos utilizam antígenos conjugados ao nucleotídeo que são posteriormente reconhecidos por anticorpos complexados a um marcador, porém são técnicas menos sensíveis e utilizadas na observação de cortes histológicos previamente fixados. No teste TUNEL, há a necessidade de permeabilizar a célula, de forma que seja possível introduzir a enzima e os deoxinucleotídeos, porém essa permeabilização é feita após uma branda fixação da célula (formaldeído) para que não haja perda dos fragmentos LMW-DNA. A permeabilização é realizada incubando a amostra em gelo e, em seguida, é feita a marcação com a solução reacional.

Iodeto de propídio, brometo de etídio e DAPI

Nestes métodos, são utilizados marcadores que são incorporados ao DNA, tornando-se altamente fluorescentes. Para que ocorra a inclusão dos marcadores na célula é necessário que seja feita a sua permeabilização, criando poros na membrana, por exemplo através do tratamento com etanol 70% a -20° C. Devido a essa mesma permeabilização e à falta de uma fixação prévia, os fragmentos LMW-DNA são extravasados, reduzindo a quantidade de DNA no interior da célula. Esta diminuição no conteúdo de ácido nucléico é detectada pela menor fluorescência nas células apoptóticas por métodos de citometria de fluxo (CALLE *et al.*, 2001). Ao microscópio de fluorescência, é possível observar as alterações nucleares, como a condensação da

cromatina. Durante o processamento, a amostra deve ser incubada com RNase para se evitar interferência devido à ligação do marcador com fitas de RNA.

2.1.3.2. *Mudanças morfológicas*

Esta classe de métodos de detecção baseia-se na observação microscópica da morfologia celular. A detecção da condensação da cromatina é o principal evento analisado nesta metodologia, podendo ser empregados marcadores que diferenciam os estágios dos processos apoptóticos.

Laranja de acridina, iodeto de propídio/brometo de etídio

As células em processos apoptóticos podem ser discriminadas de células necróticas e células normais por métodos fluorescentes, utilizando corantes que se complexam ao DNA (laranja de acridina, brometo de etídio e iodeto de propídio) (MERCILLE e MASSIE, 1994b). A análise por microscopia de fluorescência revela claramente a condensação e fragmentação da cromatina associada com a apoptose. Combinando a marcação da cromatina em células com a membrana intacta (laranja de acridina) e em células com a membrana danificada (iodeto de propídio ou brometo de etídio), é possível identificar claramente 4 diferentes níveis de viabilidade celular (TEY *et al.*, 2000; MERCILLE e MASSIE, 1994a).

O laranja de acridina (LA) é capaz de penetrar no interior da célula independente da integridade da membrana citoplasmática, intercalando as bases das fitas duplas de DNA, quando emite comprimento de onda na faixa do verde. Ele também se liga a RNA e DNA de fita simples, mas como não é capaz de intercalar as bases, o fluorocromo emite comprimento de onda na faixa do vermelho. Desta forma, uma célula viável apresentará o núcleo verde, e, possivelmente, seu citoplasma com pontos vermelho-alaranjado.

O brometo de etídio (BE) não é capaz de permear através da membrana plasmática, penetrando, desta forma, somente em células que apresentem comprometimento da membrana plasmática (células não viáveis que perderam a permeabilidade seletiva da membrana). O BE é capaz de se intercalar com as bases das fitas duplas de DNA, resultando em uma fluorescência laranja. O BE também se liga fracamente a RNA, emitindo fluorescência vermelha. Desta forma, células não viáveis apresentam uma cromatina fortemente alaranjada (a coloração do BE encobre a do LA) e, se ainda restar conteúdo citoplasmático, citoplasma vermelho escuro.

As morfologias observadas em uma amostra incubada com uma diluição de laranja de acridina/brometo de etídio permitem, portanto, a identificação de quatro níveis de viabilidade celular:

- 1) Em células viáveis (VNA – viáveis não-apoptóticas), a marcação do núcleo se dá em verde sem o aspecto de condensação da cromatina, obtendo-se uma fluorescência uniforme do núcleo. Nesta população, somente o marcador laranja de acridina é capaz de penetrar na célula e se incorporar ao DNA.
- 2) Células apoptóticas recentes (VA – viáveis apoptóticas) são coradas em verde e com grânulos corados em verde brilhante na região nuclear. Estes grânulos correspondem à cromatina condensada e fragmentada. A condensação e fragmentação da cromatina indicam que a célula já entrou em apoptose, mas ainda mantém a integridade de sua membrana. Nesta fase, é observada a formação de corpos apoptóticos, que são corpúsculos celulares contendo material celular que são eliminados pela célula.
- 3) Células apoptóticas tardias (NVA – não viáveis apoptóticas) são coradas em vermelho alaranjado, com os grânulos na parte nuclear corados em laranja brilhante. Esta coloração dos grânulos indica que as células começaram a perder a integridade de sua membrana e estão se tornando permeáveis ao brometo de etídio. Outra característica dessa fase é a redução do tamanho celular, devido à perda de material celular por meio da eliminação dos corpos apoptóticos.
- 4) Células necróticas (NEC – necróticas), são coradas totalmente em laranja, indicando perda da integridade da membrana. As características que diferenciam estas células das anteriores é que células necróticas não apresentam núcleo fragmentado nem condensado e não têm seu tamanho reduzido, ao contrário, há uma tendência de aumento de volume. Não há formação de corpos apoptóticos na superfície da célula. Este estágio é muito curto, ocorrendo rapidamente a lise da célula.

2.1.3.3. Assimetria de membrana

A translocação de fosfatidilserina do folheto interno da membrana citoplasmática para o folheto externo é um evento inicial do processo de apoptose e

serve, possivelmente, como um sinal para a fagocitose dos corpos apoptóticos por células do sistema fagocitário (MARTIN *et al.*, 1995). A exposição deste fosfolípídeo tem sido amplamente utilizada como marcador específico de apoptose.

A mudança na assimetria da membrana plasmática pode ser detectada por citometria de fluxo utilizando um marcador conjugado à anexina V, uma proteína encontrada na natureza que possui alta afinidade pela fosfatidilserina. Isso é alcançado, conjugando-se anexina V com fluoresceína (FITC) ou outro fluorocromo, que fluoresce quando excitado com um determinado comprimento de onda (488 nm para a fluoresceína). Esta técnica também pode ser quantitativa por microscopia de fluorescência com o auxílio de um hemocitômetro.

Infelizmente, a anexina V também se liga aos resíduos de fosfatidilserina no folheto interno da membrana plasmática de células necróticas devido à perda da integridade da membrana plasmática, permitindo a entrada da proteína na célula. No entanto, utilizando iodeto de propídio como um contra-marcador para distinguir células necróticas, é possível utilizar a anexina V para diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas (PLÄSIER *et al.*, 1999).

2.1.3.4. *Proteínas apoptóticas e relacionadas*

Existe um grande número de genes relacionados à apoptose, e as proteínas codificadas por esses genes modulam o processo de morte celular. Testes que detectam essas proteínas ou as suas atividades são amplamente utilizados para detectar a apoptose em cultura de células. A família de proteínas apoptóticas é muito extensa e teoricamente qualquer proteína chave das vias apoptóticas, como a p53 e as caspases 3 e 7, pode ser utilizada para a caracterização do processo (KIM *et al.*, 2002; ARDEN *et al.*, 2004).

2.1.3.5. *Liberação de citocromo C*

As alterações a nível de membrana mitocondrial podem preceder as ocorridas no núcleo, envolvendo tanto a membrana interna quanto a externa, levando a uma dissipação do potencial transmembranar e/ou liberação de proteínas intermembrana através da membrana externa. O principal grupo de proteínas responsáveis pelas alterações mitocondriais consiste das proteínas Bax, que formam poros na sua membrana externa, liberando citocromo C para o citoplasma celular (LOEFFLER e KROEMER, 2000, ARDEN *et al.*, 2004). A técnica de *Western blot* é capaz de identificar especificamente a presença de citocromo C no citoplasma de células

apoptóticas. Para isso, há a necessidade de processos complexos de purificação que exigem muito tempo e trabalho por parte do pesquisador, podendo ainda resultar em resultados duvidosos devido à contaminação do citoplasma por mitocôndrias que não conseguiram ser devidamente separadas (ARDEN *et al.*, 2004).

2.2. Processos de cultivo de células animais

Existe um grande número de sistemas que permite o cultivo industrial de células animais. A escolha de um sistema depende das características da célula empregada e do produto a ser expresso. Os fatores limitantes da maioria dos sistemas de cultivo celular são oxigenação, homogeneização, superfície de crescimento (no caso de células aderentes), disponibilidade de nutrientes e presença de metabólitos tóxicos. Em geral, os processos de cultivo celular podem ser divididos em dois grupos, de acordo com o tipo de célula utilizado (células aderentes ou em suspensão). Células animais são, na sua maioria, naturalmente aderentes, tendo em vista a sua procedência tecidual. Com exceção das células de origem sanguínea (hibridomas e mielomas), linhagens como a CHO dependem do contato com uma superfície sólida para a sua proliferação. No entanto, algumas células são passíveis de adaptação ao crescimento em suspensão, independente da adesão a alguma superfície sólida (TOKASHIKI e YOKOYAMA, 1997).

A adesão e o espraçamento de células aderentes sobre uma superfície apropriada são resultados de forças físicas e de adesão exercidas por moléculas presentes na membrana celular. O meio de cultura exerce forte influência no fenômeno de adesão, sendo o pH e a força iônica do meio importantes fatores de aderência celular. Os materiais normalmente utilizados para adesão celular podem ser divididos em três categorias: minerais (vidro de boro silicato), metálicos (titânio, alumínio) e materiais orgânicos (PVC, poliestireno, acetato de celulose e outros) (KOLLER e PAPOUTSAKIS, 1995).

2.2.1. Sistemas de cultivo

Em sistemas de cultivo de células aderentes, estas aderem a uma superfície, se espalham (espraçam) e proliferam. A proliferação ocorre na forma de camada, onde as células crescem sobre a superfície até formarem uma monocamada celular. Neste ponto

diz-se que a cultura alcançou a confluência. Culturas primárias, obtidas a partir de tecidos, possuem um sistema de proliferação que é inibido pelo contato intercelular. Desta forma, a cultura cessa a sua proliferação ao se formar a monocamada celular. No entanto, células transformadas ou imortalizadas perdem este sistema de controle proliferativo, podendo formar multicamadas de células. No entanto, é possível crescer culturas primárias além do ponto de inibição por contato. Utilizando regimes de troca de meio, suplementos (tais como soro), aminoácidos, glicose, fosfatases, fatores de crescimento, hormônios, entre outros, é possível estabelecer cultivos, nos quais a densidade celular ultrapassa a monocamada (PANINA, 1984).

Os tipos mais comuns de sistemas para o cultivo de células aderentes são os frascos T ou garrafas Roux. A superfície de cultivo deste tipo de frasco é plana e varia de 25 a 300 cm², adotando-se uma relação superfície/meio de cultivo de aproximadamente 2000 cm²/L. A camada de células é mantida imersa no meio de cultura durante todo o período de incubação, podendo alcançar concentrações da ordem de 5 x 10⁵ células/cm². Este tipo de frasco é utilizado normalmente em pequena escala e em laboratórios de pesquisa, sendo incubadas em estufas com umidade e concentração de CO₂ controlados (PANINA, 1984; WU *et al.*, 2002). Variações deste modelo consistem de sistemas multiplacas, onde os frascos são modificados para acomodarem discos ou placas que aumentam a superfície de crescimento disponível por volume de equipamento. No entanto, são dispositivos de manutenção laboriosa.

Por outro lado, sistemas de cultivo baseados em garrafas rotatórias permitem aumentar a relação superfície/volume para a faixa de 6000-6200 cm²/L. As células se propagam em toda a superfície (cerca de 850 cm²) de uma garrafa cilíndrica que contém um pequeno volume de meio e que gira continuamente em torno do seu eixo longitudinal. Ao invés da monocamada estar constantemente coberta pelo meio de cultivo, este cobre somente uma parte da superfície interna da garrafa e, conforme a garrafa gira em torno do seu eixo, o meio entra em contato com toda a superfície, diminuindo a necessidade de meio e aumentando a concentração do produto. A concentração celular alcançada neste sistema é maior do que em frascos T, chegando a cerca de 8 x 10⁵ células/cm². Este fenômeno é explicado pela melhor transferência de nutrientes e oxigênio do meio para as células, e de metabólitos da proximidade das células para o meio. As garrafas rotatórias podem apresentar parede corrugada, de modo a aumentar a razão área/volume do sistema (PANINA, 1984; WU *et al.*, 2002). Entretanto, tanto sistema de frascos T quanto sistemas de garrafas rotatórias são de

difícil monitoramento e controle, fatores essenciais para a qualidade do produto. Além disso, a utilização destes sistemas em grande escala requer o uso de muitas garrafas e módulos de rotação, tornando-se excessivamente trabalhoso, intensivo em mão de obra e susceptível a contaminações (PANINA, 1984).

Microcarregadores são esferas de 100 a 500 μm com densidades entre 1,00 e 1,06 g/mL, que podem ser não porosas, microporosas ou macroporosas. A composição de sua superfície permite a adesão celular devido ao uso de materiais orgânicos, como dextrana, poliestireno, colágeno, gelatina e celulose, e de minerais como o vidro (KADOURI, 1994). Neste sistema de cultivo, as células crescem aderidas a micropartículas, podendo ser cultivadas em biorreatores de leito fluidizado, leito fixo ou do tipo tanque agitado (DOYLE e GRIFFITHS, 1998). A tecnologia de microcarregadores é amplamente utilizada em escala industrial devido às suas vantagens sobre os sistemas clássicos de cultivo de células aderentes, como maior razão entre superfície de crescimento e volume do equipamento, melhor monitoramento das condições de cultivo e maior densidade celular atingida (KALLEL, 2002). Por exemplo, um grama do microcarregador Cytodex 1TM, da empresa GE Healthcare, equivale a uma área superficial de 4400 cm^2 , obtendo-se 8800 cm^2/L , quando utilizando-se uma concentração de microcarregador de 2 g/L. No entanto, este sistema também possui alguns inconvenientes. No caso de microcarregadores macroporosos, nos quais as células crescem em seu interior, a difusão de nutrientes para o seu interior é lenta, assim como a eliminação de metabólitos, sendo necessário aumentar a agitação do tanque, o que acaba expondo os microcarregadores a altas tensões de cisalhamento. Outra desvantagem é o acesso ao interior dos microcarregadores, uma vez que estudos utilizando microscopia confocal a laser e de fluorescência mostraram que, em alguns casos, após a adesão superficial das células, elas não eram capazes de proliferar no interior do microcarregador (ALVES *et al.*, 1999; HU e AUNINS, 1997).

Industrialmente, a maioria dos produtos recombinantes obtidos em células animais é produzida em células que crescem em suspensão (individualmente ou na forma de agregados), utilizando linhagens como a CHO e a BHK (HU e AUNINS, 1997). O cultivo em suspensão em sistemas agitados é muito eficiente na produção de grandes quantidades de proteína (LUBINIECKI, 1998) e é caracterizado por concentrações homogêneas de células, nutrientes, metabólitos e produto, facilitando a sua ampliação de escala e permitindo um monitoramento mais eficiente das condições da cultura (CASTILHO e MEDRONHO, 2002). Células em suspensão são obtidas a

partir da adaptação de células originalmente aderentes ou utilizando-se células de origem sanguínea. Os protocolos de adaptação de células animais à suspensão são os mais diversos, porém, a maioria consiste na realização da passagem do cultivo em frasco estático para frasco agitado do tipo *spinner*, que mantém as células em suspensão. Inicialmente, as células geralmente apresentaram uma queda na sua proliferação, porém após cerca de quatro trocas de meio (passagens) em suspensão, o crescimento celular é restabelecido e concentrações de $1-2 \times 10^6$ células/mL geralmente são alcançadas (SINACORE *et al.*, 2000; WU *et al.*, 1990). Quando mantidas em suspensão, as células animais são constantemente expostas a tensões hidrodinâmicas que, em alguns tipos de células, podem causar danos e reduzir a viabilidade celular. Nesses casos, pode-se empregar aditivos poliméricos, tais como Pluronic F68 que reduzem os danos por tensões cisalhantes (CHU *et al.*, 2001).

Em pequena escala, o cultivo em suspensão pode ser realizado em frascos agitados do tipo *spinner*, ajustando-se o número de unidades de acordo com a necessidade de cultivo. O cultivo em grande escala em biorreatores agitados permite o monitoramento da maioria das variáveis em linha, reduzindo a manipulação direta da cultura. Dependendo do modo de operação, o cultivo em suspensão pode alcançar diferentes concentrações celulares. Em cultivos em batelada, por exemplo, a concentração celular pode alcançar cerca de 2×10^6 células/mL. No entanto, como células animais apresentam uma baixa velocidade específica de crescimento (o tempo de duplicação é de aproximadamente 24h), são necessários vários dias para se obter uma alta concentração celular. Entretanto, esta alta concentração leva à exaustão de nutrientes e/ou acúmulo de metabólitos tóxicos, de modo que logo a cultura entra em fase de declínio, resultando em um período efetivo de produção relativamente curto (TOKASHIKI E YOKOYAMA, 1997). A solução para este problema se encontra no emprego de modos alternativos de operação do biorreator, que permitam a obtenção de altas densidades celulares por períodos prolongados.

2.2.2. Modos de operação

A produção de biofármacos em grande escala deve ser realizada, levando-se em consideração algumas limitações das células animais. As células possuem baixa taxa específica de crescimento, baixa produtividade específica, necessidade de meios de cultivo complexos e alta sensibilidade a tensões cisalhantes, além de sofrerem de

inibição por produtos de seu próprio metabolismo. A consideração desses pontos é um fator muito importante na qualidade das proteínas recombinantes produzidas, sendo necessário considerá-los, de modo a obter-se elevadas taxas de crescimento e altas produtividades. Assim, as seguintes necessidades devem ser observadas no cultivo de células animais, especialmente em grande escala: suprimento de nutrientes e fatores necessários para a proliferação celular; suprimento e controle do nível de oxigênio dissolvido; manutenção da concentração de metabólitos tóxicos (amônia e lactato) em níveis não inibitórios; emprego de baixas tensões cisalhantes; e controle da temperatura, pH e pressão osmótica dentre outros fatores (TOKASHIKI e YOKOYAMA, 1997). Dispositivos para controle das variáveis básicas, como pH, temperatura e oxigenação já vêm geralmente incorporados em modelos comerciais de biorreatores agitados (KRETZMER, 2002)

Diferentes estratégias de operação visam resolver o problema de suprimento de nutrientes e eliminação de metabólitos tóxicos. Os modos de operação de um biorreator são: batelada, batelada alimentada, contínuo e contínuo com reciclo celular (perfusão) (Figura 4 e 5). Diversos fatores, como linhagem celular e tipo de produto, devem ser considerados na escolha do modo de operação a ser conduzido na produção de um determinado biofármaco (KADOURI *et al.*, 1997).

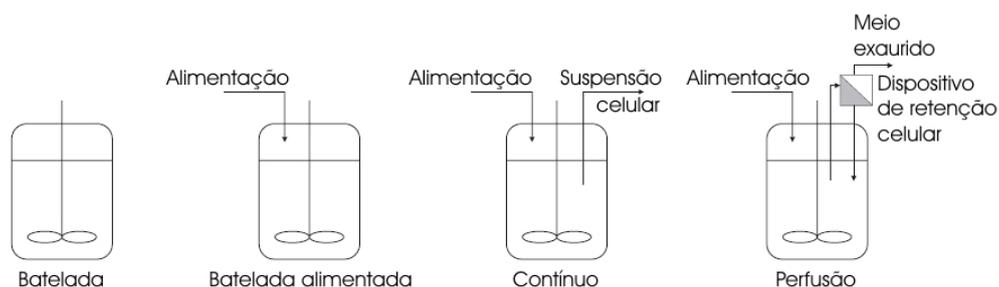


Figura 4- Esquema de diferentes modos de operação de biorreatores com células animais em suspensão: batelada, batelada alimentada, contínuo e perfusão (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

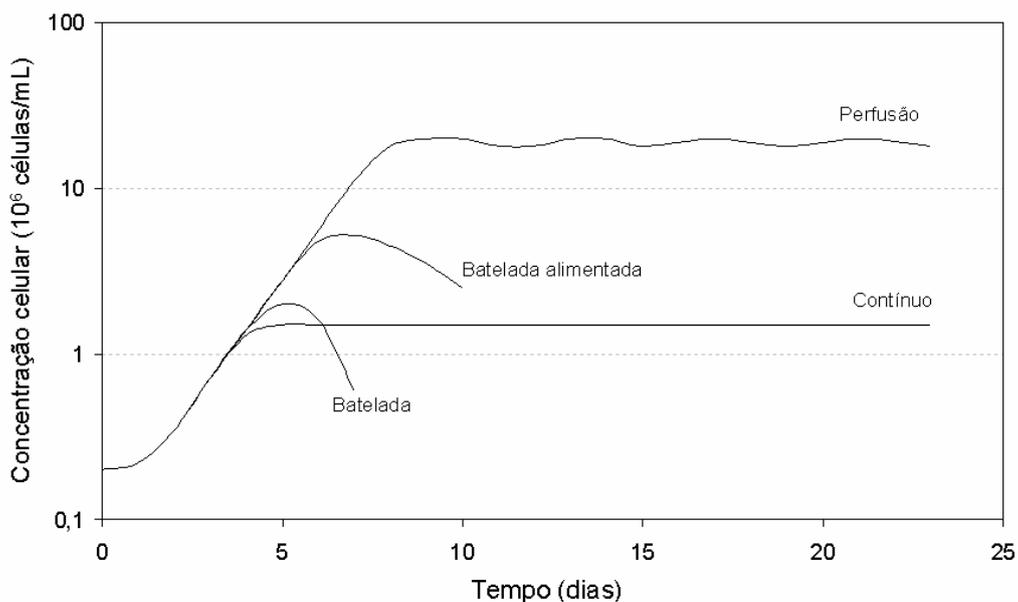


Figura 5- Comparação das concentrações celulares obtidas em função do modo de operação empregado (adaptado de Griffiths, 1992).

No cultivo em batelada, o meio de cultivo é adicionado ao biorreator e, em seguida, é adicionado o inóculo. Durante o processo, não é adicionado nem retirado meio de cultivo do biorreator. Ao longo do tempo, as células proliferam, consumindo os nutrientes e gerando metabólitos que se acumulam no biorreator. Desta forma, as células têm sua proliferação reduzida quando concentrações limitantes de nutrientes ou inibitórias de metabólitos são alcançadas, momento este em que mecanismos de morte celular começam a predominar. Este é um processo simples, que gera uma densidade celular máxima de cerca de 2×10^6 células/mL e apresenta geralmente baixas produtividades (FUSSENEGGER e BAILEY, 1999). Durante o progresso de um cultivo em batelada, a cultura passa por diferentes fases, sendo que as condições da cultura estão em constante mudança. Diversos estudos já mostraram que existe uma grande variabilidade na expressão de alguns biofármacos nas diversas etapas de progressão do cultivo em batelada (CHU e ROBINSON, 2001).

A batelada alimentada consiste na realização de uma batelada inicial, após a qual se passa a adicionar meio de forma contínua ou intermitente, em condições de volume variável. O nível de nutrientes no biorreator pode ser, desta forma, ajustado para que não limite o crescimento celular, porém, como não há remoção de meio de cultivo, ainda há o acúmulo de metabólitos. Comparado ao sistema em batelada, no qual o crescimento é cessado geralmente pela exaustão de nutrientes, este processo permite períodos de cultivo mais prolongados e com maior densidade celular, aumentando a

produtividade do sistema. Entretanto, a inibição do crescimento celular pode ocorrer pelo acúmulo de metabólitos, como lactato e amônia (TOKASHIKI E YOKOYAMA, 1997). Estudos relatam a otimização deste sistema através da adição galactose e glutamato em conjunto com a glicose e glutamina, de forma a reduzir o acúmulo de amônia e lactato, aumentando o período de operação do biorreator (ALTAMIRANO *et al.*, 2000).

O modo contínuo de operação consiste na ininterrupta alimentação do biorreator com meio de cultivo, em paralelo à remoção da mesma quantidade de meio utilizado. No caso de células em suspensão, a retirada do meio com células resulta na operação contínua em estado estacionário, no qual as concentrações de células, nutrientes, metabólitos e produto permanecem constantes até o final do processo. A vazão de alimentação do biorreator é função da taxa específica de crescimento das células, de modo a evitar arraste completo das células do biorreator. Neste processo, os nutrientes são constantemente renovados e o acúmulo de metabólitos controlado, resultando em um cultivo contínuo por um longo período de tempo. No entanto, o inconveniente deste processo reside no fato de não ser possível alcançar altas concentrações celulares, devido à baixa velocidade específica de crescimento das células, que limita a vazão de alimentação de nutrientes aplicável para que não ocorra o arraste completo (TOKASHIKI E YOKOYAMA, 1997).

No cultivo contínuo em perfusão, assim como no contínuo, há a constante adição de meio novo e remoção de meio exaurido. Entretanto, dispositivos de retenção celular são utilizados para que o meio retirado seja isento ou quase isento de células. Desta forma, a combinação da adição de nutrientes, remoção de metabólitos e retenção celular permite alcançar altas concentrações celulares (acima de 10^7 células/mL) e altas produtividades (geralmente pelo menos 10 vezes maiores do que em processos em batelada) (TOKASHIKI E YOKOYAMA, 1997; WOODSIDE *et al.*, 1998). O fator de coagulação sanguínea VIII produzido por uma linhagem de BHK recombinante, licenciado pela Bayer, foi o primeiro biofármaco a ser obtido comercialmente utilizando o cultivo em perfusão. O processo validado foi operado por 185 dias consecutivos, alcançando concentrações celulares e produtividades 30 vezes maiores do que o respectivo processo em batelada. Produtividades com essa, permitem reduzir a capacidade do biorreator de 5000 - 15000 L para 100 - 500 L (KRETZMER, 2002). Desta forma, a perfusão torna possível a produção de grandes volumes de produto em um biorreator relativamente pequeno, operando continuamente por longos períodos, o

que reduz os custos operacionais. A alta densidade alcançada no processo em perfusão, permite, ainda, que o sistema se torne auto-sustentável, pois as células produzem e secretam fatores de crescimento e outras proteínas, diminuindo ou dispensando completamente a adição de suplementos como o soro fetal bovino (WOODSIDE *et al.*, 1998; CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

Diferentemente dos processos em batelada, a perfusão permite a operação em estado estacionário durante longos períodos de tempo, de modo que a expressão de proteínas recombinantes não sofre alterações de acordo com o estágio do cultivo. O curto período de permanência do produto no interior do biorreator (horas) permite, também, a expressão de proteínas lábeis e sensíveis à degradação enzimática (KADOURI *et al.*, 1997). Apesar da complexidade de se configurar um sistema de cultivo em perfusão de grande escala, este é capaz de prover uma corrente contínua concentrada em produto por longos períodos de tempo (BUTLER, 2005). O período improdutivo do sistema é relativamente pequeno em comparação ao tempo total de operação, se resumindo à montagem e esterilização do reator e à fase de crescimento inicial, que consiste de 4 a 6 dias. Sistemas de monitoramento e controle de diversas variáveis da cultura são facilitados, já que podem ser avaliados em linha na corrente de saída de meio (MERCILLE *et al.*, 2000). A grande vantagem da perfusão é que os biorreatores podem ser muito menores para a produção de uma mesma quantidade de proteína, quando comparado a processos em batelada (RYLL *et al.*, 2000). Do ponto de vista econômico, o cultivo de células animais em perfusão deve ser operado a altas taxas de perfusão (ZENG *et al.*, 1999). Entretanto, a alta concentração celular alcançada nesses casos pode resultar em outras limitações, como a transferência de oxigênio, remoção do CO₂, formulação do meio e, em especial, eficiência de retenção celular (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

2.3. Dispositivos de Retenção Celular

Os dispositivos de retenção celular usados em processos em perfusão devem apresentar características necessárias à sua adequada operação. A separação celular deve idealmente ser realizada satisfatoriamente por longo período de tempo, sem necessidade de manutenção do equipamento ou interrupção do processo. Além disso, o dispositivo, em geral, deve ser esterilizável e reutilizável. O equipamento não deve afetar a viabilidade da cultura, a produtividade ou a qualidade do produto (por exemplo,

o padrão de glicosilação), e deve apresentar alta eficiência de separação de células viáveis, independentemente da concentração celular na alimentação. O dispositivo ideal deve separar preferencialmente as células viáveis, permitindo a retirada de células não-viáveis do sistema de cultivo. O princípio de separação da maioria dos dispositivos atuais de retenção celular baseia-se no tamanho e na densidade da partícula (célula animal) (Tabela 3), e consiste de adaptações dos métodos tradicionais de separação sólidos líquido. Métodos mais recentes levam, também, em consideração as forças geradas em um plano de ondas estacionárias, devido às diferenças de compressibilidade e densidade entre as células e o fluido e a capacidade de deslocamento das células em um campo elétrico não uniforme (WOODSIDE *et al.*, 1998; CASTILHO e MEDRONHO, 2007).

TABELA 3- Dispositivos de separação celular. Os princípios pelos quais os dispositivos executam a separação estão marcados com X. O tamanho da célula auxilia no efeito de alguns dispositivos, indicado entre parênteses (adaptado de WOODSIDE *et al.*, 1998, CASTILHO e Medronho, 2007).

Dispositivo de retenção celular	Princípio da retenção		
	Tamanho	Densidade	Compressibilidade
Filtros tangenciais	X	-	-
<i>Spin-Filters</i>	X	(X)	-
Sedimentadores	X	X	-
Centrífugas	X	X	-
Hidrociclones	X	X	-
Separação ultrassônica	(X)	X	X

Entretanto, freqüentemente as limitações dos dispositivos de retenção celular limitam a duração dos processos em perfusão. Devido ao relativamente alto conteúdo de proteínas na maioria dos meios de cultivo, assim como ao reduzido tamanho celular, os dispositivos convencionais de retenção celular tendem a colmatar ou obstruir, interrompendo o processo (KRETZMER, 2002).

Diferentes tipos de equipamentos têm sido utilizados para reter as células no interior de biorreatores industriais operando em perfusão. Esses aparatos se baseiam principalmente na sedimentação em campo de força centrífugo ou gravitacional (centrífugas e sedimentadores) e na filtração (*spin-filters*, filtros de fluxo tangencial). No entanto, os equipamentos baseados nessas técnicas apresentam diversas limitações (CASTILHO e MEDRONHO, 2002). Na filtração, o grande problema é colmatação (*fouling*) progressiva do meio filtrante (KAWAHARA *et al.*, 1994). Na sedimentação gravitacional, pode ocorrer adesão celular nas paredes do sedimentador, além de ser necessário um grande tempo de residência das células no interior do equipamento, onde

as mesmas permanecem por longos períodos em condições não controladas de pH e de oxigênio dissolvido (BATT *et al.*, 1990). Na centrifugação pode ocorrer adesão celular, com o conseqüente bloqueio dos canais das centrífugas contínuas (JÄGER, 1992).

Os dispositivos que se baseiam no processo de filtração, estão divididos em módulos de filtração tangencial, filtração dinâmica e *spin-filters*. Dos problemas pertinentes aos diferentes tipos de filtração, a colmatção da superfície filtrante é o principal fator que reduz o tempo de operação devido ao acúmulo de células, fragmentos celulares e proteínas (VAN REIS e ZYDNEY, 2001). Este fenômeno, além de limitar a vazão de filtrado, pode ocasionar a retenção de compostos de alta massa molecular, como algumas proteínas recombinantes (WOODSIDE *et al.*, 1998).

A filtração tangencial (Figura 6) pode ser empregada utilizando-se módulos de membranas planas e de fibras ocas (MAIORELLA *et al.*, 1993). Neste sistema, a suspensão de alimentação escoia tangencialmente a membrana e perpendicularmente à direção do permeado. O fluxo tangencial, que é função da vazão de alimentação gera altas taxas de cisalhamento na superfície da membrana, reduzindo a colmatção e o entupimento, permitindo a operação contínua com um fluxo de permeado relativamente alto (CASTILHO e MEDRONHO, 2002). Este é considerado um processo simples e de fácil adaptação aos diferentes tipos de biorreatores, permitindo a obtenção de filtrado totalmente isento de células (100% de retenção), o que facilita os processos de purificação da proteína de interesse. A possibilidade de operação externa ao biorreator garante a flexibilidade do sistema, permitindo a troca de módulo no caso de entupimento, apesar dos riscos de contaminação inerentes a isto. Devido à sua natureza, a utilização da filtração tangencial pode ser facilmente escalonada de uma escala piloto para uma escala industrial, respeitando-se as razões de volume de filtrado e área filtrante (WOODSIDE *et al.*, 1998; CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

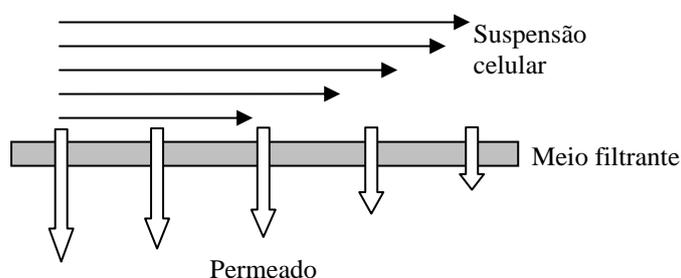


Figura 6- Filtração tangencial. A suspensão celular é alimentada tangencialmente à membrana, evitando o acúmulo de resíduos sobre a mesma (VOISARD, 2003).

O fluxo de permeado pode ser aumentado quando altas tensões de cisalhamento são aplicadas na superfície da membrana, devido à redução do acúmulo de células e fragmentos sobre a mesma (VAN REIS e ZYDNEY, 2001). Entretanto, os níveis de tensões de cisalhamento aplicados são limitados de acordo com a tolerância da célula, sob risco de ocorrer lise celular (WOODSIDE *et al.*, 1998). Como um efeito em cascata, a lise celular e a conseqüente queda de viabilidade podem resultar em uma cultura com diâmetro celular médio reduzido e no acúmulo de debris celulares, ambos responsáveis pela diminuição do fluxo de filtrado pelos motivos já mencionados (MAIORELLA *et al.*, 1991). O tamanho dos poros da membrana é outro ponto que deve ser cuidadosamente considerado, uma vez que membranas com poros na faixa de 0,2 – 0,65 μm são menos suscetíveis à colmatação do que membranas com poros de 2 a 10 μm (WOODSIDE *et al.*, 1998). Diferentes alternativas foram utilizadas para reduzir a ocorrência de fouling, como retrolavagem das membranas com o próprio permeado sendo alimentado em fluxo contrário, alimentação com fluxo pulsante (SMITH *et al.*, 1991) e revestimento da membrana com polietileno glicol (PEG), para reduzir a adsorção de proteínas e a adesão de células (ZHANG *et al.*, 1994). No entanto, estas medidas só prolongaram o tempo de operação dos módulos, apenas adiando a necessidade de troca ou paralisação dos processos devido à diminuição do fluxo permeado.

A filtração dinâmica consiste na criação de um movimento relativo entre a membrana e um rotor, desacoplando a vazão de alimentação dos níveis de tensão de cisalhamento na superfície da membrana. Isto permite que os níveis de cisalhamento sejam ajustados de forma precisa e independente da vazão de alimentação, a qual pode ser mantida baixa, diferentemente do que ocorre na filtração tangencial. Existem, basicamente, duas geometrias empregadas em filtração dinâmica: filtros de cilindro rotativo (*VFF – Vortex Flow Filter*) e filtros de disco rotativo (*RDF – Rotating Disk Filter*) (CASTILHO e MEDRONHO, 2002, VOISARD *et al.*, 2003).

Filtros de cilindro rotativo (VFF) (Figura 7) são dispositivos compostos por um cilindro externo estacionário, dentro do qual existe outro cilindro concêntrico mantido sob rotação. Este movimento de rotação do cilindro interno gera, no espaço entre os dois, um escoamento do tipo Taylor-Couette. O meio filtrante pode ser montado no cilindro interno ou no cilindro externo. Os vórtices gerados perpendicularmente à superfície do meio filtrante reduzem os problemas de colmatação (ROTH *et al.*, 1997).

A vazão de alimentação pode, desta forma, ser mantida baixa, já que a tensão cisalhante na superfície da membrana é determinada pelo movimento do rotor .

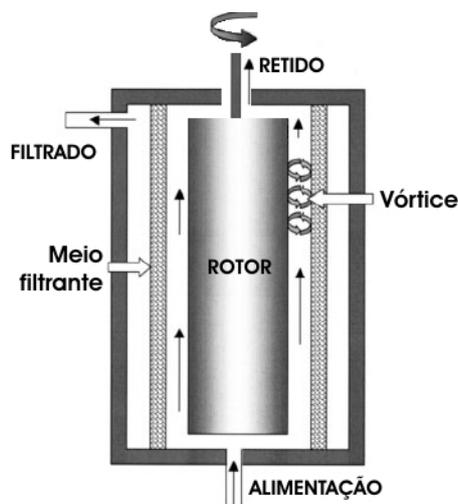


Figura 7- Esquema de um filtro de cilindro rotativo (VFF) (adaptado de VOISARD *et al.*, 2003).

Experimentos utilizando diversas linhagens de células animais mostraram que velocidades angulares de até 500 rpm não afetam a viabilidade celular, nem o crescimento das células após a passagem pelo VFF, além de não ter sido evidenciado entupimento nem colmatação da membrana. Este fato sugere que este tipo de filtro pode ser aplicado como dispositivo de retenção celular para operações em perfusão durante longos períodos de tempo (HAWRYLIK *et al.*, 1994). Em velocidades de cerca de 800 rpm, foi verificada uma queda significativa na viabilidade celular. No entanto, após um período de adaptação, as células recuperaram a viabilidade inicial e apresentam maior resistência, podendo ser mantidas em rotações de até 1000 rpm sem apresentar alterações significativas na viabilidade (MERCILLE *et al.*, 1994).

A hidrodinâmica criada dentro do sistema de VFF auxilia, também, no desagregamento de células (MERCILLE *et al.*, 1994). Os agregados celulares impedem o transporte de nutrientes e oxigênio para as células retidas no seu interior, aumentando a quantidade de células não viáveis que, quando desprendidas dos agregados, podem gerar uma maior quantidade de fragmentos celulares e podem provocar a colmatação da membrana (ROTH *et al.*, 1997). De acordo com MERCILLE *et al.* (1994), o tratamento com DNase evita a colmatação e a retenção de produto nas membranas de um módulo de VFF, indicando que fragmentos de DNA são parcialmente responsáveis pela colmatação das membranas (MERCILLE *et al.*, 1994). Diferentes filtros de cilindro rotativo já foram utilizados com membranas de polisulfona (MERCILLE *et al.*, 1994; MERCILLE *et al.*, 2000) ou telas de aço inox com poros de 10 μm (ROTH *et al.*, 1997).

Os módulos com membranas apresentaram problemas de colmatção, e o aumento de duas vezes em sua superfície filtrante representou uma elevação de somente 50% do fluxo de filtrado, dificultando a sua ampliação de escala. Os filtros com tela de aço inox, por outro lado, foram capazes de operar durante um período que variou de 30 a 60 dias consecutivos.

Os filtros de disco rotativo (RDF) (Figura 8) consistem em um disco giratório montado dentro de um módulo estático, onde as membranas podem estar localizadas tanto no disco quanto na parte estática. Os filtros de disco rotativo geram altas taxas de cisalhamento na superfície da membrana, contribuindo para a remoção das partículas/células e minimizando os problemas de colmatção das membranas (VOGEL e KRONER, 1999; CASTILHO, 2001). De acordo com a velocidade de rotação do disco, um gradiente de velocidades sobre a superfície das membranas, gera um cisalhamento que evita colmatção. Este gradiente é também responsável por criar forças de sustentação que tendem a afastar a célula da superfície da membrana, que é uma região com altas taxas de cisalhamento. (VOGEL e KRONER, 1999).

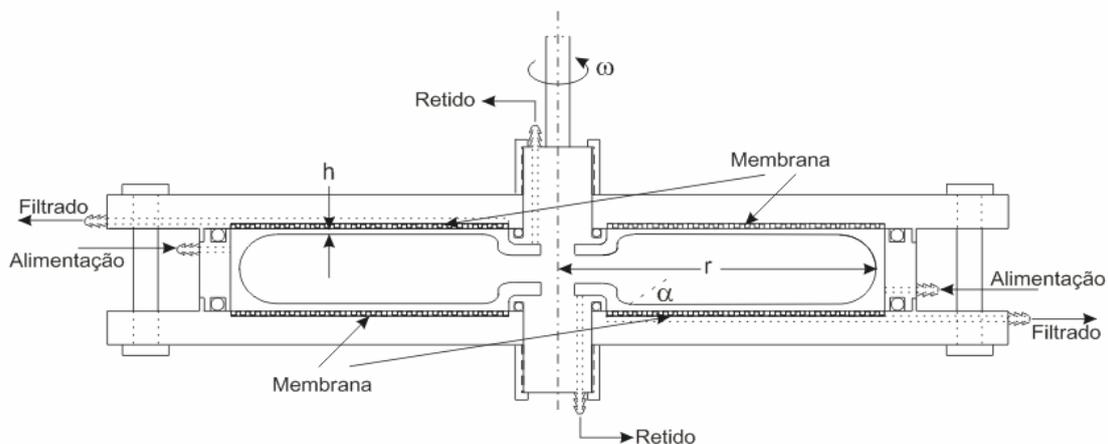


Figura 8- Esquema da unidade de filtro de disco rotativo (RDF) (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

A queda na viabilidade de células submetidas a tensões de cisalhamento depende de dois fatores: a intensidade das mesmas e o tempo de exposição. Durante a operação do RDF próximo aos limites de estabilidade celular, a viabilidade celular pôde ser mantida, enquanto a colmatção foi minimizada, obtendo-se fluxos de permeado 3 vezes maiores do que na filtração tangencial, com o benefício de uma melhor manutenção da viabilidade celular (VOGEL e KRONER, 1999). A vazão de alimentação e o volume morto da unidade define o tempo de residência da célula no

interior do filtro, assim como a frequência com que uma célula passa no sistema. Assim, deve-se buscar um compromisso entre ambos parâmetros que minimize os efeitos adversos das tensões de cisalhamento, já que uma diminuição no tempo de residência significa uma maior vazão de fluido, aumentando a frequência com que as células passam no filtro. Conseqüentemente, os valores desses parâmetros devem ser escolhidos a fim de operar o sistema dentro da faixa de estabilidade da linhagem celular a ser separada (VOGEL e KRONER, 1999). Sob condições apropriadas, os danos celulares são insignificantes, como recomendável, em geral, para um sistema de separação de células animais e indispensável para um dispositivo de retenção celular a ser empregado em cultivos em perfusão de longa duração (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

CASTILHO e ANSPACH (2003) utilizaram fluidodinâmica computacional (CFD) para projetar um FDR com base em dados experimentais de resistência de células CHO e BHK a tensões de cisalhamento. Após a construção do filtro assim projetado, o mesmo foi utilizado acoplado a um biorreator em perfusão (CASTILHO *et al.*, 2002). Durante um período de operação de 16 dias, o filtro de disco rotativo permitiu que fosse mantida uma concentração celular da ordem de 10^7 células/mL, com viabilidade, em geral, superior a 90%. Apenas no primeiro dia de funcionamento do dispositivo, foi observada uma queda significativa na viabilidade, até 74%, sendo rapidamente recuperada e atingindo 92% no quarto dia. Este fenômeno foi relacionado à desagregação dos grumos de células devido às tensões de cisalhamento geradas pelo filtro, liberando as células não-viáveis que se encontravam no interior dos agregados. Outros trabalhos, mencionados anteriormente, já haviam demonstrado que a adição de DNase ao meio de cultivo é capaz desfazer os grumos de células, aumentando a concentração de células não-viáveis (MERCILLE *et al.*, 1994). Além disso, se o motivo da queda de viabilidade estivesse relacionado a danos celulares, os seus valores deveriam continuar baixando durante todo o tempo de operação do filtro de disco rotativo, o que não foi verificado (CASTILHO, 2001). De acordo com CASTILHO *et al.* (2002), uma característica interessante é que o FDR permitiu a integração do cultivo em perfusão com a purificação do produto, utilizando-se membranas de afinidade.

Filtros de malha rotativa (*Spin-filters*) são dispositivos cilíndricos, compostos em sua maioria por uma tela porosa, ou também por membranas, e localizados geralmente no interior do biorreator (Himmelfarb, 1969). Alguns autores, no entanto, utilizam *spin-filters* acoplados externamente ao biorreator, denominando-os *spin-filters* externos, os quais são, basicamente, filtros de cilindro rotativo (discutido

anteriormente). O *spin-filter* pode ser montado no eixo de agitação ou em um eixo independente (Figura 9). O perfundido (filtrado) é bombeado de dentro do dispositivo à mesma taxa em que é realizada a alimentação de meio de cultivo novo (CASTILHO e MEDRONHO, 2002). O principal fator que influencia o desempenho destes filtros é sua a velocidade angular, que irá determinar as forças centrífugas e de sustentação, definindo a possível colisão entre as células e o filtro, e, também, as tensões cisalhantes na sua superfície, evitando a adesão das células (CASTILHO e MEDRONHO, 2002). Altas concentrações celulares e produtividades foram alcançadas desde os primeiros *spin-filters* utilizados em processo em perfusão com células animais. No entanto, os cultivos, em geral, não apresentam longa duração, devido ao entupimento da malha. Assim como na filtração tangencial, a colmatção é função da concentração celular e da taxa de perfusão, assim como do tamanho dos poros, do material da malha filtrante e da velocidade de rotação (VOISARD *et al*, 2003).

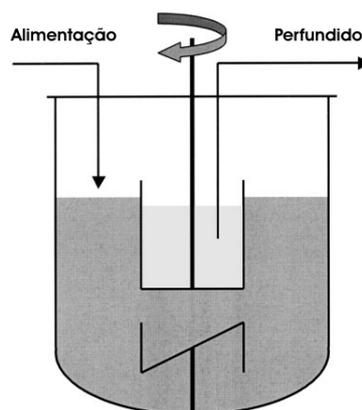


Figura 9- Esquema de um *spin-filter* (VOISARD *et al*, 2003).

Diversas modificações já foram realizadas no *spin-filter* com o objetivo de solucionar os problemas inerentes a este sistema de separação. O emprego de células aderentes em microcarregadores aumenta o tamanho das partículas a serem separadas (200-600 μm) e, ao se utilizar malhas de 120 μm , foi possível operar por 31 dias consecutivos sem problemas de colmatção do filtro (AVGERINOS *et al.*, 1990). O uso de grandes tamanhos de poros também foi adotado por Verecka e Sheirer (1987), que, ao utilizarem células com tamanho médio de 20 μm e filtro com poros de 56 μm , conseguiram operar um biorreator continuamente por um período de 2 meses. A força centrífuga decorrente da rotação da malha filtrante, neste caso, permitiu que as células fossem retidas no biorreator.

A utilização de filtros de malha rotativa de diferentes materiais mostrou que a sua composição influencia diretamente na adesão celular e no entupimento. Testes realizados com filtros de poliamida e etileno-tetrafluoretileno (ETFE) demonstraram que estes materiais são menos susceptíveis à adesão de células e fragmentos do que o aço inox (ESCLADE *et al.*, 1991; AVGERINOS *et al.*, 1990). As condições de operação, também, têm grande influência sobre o desempenho do *spin-filter*, podendo-se observar colmatção mesmo em altas rotações (DEO *et al.*, 1996). Apesar dos avanços relatados nos últimos anos, os problemas inerentes ao *spin-filter* ainda representam uma barreira a ser transposta, uma vez que este equipamento não permite reposição durante uma operação prolongada e possui uma complexidade mecânica que diminui a sua confiabilidade.

A separação de células animais em sedimentadores e centrífugas tem como princípio de separação a sedimentação da célula em um campo gravitacional ou centrífugo, respectivamente. Em ambos os sistemas, a velocidade terminal da partícula é o principal fator que irá influenciar na sedimentação. Infelizmente, as células animais apresentam uma velocidade terminal muito baixa em campos gravitacionais (1-15 cm/h em meio a 37°C) devido à diferença entre sua densidade e do meio de cultivo ser muito baixa (5% de diferença). No caso de sedimentadores gravitacionais, isso representa a necessidade de uma área de sedimentação muito grande para evitar que as células sejam arrastadas junto com o perfundido (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

Existem dois tipos de sedimentadores. No sedimentador vertical, as células sedimentam em contra-corrente com o líquido, sendo necessário que a velocidade de ascensão do líquido seja inferior à velocidade terminal da célula animal a ser separada. No sedimentador lamelado (Figura 10), as células em suspensão passam por placas inclinadas e paralelas entre si (lamelas). As células sedimentam conforme passam pelo dispositivo e acumulam-se nas placas. Como as placas são inclinadas (20°–30°), as células migram para a extremidade inferior, retornando ao biorreator (CASTILHO e MEDRONHO, 2007). Em geral, esses são equipamentos robustos e ideais para células sensíveis a tensões cisalhantes.

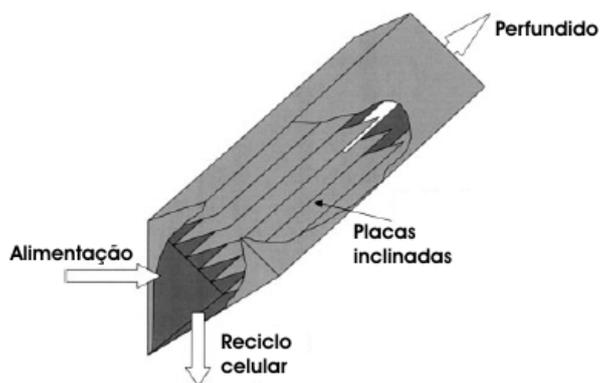


Figura 10- Esquema de um sedimentador lamelado (VOISARD *et al.*, 2003).

Um dos fatores críticos relacionados a sedimentadores é a dificuldade de ampliação de escala, uma vez que sua área aumenta com o quadrado e o volume do biorreator com o cubo de uma dimensão característica. Neste contexto, sedimentadores lamelados apresentam a vantagem de serem mais compactos do que sedimentadores verticais. Teoricamente, a sua área de sedimentação total é a soma da projeção horizontal de suas placas, porém, normalmente, somente 50% desta área é efetiva. No entanto, as células tendem a aderir nas placas dos sedimentadores inclinados, sendo necessários revestimentos especiais e vibração para evitar entupimentos (CASTILHO e MEDRONHO, 2002, CHOO *et al.*, 2007). Além disso, o tempo de residência no interior dos sedimentadores é muito alto, podendo variar entre 2 e 4 horas (SEARLES *et al.*, 1994), expondo a célula a uma condição ambiental subótima (baixa tensão de oxigênio dissolvido, ausência de monitoramento e controle de pH e temperatura). Por outro lado, um fenômeno interessante observado na separação por este tipo de dispositivo é a separação preferencial de células vivas. Trabalhos demonstraram que dependendo das vazões empregadas no sedimentador, a eficiência de separação de células mortas é menor, fazendo com que essas células sejam retiradas do biorreator. Foi observada uma eficiência de separação de cerca de 20% para as células mortas (BATT *et al.*, 1990; WEN *et al.*, 2000; LIPSCOMB *et al.*, 2004). Apesar das altas eficiências de separação obtidas por CHOO *et al.* (2007), a concentração celular máxima alcançada neste trabalho não ultrapassou 8×10^6 células/mL em cultivos de 53 dias de duração.

Na centrifugação, um campo centrífugo é aplicado sobre as células com o intuito de se aumentar sua velocidade terminal. Estudos relacionados à sensibilidade a diferentes acelerações centrífugas e tempos de exposição mostraram que uma linhagem de hibridoma resiste a duas centrifugações consecutivas de 10 minutos até 500 g sem alterar o seu metabolismo ou taxa de crescimento (TOKASHIKI *et al.*, 1990). No

entanto, assim como para qualquer outro estímulo que a célula sofra, a sensibilidade às condições de separação centrífuga varia entre as várias linhagens celulares. Diversos estudos mostraram ser possível conduzir processos contínuos utilizando centrífugas comerciais como dispositivo de separação. No entanto, os tempos máximos de operação relatados estão entre 12 e 40 dias, tempos relativamente pequenos em comparação com outros dispositivos de retenção. Os principais problemas observados foram o entupimento dos dutos e acúmulo de células aderidas no interior dos equipamentos (CASTILHO e MEDRONHO, 2002). Além destes problemas e de outros relacionados à sua complexidade mecânica, especialmente dos selos mecânicos requeridos para manter esterilidade, as centrífugas são equipamentos caros, o que aumenta o investimento inicial do processo de produção de biofármacos. Devido à falta de confiabilidade nos selos mecânicos (TOKASHIKI *et al.*, 1990), uma nova centrífuga (Centritech[®]) foi desenvolvida sem selos mecânicos. A Centritech utiliza uma bolsa estéril descartável que deve ser trocada ao final de cada perfusão. Testes com esta centrífuga permitiram a condução de um cultivo contínuo em perfusão que alcançou concentrações celulares de 10^7 células/mL. Entretanto, a produtividade de um determinado anticorpo foi reduzida em 30% (JOHNSON *et al.*, 1996).

A separação ultrassônica se baseia em forças acústicas que atuam sobre as células em suspensão em um campo de ondas estacionárias. Estas forças são proporcionais às diferenças de compressibilidade e densidade entre as células e o meio de cultivo. O campo ultrassônico retém e agrega as partículas, e os agregados sedimentam rapidamente com o desligamento periódico do equipamento (PUI *et al.*, 1995), obtendo-se, então, altas eficiências de separação (95-100%) e altas concentrações celulares (10^7 células/mL). O alto grau de energia inserido no sistema pode gerar um aumento da temperatura (+1,3° C/min), representando um problema para as células e proteínas termolábeis e resultando em gradientes de temperatura que tornam o sistema heterogêneo e altera a sua eficiência de separação (PUI *et al.*, 1995). Isto pode ser resolvido com modificações no projeto, agregando-se uma segunda câmara, que é utilizada para resfriar a câmara de separação (DOBLHOFF-DIER *et al.*, 1994). Utilizando parâmetros operacionais dentro dos compatíveis com as linhagens celulares empregadas, foi possível observar-se que a viabilidade da cultura e a produtividade são mantidas inalteradas durante longos períodos de exposição aos efeitos do separador (DOBLHOFF-DIER *et al.*, 1994; PUI *et al.*, 1995). O separador ultrassônico retém, ainda, de forma seletiva, as células viáveis (GAIDA *et al.*, 1996). O principal problema

destes equipamentos, no entanto, se encontra na sua capacidade de operar em biorreatores de grande porte, uma vez que já foi observado que altas taxas de perfusão em biorreatores de escala piloto diminuem significativamente a sua eficiência de separação (RYLL *et al.*, 2000; SHYRGAONKAR *et al.*, 2004). Foi observado, também, que altas concentrações celulares tendem a diminuir a sua eficiência de separação, sendo necessário realizar alguns procedimentos operacionais como a inversão do fluxo dentro do separador, retornando a suspensão para dentro do biorreator (SHYRGAONKAR *et al.*, 2004).

2.3.1. Hidrociclones

Hidrociclones são dispositivos normalmente utilizados na separação sólido-líquido, sólido-sólido, líquido-líquido e gas-líquido. A sua simplicidade confere facilidade de operação e de previsão de performance (Figura 11). Este dispositivo consiste de uma seção cônica acoplada a uma porção cilíndrica, a qual possui entrada tangencial em sua lateral. Esta seção cilíndrica é fechada na sua parte superior por uma placa com um duto central axial para o escoamento da corrente de *overflow*. A extremidade da porção cônica inferior termina em um orifício de saída da corrente de *underflow*. Hidrociclones utilizam o mesmo princípio das centrífugas (sedimentação em um campo centrífugo), porém sem partes móveis e sem complexidade mecânica. A alimentação do fluido é realizada pela entrada ou entradas tangenciais na parte cilíndrica, adquirindo um movimento espiralado em direção ao orifício do *underflow*, criando um campo centrífugo que resulta na sedimentação das partículas em direção a parede (Figura 11). O diâmetro reduzido do orifício do *underflow* não permite que toda a suspensão seja descarregada, eliminando somente uma parte do fluido contendo as partículas mais densas ou maiores. A outra parte retorna em sentido contrário em um vórtice interno mais intenso, que é descarregado pelo orifício do *overflow*, carregando as partículas mais leves ou menores. Com o auxílio da fluidodinâmica computacional, tornou-se possível compreender e prever o comportamento do seu escoamento turbulento em vórtice e, conseqüentemente, de seu desempenho (MEDRONHO *et al.*, 2005). A sua aplicação na biotecnologia é recente (LÜBBERSTEDT *et al.*, 2000a e 2000b) e somente nos últimos anos este dispositivo vem sendo estudado como uma alternativa promissora na separação de células animais.

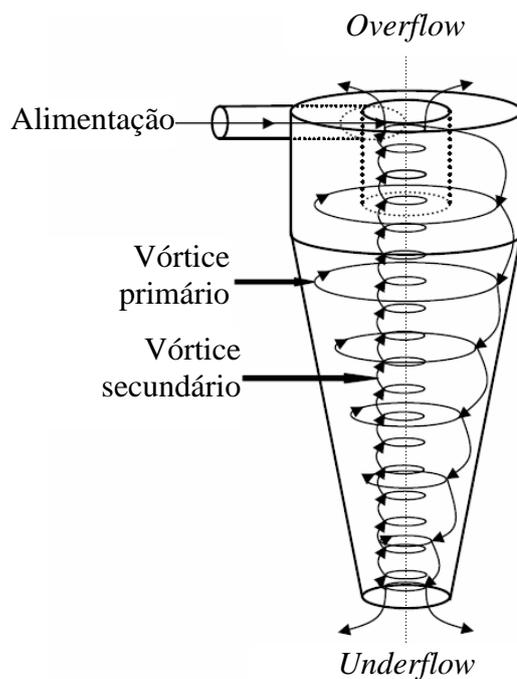


Figura 11- Vista em perspectiva de um hidrociclone e seu padrão de fluxo interno (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

Estudos utilizando três tipos diferentes de hidrociclones comerciais mostraram resultados que motivam o emprego de tal dispositivo na separação de células animais (LÜBBERSTEDT *et al.*, 2000a,b). Suspensões de células HeLa foram separadas utilizando os seguintes hidrociclones: Bradley 7 mm (diâmetro da parte cilíndrica), Mozley 10 mm e Dorr-Oliver 10 mm. Os melhores resultados foram obtidos com o hidrociclone Dorr-Oliver, com o qual se obteve uma eficiência de separação de 81%, quando operando a uma queda de pressão de 3 bar e uma vazão de 2,8 L/min. A operação com dois hidrociclones Dorr-Oliver conectados em série (o *overflow* do primeiro alimentando o segundo hidrociclone), a 2 bar de queda de pressão, permitiu obter-se uma eficiência global de separação de 94% (LÜBBERSTEDT *et al.*, 2000b). Os dados experimentais obtidos com os hidrociclones comerciais corroboraram com dados de fluidodinâmica computacional, segundo os quais altos níveis de eficiência para células de mamíferos foram obtidos com hidrociclones de diâmetros pequenos (10 mm) (MEDRONHO *et al.*, 2005).

A influência da queda de pressão na viabilidade de células HeLa no *underflow* e *overflow* foi analisada para os mesmos três tipos de hidrociclones comerciais (LÜBBERSTEDT *et al.*, 2000a). Foi possível observar que a viabilidade das células obtidas do *underflow* dos três hidrociclones não diminuiu, enquanto que no *overflow*, só foi observada queda na viabilidade em pressões acima de 3 bar. Apesar dos

relativamente altos níveis de tensão cisalhante gerados dentro do hidrociclone, as células foram capazes de resistir até este limite de queda de pressão. Isto acontece, provavelmente, devido ao baixo tempo de residência das células no interior dos hidrociclones, que varia na faixa de 0,03-0,1 segundo. Como o dano celular depende tanto da intensidade das forças quanto do tempo de exposição (YIM e AYAZI-SHAMLOU, 2000; BORN *et al.*, 1992, CASTILHO e ANSPACH, 2003), o curto tempo de residência pode explicar como as células resistem a altas tensões cisalhantes.

Devido à sua enorme simplicidade, os hidrociclones são equipamentos altamente apropriados na operação de biorreatores em perfusão durante longos períodos de tempo. Eles não apresentam partes móveis, sendo altamente apropriados para o uso em procedimentos estéreis, como os requeridos na indústria biotecnológica. Além do mais, para tal aplicação, eles não necessitam de manutenção, o que evita riscos adicionais e permite a operação contínua de biorreatores em perfusão por vários meses. Hidrociclones dimensionados para esta finalidade podem aumentar ainda mais a eficiência de separação, assim como, reduzir a perda de viabilidade celular. JOCKWER e colaboradores (2001) desenvolveram hidrociclones especialmente projetados para garantir uma alta eficiência de retenção quando utilizados em processos de cultivo de células animais (Figura 12). Foram utilizadas variações quanto ao diâmetro dos orifícios dos dutos de *overflow* (0,10, 0,15 e 0,20 cm) e *underflow* (0,20, 0,25 e 0,30 cm), resultando em 9 tipos diferentes de configurações de hidrociclones. Com exceção de uma configuração, todas as outras apresentaram altas eficiências de separação, alcançando até 99,1%, quando operados com uma queda de pressão de 1,0 bar. Este dispositivo foi utilizado com sucesso na operação de um biorreator de 5L durante 23 dias, mantendo a viabilidade celular acima de 90%. Devido às suas altas vazões, o hidrociclone HC2520 (0,25 cm de *underflow* e 0,20 cm de *overflow*) foi operado de forma intermitente.

Nos últimos estudos realizados com estes hidrociclones (ELSAYED *et al.*, 2006), culturas de células BHK e HeLa em baixas concentrações foram utilizadas para medir a eficiência de separação e queda de viabilidade durante um período de operação de 3 minutos. Os testes utilizaram quedas de pressão que variaram de 0,4 a 1,3 bar, correspondendo a volumes de cultura testados de 2,7 a 4,8L, respectivamente. As eficiências de separação observadas permaneceram na faixa de 77 a 97% e a viabilidade celular não foi alterada, com exceção da corrente proveniente do *overflow*. Sendo esta uma corrente usada para a coleta de produto, onde as células são descartadas, a

aplicação do hidrociclone não influenciaria negativamente na viabilidade do biorreator. Sugeriu-se neste trabalho, que somente células que passaram do vórtice primário para o secundário em sentido contrário, seriam danificadas. Para comprovar esta hipótese, os autores fecharam a saída do *overflow*, evitando a formação do vórtice secundário, de modo a manter as suspensões de células sujeitas somente às forças centrífugas responsáveis pela separação. Durante 3 horas de experimento, não foi observada influência significativa sobre a viabilidade das duas linhagens testadas. Devido aos resultados promissores obtidos com estes hidrociclones, os mesmos foram investigados na presente tese para a separação de células CHO.



Figura 12- Foto do hidrociclone especialmente projetado para a separação de células animais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral desta tese foi investigar o emprego de hidrociclones especialmente projetados para a separação de células animais, tanto em testes em batelada quanto em sistemas de cultivo em perfusão, assim como determinar a sua influência sobre a viabilidade da cultura e avaliar uma possível indução de mecanismos de morte celular.

3.2. Objetivos específicos

A primeira parte do presente trabalho consistiu na definição das condições operacionais ideais para a maximização da eficiência de separação das diferentes configurações de hidrociclones. Diferentes variáveis (queda de pressão, diâmetro do orifício do *overflow*, diâmetro do orifício do *underflow*) foram investigadas empregando, como ferramenta o planejamento estatístico de experimentos. Modelos matemáticos foram desenvolvidos com o objetivo de prever o desempenho destes hidrociclones (eficiência de separação, vazão de alimentação e razão de fluido).

Utilizando as condições ideais de operação e a configuração de hidrociclone que satisfaz às necessidades de separação, foram analisados os fatores e variáveis que influenciam na viabilidade da cultura. Nesta etapa, foram realizados experimentos em batelada para investigar a influência de uma única passagem pelo hidrociclone sobre os fenômenos de morte celular, utilizando teste específicos para a detecção da apoptose e necrose, determinando os possíveis mecanismos envolvidos.

Em uma terceira parte do trabalho, foram realizados cultivos em biorreator agitado operado em modo contínuo, utilizando o hidrociclone como dispositivo de retenção celular. As condições da cultura (viabilidade, células apoptóticas, células necróticas, distribuição de tamanho, produto de interesse, metabólitos e fontes de energia) foram analisadas para se avaliar a influência, a longo prazo, da exposição intermitente às condições hidrodinâmicas no interior do hidrociclone.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Meios de cultura e soluções

4.1.1. Meio de cultivo suplementado com 5% v/v de soro

Meio MEM (Cultilab, Campinas), contendo 4,5g/L de glicose e suplementado com NaHCO₃ (2,2g/L), foi preparado com água purificada por sistema de osmose reversa. Após o preparo, o meio foi esterilizado por meio de filtração, com pressão positiva, 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 a quantidade necessária de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas).

4.1.2. Meio de cultivo suplementado com 0,2 e 1% v/v de soro

O meio utilizado em culturas adaptadas à baixa concentração de SFB consiste em uma mistura 1:1 dos meios DMEM (Cultilab, Campinas) e Ham's F12 (Cultilab, Campinas), contendo 4,5 g/L de glicose. A metodologia de preparo foi a mesma descrita acima, adicionando-se ao meio DMEM 3,7 g/L de NaHCO₃, e ao meio Ham's F12, 1,2 g/L. O pH foi ajustado para valores em torno de 7,2 e 7,4 com HCl 5M.

4.1.3 Solução de tripsina-EDTA

Foi utilizada uma solução balanceada com tripsina (2,5 g/L) sem íons cálcio e magnésio e com um agente quelante (EDTA). Esta solução, obtida da Cultilab (Campinas, SP), age permitindo o desprendimento de células aderentes de frascos de cultivo, desagrega células entre si através de sua ação proteolítica sobre proteínas intercelulares e, ainda, altera a estabilidade das membranas ao quelar o íon cálcio.

4.1.4. Meio de congelamento

O meio de congelamento consiste de uma mistura contendo 80% v/v de soro fetal bovino, 12,5 % v/v de meio DMEM e 7,5% de dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma).

O meio de congelamento foi armazenado em refrigerador a 4° C e utilizado nesta mesma temperatura.

4.1.5. Solução de cristal violeta para coloração de núcleos

A solução é constituída de ácido cítrico (Sigma) 2,1% m/v, triton X-100 (Vetec, Brasil) 0,1% v/v e cristal violeta (Sigma) 0,05 m/v, em água destilada. Após a dissolução de todos os componentes, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm para a remoção de possíveis precipitados (SANFORD *et al.*, 1950).

4.1.6. Solução de azul de trypan para coloração de células

A solução é constituída de azul de trypan (Sigma) 0,5% m/v em solução salina 0,9% m/v tamponada com tampão fosfato 0,1M (PBS – *Phosphate Buffered Saline*), pH 7,1 – 7,3. Após a dissolução do azul de trypan, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm para a remoção de possíveis precipitados (KUCHLER, 2000).

4.2. Linhagem celular

A linhagem CHO.K1 (AC 110)(PUCK *et al.*, 1958) utilizada neste trabalho foi obtida da DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* – Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares), localizada em Braunschweig, Alemanha. A Linhagem recombinante expressando o GM-CSF humano (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Cultivos Celulares da Universidad Nacional del Litoral (Santa Fé, Argentina). A linhagem recombinante expressando EPO humana (eritropoetina) pertence ao centro de Inmunología Molecular (Havana, Cuba).

4.2.1. Criopreservação

As células CHO.K1 aderentes foram tripsinizadas quando atingiram a confluência em frascos T, centrifugadas (250g, 5 minutos) e então ressuspensas no meio de congelamento na concentração de 2-4x10⁶ células por mL. As células CHO.K1 adaptadas ao crescimento em suspensão foram centrifugadas e ressuspensas em meio

de congelamento na concentração de $2-4 \times 10^7$ células/mL. As células foram distribuídas em criotubos com capacidade de 1,8 mL (Corning), com volume de trabalho de 1mL. Os criotubos foram mantidos a -80°C por 24 horas em recipiente contendo isolamento de isopropanol (NALGENE®, *Cryo 1°C Freezing Container*), para se obter uma velocidade de resfriamento de $-1^\circ\text{C}/\text{minuto}$, seguindo imediatamente para estocagem em nitrogênio líquido na fase líquida (-196°C). Como teste de esterilidade e de viabilidade celular, um dos criotubos foi descongelado após uma semana do procedimento.

4.2.2. Descongelamento

Após a retirada do criotubo do nitrogênio líquido, as células foram rapidamente levadas ao banho termostático (37°C) e rapidamente descongeladas (2 minutos). O conteúdo foi ressuspensão em 20 mL de meio de cultivo em tubo para centrífuga de 50 mL (Corning) e centrifugado (250g, 5 minutos). Após a retirada do sobrenadante, foi realizada outra lavagem com 20 mL de meio de cultivo e centrifugado novamente. O precipitado foi, então, ressuspensão no meio de cultivo de manutenção suplementado com a quantidade de SFB para a qual a linhagem celular está adaptada. Células aderentes foram ressuspensas em 5 mL de meio de cultivo e inoculadas em frascos T de 25cm^2 , enquanto células em suspensão foram inoculadas em frascos do tipo *spinner* (Techne) com 50mL de volume de meio de cultivo.

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. Determinação da concentração celular

A quantificação celular em culturas em suspensão foi realizada pela técnica de contagem de núcleos corados com cristal violeta (SANFORD *et al.*, 1950). Culturas em suspensão tendem a formar grumos e, conseqüentemente, técnicas de contagem direta das células não são precisas neste tipo de sistema. Neste procedimento, os núcleos celulares são corados individualmente após o rompimento dos grumos e das células por choque osmótico e ação de detergente. Uma alíquota de 1 mL de suspensão celular recém-coletada foi centrifugada (250 g por 3 minutos), ressuspensa em 0,5 mL de solução de cristal violeta e agitada vigorosamente em agitador tipo *vortex* (MS2 Mini

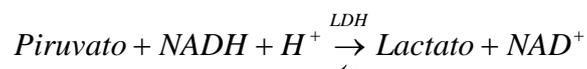
Shaker, IKA). A contagem dos núcleos corados foi realizada em câmara de Neubauer ao microscópio óptico.

4.3.2. Determinação de células não viáveis por exclusão de azul de trypan

A concentração de células não viáveis foi analisada pelo método de exclusão do corante vital azul de trypan 0,5% v/v (KUCHLER, 2000). A técnica se baseia na incorporação do corante nas células mortas, devido ao comprometimento da integridade da membrana plasmática, tornando-as azuis. O procedimento consiste em adicionar 40µL da solução de azul de trypan a um volume de 160µL de suspensão de células recém-coletadas. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer. Subtraindo-se a concentração de células não viáveis da concentração de núcleos (células totais), obteve-se a concentração de células viáveis. Os dados de viabilidade celular apresentados ao longo deste trabalho se referem à proporção entre células viáveis e células totais.

4.3.3. Dosagem da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante da cultura

A atividade da enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH) foi medida em sobrenadante isento de células após centrifugação (250 g, 5 minutos). A LDH foi dosada em triplicata em espectrofotômetro a 340 nm, à temperatura ambiente, em função de sua capacidade de catalisar a oxidação do NADH (RACHER *et al.*, 1989; DOYLE e GRIFFITHS, 1998). A reação foi iniciada com a adição de 1 mL de sobrenadante de cultura a uma mistura de 400 µL de piruvato 2,4 mM em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e 25 µL de NADH 6 mM em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2). Após o início da reação, a queda de absorbância foi acompanhada durante 1 minuto para determinar o consumo de NADH em condições de velocidade inicial de reação, possibilitando o cálculo da atividade da enzima LDH. Uma unidade (U) de atividade é definida como a quantidade de enzima que catalisa o consumo de 1 µmol de NADH por minuto, nas condições do ensaio.



4.3.4. Determinação da morte por apoptose e necrose

Uma suspensão de células foi misturada a corantes fluorescentes (laranja de acridina e brometo de etídio) que se ligam ao DNA e examinada ao microscópio de epi-fluorescência (marca Nikon, modelo TS-100F com dispositivo T1-FM EPI-FL) para visualização e quantificação de células normais, apoptóticas e necróticas, de acordo com aberrações visíveis da cromatina (MERCILLE e MASSIE, 1994a). Um volume de 4 µL de uma solução contendo 100 µg/mL de laranja de acridina (LA) (Fluka) e 100 µg/mL de brometo de etídio (Fluka) em PBS (pH 7,2) foi adicionada a 100 µL de suspensão celular (5×10^5 – 5×10^6 células/mL). Esta mistura foi examinada com objetiva de 40x utilizando epi-iluminação e combinação de filtros para fluoresceína. Por esta técnica, foi possível identificar cinco diferentes estágios fisiológicos da célula: células viáveis não apoptóticas (VNA), viáveis apoptóticas (VA), não-viáveis apoptóticas (NVA), necróticas (NEC) e livres de cromatina (LC).

4.3.5. Determinação da distribuição de tamanho das células CHO.K1

A determinação da distribuição de tamanho das células CHO.K1 foi realizada em equipamento Malvern Mastersizer Micro “Plus”, MAF 5001. Uma amostra de 500mL de suspensão celular em meio DMEM-Ham’s F12, suplementado com 1 % de SFB, foi analisada.

4.3.6. Determinação da concentração de glicose e lactato

A análise da concentração de glicose e lactato presente no sobrenadante do meio de cultivo foi realizada utilizando-se o analisador enzimático YSI-2700 (Yellow Springs Instruments, EUA), com membrana própria para a detecção de glicose e lactato, respectivamente.

4.3.7. Citometria de fluxo

Durante o processo de apoptose, ocorre a fragmentação do DNA em fragmentos de baixa massa molar. Após um tratamento de permeabilização das células, esses

fragmentos são liberados e o conteúdo de DNA das células apoptóticas é reduzido. Utilizando marcadores fluorescentes de ácidos nucleicos, como o iodeto de propídio, as células apoptóticas apresentam uma intensidade menor do que células normais ao serem excitadas. Na citometria de fluxo, essa população pode ser prontamente identificada e quantificada.

As amostras coletadas para a análise do ciclo celular foram centrifugadas (300 g, 5 minutos) e, em seguida, lavadas em PBS e ressuspensas em solução de metanol/acetona na proporção 4:1. As amostras foram armazenadas a 4° C até o momento do processamento para a análise. Após nova centrifugação a 300 g por 5 minutos, as células foram lavadas em PBS e ressuspensas em 25 µL de solução de RNase a 100 µg/mL e, posteriormente, em 250 µL de solução de iodeto de propídio a 100 µg/mL, incubando-se por 20 minutos a 37° C. A análise do conteúdo de DNA marcado com iodeto de propídio foi realizada utilizando um *FACScan flow cytometer* (Beckton Dickinson, EUA). Imediatamente após a marcação a análise foi efetuada com um feixe de laser de argônio a 488nm. A fluorescência do iodeto de propídio foi detectada com filtro na faixa de 620-700 nm. Foram coletados cerca de 10000 eventos por amostra. Os dados adquiridos foram analisados no programa FlowJo 7.2.1 (Tree Stars, Inc.EUA) (DALM *et al.*, 2004).

4.3.8. ELISA competitivo para dosagem de GM-CSF

O ELISA competitivo consiste em um imuno-ensaio específico para a quantificação de GM-CSF presente no meio de cultura. A quantificação foi realizada mediante a comparação das amostras com uma concentração conhecida de GM-CSF padrão (FOGOLÍN *et al.*, 2002). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com a proteína padrão de GM-CSF humano recombinante (Leucocitim - Molgramostim). A sensibilização consistiu em adicionar 100 µL por poço de solução de rhGM-CSF padrão diluído em tampão de sensibilização carbonato/bicarbonato 50mM (pH 9,6), a concentração de 0,165 µg/mL (16,5 ng/poço). Incubou-se por 1 hora a 37°C e, posteriormente, durante a noite a 4° C. Em seguida, lavou-se por 6 vezes consecutivas em PBS+TWEEN 20 0,05% (6X) e realizou-se o bloqueio dos sítios de ligação inespecífica com 200 µL de PBS + SFB 5% V/V por poço, por 1 hora a 37°C. As amostras e padrão foram analisadas em diluição seriada de 1:2. A faixa de concentração do padrão foi de 100ng/mL até 0,78ng/mL. A competição foi realizada incubando as

placas sensibilizadas com 100 µL de amostra e, em seguida, com o anticorpo primário (M7E10 anti-GM-CSF, ascite gentilmente cedido pelo Laboratório de Cultivos Celulares da Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina) diluído 1:100.000 em PBS + SFB 5% V/V. As placas foram incubadas por 2 horas a 37° C. Após lavagem, 100 µL da solução de anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP – *Horseradish Peroxidase*) diluído 1:1.000 foi adicionado a cada poço. Após incubação a 37° C por 1 hora, as placas foram lavadas e o substrato da reação adicionado, 100 µL por poço da solução de o-fenilenodiamina (OPD) 0,5ng/mL e H₂O₂ em tampão fosfato/citrato 50 mM, pH 5,3. A reação foi interrompida adicionando-se 50µL/poço de ácido sulfúrico 2N. A leitura de absorbância foi realizada a 492nm em leitor de micro placas (PowerWave XS, Biotek Instruments Inc., EUA).

4.4. Crescimento celular

4.4.1. Propagação em monocamada

As células CHO.K1 foram propagadas em frascos T de 25, 75 e 150 cm² em meio MEM suplementado com 5% v/v de SFB, incubadas em estufa (Thermoforma) climatizada a 37° C e com atmosfera umedecida contendo 5% v/v de CO₂. Após o estabelecimento de uma monocamada confluenta, o sobrenadante da cultura foi aspirado e a monocamada lavada com meio sem SFB (0,1 mL/cm²). Após a retirada do meio de lavagem, acrescentou-se a solução de tripsina (0,05 mL/cm²), e retirou-se o excesso logo em seguida. O frasco foi mantido em estufa a 37°C, onde permanece até que as células se desprendam (3 a 5 minutos). Após a verificação em microscópio invertido (Nikon, modelo TS-100F), as células foram ressuspensas em meio contendo SFB para neutralizar a ação da tripsina, centrifugadas (250 g por 5 minutos) e o sobrenadante descartado. Após ressuspender o sedimentado em meio de cultivo, procedeu-se a quantificação celular e distribuição em novos frascos na concentração de inóculo de 1-3 x 10⁴ células/cm².

4.4.2. Propagação em suspensão

As células adaptadas à suspensão foram mantidas em frascos do tipo *spinner* (Techne, EUA) de 125, 250 e 500 mL de volume médio, sob agitação de 40 rpm, incubados em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO₂. As culturas em suspensão foram iniciadas, inoculando-se 1 x 10⁵ células/mL no volume de trabalho do *spinner*. A concentração e viabilidade celular foram acompanhadas diariamente pelos métodos de coloração de núcleos e exclusão do azul de trypan, respectivamente. Quando a concentração celular alcançava 1-2 x 10⁶ células/mL (início da fase estacionária), as culturas eram repicadas, retirando-se o volume necessário de cultura. Procedia-se à centrifugação e o sedimentado era ressuspensão na quantidade necessária de meio de cultivo para se iniciar um novo *spinner*.

O biorreator BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co. EUA) foi operado com um volume de 1000 mL de meio, com agitação de 50 rpm. Os cultivos em biorreator foram iniciados com uma concentração celular de, no mínimo, 2 x 10⁵ células/mL. O sistema foi equipado com eletrodos para determinação de oxigênio dissolvido e pH. Estas variáveis foram controladas em 50% da saturação do ar e 7,2, respectivamente, através da injeção de uma mistura contendo nitrogênio, oxigênio, gás carbônico e ar em proporções variáveis. A temperatura foi controlada em 37°C. Foi realizada a oxigenação livre de bolhas utilizando cerca de 4 metros de tubo de silicone (Diâmetro interno: 1,0 mm; Diâmetro externo: 1,4 mm) por litro de meio de cultivo.

O biorreator de 300L (Centro de Inmunología Molecular, Havana, Cuba) foi operado com um volume inicial de 300 L de meio. Foi utilizado meio livre de SFB (PFHM II, Gibco) na manutenção da cultura da linhagem recombinante de CHO expressando o biofármaco eritropoetina (EPO). O pH e níveis de oxigênio foram controlados como descrito anteriormente. A oxigenação foi realizada por borbulhamento. Os cultivos em biorreator foram iniciados com uma concentração celular de 2 x 10⁵ células/mL. A temperatura foi controlada em 37°C.

4.5. Adaptação ao cultivo em suspensão

A adaptação de células CHO.K1 ao cultivo em suspensão seguiu o protocolo apresentado por SINACORE *et al.*, (2000). Uma alta concentração de células recém-tripsinizadas, cultivadas em frascos T, foi empregada como inóculo inicial (5 x 10⁵

células/mL) em meio MEM suplementado com 5% v/v de SFB. As células foram mantidas em suspensão pela agitação de um pêndulo magnético no interior do *spinner* com velocidade de rotação de 40 rpm. A quantificação da concentração e viabilidade celular da cultura foi realizada diariamente. A cultura foi repicada em um período de 4-5 dias após a inoculação ou quando a concentração celular atingisse 1×10^6 células/mL, podendo-se separar os grumos celulares maiores por decantação, descartando-os a cada passagem.

As linhagens recombinantes, produtoras de GM-CSF e EPO usadas neste trabalho já se encontravam adaptadas ao cultivo em suspensão.

4.6. Adaptação ao meio com 1% de soro

A adaptação de células CHO.K1 ao meio DMEM+Ham's F12 suplementado com 1% v/v de SFB foi realizado gradualmente como recomendado pela empresa InvitrogenTM. A adaptação seqüencial consiste em misturar o meio MEM com 5% de SFB e a mistura DMEM+Ham's F12 com 1% de SFB em diferentes proporções, reduzindo a concentração final de SFB a cada passagem, como pode ser visualizado abaixo:

Passagem 1:	75% MEM (5%) : 25% mistura (1%)	4,0% SFB
Passagem 2:	50% MEM (5%) : 50% mistura (1%)	3,0% SFB
Passagem 3:	25% MEM (5%) : 75% mistura (1%)	2,0% SFB
Passagens 4-6:	10% MEM (5%) : 90% mistura (1%)	1,4% SFB
Passagem 7:	100% mistura (1%)	1,0% SFB

As linhagens recombinantes utilizadas neste trabalho já se encontravam adaptadas a níveis baixos ou nulos de SFB.

4.7. Procedimentos experimentais com hidrociclones

Os hidrociclones utilizados neste trabalho foram especialmente desenvolvidos para gerar altas eficiências de retenção celular (JOCKWER *et al.*, 2001). Estes equipamentos possuem dupla entrada tangencial e a possibilidade de escolha de dois diâmetros do orifício de saída da corrente concentrada (*underflow*) (D_u de 0,20 cm e 0,30 cm) e três diâmetros do orifício de saída da corrente diluída (*overflow*) (D_o de 0,10

cm, 0,15 cm e 0,20 cm). Através da combinação dos diâmetros dos dois orifícios, seis diferentes geometrias de hidrociclones foram testadas neste trabalho, sendo denominadas de acordo com os seus diâmetros de *overflow* e *underflow*. A nomenclatura consiste de 4 algarismos, sendo os dois primeiros relacionados ao diâmetro do *underflow* e os dois últimos ao *overflow* (por exemplo, o HC 2010 possui 0,20 cm de diâmetro do *underflow* e 0,10 cm de diâmetro do *overflow*).

4.7.1. Testes em batelada

4.7.1.1. Estudo das variáveis seguindo planejamento experimental

Utilizando métodos estatísticos de planejamento experimental, é possível especificar condições experimentais de forma a maximizar a quantidade de informação que pode ser obtida com o mínimo de experimentos. A importância das variáveis (D_o , D_u e queda de pressão) e efeitos das interações foram investigados utilizando um planejamento fatorial fracionado a 2 níveis. A matriz de experimentos planejados com três variáveis é apresentada na Tabela 4. Além dos 4 experimentos fatoriais, foram adicionadas 4 corridas extras, relativas às duplicatas dos pontos centrais das variáveis D_o e pressão, para avaliar o erro experimental.

Tabela 4- Matriz de experimentos. As variáveis testadas são o diâmetro do *underflow* (D_u), o diâmetro do *overflow* (D_o) e a queda de pressão (ΔP), as quais são mostradas abaixo em seus valores absolutos e normalizados (os quais estão entre parênteses).

Experimentos	D_u	D_o	ΔP
1	0,20 cm (-1)	0,10 cm (-1)	1 bar (-1)
2	0,20 cm (-1)	0,20 cm (+1)	3 bar (+1)
3	0,30 cm (+1)	0,10 cm (-1)	1 bar (-1)
4	0,30 cm (+1)	0,20 cm (+1)	3 bar (+1)
5 e 6	0,30 cm (+1)	0,15 cm (0)	2 bar (0)
7 e 8	0,20 cm (-1)	0,15 cm (0)	2 bar (0)

Os testes de separação das células foram conduzidos utilizando um tanque de aço inox, onde a suspensão de células previamente cultivadas em frascos do tipo *spinner* a 1% v/v de soro fetal bovino (SFB) foi diluída diretamente em PBS. A suspensão de células resultante apresentava uma concentração de $6-7 \times 10^4$ células/mL. A alimentação dos hidrociclones foi efetuada através da pressurização do tanque com ar comprimido

(Figura 13). Durante os experimentos, a suspensão celular foi homogeneizada. As vazões das correntes de saída foram determinadas realizando a coleta cronometrada em bécheres. As vazões foram calculadas, levando em consideração a massa da amostra, sua densidade ($1,008 \text{ g/cm}^3$) e o tempo de coleta.

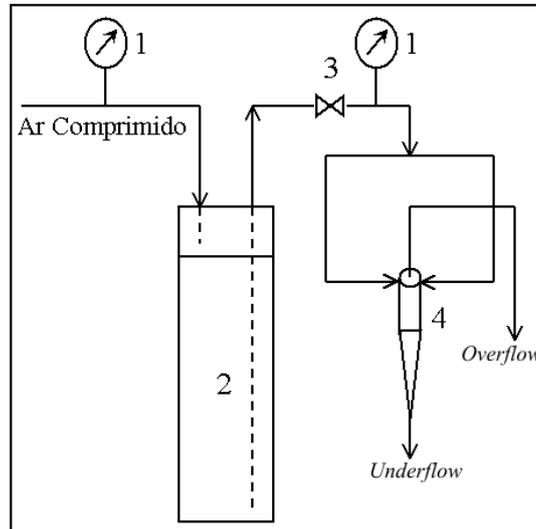


Figura 13- Esquema do sistema experimental mostrando os manômetros (1), o tanque com a suspensão de células (2), a válvula de esfera (3) e o hidrociclone (4).

Amostras de 50 mL foram coletadas das correntes do *overflow* e *underflow* para as análises de concentração, viabilidade celular e dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH). Após a coleta, as amostras de 50 mL foram centrifugadas (250g por 5 minutos) e, em seguida, o sedimentado foi ressuspenseo em 5 mL de meio de cultivo, para a quantificação de concentração e viabilidade celular, e o sobrenadante armazenado em refrigerador (4° C) para a dosagem de LDH.

A eficiência de separação (E) foi obtida como a fração de células (em número) recuperada no *underflow* (Equação 1).

$$E = \frac{Q_u X_u}{QX} \quad (1)$$

onde Q_u , X_u , Q e X são as vazões e concentrações do *underflow* e da alimentação, respectivamente.

Os dados obtidos foram analisados no pacote STATISTICA (versão 6.0), com a finalidade de obterem-se modelos matemáticos para a vazão, a eficiência de separação e a razão de fluido (R_f), a qual, em sistemas diluídos, pode ser descrita pela Equação 2.

$$R_f = \frac{X_u}{X} \quad (2)$$

A modelagem realizada no pacote STATISTICA (6.0) utilizou o recurso de estimação não-linear de parâmetros com a função objetivo de mínimos quadrados.

4.7.1.2. *Teste da eficiência de separação*

Com o intuito de avaliar a eficiência de separação das diferentes configurações de hidrociclones em um sistema similar ao encontrado em cultivos em biorreatores, testes foram realizados a uma queda de pressão de 1 bar, utilizando bombas peristálticas. As configurações testadas foram 2010, 3020, 2015 e 2515. Uma configuração (2010) foi testada com dois tipos diferentes de bomba peristálticas: uma de baixa pulsação com cabeçote duplo (Watson Marlow, modelo 520U com cabeça 505L) e outra com cabeçote simples (Watson Marlow, modelo 701). Uma suspensão de células em meio de cultura, oriunda de um frasco *spinner* e inicialmente com viabilidade superior a 97%, foi bombeada (uma passagem) sob condições estéreis através do hidrociclone a uma queda de pressão de 1 bar.

4.7.1.3. *Teste da indução de mecanismos de morte celular*

A avaliação de possíveis efeitos da passagem pelo HC sobre a indução da apoptose foi realizado com os hidrociclones de configurações 3020 e 2010. Foram utilizadas as linhagens CHO.K1 e CHO GM-CSF com a finalidade de averiguar diferenças de susceptibilidade ao cisalhamento entre as duas linhagens. A linhagem CHO.K1 foi testada com o 3020 e no experimento controle, enquanto a linhagem recombinante foi testada com as configurações 3020 e 2010. As suspensões de células em meio de cultura, oriundas de um frasco *spinner* e inicialmente com viabilidade superior a 97%, foi bombeada (uma passagem) sob condições estéreis através do HC com bomba Watson Marlow (modelo 520U com cabeça 505L) a uma queda de pressão de 1 bar. A corrente de *underflow* foi coletada em *spinner* estéril e incubada a 37°C por 48 horas para testes de apoptose, LDH, amônia, lactato e avaliação da cinética de crescimento. O experimento controle foi realizado na ausência do hidrociclone, passando a suspensão celular somente pela bomba e pelas mangueiras que levam ao *spinner*.

4.7.2. Testes em perfusão

O biorreator de 1L (New Brunswick, modelo BioFlo 110) foi operado em modo de batelada até alcançar a concentração celular de $1-2 \times 10^6$ células/mL e uma concentração de glicose inferior a 1g/L, quando se iniciou o cultivo contínuo com retenção celular (perfusão). A operação do hidrociclone foi intermitente e ocorreu sempre que a concentração de glicose atingiu níveis inferiores a 1g/L. Amostras foram coletadas diariamente, antes e após cada operação do dispositivo de separação, para a realização dos testes de quantificação e viabilidade celular, apoptose, LDH, GM-CSF, glicose e lactato.

No caso do biorreator de 300L, inicialmente este foi operado em perfusão com um dispositivo de filtro de malha rotativa (“spin-filter”) durante 23 dias, quando ocorreu o entupimento completo da malha e se iniciou um regime contínuo sem reciclo celular por mais 6 dias. Após este período, o hidrociclone (2517, D_u : 2,5mm e D_o : 1,7mm) foi conectado a linha de coleta e operado de forma intermitente para o ajuste da taxa de perfusão requerida. Amostras foram coletadas diariamente, antes de cada operação do dispositivo de separação, para a realização dos testes de quantificação e viabilidade celular, apoptose, quantificação de EPO e glicose.

Devido à alta vazão da corrente de *overflow* dos hidrociclones testados, nos dois biorreatores, a operação do hidrociclone foi realizada de forma intermitente para satisfazer a taxas de perfusão necessárias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Adaptação ao cultivo em suspensão e em baixos níveis de soro

As células CHO.K1, obtidas da DSMZ (Coleção Alemã de Microorganismos e Cultura Celular), crescem normalmente aderidas a uma superfície. Esta característica remete à sua natureza tecidual, uma vez que a seleção do clone que originou a linhagem atual foi realizada a partir do tecido do ovário de um hamster chinês desmembrado com proteases (PUCK *et al.*, 1958). Os processos de adaptação de linhagens normalmente aderentes são descritos em diversas publicações (WU *et al.*, 1990; HALDANKAR *et al.*, 1999; SINACORE *et al.*, 2000). A adaptação de linhagens celulares pode ser um processo longo, começando pela seleção de células provenientes de uma monocamada celular que sobrevivem em suspensão. Agitação branda é aplicada a esta cultura a fim de não permitir a sedimentação das células. A literatura mostra que algumas linhagens celulares são facilmente adaptadas ao cultivo em suspensão e a meios livre de SFB, como é o caso da BHK-21 e da CHO.K1 (HALDANKAR *et al.*, 1999, TOKASHIKI e YOKOYAMA, 1997). A linhagem CHO.K1, quando adaptada, consegue atingir concentrações de $1-2 \times 10^6$ células/mL em frascos tipo *spinner*, com um período de duplicação de aproximadamente 24-30 horas (SINACORE *et al.*, 2000; HALDANKAR *et al.*, 1999).

A passagem direta de células CHO.K1 aderentes ao cultivo em suspensão em meio MEM suplementado com 5% v/v de SFB possibilitou a obtenção de uma cultura com taxas de crescimento compatíveis às registradas nos trabalhos citados (Figura 14). A viabilidade celular obtida se manteve acima de 95% durante o período de crescimento (4 dias), após o qual se verificou queda, provavelmente devido à exaustão de um nutriente essencial ou acúmulo de um metabólito tóxico em concentrações inibitórias. Em vista dos resultados obtidos, concluiu-se que a linhagem estava adaptada ao crescimento em suspensão. Durante o processo de adaptação foi possível observar grumos celulares de tamanhos variados. À medida que passagens progressivas foram realizadas, o tamanho médio dos grumos foi reduzido, porém a sua presença persistiu mesmo após as células se adaptarem ao crescimento em suspensão. A formação de grumos é uma medida de auto-proteção celular que ocorre naturalmente neste processo, como observado por diferentes autores (HALDANKAR *et al.*, 1999, HU *et al.*, 1997).

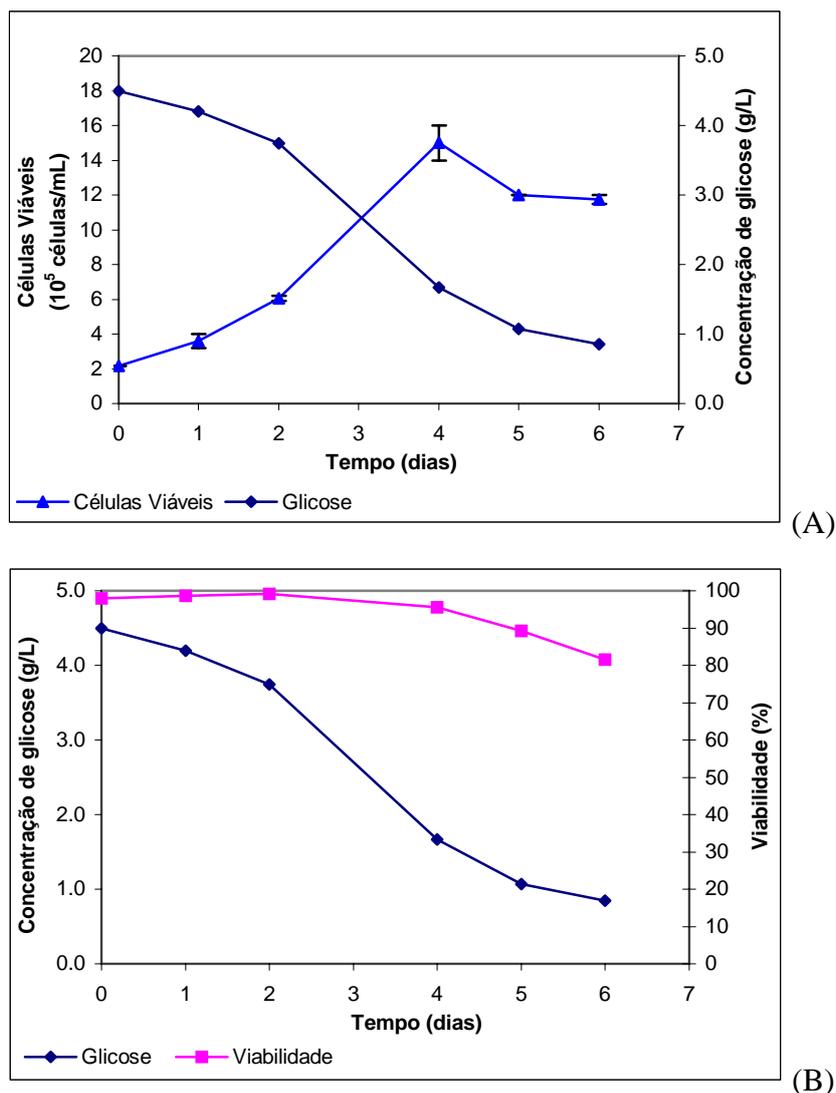


Figura 14- Adaptação da linhagem CHO.K1 ao cultivo em suspensão. A concentração celular máxima (A) é obtida em 4 dias de cultivo com alta viabilidade (B) e consumo esperado de glicose.

O soro fetal bovino é amplamente utilizado como suplemento ao meio de cultivo de células animais, provendo este com fatores de crescimento, hormônios e nutrientes que complementam a composição de meios como o MEM (DOYLE e GRIFFITHS, 1998). A iniciativa de remoção do soro dos processos de produção de biofármacos se justifica por diversos fatores. Agências regulatórias estão progressivamente inibindo o uso de constituintes de origem animal devido à possibilidade de transmissão de certos patógenos, como o responsável pela encefalite bovina espongiiforme (LUBINIECKI, 1998). O soro também pode significar uma importante fonte de contaminação das culturas com micoplasma, que podem alterar o padrão de crescimento celular. O alto custo inerente ao uso do soro e sua grande concentração de proteínas também são

fatores que desfavorecem o seu uso quando se trata de cultivos em grande escala, uma vez que aumenta o custo do cultivo e dos processos de purificação da proteína recombinante (HALDANKAR *et al.*, 1999, ZANGHI *et al.*, 1999).

Além das motivações acima, diminuir a concentração do SFB neste trabalho mostrou-se importante para evitar a formação de espuma durante os testes com o hidrociclone e operação do biorreator. A espuma formada está relacionada à degradação e desnaturação das proteínas séricas. Quando as células estão em um ambiente como a superfície de uma bolha que se rompe, as tensões a que elas estão sujeitas são muito fortes, comprometendo a membrana celular e lisando as células (CHISTI, 2001). A eliminação completa do SFB de uma cultura afeta significativamente a viabilidade celular, inibindo o crescimento, sendo necessária a substituição dos meios comuns por meios especialmente formulados para este (DOYLLE e GRIFFITHS, 1998). A mistura 1:1 dos meios clássicos DMEM e Ham's F12 é comumente utilizada na adaptação de culturas a condições de baixa concentração de soro, e foi utilizada com êxito no presente trabalho. Após a adaptação gradativa à mistura contendo (1% SFB), as culturas foram capazes de alcançar 2×10^6 células/mL com viabilidades superiores a 90% durante toda fase exponencial e estacionária (Figura 15). ZANGHI e colaboradores (1999) observaram os efeitos da privação de SFB em cultivos com células CHO, constatando que a sua ausência pode induzir mecanismos de morte celular por apoptose pela exaustão de nutrientes como a glicose, devido ao seu consumo acelerado. No presente trabalho, apesar da redução significativa na concentração de soro, a cultura em questão não apresentou aumento no consumo de glicose, passando até mesmo a utilizar de forma mais eficiente a glicose disponível (Figuras 14 e 15). Tampouco foram observadas, após a adaptação, queda de viabilidade e morte celular prematura ao final da fase exponencial e durante a fase estacionária.

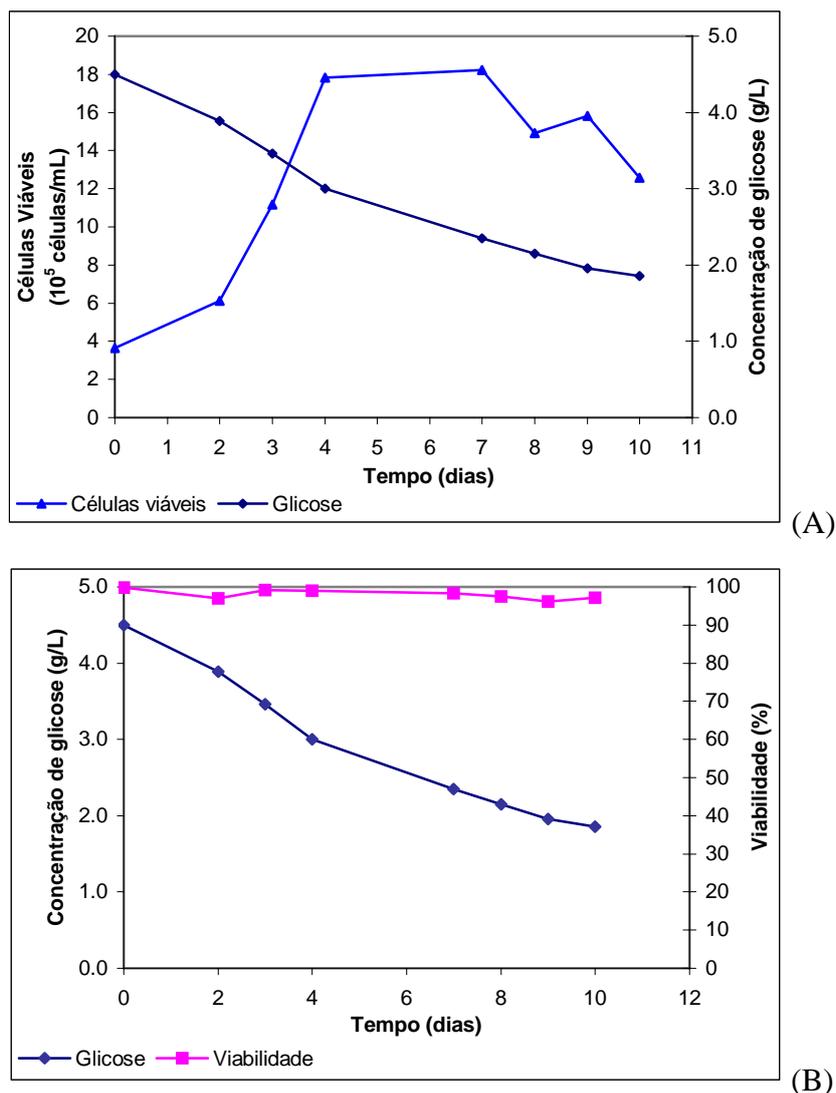


Figura 15- Adaptação da linhagem CHO.K1 ao cultivo em meio DMEM+Ham's F12 (1:1) suplementado com 1% v/v SFB. A concentração celular máxima (A) é obtida entre o 4^o e 6^o dias de cultivo com alta viabilidade (B).

5.2. Estudo de variáveis geométricas e operacionais na separação de células CHO por Hidrociclones

Com o objetivo de determinar a geometria do hidrociclone e a queda de pressão mais adequadas para a separação de células CHO, foi realizado um planejamento estatístico de experimentos para avaliar estas variáveis.

Suspensões de células CHO.K1 mantidas em meio DMEM+Ham's F12 (1% SFB) foram alimentadas, a partir de um tanque de aço inox pressurizado, às seis configurações de hidrociclones testadas, resultantes da combinação dos diferentes diâmetros de *underflow* e *overflow*. Os resultados obtidos para todas as geometrias testadas são mostrados na Tabela 5 e na Figura 16 em termos de vazão de alimentação

(Q), razão de fluido (R_f), queda de viabilidade no *underflow* (ΔV_u) e eficiência de separação (E). No caso do hidrociclone 3010 ($D_u = 0,3$ cm e $D_o = 0,1$ cm), a razão de fluido obtida foi de 100%, indicando que esta configuração é inadequada para efetuar qualquer tipo de separação. Todas as demais geometrias testadas apresentaram eficiências de separação acima de 97%. A queda de viabilidade no *underflow* se manteve na faixa de 2,9% a 5,8% para as configurações 2010, 3020 e 3015, enquanto as geometrias 2015 e 2020 resultaram em perdas de viabilidade maiores (9,1% e 14,4%, respectivamente). Os dados obtidos pelo método de exclusão do azul de trypan foram confirmados pela dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase no meio de cultivo, tendo-se observado níveis coerentes com a viabilidade celular medida após cada experimento (Figura 16. Em células não viáveis, esta enzima intracelular é liberada, detectando-se sua atividade no meio de cultura (RACHER *et al*, 1989).

Tabela 5- Separação de células CHO.K1 mantidas em meio DMEM+Ham's F12 (1% SFB). Vazão de alimentação (Q), razão de fluido (R_f), atividade de LDH, queda de viabilidade no *underflow* em relação a alimentação (ΔV_u) e eficiência de separação (E) para os diferentes hidrociclones (HC) às dadas quedas de pressão (ΔP).

HC	D_u (cm)	D_o (cm)	ΔP (bar)	Q (L/min)	R_f (%)	LDH (U/L)	ΔV_u (%)	E (%)
2010	0,20	0,10	1	1,13	93,9	12,1	5,8	99,6
2015	0,20	0,15	2	1,60±0,01	77,4±0,1	14,6±1,4	9,1±0,8	99,7±0,2
2020	0,20	0,20	3	2,12	60,4	21,1	14,4	97,9
3010	0,30	0,10	3	2,46	100,0	--	--	--
3015	0,30	0,15	2	2,01±0,02	97,3±0,1	11,41±0,9	5,7±1,9	99,9±0,0
3020	0,30	0,20	1	1,44	87,8	11,7	2,9	99,1

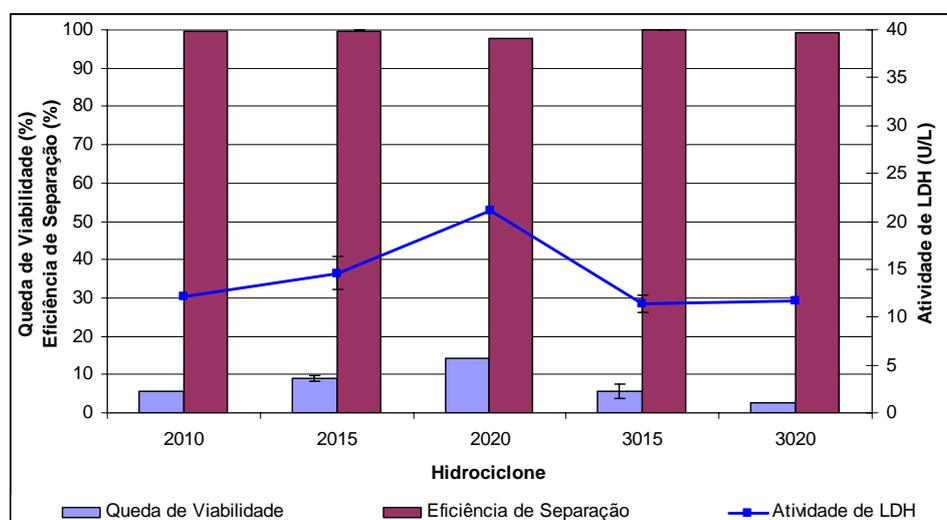


Figura 16- Quedas de viabilidade e eficiências de separação nos hidrociclones testados com células CHO.K1 mantidas em meio MEM (1% SFB).

As quedas de viabilidade obtidas variaram consideravelmente. Os valores observados neste trabalho são superiores aos encontrados para a separação de células HeLa em um hidrociclone da marca "Dorr-Oliver" (LÜBBERSTEDT *et al.*, 2000a). No entanto, em alguns casos, os valores obtidos são menores (2,9 a 9,1% para as configurações 2010, 2015, 3015 e 3020) quando comparados com testes realizados anteriormente com estes hidrociclones em culturas de células CHO mantidas em meio livre de SFB (JOCKWER *et al.*, 2001). A configuração 2020 apresentou queda de viabilidade no mesmo nível do trabalho citado anteriormente (14,4%). Estes resultados indicam uma diferença de sensibilidade de células CHO e células HeLa às tensões cisalhantes geradas no interior do hidrociclone. Além do mais, os resultados também sugerem que, quando comparados com os resultados dos experimentos realizados com meio livre de soro, a presença de proteínas séricas pode estar atuando como protetor físico nas culturas mantidas com 1% de SFB, fato já observado em culturas de hibridomas (VAN DER POL *et al.*, 1990).

A desagregação de grumos celulares pelas altas taxas de cisalhamento no interior do hidrociclone pode ser um importante fator que aumenta artificialmente a queda da viabilidade da cultura, já que apenas células isoladas são consideradas na medida de viabilidade celular. Culturas de linhagem CHO.K1 formam naturalmente grumos de células que são facilmente observados a olho nu ou ao microscópio óptico. A difusão de nutrientes e oxigênio para o interior dos grumos é dificultada, podendo gerar uma quantidade de células não-viáveis que não são detectáveis pelas técnicas de exclusão do corante vital, gerando dados super-estimados para a viabilidade celular. Diversos estudos (MERCILLE *et al.*, 1994; CASTILHO, 2001) mostraram que o tratamento de culturas de CHO com DNase é capaz de desagregar os grumos celulares, aumentando significativamente a concentração de células não-viáveis. Um dos fatores que pode ter gerado a queda de viabilidade das células recuperadas na corrente concentrada do *underflow* é, portanto, a desagregação dos grumos celulares liberando células não-viáveis para a contagem em câmara de Neubauer. Visualmente, foi possível observar que as suspensões de células coletadas no *underflow* apresentaram uma redução no número e tamanho dos grumos, quando comparadas à suspensão celular alimentada aos hidrociclones. Através da medida da distribuição de tamanho das células alimentadas ao hidrociclone, realizada em um equipamento Malvern Mastersizer (Figura 17), foi possível detectar a presença de células com diâmetro médio em torno de 12 μm e

agregados celulares na faixa de 50-200 μm , característicos da linhagem CHO quando cultivada em suspensão.

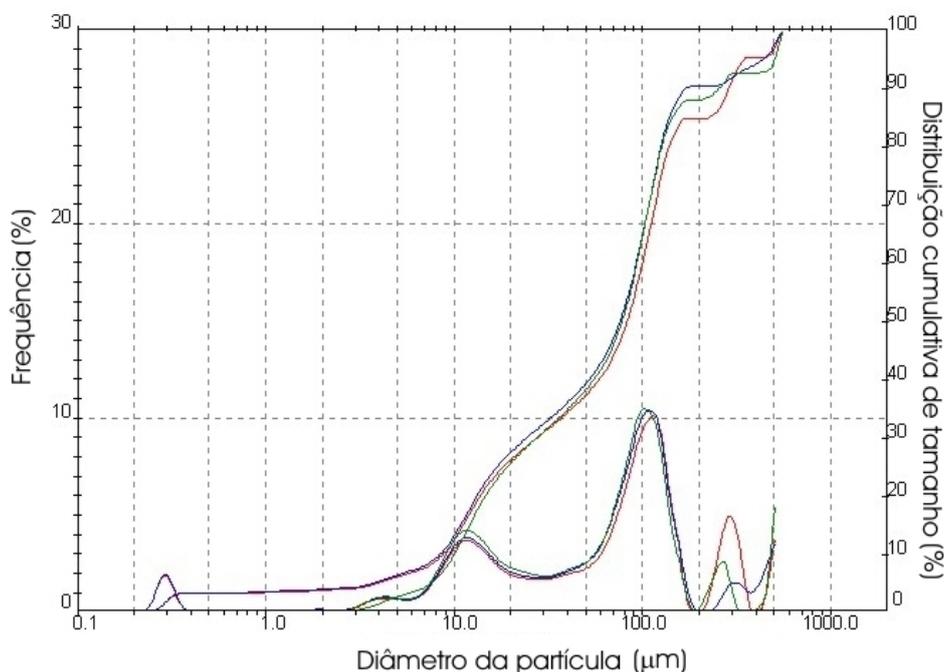


Figura 17- Distribuição de tamanhos da uma cultura mantida com meio DMEM+Ham's F12 (1%SFB), posteriormente alimentada ao hidrociclone.

Os níveis de eficiência de separação obtidos no presente trabalho (Figura 16) são superiores aos usualmente reportados na literatura para outros tipos de equipamentos de separação de células. Por exemplo, WEN e colaboradores (2000), empregando dois sedimentadores em série para a retenção de células de hibridoma produtoras de uma imunoglobulina G, obtiveram eficiências de separação de 88%. IDING e colaboradores (2000), estudando o cultivo de células CHO em perfusão, utilizando um filtro de malha rotativa (*spin-filter*) como dispositivo de retenção celular, obtiveram eficiências de separação na faixa de 75% a 95%. Além disso, diferentemente dos hidrociclones, os filtros de malha rotativa têm a desvantagem de apresentar colmatção progressiva da malha filtrante, o que ocasiona a interrupção do processo de cultivo em perfusão devido ao colapso do equipamento de retenção celular (ESCLADE *et al.*, 1991). Mesmo a menor eficiência observada neste trabalho (97,9%) ainda se mostrou superior à maior eficiência (81%) obtida por LÜBBERSTEDT *et al.* (2000b) com hidrociclones Mozley e Dorr-Oliver, ambos com 10 mm de diâmetro e de Bradley de 7 mm.

Com base nos resultados mostrados na Tabela 5, foram obtidos modelos empíricos para descrever a vazão (Q) e a eficiência de separação (E) em função das variáveis geométricas (D_u e D_o) e da queda de pressão aplicada (ΔP).

O modelo obtido para a vazão (Equação 3) apresentou coeficiente de correlação de 0,961. A Figura 18 compara o valores previstos pela equação 3 com os valores observados experimentalmente, considerando um intervalo de confiança de 98%.

$$Q = 3,42D_u^{0,75} \Delta P^{0,62} \quad (3)$$

onde D_u está em cm, ΔP em bar e Q em L/min.

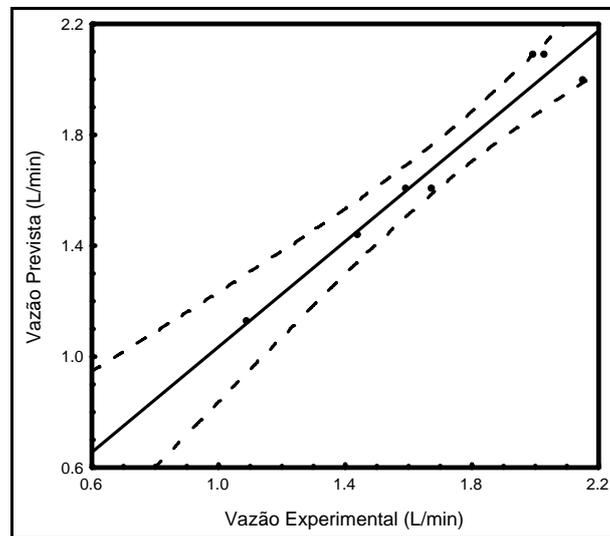


Figura 18- Vazões experimentais *versus* previstas para um intervalo de confiança de 98%.

A equação 4 mostra o modelo encontrado para a eficiência total, o qual apresenta coeficiente de correlação de 0,988. Os valores observados e aqueles previstos pelo modelo, considerando-se um intervalo de confiança de 98%, encontram-se mostrados na Figura 19.

$$E = 90,29D_o^2 + 112,34D_u^2 - 3,56\Delta P^2 - 374,34D_oD_u + 66,43D_o\Delta P \quad (4)$$

onde D_o e D_u estão em cm, ΔP em bar e Q em $L \text{ min}^{-1}$.

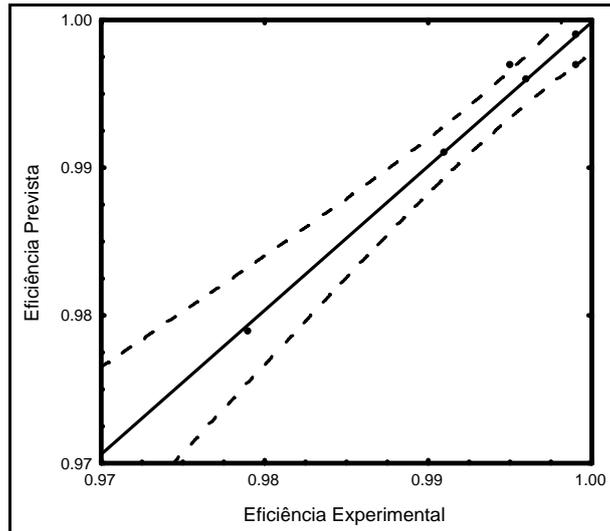


Figura 19- Eficiência de separação obtida *versus* previstas (Equação 4) para um intervalo de confiança de 98%.

A equação 5 mostra o modelo encontrado para a razão de fluido, o qual apresenta coeficiente de correlação de 0,977. Os valores observados e aqueles previstos pelo modelo, considerando-se um intervalo de confiança de 98%, encontram-se mostrados na Figura 20.

$$R_F = 0.79 D_o^{-0.53} D_u^{0.65} \tag{5}$$

onde D_o e D_u estão em cm.

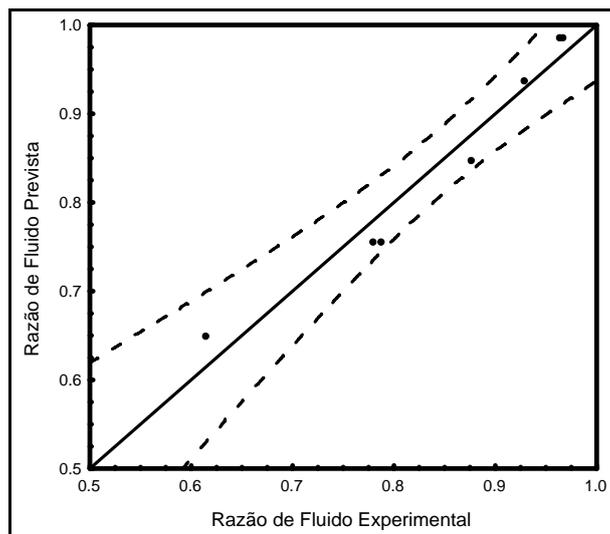


Figura 20- Razão de fluido obtida *versus* previstas (Equação 5) para um intervalo de confiança de 98%.

5.3. Teste da eficiência total de separação

A resistência ao cisalhamento e a formação de agregados em suspensão pode variar entre linhagens celulares. Em função disto diferentes configurações de hidrociclones foram testadas utilizando a célula recombinante produtora de GM-CSF. Visando empregar também um sistema mais semelhante ao que se encontraria em um biorreator operando em perfusão, a suspensão de células CHO GM-CSF, mantidas a 0,2% v/v SFB, foi direcionada aos hidrociclones não por meio de um tanque pressurizado, mas sim através do uso de bombas peristálticas a uma queda de pressão de 1 bar. Após a passagem, as correntes de *underflow* e *overflow* foram coletadas, a concentração celular quantificada e a eficiência total de separação estimada (Tabela 6). As eficiências de separação encontradas foram superiores a 95,3%, quando utilizando o HC 2015, e superiores a 97,4%, no caso dos demais hidrociclones.

Tabela 6- Teste de separação da linhagem recombinante CHO GM-CSF com diferentes configurações de hidrociclones e com duas bombas peristálticas (modelo 520U de cabeçote duplo de baixa pulsação e modelo 701 de cabeçote simples). X: Concentração de células totais na alimentação, V: Viabilidade da alimentação, X_U : Concentração de células totais no *underflow*, V_U : Viabilidade no *underflow*, X_O : Concentração de células totais no *overflow*, V_O : Viabilidade no *overflow*, E: Eficiência total de separação, e ΔV_u : Diferença de viabilidade entre a alimentação e o *underflow*. A queda de pressão nesses experimentos foi de 1bar.

HC	BOMBA	X (10 ⁶ cels/mL)	V (%)	X_U (10 ⁶ cels/mL)	V_U (%)	X_O (10 ⁴ cels/mL)	V_O (%)	E	ΔV_u (%)
2010	520U	1,2±0,0	98,1±0,1	1,1±0,0	96,5±0,5	2,9±0,1	47,7±3,3	99,8	1,6
2010	701	1,5±0,1	99,0	1,6±0,1	95,0	51,8±1,1	92,4	97,8	4,0
2015	520U	1,6±0,2	100,0	1,8±0,1	94,6	29,0±4,0	86,0	95,3	5,4
2515	520U	1,5±0,0	97,0	1,41±0,1	92,9	17,4±14,1	90	99,1	4,1
2517	520U	3,0±0,5	98,1	3,1	92,4	35,4	82,3	98,0	5,7
3020	520U	1,6±0,2	99,1±0,5	2,1±0,0	92,0±0,3	42,4±3,0	84,0±0,8	97,4	7,1

A partir da Tabela 6, observa-se que, também para a linhagem celular recombinante adaptada a baixíssimas concentrações de SFB (0,2% v/v), as quedas de viabilidade se mantiveram baixas. Um resultado interessante destes experimentos é o fato de que, mesmo com uma bomba peristáltica convencional, de elevada pulsação, uma alta eficiência de separação foi obtida.

5.4. Influência da separação em hidrociclone sobre o crescimento e morte celular

Para testar o efeito da separação em hidrociclone sobre a viabilidade celular e uma possível indução de apoptose na cultura, suspensões de células mantidas em culturas em *spinners* foram passadas pelas configurações 3020 e 2010 do hidrociclone, a uma queda

de pressão de 1 bar. Os resultados obtidos, tanto para células parentais (CHO.K1) quanto para a linhagem recombinante (CHO GM-CSF), são mostrados nas Tabelas 7-9. Observam-se os dados da cultura antes da passagem pelo HC, assim como da suspensão diluída coletada no *overflow* logo após a separação e da suspensão concentrada oriunda do *underflow*, cultivada e monitorada em um *spinner* de 0 a 48 horas após a separação.

A concentração celular total nas primeiras seis horas apresentou um ligeiro incremento e manteve sua viabilidade em níveis altos. A concentração da enzima intracelular LDH liberada no sobrenadante das culturas também apresentou um ligeiro aumento com o decorrer do tempo, compatível com o aumento de células necróticas na cultura (Figuras 21-23). As células necróticas apresentam sua capacidade de permeabilidade seletiva de membrana comprometida, liberando, desta forma, conteúdo citoplasmático e permitindo a entrada de componentes extracelulares. A liberação da enzima LDH ocorre em células necróticas, porém a sua total liberação não é um fenômeno instantâneo. Ela ocorre de forma lenta e parcial em células CHO (LEGRAND *et al.*, 1992), o que explicaria o progressivo aumento da atividade da enzima nas primeiras 6 horas, apesar da redução do percentual de células necróticas e da estabilidade da viabilidade da cultura. Existem vários fatores que podem estar influenciando o aumento na concentração da LDH. O primeiro é o fato de que, mesmo com uma concentração reduzida de SFB (1% e 0,2%), a passagem pelo hidrociclone leva a formação de espuma, podendo causar danos às células (CHISTI, 2001). Outro fator que pode estar influenciando o aumento do LDH é o fenômeno de desagregação dos grumos, liberando as células necróticas do seu interior e aumentando a quantidade de LDH no sobrenadante, como discutido anteriormente.

Tabela 7- Dados das condições das células CHO.K1 antes (Cultura) e após (0, 3, 6, 24 e 48h) a passagem pelo hidrociclone 3020 a uma queda de pressão de 1 bar.

HC 3020 CHO.K1	Concentração (10 ⁵ Células/mL)	Viabilidade (%)	LDH (U/L)
Cultura	8,0	99	71,5 ± 6,9
0 h	7,7 ± 0,1	97	95,9 ± 6,1
3 h	8,7 ± 0,0	93	110,4 ± 11,5
6 h	9,2 ± 0,8	93	116,1 ± 18,4
24 h	8,1 ± 0,5	96	132,0 ± 12,4
48 h	11,7 ± 0,4	99	126 ± 17,9
Overflow	0,8 ± 0,0	82	83,4 ± 3,3

Tabela 8- Dados das condições das células CHO recombinantes antes (Cultura) e após (0, 3, 6, 24 e 48h) a passagem pelo hidrociclone 3020 a uma queda de pressão de 1 bar.

HC 3020 CHO GM-CSF	Concentração (10 ⁵ Células/mL)	Viabilidade (%)	LDH (U/L)
Cultura	16,2 ± 2,0	99	23,0 ± 1,7
0 h	19,1 ± 0,1	92	77,9 ± 5,4
3 h	20,8 ± 1,3	94	76,7 ± 4,6
6 h	17,1 ± 1,7	93	85,6 ± 7,5
24 h	18,2 ± 0,3	95	94,9 ± 6,6
48 h	22,1 ± 0,1	98	54,9 ± 10,7
Overflow	3,6 ± 0,3	84	45,6 ± 6,7

Tabela 9- Dados das condições das células CHO recombinantes antes (Cultura) e após (0, 3, 6, 24 e 48h) a passagem pelo hidrociclone 2010 a uma queda de pressão de 1 bar.

HC 2010 CHO GM-CSF	Concentração (10 ⁵ Células/mL)	Viabilidade (%)	LDH (U/L)
Cultura	11,4 ± 0,3	98	21,4 ± 1,8
0 h	10,9 ± 0,1	97	49,0 ± 2,9
3 h	13,3 ± 0,6	97	49,8 ± 6,2
6 h	12,2 ± 0,2	95	48,0 ± 3,2
24 h	15,4 ± 0,7	99	57,1 ± 6,5
48 h	18,8 ± 0,5	99	52,9 ± 6,4
Overflow	0,8 ± 0,0	82	25,3 ± 2,1

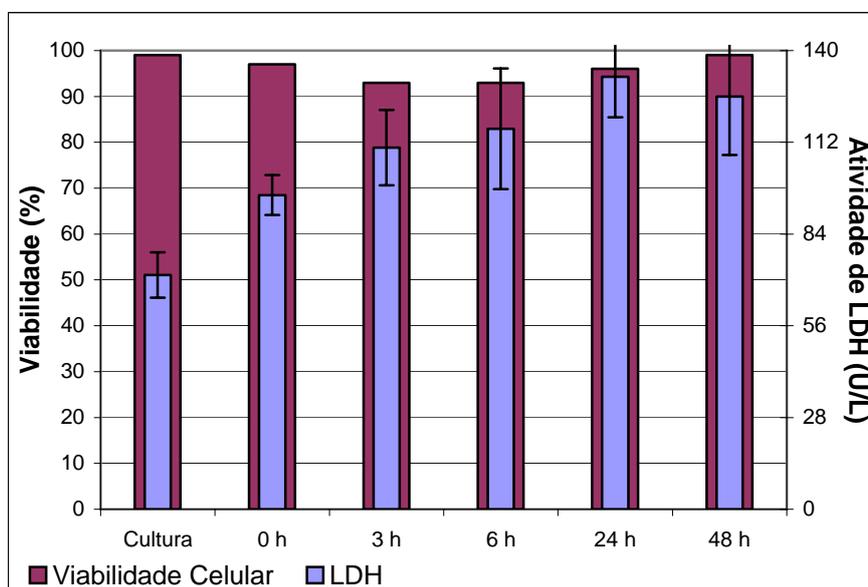


Figura 21- Dados da viabilidade celular e da concentração de LDH na cultura de CHO.K1 antes (Cultura) e após (0, 3, 6, 24 e 48 horas) a passagem pelo hidrociclone 3020.

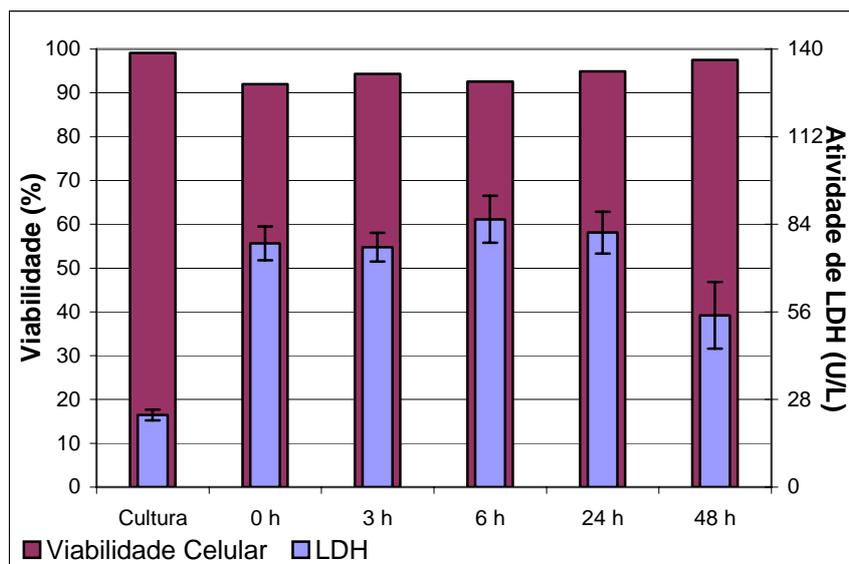


Figura 22- Dados da viabilidade celular e da concentração de LDH na cultura de CHO-GMCSF antes (Cultura) e após (0, 3, 6, 24 e 48 horas) a passagem pelo HC 3020.

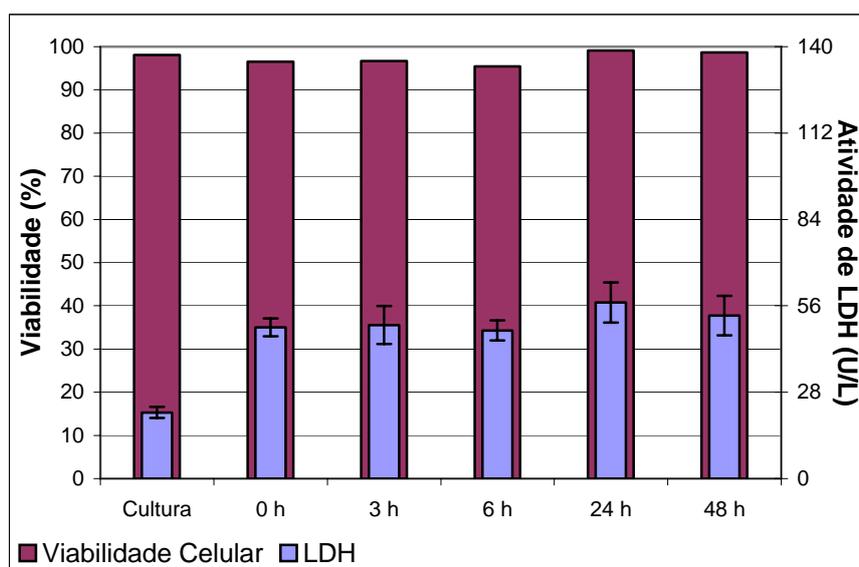


Figura 23- Dados da viabilidade celular e da concentração de LDH na cultura de CHO-GMCSF antes (Cultura) e após (0, 3, 6, 24 e 48 horas) a passagem pelo HC 1010.

As células em processos apoptóticos podem ser discriminadas de células necróticas e células normais por métodos fluorescentes, utilizando corantes que se complexam ao DNA (laranja de acridina, LA, e brometo de etídio, BE) (MERCILLE e MASSIE, 1994a). O percentual de células necróticas e apoptóticas é determinado pela identificação das mudanças morfológicas que ocorrem em cada um desses processos. As células viáveis não apoptóticas (VNA) não permitem a entrada do BE, sendo coradas somente pelo LA, que confere uma coloração verde uniforme ao núcleo e ao citoplasma (Figura 24). Em células necróticas (NEC), o mesmo padrão é observado na cor

vermelha alaranjada. Um dos fenômenos que caracterizam a apoptose é a fragmentação da cromatina, sua condensação e formação dos corpos apoptóticos (AL-RUBEAI, 1998). Esses eventos podem ser facilmente observados em células apoptóticas viáveis (VA), estágio inicial da apoptose, que apresentam o núcleo fragmentado e condensado corado de verde brilhante. Em células apoptóticas tardias, não-viáveis (NVA), a coloração é feita principalmente pelo BE, que, com o comprometimento da membrana, é capaz de penetrar e marcar o núcleo fragmentado de laranja brilhante. Esta última etapa é chamada também de necrose secundária. Em estágios avançados a célula acaba perdendo todo o seu conteúdo nuclear, tornando-se uma célula livre de cromatina (LC), podendo ser identificada como fantasmas laranjas, de fraca intensidade (TEY *et al.*, 2000).

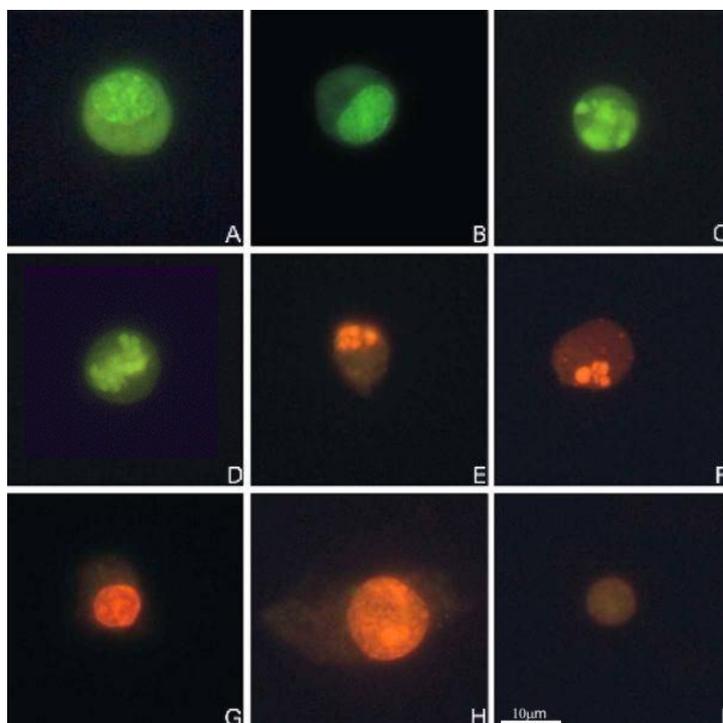


Figura 24- Morfologias observadas em microscopia de fluorescência com LA/BE. A e B, células viáveis não apoptóticas; C e D, células viáveis apoptóticas; E e F, células não viáveis apoptóticas; G e H, células necróticas; e I, célula livre de cromatina.

Pela técnica de microscopia de fluorescência com LA/BE, foi possível observar que a passagem pelo hidrociclone não induziu a morte por apoptose, tendo-se obtido um patamar de células apoptóticas similar ao encontrado na cultura antes da passagem pelo hidrociclone e no experimento controle, onde não havia a influência do hidrociclone (Figuras 25-28). Como discutido anteriormente, inúmeros fatores podem estar influenciando o aparecimento de células necróticas, porém é importante observar que a concentração destas diminui rapidamente nas primeiras 6 horas, alcançando os níveis

iniciais dentro de 24 h. Após 48h, a fração de células necróticas, em todos os casos, foi de aproximadamente 7,5%. Como a indução da morte por apoptose não depende somente da intensidade de cisalhamento, mas também do tempo de exposição a ele (COTTER *et al.*, 1995), pode-se sugerir que os níveis de tensões de cisalhamento existentes no interior dos hidrociclones testados, associados aos baixos tempos de residência das células no equipamento (entre 0,03 e 0,1s, segundo CASTILHO e MEDRONHO, 2002) não induzem a apoptose.

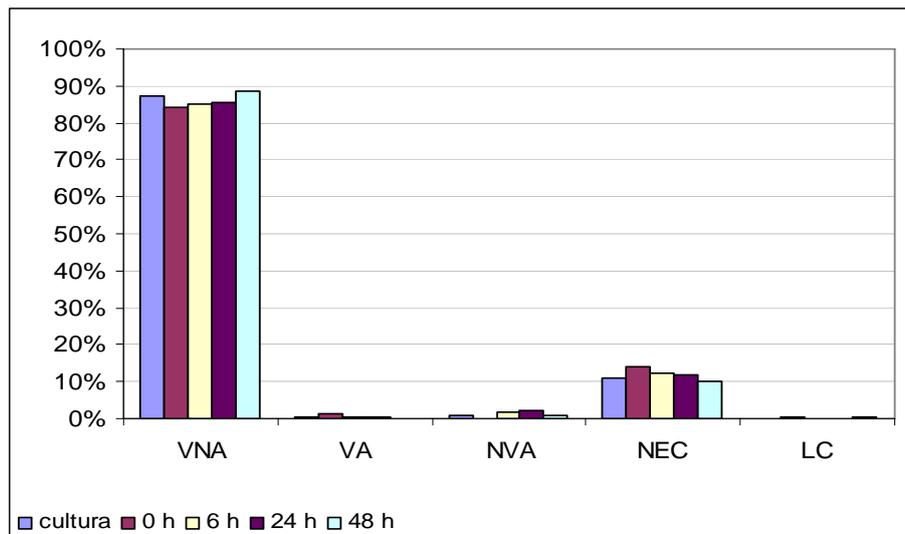


Figura 25- Experimento controle. Acompanhamento da possível indução de apoptose na cultura de CHO.K1 após a passagem pelo sistema experimental sem o hidrociclone. VNA, células viáveis não apoptóticas; VA, viáveis apoptóticas; NVA, não viáveis apoptóticas; NEC, necróticas; e LC, livre de cromatina.

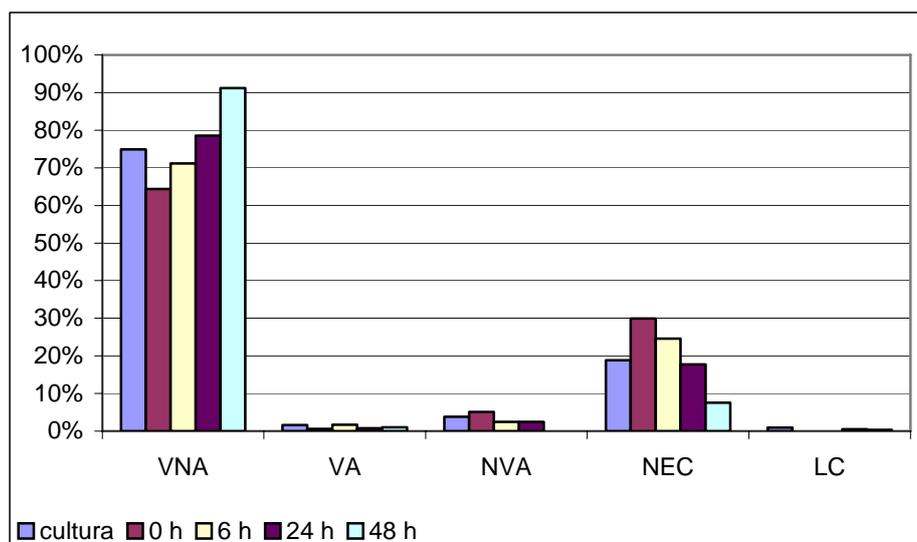


Figura 26- Acompanhamento da possível indução de apoptose na cultura de CHO.K1 após a passagem pelo HC 3020. VNA, células viáveis não apoptóticas; VA, viáveis apoptóticas; NVA, não viáveis apoptóticas; NEC, necróticas; e LC, livre de cromatina.

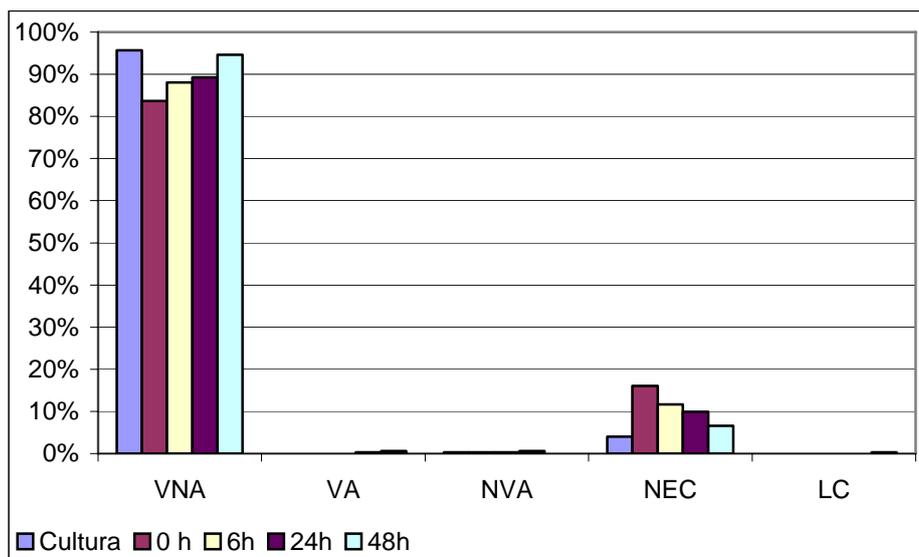


Figura 27- Acompanhamento da possível indução de apoptose na cultura de CHO-GMCSF após a passagem pelo HC 3020. VNA, células viáveis não apoptóticas; VA, viáveis apoptóticas; NVA, não viáveis apoptóticas; NEC, necróticas; e LC, livre de cromatina.

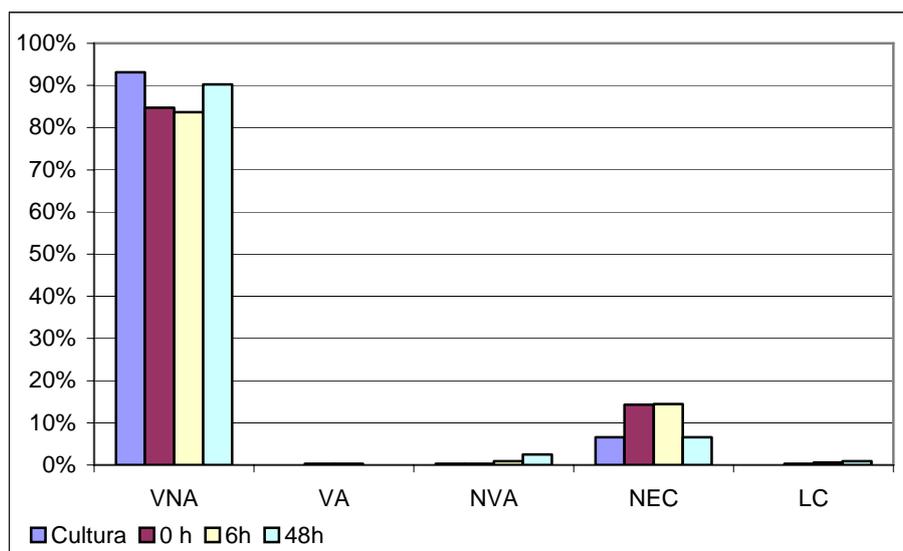


Figura 28- Acompanhamento da possível indução de apoptose na cultura de CHO-GMCSF após a passagem pelo HC 2010. VNA, células viáveis não apoptóticas; VA, viáveis apoptóticas; NVA, não viáveis apoptóticas; NEC, necróticas; e LC, livre de cromatina.

5.5. Cultivo em biorreatores em perfusão

5.5.1. Cultivo em biorreator de pequena escala

Os primeiros testes realizados em perfusão foram conduzidos em um biorreator agitado de 1L com aeração livre de bolhas. Células CHO GM-CSF foram mantidas em meio DMEM+Ham's F12 suplementado com 0,2% v/v de SFB (Figura 29). O inóculo

inicial, proveniente de uma cultura previamente mantida em *spinner* e com alta viabilidade celular (> 90%), foi fixado em cerca de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Os cultivos foram operados em batelada até que alcançassem uma concentração de células de $1-2 \times 10^6$ células/mL e de glicose de 1,0 g/L (OZTURK *et al.*, 1997).

A Figura 30 mostra um cultivo de cerca de 12 dias. A perfusão iniciou no quarto dia do processo, utilizando-se de hidrociclone 3020. No entanto, devido a um problema no sistema de controle da bomba peristáltica, nesse momento foi retirado 75% do volume do vaso. Após o restabelecimento do volume da cultura, o sistema foi operado novamente em batelada pelos 3 dias seguintes, quando se iniciou novamente a perfusão com 0,125 vvd (volume de meio/volume de reator/dia). No décimo dia de cultivo, a taxa de perfusão foi elevada para 0,25 vvd. Como a vazão do *overflow* (248,4 L/dia) é muito alta para o volume de vaso em questão, a operação do hidrociclone foi feita de forma intermitente. O hidrociclone operou durante intervalos de tempo onde a cada operação eram retirados cerca de 12,5% do volume do biorreator. Assim quando a taxa de perfusão passou para 0,25 vvd, o hidrociclone foi ligado em um intervalo de 12 horas entre cada operação. No 12º dia, entretanto, ocorreram problemas na rede elétrica que impossibilitaram o progresso do cultivo. Mesmo assim, foi possível observar que a concentração de células viáveis neste dia era de $2,2 \times 10^6$ células/mL, com tendência crescente.

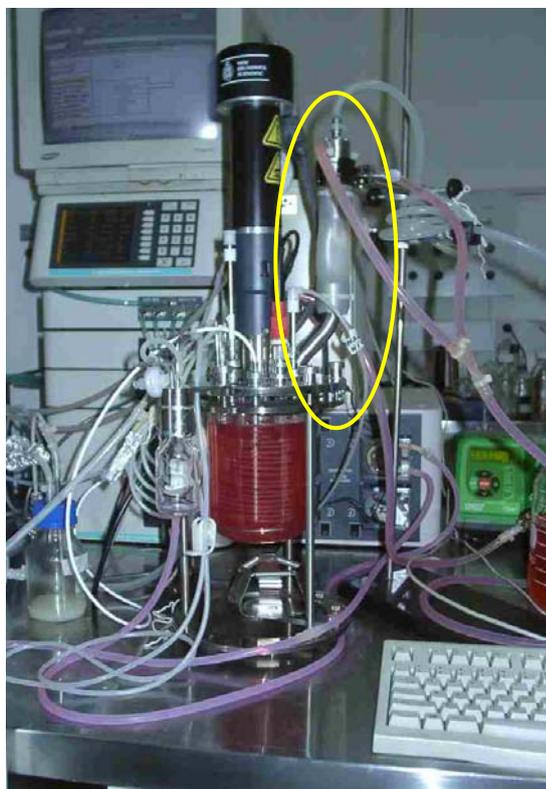
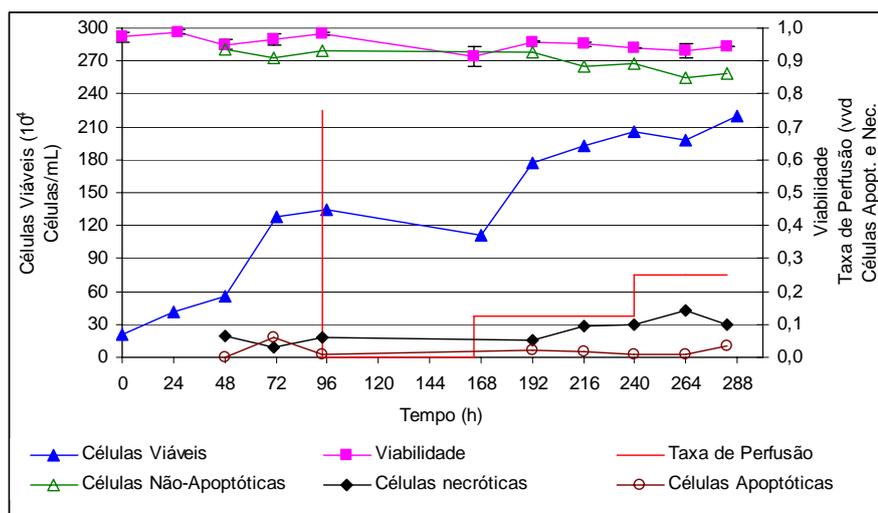
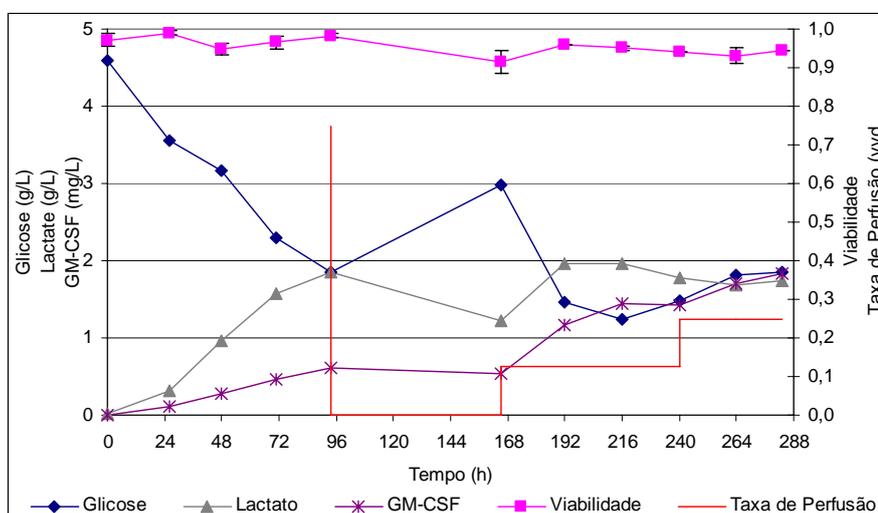


Figura 29- Biorreator de 1L BioFlo 110 (New Brunswick). O hidrociclone (detalhe) é montado em um adaptador especialmente projetado para encaixar na tampa do biorreator.



(A)



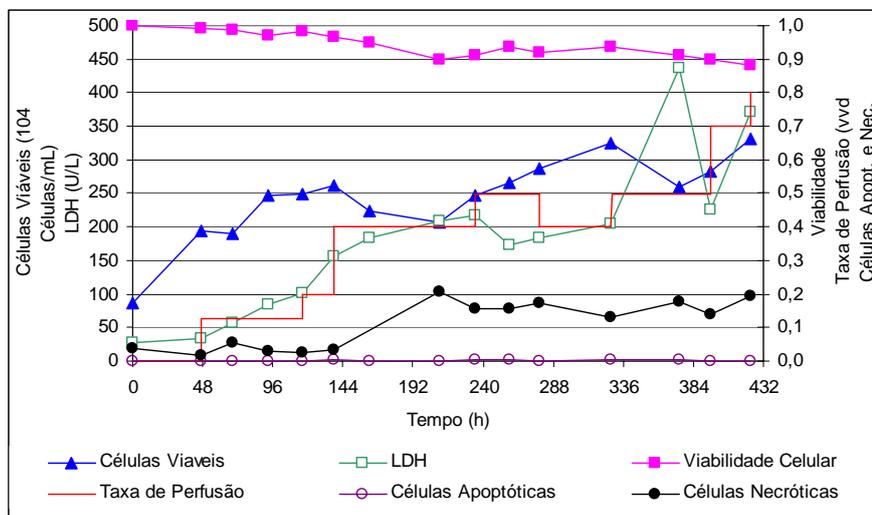
(B)

Figura 30- Progressão do cultivo em perfusão de CHO GM-CSF utilizando o hidrociclone HC 3020 em meio contendo 0,2% em biorreator agitado de 1L (corrida 1).

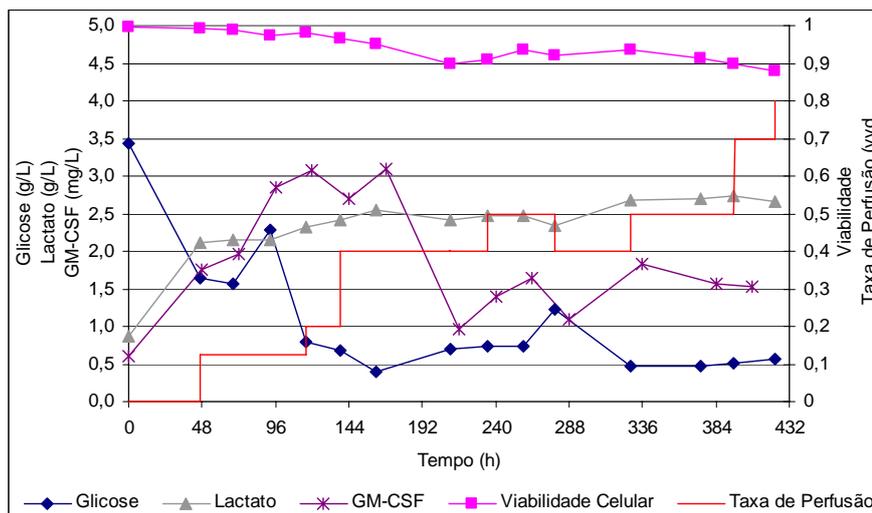
A viabilidade da cultura se manteve inalterada após o início da operação do hidrociclone, permanecendo sempre acima de 90%. Os testes com laranja de acridina/brometo de etídio mostram que a separação das células pelo hidrociclone em questão não induziu mecanismos de morte por apoptose, visto que a concentração de células apoptóticas foi sempre inferior a 5%. A concentração de glicose foi mantida acima de 1 g/L e, dentro da estratégia de perfusão adotada, foi possível mantê-la relativamente estável entre 1 e 2 g/L durante a operação do hidrociclone. O mesmo comportamento foi observado em relação à concentração de lactato, que foi mantida abaixo dos níveis inibitórios (<2 g/L) (OZTURK *et al.*, 1997). Apesar da constante retirada de meio de cultivo após o início da perfusão, a concentração de GM-CSF

aumentou proporcionalmente à concentração celular, alcançando uma concentração máxima de 1,84 mg/L.

Outra corrida foi realizada com o mesmo biorreator e o mesmo hidrociclone porém utilizando um inóculo maior ($8-9 \times 10^5$ células/mL) (Figura 31). Após 48 horas de operação em batelada, quando a concentração celular total alcançou 2×10^6 células/mL, a perfusão foi iniciada com uma taxa de 0,125 vvd. Após o início da perfusão, a taxa de perfusão foi controlada de forma que a concentração de glicose permanecesse acima de 0,5 g/L. No entanto, a concentração de lactato permaneceu relativamente alta, em torno de 2,5 g/L, o que poderia estar exercendo uma influencia inibitória sobre a cultura (LAO e TOTH, 1997).



(A)



(B)

Figura 31- Progressão do cultivo em perfusão de CHO GM-CSF utilizando o hidrociclone HC 3020 em meio contendo 0,2% em biorreator agitado de 1L (corrida 2).

A concentração de células viáveis alcançada neste cultivo foi de cerca de $3,3 \times 10^6$ células/mL. Infelizmente, devido a um problema na conexão da garrafa de

alimentação de meio, o processo teve que ser interrompido justamente em uma fase onde o crescimento celular era evidente. A viabilidade da cultura permaneceu alta durante todo o cultivo, assim como não foi observada indução de morte por apoptose pelo método de LA/BE. A concentração máxima de GM-CSF no sobrenadante da cultura foi de 3,1 mg/L no sexto dia, porém foi observada uma queda significativa na concentração do produto (aproximadamente 1,5 mg/L) que pode ser explicada pelo aumento da taxa de perfusão, que causou a diluição da proteína. Cabe ressaltar que, em trabalhos com essa mesma linhagem celular (FOGOLÍN *et al.*, 2002, FORNO *et al.*, 2004), as concentrações de GM-CSF em cultivos em batelada em frascos *spinner* foi de 0,7-1,1 mg/L, sendo que a concentração máxima de $2,6 \times 10^6$ células/mL foi alcançada após 12 dias.

5.5.2. Biorreator de grande escala

Para testar a aplicabilidade dos hidrociclones em sistemas industriais, foram realizados testes dos hidrociclones em um biorreator de larga escala com 300L de volume útil. O hidrociclone 2517 foi ligado na linha de coleta do biorreator, que vinha operando previamente com um filtro de malha rotativa por 22 dias seguido por 9 dias em contínuo sem reciclo de células. As Figuras 32-34 mostram, para permitir uma comparação posterior com os dados do hidrociclone, o desempenho do cultivo em perfusão utilizando *spin-filter*.

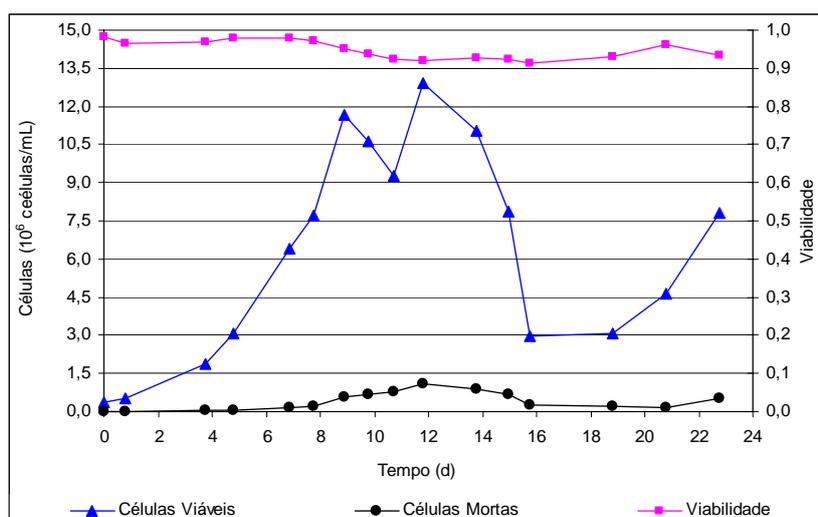


Figura 32- Progressão do cultivo em perfusão de CHO-EPO utilizando *spin-filter* em meio livre de SFB em biorreator agitado de 300L. Acompanhamento da concentração e viabilidade celular por azul de trypan.

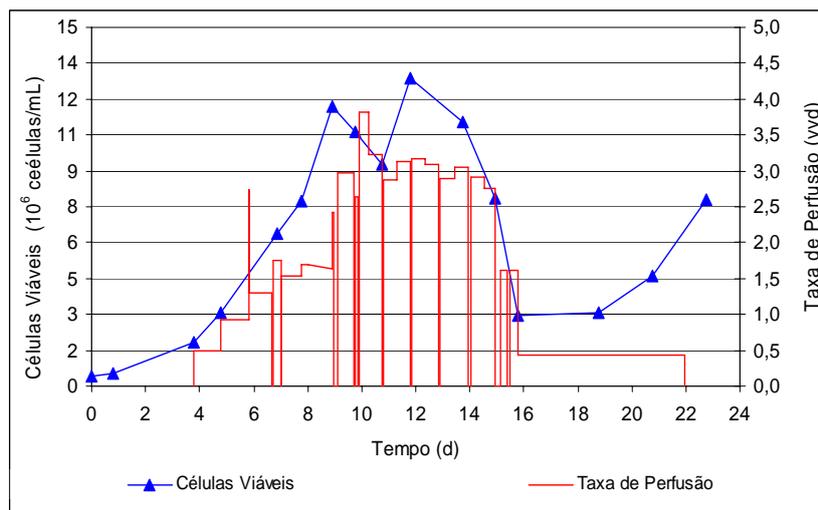


Figura 33- Progressão do cultivo em perfusão de CHO-EPO utilizando *spin-filter* em meio livre de SFB em biorreator agitado de 300L. Acompanhamento da concentração e taxa de perfusão em volume de vaso por dia.

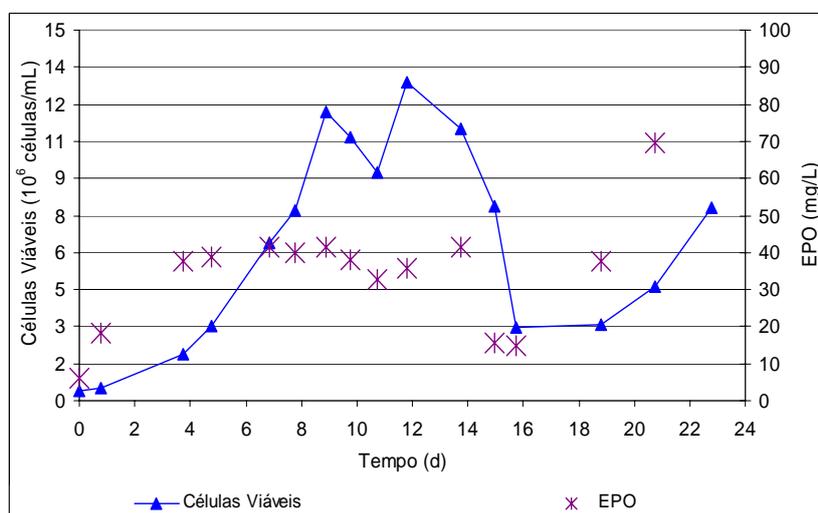


Figura 34- Progressão do cultivo em perfusão de CHO-EPO utilizando *spin-filter* em meio livre de SFB em biorreator agitado de 300L. Acompanhamento da concentração celular e de EPO.

Após 31 dias de cultivo desde a inoculação (22 dias com *spin-filter* e 9 dias em contínuo simples), iniciou-se a operação com o hidrociclone. A linha de coleta foi propriamente modificada para receber, mantendo a esterilidade do sistema, uma bomba de baixa pulsação e o hidrociclone. As Figuras 35 e 36 mostram o comportamento do cultivo a partir do início da operação com o HC 2517. No décimo dia de operação, no entanto, o volume do biorreator foi reduzido para 150L devido à necessidade de se conciliar a quantidade de meio de cultivo disponível e a de meio necessário para manter o processo.

Durante a experimentação do hidrociclone como dispositivo de perfusão, foram coletadas amostras diariamente para a avaliação da concentração celular, viabilidade

celular (azul de trypan e LDH), apoptose e ciclo celular (iodeto de propídio em citometria de fluxo), glicose e eritropoetina (EPO).

O hidrociclone foi conectado no dia 1, utilizando uma bomba na corrente de *overflow* para o controle da vazão. O sistema foi operado desta maneira por 3 dias consecutivos, porém sem aumento significativo na concentração celular. Utilizando uma bomba na corrente de *overflow* torna-se possível controlar de forma mais sensível a vazão desta linha. No entanto, o efeito sobre o desempenho do hidrociclone ainda não era conhecido e, devido à presumível queda da eficiência de separação, pode-se sugerir que, da forma como utilizada, a bomba peristáltica na linha de *overflow* apresentou-se prejudicial ao funcionamento do hidrociclone.

A bomba do *overflow* foi retirada e se iniciou a operação intermitente do hidrociclone, pois a vazão de OF era relativamente alta para o volume de meio do biorreator. A taxa de perfusão utilizada no momento era de 0,55 vvd (Figura 35), logo havia a necessidade de se retirar cerca de 165 L/dia de meio de cultura e o hidrociclone apresentava uma vazão de *overflow* de cerca de 360 L/dia. Consequentemente, para garantir uma taxa de perfusão com a vazão constante de OF, foi necessário ativar o hidrociclone por períodos pré-determinados. A eficiência de separação total foi mantida acima de 90% durante a maior parte do período de cultivo (Figura 36).

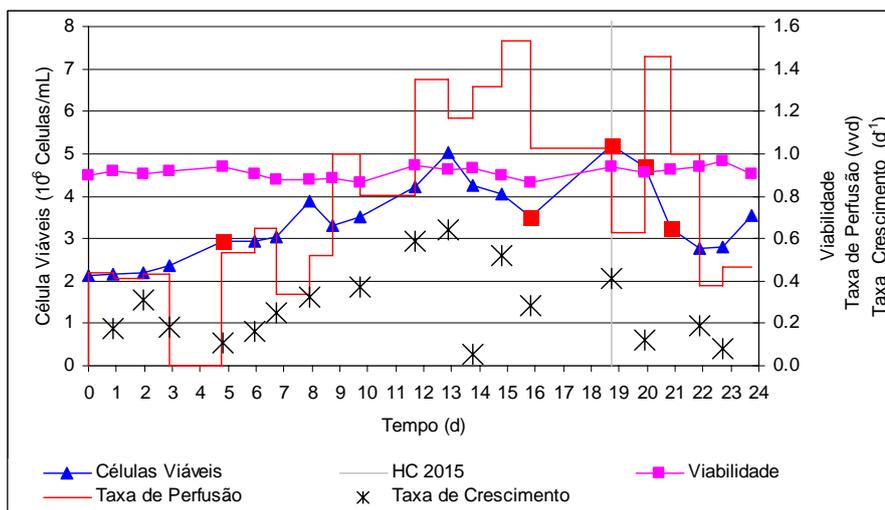


Figura 35- Progressão do cultivo em perfusão de CHO EPO utilizando os hidrociclones 2517 e 2015 em meio livre de SFB em biorreator agitado de 300L (0<t<10dias) e 150L (10<t<24). Os pontos vermelhos representam dias onde ocorreram problemas que poderiam influenciar na estabilidade do cultivo. A linha vertical mostra o momento em que o hidrociclone 2517 foi substituído pelo 2015.

A máxima concentração total de células alcançada foi de $5,2 \times 10^6$ células viáveis/mL. Durante todo o período de operação com o hidrociclone 2517, a viabilidade

celular (azul de trypan) permaneceu em níveis que variaram entre 87% e 92%. O período total de operação com o HC 2517 foi de 15 dias consecutivos, quando foi substituído pelo HC 2015. No entanto, devido à ocorrência de problemas relacionados com o sistema de aeração e controle de oxigênio dissolvido do biorreator, não foi possível extrair dados concretos sobre a performance deste outro hidrociclone.

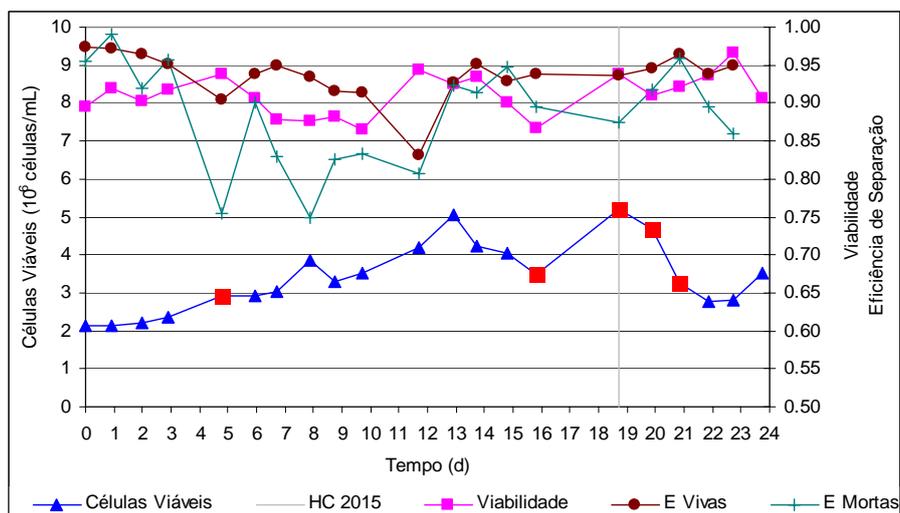


Figura 36- Progressão do cultivo em perfusão de CHO EPO utilizando os hidrociclones 2517 e 2015 em meio livre de SFB em biorreator agitado de 300L (0<t<10dias) e 150L (10<t<24). Diferença de eficiência de separação células vivas e mortas. Os quadrados vermelhos representam dias onde ocorreram problemas que poderiam influenciar na estabilidade do cultivo. A linha vertical mostra o momento em que o hidrociclone 2517 foi substituído pelo 2015.

Durante o cultivo neste biorreator de larga escala, foi observada uma variação relativamente grande na pressão interna do mesmo, a qual variou de 1,1 a 1,4 bar. Esta variação influenciou significativamente na operação do hidrociclone. Uma vez que a corrente de *underflow* retornava para o biorreator, a pressão de descarga da mesma era maior do que a pressão de descarga da corrente de *overflow*, alterando o escoamento no interior do hidrociclone. Uma pressão maior no *underflow* resulta na diminuição da razão de fluido, ou seja, a vazão da corrente de *overflow* é aumentada, reduzindo a eficiência de separação do dispositivo.

A taxa específica de crescimento das células variou entre 0,17 d⁻¹ e 0,67 d⁻¹, levando-se em consideração, no cálculo, apenas os dias onde não ocorreram imprevistos que pudessem influenciar o crescimento celular. Para fins de avaliação comparativa do crescimento desta linhagem celular, a mesma foi cultivada em pequena escala em garrafas rotatórias (*roller bottles*) (Figura 37). O valor máximo da taxa específica de crescimento obtida foi de 0,72 d⁻¹, ou seja, superior às taxas observadas no biorreator.

Diversos fatores podem ter contribuído para tal fato, tais como os problemas operacionais do biorreator (como a falha no sistema de controle de oxigênio dissolvido) e o longo tempo em que a célula se encontrava em cultura (cerca de 30 dias de cultivo antes do acoplamento do hidrociclone).

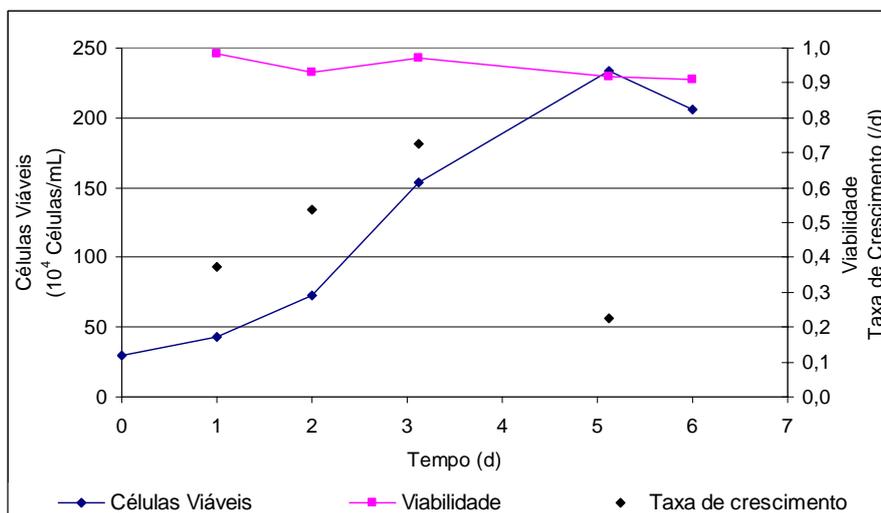


Figura 37- Cinética de crescimento da linhagem recombinante CHO-EPO em meio livre de SFB em roller bottle.

A análise da população de células apoptóticas por citometria de fluxo com iodeto de propídio não revelou indução significativa de morte por apoptose (Figura 38). Os níveis de apoptose se mantiveram abaixo de 3,54% em quase todos os dias analisados, com exceção do 8º e 9º dias, quando foi observado um aumento na população de células apoptóticas (6,32% e 5,75%, respectivamente). Apesar dos problemas observados com o sistema de aeração, as amostras retiradas nesses dias (18º, 19º e 20º dias) não apresentaram aumento significativo de células apoptóticas. Os dados obtidos a partir de amostras do biorreator de 300L foram comparados com dados adquiridos de um outro biorreator de 1000L (Figura 39) operando em sistema contínuo sem reciclo celular. Verificou-se que ambos apresentaram proporções semelhantes de células apoptóticas enquanto operando normalmente. Posteriormente, devido a um problema no sistema de aeração do biorreator de 1000L, foi possível observar como a privação de oxigênio neste biorreator foi capaz de induzir rapidamente a morte por apoptose, aumentando drasticamente os níveis desta população de células (>37%). Os mesmos testes foram conduzidos com a mesma linhagem celular (CHO EPO) em cultura de pequena escala mantida em frasco de cultivo. Durante os 7 dias em que a

cultura foi acompanhada os níveis de apoptose se mantiveram abaixo de 7,73% (Figura 40).

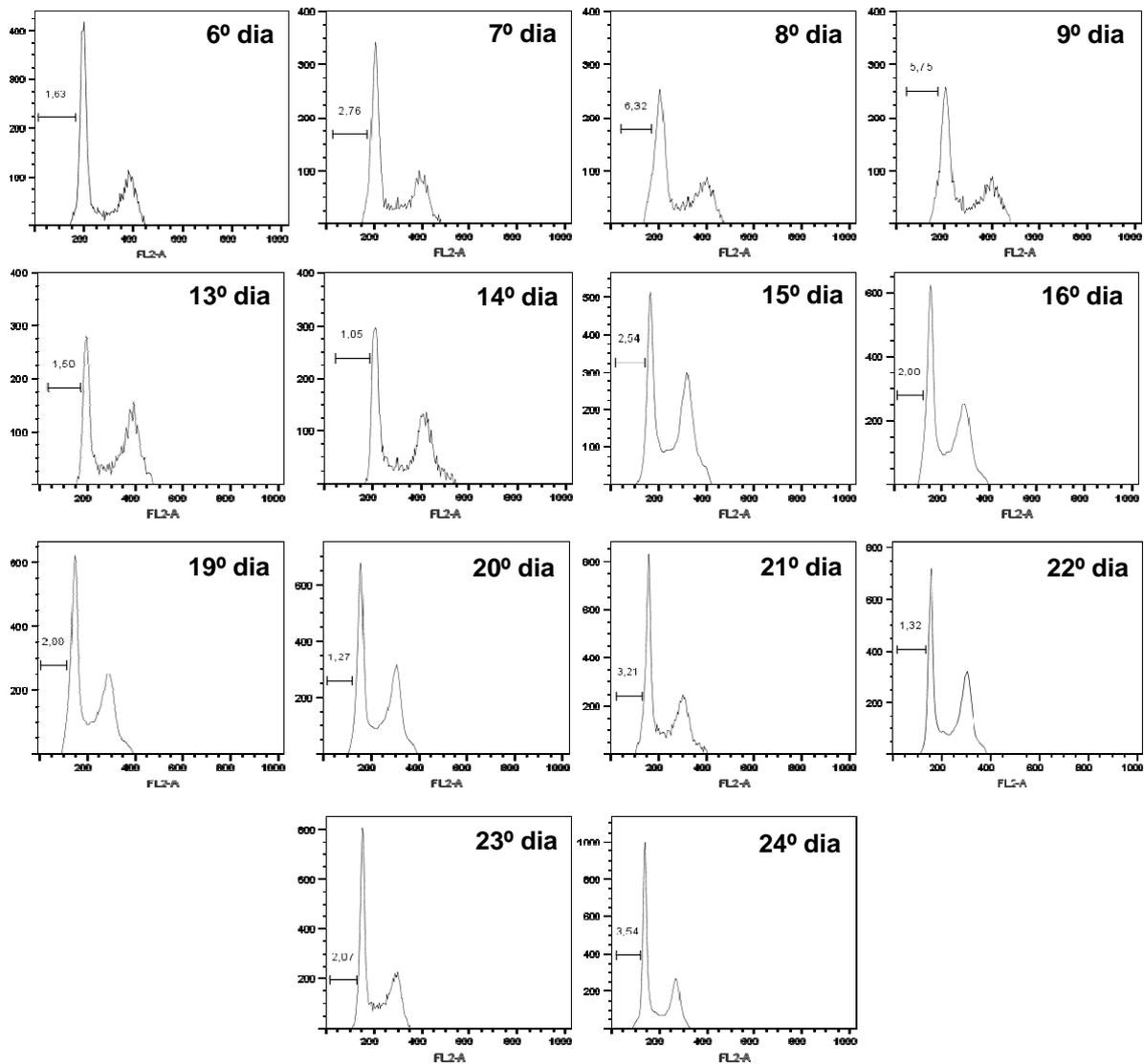


Figura 38- Durante o cultivo no biorreator de 300L com o hidrociclone, amostras foram retiradas para testar a indução de apoptose por citometria de fluxo com iodeto de propídio. As amostras representam os respectivos dias após a inclusão e início da operação do hidrociclone no sistema.

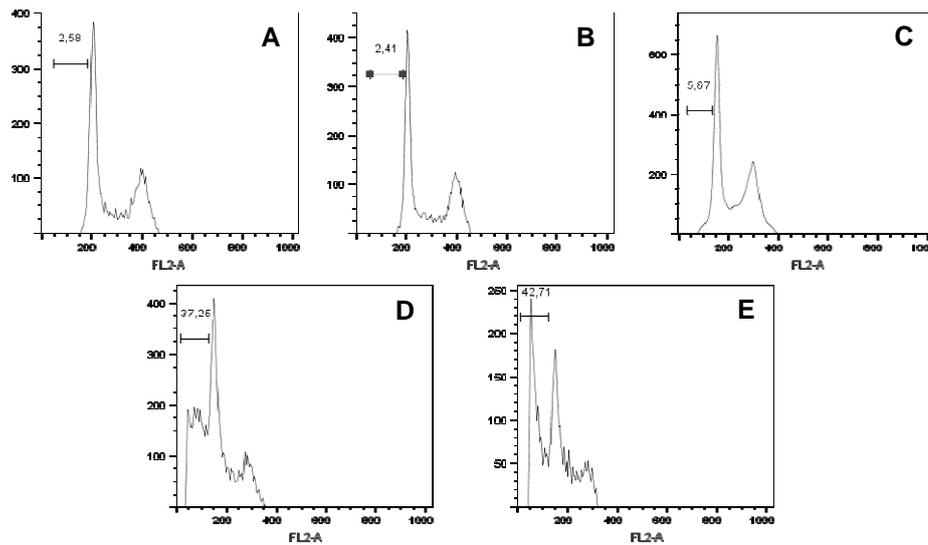


Figura 39- Durante o cultivo no biorreator de 1000L operando em sistema contínuo sem reciclo, amostras foram retiradas para testar a indução de apoptose por citometria de fluxo com iodeto de propídio. A, B e C representam amostras retiradas em dias de funcionamento normal do biorreator. D e E, amostras retiradas após um período em que a cultura permaneceu sob condições anóxicas, quando foi observado um aumento muito grande na população de células apoptóticas.

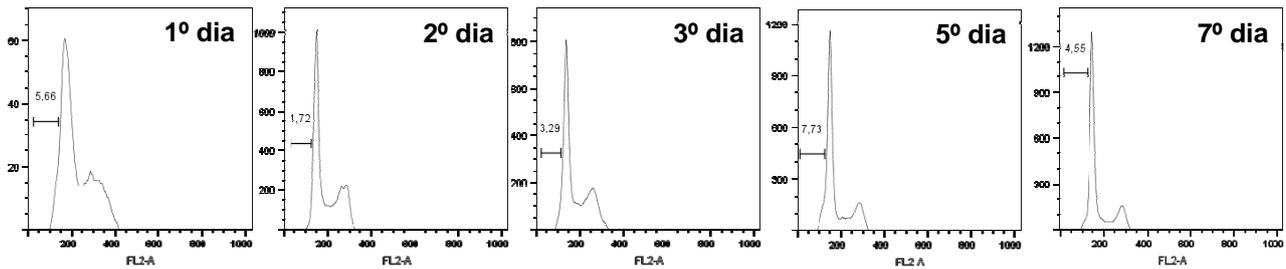


Figura 40- Acompanhamento da indução de apoptose por citometria de fluxo com iodeto de propídio em cultivo de pequena escala em *roller bottles* da linhagem CHO-EPO. Durante os sete dias de acompanhamento, os níveis de células apoptóticas permaneceram baixos.

Um aspecto importante no cultivo em perfusão é avaliar a capacidade do dispositivo de retenção celular reter preferencialmente células viáveis. Na Figura 41, pode-se verificar uma diferença na viabilidade celular da corrente de *overflow* e biorreator, onde a população de células coletada no *overflow* apresenta viabilidade consideravelmente menor do que a presente no biorreator. Tal fenômeno se deve à retenção preferencial de células viáveis, como observado nos experimentos em batelada. Na Figura 41, pode-se observar que a eficiência total de separação para células não-viáveis se encontra em níveis inferiores aos valores de eficiência de separação de células viáveis, confirmando que o hidrociclone promove uma lavagem das células mortas. Esta menor eficiência de separação para as células mortas pode ser explicada por dois motivos. Células mortas podem apresentar uma diminuição de tamanho, como observado em culturas de hibridomas (BATT *et al.*, 1990; LIPSCOMB *et al.*, 2004), e

podem ter sua densidade diminuída, devido ao extravasamento de material citoplasmático e entrada de fluido do ambiente para o seu interior (AL-RUBEAI, 1998). Em ambos os casos, a velocidade de sedimentação das células mortas diminui, fazendo com que as mesmas sejam removidas do sistema de cultivo através da corrente de *overflow*.

Outro dispositivo que apresentou separação seletiva de células viáveis foi o sedimentador inclinado (BATT *et al.*, 1990; LIPSCOMB *et al.*, 2004), no qual foi possível remover cerca de 20% das células mortas da cultura. TAKAGI e colaboradores (2000), obtiveram fenômeno semelhante aplicando baixas forças centrífugas em uma centrífuga Centritech, separando células CHO expressando tPA.

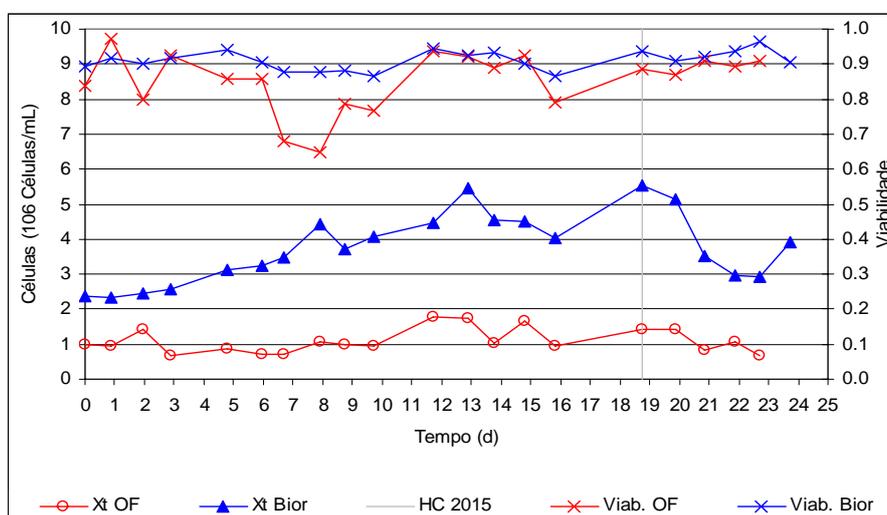


Figura 41- Progressão do cultivo em perfusão de CHO-EPO utilizando os hidrociclones HC 2517 e 2015 em meio livre de SFB em biorreator agitado de 300L ($0 < t < 10$ dias) e 150L ($10 < t < 24$). Diferença de viabilidade e concentração celular entre as correntes de *overflow* e *underflow*. A linha vertical mostra o momento em que o hidrociclone 2517 foi substituído pelo 2015.

Em relação à produção da proteína recombinante, é possível observar, na Figura 42, as concentrações de EPO obtidas no sobrenadante da cultura após o início da operação do hidrociclone. Durante o uso do *spin-filter* foram obtidas concentrações que alcançaram a faixa de 70 mg/L durante a perfusão (Figura 34). No caso da perfusão com o hidrociclone, a concentração de EPO alcançou valores de até 47 mg/L no início do processo, porém com o aumento da taxa de perfusão entre os dias 12 e 16, os valores de EPO baixaram para cerca de 15 mg/L.

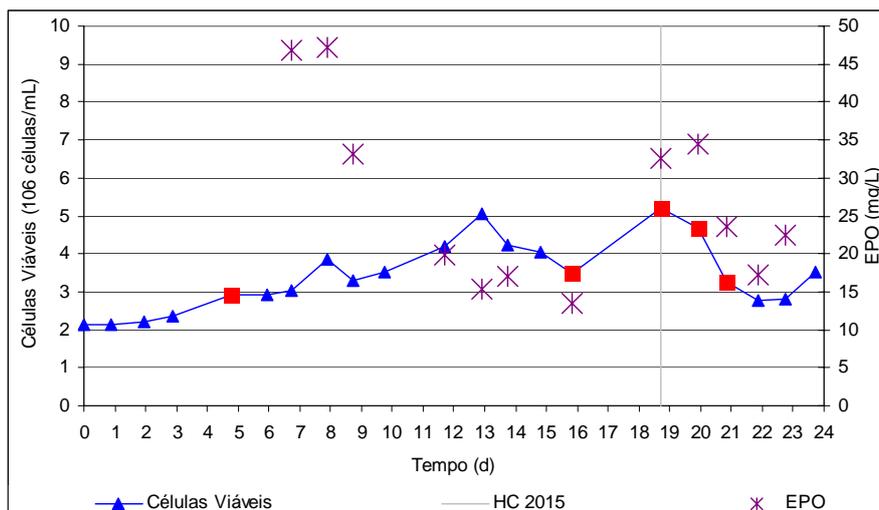


Figura 42- Progressão do cultivo em perfusão de CHO-EPO utilizando os hidrociclones HC 2517 e 25015 em meio livre de SFB em biorreator agitado de 300L ($0 < t < 10$ dias) e 150L ($10 < t < 24$ dias). Acompanhamento da concentração de eritropoetina.

5.6. Considerações finais

Os hidrociclones testados no presente trabalho mostraram um desempenho satisfatório sob as condições experimentais adotadas, apresentando eficiências de separação geralmente superiores a 97% quando operados em condições ideais. Durante o acompanhamento das culturas em perfusão, nas quais as células foram submetidas a diferentes frequências de passagem pelos hidrociclones, não foi observado efeito negativo significativo sobre a viabilidade celular nem indução de morte por apoptose. O uso dos hidrociclones em cultivos que variaram de 12 a 20 dias também mostrou alta eficiência de separação. No entanto, não foi possível atingir altas densidades celulares durante os cultivos. Durante os testes em biorreatores de pequena escala, ocorreram problemas que não permitiram a continuidade do processo. No entanto, observando a evolução das culturas, constata-se que a concentração celular apresentava tendência crescente no momento da interrupção, indicando que maiores concentrações celulares eram passíveis de serem alcançadas. No biorreator de 300 L, uma maior concentração celular foi alcançada, apesar de, neste sistema, a eficiência de separação ter sido menor devido à impossibilidade de controle da pressão do biorreator.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

De uma forma geral, baseado nos resultados obtidos no presente trabalho, utilizando diferentes linhagens de células CHO e diferentes condições experimentais, foi possível evidenciar que hidrociclones de pequeno tamanho são dispositivos que possuem as características necessárias para a sua aplicação na retenção de células animais e, desta maneira, são aplicáveis em sistemas de cultivo em perfusão.

De forma específica, os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- O uso de protocolos de baixa complexidade permitiu estabelecer uma linhagem de células CHO.K1 adaptada ao cultivo em suspensão em meio com baixa concentração de soro fetal bovino.

- Baseado no planejamento experimental utilizado, foi possível estabelecer modelos matemáticos baseados em variáveis geométricas operacionais do hidrociclone (diâmetro do *overflow*, diâmetro do *underflow* e queda de pressão), de modo a prever o seu desempenho dentro da faixa de valores testados.

- Os hidrociclones testados apresentaram sempre altas eficiências de separação, sugerindo que os hidrociclones são aplicáveis em cultivos em biorreatores de pequena e grande escala.

- Não foi observada queda significativa na viabilidade celular das culturas de células CHO.K1 e CHO GM-CSF quando separadas pelas diferentes configurações de hidrociclones em testes em batelada. A dosagem da enzima LDH corrobora com os dados obtidos pelo método de exclusão do azul de trypan.

- Não foram observados indícios de indução de mecanismos de morte por apoptose em culturas passadas através dos hidrociclones testados. O acompanhamento de 48 horas das culturas expostas à separação pelos hidrociclones (uma passagem) não indicou aumento da população de células apoptóticas.

- Os testes em biorreatores de pequena escala mostraram que os hidrociclones são capazes de manter a cultura de células CHO por vários dias consecutivos sem alterar a viabilidade celular e induzir apoptose. Apesar de não ter sido possível alcançar altas densidades celulares por motivos alheios ao sistema de separação, as culturas apresentavam concentrações celulares crescentes no momento em que os processos foram interrompidos.

- Não foi observada alteração no metabolismo da cultura, como pode ser observado pelo consumo de glicose, produção de lactato e do produto (GM-CSF).

- O hidrociclone 2517 foi empregado em um biorreator de escala industrial com alta eficiência de separação e baixa queda de viabilidade. Apesar do sistema necessitar de um controle mais sensível de pressão, foi possível alcançar concentrações celulares superiores ao cultivo em pequena escala.

- Analisando os dados de experimentos em pequena e larga escala, pode-se concluir que os hidrociclones apresentam retenção preferencial seletiva de células vivas, uma vez que as eficiências de separação de células mortas observadas foram menores do que as de células viáveis

Como recomendado para trabalhos futuros, sugere-se que os próximos experimentos sejam conduzidos de forma que alguns problemas observados durante o presente trabalho possam ser solucionados. Quando operando em biorreatores de escala industrial, os hidrociclones devem ser montados de forma que a pressão de trabalho seja estável e igual nas saídas de *underflow* e *overflow*. Em pequena escala, estratégias mais adequadas de operação intermitente dos hidrociclones ainda devem ser estabelecidas, de modo a permitir a operação estável de cultivos em perfusão de alta densidade celular e longa duração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., et al., 2002, *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York, Garland Science.
- AL-RUBEAI, M., 1998, "Apoptosis and cell culture technology". In: Scheper (ed), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 59, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, pp.225-249.
- AL-RUBEAI, M., EMERY, A.N., CHALDER, S., et al., 1992, "Specific antibody productivity and the cell-cycle comparisons of batch, continuous and perfusion cultures", *Cytotechnology*, v. 45, pp. 463-472.
- AL-RUBEAI, M., SING, R.P., GOLDMAN, M.H., et al., 1994, "Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 45, pp. 463-472.
- AL-RUBEAI, M., SING., R. P., 1998, "Apoptosis in cell culture", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 9, pp. 152-156.
- AL-RUBEAI, M., SINGH, R.P., EMERY, A.N., et al., 1995a, "Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 46, pp. 88-92.
- AL-RUBEAI, M., SINGH, R.P., GOLDMAN, M.H., et al, 1995b, "Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 45, pp. 463-472.
- ALTAMIRANO, C., PAREDES, C., CAIRÓ, J.J., et al., 2000, "Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine", *Biotechnology Progress*, v. 16, pp. 69-75.
- ALVES, P.P.M., MOREIRA, J.L., RODRIGUES, K.M., et al., 1996, "Two-dimensional versus three-dimensional culture systems: effect on growth and productivity of BHK cell", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 52, pp. 429-432.

- ANDERSEN, D.C., BRIDGES, T., GAWLITZEK, M., et al., 2000, "Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 70, pp. 25-31.
- ANDERSEN, D.C., KRUMMEN, L. 2002, "Recombinant protein expression for therapeutic applications", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 117-123.
- ARDEN, N., BETENBAUGH, M.J., 2004, "Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition", *Trends in Biotechnology*, v. 22, pp. 174-80.
- AVGERINOS, G.C., DRAPEU, D., SOCOLOW, J.S., et al., 1990, "Spin filter perfusion system for high density cell culture: production of recombinant urinary type plasminogen activator in CHO cells", *BioTechnology*, v. 8, pp. 54-58.
- BATT, B.C., DAVIS, R.H., KOMPALA D.S., 1990, "Inclined sedimentation for selective retention of viable hybridomas in a continuous suspension bioreactor", *Biotechnology Progress*, v. 6, p. 458-464.
- BIERAU, H., PERANI, A., AL-RUBEAI, M., et al., 1998, "A comparison of intensive cell culture bioreactors operating with Hybridomas modified for inhibited apoptotic response", *Journal of Biotechnology*, v. 62, pp. 195-207.
- BORN, C., ZHANG, Z., AL-RUBEAI, M., et al., 1992, "Estimation of disruption of animal cells by laminar shear stress", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, pp. 1004-1010.
- BROWN, D.G., SUN, X-M., COHEN, G.M., 1993, "Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation", *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, pp. 3037-3039.
- BUJA, L.M., EIGENBRODT, M.L., EIGENBRODT, E.H., 1993, "Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death", *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 117, n. 12, pp. 1208-1214.
- CALLE, Y., PALOMARES, T., CASTRO, B., et al., 2000, "Removal of N-glycans from cell surface proteins induces apoptosis by reducing intracellular glutathione

levels in the rhabdomyosarcoma cell line S4MH”, *Biology of the Cell*, v. 92, pp. 639-646.

CASTILHO, L., MEDRONHO, R.A., 2002, “Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures”, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 74, pp. 129-169.

CASTILHO, L., MEDRONHO, R.A., 2007, “Animal Cell Separation”, In: Castilho, L.R., Augusto, E.F, Moraes, A.M e Butler, M. (eds), *Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Taylor & Francis, Andover, UK

CASTILHO, L.R., 2001, *Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells*. Ph.D. thesis, Fortschritt-Berichte VDI, Düsseldorf: VDI Verlag, Alemanha.

CASTILHO, L.R., ANSPACH, F.B., DECKWER, W-D. 2002, “An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter”, *Biotechnology Progress*, v. 18, pp. 776-781.

CHISTI, Y., 2001, “Hydrodynamic damage to animal cells”, *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 21, n. 2, pp. 67-110.

CHOO, C.Y., TIAN, Y., KIM, W.S., et al., 2007, “High-level production of a monoclonal antibody in murine myeloma cells by perfusion culture using a gravity settler”, *Biotechnology Progress*, v. 23, pp. 225-231.

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

COTTER, T.G., AL-RUBEAI, M., 1995, “Cell death (apoptosis) in cell culture systems”, *Trends in Biotechnology*, v. 13, pp. 150-155.

DALM, M.C., CUIJTEN, S.M., VAN GRUNSVEN, W.M., et al., 2004, “Effect of feed and bleed rate on hybridoma cells in an acoustic perfusion bioreactor: part I. cell density, viability, and cell-cycle distribution”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, pp. 547-557.

- DEO, Y.M., MAHADEVAN, M.D., FUCHS, R., 1996, "Practical considerations in operation and scale-up of spinfilter based bioreactors for monoclonal antibody production", *Biotechnology Progress*, v. 12, pp. 57–64.
- DOBLHOFF-DIER, O., GAIDA, T., KATINGER, H., 1994, "A novel ultrasonic resonance field device for the retention of animal-cells", *Biotechnology Progress*, v. 10, pp. 428–432.
- DOYLE, A., GRIFFITHS, J.B. 1998, "The cell: Selection and standardization". In: DOYLE, A., GRIFFITHS, J.B. (eds), *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*, Chapter 1, New York, John Wiley & Sons.
- EAGLE, R.E. 1955, "Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture", *Science*, v. 122, pp. 501-504.
- ELSAYED, E.A., MEDRONHO, R.A., WAGNER, R., et al., 2006, "Use of Hydrocyclones for Mammalian Cell Retention: Separation Efficiency and Cell Viability (Part 1)", *Engineering Life Science*, v. 6, pp. 347-354.
- ESCLADE, L.R.J., CARREL, S., PERINGER, P., 1991, "Influence of the screen material on the fouling of spin filters", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, pp. 159–168.
- FOGOLÍN, M.B, EBERHARDT, M.O, KRATJE, R., ETCHEVERRIGARAY, M., 2002, "Choice of the adequate quantification method for recombinant human GMCSF produced in different host systems", *Electronic Journal of Biotechnology*, v.5, pp. 243-250.
- FORNO, G., FOGOLIN, M.B., OGGERO, M., et al., 2004, "N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line" *European Journal of Biochemistry*, v. 271, pp. 907-919.
- FUSSENEGGER, M., BAILEY, J.E., 1999, "Control of mammalian cell proliferation as an important strategy in cell culture technology. Cancer therapy and tissue engineering". In: Al-Rubeai, M. (ed), AH Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers.

- FUSSENEGGER, M., BAILEY, J.E., HAUSER, H. et al., 1999, "Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells", *Trends in Biotechnology*, v. 17, pp. 35-42.
- GAIDA, T., DOBLHOFF-DIER, O., STRUTZENBERGER, K., et al., 1996, "Selective retention of viable cells in ultrasonic resonance field devices", *Biotechnology Progress*, v. 12, pp. 73-76.
- GORENFLO, V.G, SMITH, L., DEDINSK, B., et al., 2002, "Scale-up and optimization of an acoustic filter for 200 l/day perfusion of a cho cell culture" *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, pp. 438-444.
- GRIFFITHS, J.B., 1984, "Cell Biology: Experimental Aspects". In: Spier, R.E, Griffiths, J.B. (eds), *Animal Cell Biotechnology*, 1 ed., chapter 3, Orlando, USA, Academic Press.
- GRIFFITHS, J.B., 1992, "Scaling up of animal cell cultures". In: Freshney, R.I. (ed), *Animal Cell Culture, a Practical Approach*, pp. 47-93 Oxford, IRL Press at Oxford University Press.
- HALDANKAR, R., KOPCHICK, J.J., RIDGWAY, D., 1999, "Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture", *Biotechnology Progress*, v. 15, pp. 336-346.
- HAWRYLIK, S.J., WASIKO, D.J., PILLAR, J.S., et al., 1994, "Vortex flow of mammalian and insect cells", *Cytotechnology*, v. 15, pp. 253-258.
- HOUDEBINE, L.M., 2002, "Antibody manufacture in transgenic animal and comparison with others systems", *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, pp. 625-629.
- HU, W.S., AUNINS, J.G., 1997, "Large-scale mammalian cell culture", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 8, pp. 417-449.
- IDING, K., LÜTKEMEYER, D., FRAUNE, E., 2000, "Influence of alterations in culture condition and changes in perfusion parameters on retention performance of

a 20µm spinfilter during a perfusion cultivation of a recombinant CHO cell line in pilot scale”, *Cytotechnology*, v. 14, pp. 141-200.

IMM, 2005, “Institute for Environmental Medicine”, <http://www.imm.ki.se/sft/bilder>, acessado em 16/05/2005.

JÄGER, V., 1992, “A novel perfusion system for the large-scale cultivation of animal cells based on a continuous flow centrifuge”. In: SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B.; MACDONALD, C. (eds.), *Animal cell technology: developments, processes and products.*, pp. 397-402, Butterworth-Heinemann, Oxford.

JOCKWER, A., MEDRONHO, R. A., WAGNER, R., et al., 2001, “The use of hydrocyclones for mammalian cell retention in perfusion bioreactors”, In: *17th Meeting of ESACT (European Society for Animal Cell Technology), Animal Cell Technology: From Target to Market*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

JOHNSON, M., LANTHIER, S., MASSIE, B., et al., 1996, “Use of the Centritech Lab centrifuge for perfusion culture of hybridoma cells in protein-free medium”, *Biotechnology Progress*, v. 12, PP. 855–864.

KADOURI, A., 1994, “Cultivation of anchorage-dependent mammalian cells and production of various metabolites”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 2, pp. 265-272.

KADOURI, A., SPIER, R.E., 1997, “Some myths and messages concerning the batch and continuous culture of animal cells”, *Cytotechnology*, v. 24, pp. 89-98.

KALLEL, H., ROUROU, S., NAJOU, S., et al., 2003, “A novel process for the production of variety rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in a 20-L bioreactor”, *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 61, pp. 441-446.

KAWAHARA, H., MITSUDA, S., KUMAZAWA, E., et al., 1994, “High-density culture of FM-3A cells using a bioreactor with an external tangential-flow filtration device”, *Cytotechnology*, v. 14, p. 61-66.

- KIM, N.S., LEE, G.M., 2002, "Response of recombinant Chinese hamster ovary cells to hyperosmotic pressure: effect of Bcl-2 overexpression", *Journal of Biotechnology* V. 95, pp. 237-248.
- KOLLER, M.R., PAPOUTSAKIS, E.T., 1995, "Cell adhesion in animal cell culture: physiological and fluid-mechanical implications", *Bioprocess Technology*, v. 20, pp. 61-110.
- KRETZMER, G. 2002, "Industrial processes with animal cells", *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 59, pp. 135-142.
- KUCHLER, R.J., 2000, *Biochemical methods in cell culture and virology*. Dowden, Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, USA.
- LAO, M.S., TOTH, D., 1997, "Effect of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant chinese ovary cell culture", *Biotechnology Progress*, v. 13, pp. 688-691.
- LEGRAND, C., BOUR, J.M., JACOB, C., 1992, "Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium", *Journal of Biotechnology*, v. 25, pp. 231-243.
- LIPSCOMB, M.L., MOWRY, M.C., KOMPALA, D.S., 2004, "Production of a secreted glycoprotein from an inducible promoter system in a perfusion bioreactor", *Biotechnology Progress*, v. 20, pp. 1402-1407.
- LOEFFLER, M., KROEMER, G., 2000, "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita". *Experimental Cell Research*, v. 256, pp. 19-26.
- LÜBBERSTEDT, M., MEDRONHO, R.A., ANSPACH, F.B., 2000a, "Separation of mammalian cells using hydrocyclones", In: *Proceedings of Biotechnology*, Dechema eV, Frankfurt am Main, v. 1, p. 460-462.
- LÜBBERSTEDT, M., MEDRONHO, R.A., ANSPACH, F.B., et al., 2000b "Abtrennung tierischer Zellen mit Hydrozyklonen", *Chemical Engineering & Technology*, v. 72, p. 1089-1090.

- LUBINIECKI, A.S., 1998, "Historical reflections on cell culture engineering", *Cytotechnology*, v. 28, pp. 139-145.
- MAIORELLA, B., DORIN, G., CARION, A., et al., 1991, "Crossflow microfiltration of animal cells", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 37, pp. 121–126.
- MARTIN, S.J, REUTELINGSPERGER, C.P.M, MCGAHON, A.J., et al., 1995, "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl", *Journal of Experimental Medicine*, v. 182, pp. 1545-1556.
- MEDRONHO, R.A., SCHUETZE, J., DECKWER, W.-D., 2005, "Numerical simulation of hydrocyclones for cell separation", *Latin American Applied Research*, v. 35, pp.1-8.
- MERCILLE, S., JOHNSON, M., LANTHIER, S., et al., 2000, "Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 67, pp. 435-450.
- MERCILLE, S., JOHNSON, M., LEMIEUX, R., et al., 1994, "Filtration-based perfusion of hybridoma cultures in protein-free medium: reduction of membrane fouling by medium supplementation with DNase 1", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, pp. 833-846.
- MERCILLE, S., MASSIE, B., 1994b, "Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells", *Cytotechnology*, v. 15, pp. 117-128.
- MERCILLE, S.E., MASSIE, B., 1994a, "Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 1140-1154.
- MEREDITH, J.E., SCHWARTZ, M.E., 1997, "Integrins, adhesion and apoptosis" *Trends in Cell Biology*, v.7, pp. 146.
- NAGATA, S., 2000, "Apoptotic DNA fragmentation", *Experimental Cell Research*, v. 256, pp.12-18.

- NOLLERT, M.U., DIAMOND, S.L., MCINTRE, L.V., 1991, "Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, pp. 588-602.
- OH, S.K.W., VIG, P., CHUA, F.K.F., et al, 1993, "Substantial Over production of antibodies by applying osmotic pressure and sodium butyrate", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, pp. 601.
- OZTURK, S.S., THRIFT, J.C., BLACKIE, J.D. et al., 1997 "Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor", *Biotechnology and Bioengineering*, v.53, pp. 372-378.
- PANINA, G.F., 1984, Monolayer growth systems: multiple process". In: Spier, R.E., GRIFFITHS, J.B. (eds), *Animal Cell Biotechnology Volume 1*, chapter 9, Florida, USA, Academic Press.
- PLÄSIER, B., LLOYD, D.R., PAUL, G.C., et al., 1999, "Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay", *Journal of Immunology Methods*, v. 229, pp. 81–95.
- PUCK, T.T., CIECIURA, S.J., ROBINSON, A., 1958, "Genetics of somatic mammalian cells, III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects", *Journal of Cell Physiology*, v. 52, pp. 945-956.
- PUI, P.W.S., TRAMPLER, F., SONDERHOFF, S.A., et al., 1995, "Batch and semicontinuous aggregation and sedimentation of hybridoma cells by acoustic-resonance fields", *Biotechnology Progress*, v. 11, pp. 146–152.
- RACHER, A.J., LOOBY, D. E GRIFFITHS J.B., 1990, "Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability", *Cytotechnology*, v. 3, p. 301-307.
- RAJU, T.S., BRIGGS, J.B., BORGE, S.M., et al., 2000, "Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoproteins therapeutics", *Glycobiology*, v. 10, n. 5, pp. 477-486.

- ROTH, G., SMITH, C.E, SCHOOFS, G.M., et al., 1997, "Using a external vortex flow filtration device for perfusion cell culture", *BioPharmaceuticals.*, v. 10, pp. 30-35.
- RYLL, T., DUTINA, G., REYES, A., et al., 2000, "Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 69, pp. 440–449.
- SANFELIU, A., STEPHANOPOULOS, G., 1999, "Effect of glutamine limitation on the death of attached Chinese hamster ovary cells", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 64, pp. 46-53.
- SANFORD, K.K., EARLE, W.R., EVANS, V.J., et al., 1950, "The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei", *Journal of the National Cancer Institute*, v.11, pp. 773–795.
- SEARLES, J.A., TODD, P., KOMPALA, D.S., 1994, "Viable cell recycle with an inclined settler in the perfusion culture of suspended recombinant Chinese hamster ovary cells", *Biotechnology Progress*, v. 10, pp. 198–206.
- SHIRGAONKAR, I.Z., LANTHIER, S., KAMEN, A., 2004, "Acoustic cell filter: a proven cell retention technology for perfusion of animal cell cultures", *Biotechnology Advances*, v. 22, pp. 433-444.
- SIMPSON, N.H., MILNER, A., AL-RUBEAI, M., 1997, "Prevention of hybridoma cell death by *bcl-2* during suboptimal culture conditions", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 54, pp. 1-16.
- SIMPSON, N.H., SINGH, R.P., PERANI, A., et al., 1998, "In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, wich is suppressed by the expression of the *bcl-2* gene", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59, pp. 90-98.
- SINACORE, M.S., DRAPEAU, D., ADAMSON, S.R., 2000, "Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media", *Molecular Biotechnology*, v. 15, pp. 249-57.

- SINGH, R.P., AL-RUBEAI, M., 1998, "Apoptosis and bioprocess technology", *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 62, pp. 167-84.
- SINGH, R.P., AL-RUBEAI, M., GREGORY, C.D., et al., 1994, "Cell death in bioreactors: a role for apoptosis", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 720-726.
- SINGH, R.P., FINKA, G., EMERY, A.N., et al., 1997, "Apoptosis and its control in cell culture systems", *Cytotechnology*, v. 23, pp. 87-93.
- SMITH, P.C., GUILLAUME, J.M., GREENFIELD, P.F., 1991, "Experience in scale-up of homogeneous perfusion culture for hybridomas", *Bioprocess Engineering*, v. 6, pp. 213-219.
- SUZUKI, E., OLLIS, D.F. 1989, "Cell cycle model for antibody production kinetics", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 34, pp. 1398-1402.
- SUZUKI, E., OLLIS, D.F., 1990, "Enhanced antibody production at slowed growth rates: experimental demonstration and a simple structured model", *Biotechnology Progress*, v. 6, pp. 231-236.
- TAKAGI, M., ILIAS, M., YOSHIDA, T., 2000, "Selective retention of active cells employing low centrifugal force at the medium change during suspension culture of chinese hamster ovary cells producing tpa", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 89, pp, 340-344.
- TEY, B.T., SINGH, R.P., PIREDDA, L., et al., 2000, "Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NS0 cultures", *Journal of Biotechnology*, v. 79, pp. 147-159.
- TILLY, J.L., TILLY, K.I., 1995, "Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles", *Endocrinology*, v.136, pp. 242-252.
- TINTO, A., GABERNET, C., VIVES, J., et al., 2002, "The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions", *Journal of Biotechnology*, v. 95, pp. 205-214.

- TOKASHIKI, M., ARAI, T., HAMAMOTO, K., et al., 1990, "High density culture of hybridoma cells using a perfusion culture vessel with an external centrifuge", *Cytotechnology*, v. 3, pp. 239–244.
- TOKASHIKI, M., YOKOYAMA, S., 1997, "Bioreactor designed for animal cell", In: Hauser, H., Wagner, R. (eds), *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, chapter 3.1, Berlin, Walter de Gruyter.
- VALDÉZ, R., GÓMEZ, L., PADILLA, S., et al., 2003, "Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 308, pp. 94-100.
- VAN DER POL, L., ZIJLSTRA, G., THALEN, M., et al., 1990, "Effect of serum concentration on production of monoclonal antibodies and on shear sensitivity of a hybridoma", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 5, pp. 241-245.
- VAN REIS, R., SYDNEY, A., 2001, "Membrane separations in biotechnology", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, pp. 208-211.
- VARECKA, R., SCHEIRER, W., 1987, "Use of a rotating wire cage for retention of animal cell in a perfusion fermentor", *Developments in Biology Standards*, v. 66, pp. 269–272.
- VOGEL, J.H., KRONER, K.H., 1999, "Controlled Shear Filtration: A Novel Technique for Animal Cell Separation", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 63, pp. 663-674.
- VOISARD, D., MEUWLY, F., RUFFIEUX, P.A., et al., 2003, "Potential cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 92, pp. 752-765.
- WALSH, G., 2003, "Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.55, pp. 3-10.

- WEN, Z.Y., TENG, X.W., CHEN, F., 2000, "A novel perfusion system for animal cell cultures by two step sequential sedimentation", *Journal of Biotechnology*, v.79, pp. 1-11.
- WOODSIDE, S.M., BOWEN, B.D., PIRET, J.M., 1998, "Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors", *Cytotechnology*, v. 28, pp. 163-175.
- WU, J., KING, G., DAUGULIS, A.J., 1990, "Adaptation of insect cells to suspension culture", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 70, pp. 90-93.
- WU, S.C., HUANG, G.Y.L., LIU, J.H., 2002, "Production of retrovirus and adenovirus vectors for gene therapy: a comparative study using microcarrier and stationary cell culture", *Biotechnology progress*, v. 18, pp. 617-622.
- WURM, F.M., 2004, "Production recombonant protein therapeutics in cultivated mammalian cells", *Nature Biotechnology*, v. 22, pp. 1393-1398.
- YIM, S.S., AYAZI-SHAMLOU, P., 2000, "The engineering effects of fluid flow on freely suspended biological macro-materials and macromolecules", *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.67, p. 83-122.
- ZANGHI, A.J., FUSSENEGGER, M., BAILEY, J.E., 1999, "Serum protects protein-free competent Chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture", *Biotechnology and Bioengineering*, v.64, pp. 108-119.
- ZENG, A.P., DECKWER, W.D., 1999, "Model simulation and analysis of perfusion culture of mammalian cells at high cell density", *Biotechnology Progress*, v. 15, pp. 373-382.
- ZHANG, S., HANDA-CORRIGAN, A, SPIER, R. E. 1993, "A comparison of oxygenation methods fro high-density perfusion culture of animal cells", *Biotechnology and Bioengineering*, v.41, pp. 685-692.