

*FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS*

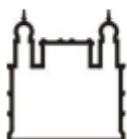
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

*DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PASSÍVEL DE AMPLIAÇÃO
DE ESCALA PARA A PROPAGAÇÃO DE CÉLULAS VERO EM
MICROCARREADORES*

ALINE GUIMARÃES DE ALMEIDA

Rio de Janeiro

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

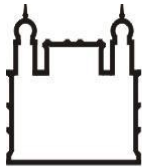
ALINE GUIMARÃES DE ALMEIDA

*Desenvolvimento de Protocolo Passível de Ampliação de Escala para
Propagação de Células Vero em Microcarregadores*

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

*Rio de Janeiro
2013*

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico sob a orientação do Dr. Rodrigo Coelho Ventura Pinto e da Dr.^a Marta Cristina de Oliveira Souza.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ALINE GUIMARÃES DE ALMEIDA

Desenvolvimento de Protocolo Passível de Ampliação de Escala para Propagação de Células Vero em Microcarregadores

Orientadores: Dra. Marta Cristina de Oliveira Souza e Dr. Rodrigo Coelho Ventura Pinto

Dissertação aprovada em 10 de abril de 2013.

Examinadores:

*Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa
FIOCRUZ*

*Profa Dra. Leda dos Reis Castilho
Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE (UFRJ)/RJ*

*Dr. Carlos Augusto Pereira
Laboratório de Imunologia Viral - Instituto Butantan/SP*

Suplentes:

*Dr. Alvio Figueredo Cardero
Centro de Imunologia Molecular – CIM/ Cuba*

*Dr. Eduardo Ruback dos Santos
FIOCRUZ*

*Rio de Janeiro
2013*

A Deus, minha família e amigos.

Minha eterna gratidão

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças quando precisei, fé para acreditar que tudo daria certo e paciência.

À Fiocruz pela oportunidade de realização do mestrado e apoio financeiro.

Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos pela possibilidade e boas condições fornecidas de realização deste trabalho e à direção do MPTI nas pessoas das Dra. Sheila e Zaíra.

Aos meus orientadores Marta Cristina de Oliveira Souza e Rodrigo Coelho Ventura Pinto pela paciência, disponibilidade, ajuda e ensinamentos. Obrigada pela tranquilidade e dedicação com que me orientaram.

A todos os colegas do LATEV pelo apoio prestado durante a execução do trabalho. Principalmente a Kelly Araújo Lúcio, Max Areas e Gerson de Oliveira da Silva pela enorme disposição em sempre me ajudar. Sem o trabalho de vocês seria muito mais difícil.

Ao meu amigo Marlon Vicente Silva muito obrigada por dividir seu conhecimento comigo, pela paciência e disposição. Obrigada por que muitas vezes eu nem sequer precisei pedir a sua ajuda.

Ao amigo Luiz Fernando Carvalho obrigada pela amizade, ajuda nos experimentos e pelos conselhos “doidos” e também sensatos que foram fundamentais para o meu crescimento como profissional e pessoa.

À equipe do projeto Febre Amarela Inativada obrigada pela ajuda e companheirismo.

Aos meus grandes amigos do MPTI Arthur Corrêa, Poliana Vitta, Aline Martins, André Fragoso, Luiz Gustavo Almeida, Lívia Rubatino e Dênis Millan. Todos vocês foram fundamentais nessa caminhada e agradeço a Deus a oportunidade de conhecê-los, obrigada pela paciência comigo nos momentos de pressão e desespero.

Aos meus amigos de Volta Redonda que de forma indireta contribuíram muito com suas amizades e apoio. Muito obrigada Silvia Kanashiro, Natália Cândido, Natália Duarte, Ana Carolina Nicácio e Thaís fragoso.

À minha linda família por acreditar em mim e compreender a minha ausência. Obrigada por sempre poder contar com vocês !

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Vacinas Virais	1
<u>1.1.1. A Vacina Amarílica.....</u>	2
<u>1.1.2. Cultivo celular para produção de vacinas</u>	4
<u>1.1.3. Cultivo celular em meio livre de soro</u>	5
1.1.4. Cultivo em microcarregadores.....	6
1.2. Sistemas de cultivo de células de mamíferos	10
1.2.2. Frascos tipo “T”.....	11
1.3.2. Frascos do tipo spinner.....	11
1.2.3. Garrafas rotatórias (roller)	12
1.4. Escalonamento	19
1.4.1. Estratégias de escalonamento utilizando microcarregadores	23
2. OBJETIVOS	1
2.1. Objetivo Geral.....	1
2.2. Objetivos Específicos.....	1
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Materiais	28
3.1.1. Linhagem Celular	28
3.1.2. Microcarregadores	28
3.1.3. Meios de Cultivo.....	29
3.1.4. Solução de tripsina/verseno	29
3.1.5. Solução de azul de trypan.....	29
3.1.6. Solução de cristal violeta.....	30
3.1.7. Solução inibidora de tripsina	30
3.2. Equipamentos.....	30
3.2.1. Frascos estáticos do tipo “T”	30
3.2.2. Frascos tipo spinner.....	30
3.3. Metodologia Experimental	31
3.3.1. Crescimento Celular.....	31
<u>3.3.1.1. Descongelamento e propagação das células em monocamada</u>	31

3.3.2. Propagação das células em microcarregadores em frascos agitados do tipo spinner.....	32
3.3.3. Transferência bead-to-bead.....	33
3.3.4. Tripsinização de células aderidas a microcarregadores.....	33
3.4. Metodologia Analítica.....	34
3.4.2. Determinação do crescimento celular em frascos estáticos.....	34
3.4.3. Determinação da concentração de células nos cultivos com microcarregadores.....	34
3.4.4. Determinação da concentração de glicose e lactato.....	35
3.4.5. Microscopia óptica.....	35
3.5. Planejamento experimental para avaliação do protocolo de agitação.....	36
3.6. Avaliação de parâmetros representativos do metabolismo celular.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Cultivo de células Vero em meio livre de soro fetal bovino.....	38
4.1.1. Cinética de crescimento celular em frascos estacionários.....	38
4.1.2. Comparação do uso de meio com soro fetal bovino e meio condicionado na etapa de tripsinização de células Vero.....	43
4.1.3. Cinética de crescimento celular em spinners.....	48
4.2. Ensaio de transferência de células Vero pela metodologia bead-to-bead.....	50
4.2.1. Transferência bead-to-bead utilizando agitação intermitente e contínua.....	50
4.2.2. Transferência bead-to-bead empregando planejamento experimental.....	54
4.2.3. Transferência bead-to-bead empregando soro fetal bovino.....	63
4.2.4. Tripsinização celular em microcarregadores.....	64
4.2.4.1. Tripsinização celular em pH alcalino.....	71
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO_2 – Dióxido de carbono

DEAE - Dietilaminoetil

DME - Dulbecco's Modified Eagle's

DMSO - Dimetilsulfóxido

ECACC - European Collection of Animal Cell Cultures

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EGF – Epidermal Growth Factor (fator de crescimento epidérmico)

FDA – Food and Drug Administration

HS – Horse serum (soro de cavalo)

LATEV – Laboratório de Tecnologia Viroológica, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ

m/v – massa/volume

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Phosphate buffered saline (Solução Salina Tamponada)

PFU – Plaque-forming units (Unidade formadora de placa)

SFB – Soro Fetal Bovino

VP-SFM – Virus Production Serum Medium Free

v/v – volume/volume

μ_x - taxa específica de crescimento celular

X_n - concentração celular no tempo n (t_n)

t_d - tempo de duplicação celular

q_{glc} - taxa específica de consumo de glicose

q_{lac} - taxa específica de produção de lactato

$Y_{x,glc}$ - fator de rendimento de glicose em células

LISTA DE FIGURAS

Número	Descrição	Página
Figura 1.1	Representação esquemática dos microcarregadores Cytodex 1, Cytodex 3, Cytopore 1 e Cytoline 1 (Adaptado de GE Healthcare, 2005).	10
Figura 1.2	Frascos T para cultivo celular em sistema estático (fonte Greiner Cellstar® Tissue Culture Flasks with plug or filter cap closures).	11
Figura 1.3	Frasco Spinner (fonte: Tri Stars Laboratory Glassware & Scientific Equipment).	12
Figura 1.4	Biorreator de ondas com capacidade de 100 a 500 litros (fonte: GE Healthcare Life Sciences).	16
Figura 1.5	Representação esquemática de um biorreator air-lift com recirculação interna (esquerda) e recirculação externa (direita) (Warnocke Al-Rubeai, 2006).	16
Figura 1.6	Representação esquemática de um biorreator de leito empacotado da CelliGen Plus (Warnock e Al-Rubeai, 2006).	17
Figura 1.7	Representação esquemática do biorreator de leito fluidizado Cytopilot mini (Warnock e Al-Rubeai, 2006).	18
Figura 1.8	Representação esquemática de formas de ampliação de escala (Adaptado de GE Healthcare, 2005) onde, partindo de garrafas estacionárias T175cm ² , é possível inocular 16 garrafas roller de 850cm ² que, por sua vez, são usadas para inocular outras 64 garrafas, ou então, um biorreator de 5 a 10 litros. Esse biorreator servirá de inóculo para um segundo biorreator de maior volume podendo chegar a um volume de trabalho final de 250 a 500 litros, o qual equivaleria a aproximadamente 10.000 garrafas roller de 850 cm ² .	21
Figura 4.9	Cinética de crescimento celular da célula Vero com diferentes concentrações de inóculo, (\diamond) 30.000 células/cm ² e (\square) 60.000 células/cm ² . Os resultados representam a média de 3 replicatas biológicas e seu desvio padrão.	39
Figura 4.10	Microscopia dos cultivos de 30.000 células/cm ² e 60.000	40 - 41

células/cm²

- Figura 4.11 (◻) Consumo de glicose, (▲) formação de lactato e (◇) concentração de células Vero cultivadas em sistema estático, para inóculo inicial de 30.000 células/cm² (A) e 60.000 células/cm² (B) utilizando meio de cultivo VP-SFM. 42
- Figura 4.12 Determinação da taxa específica de consumo de glicose das diferentes concentrações de inóculo em frascos T, (◇) 30.000 células/cm² e (◻) 60.000 células/cm² nos cultivos utilizando meio VP-SFM. 43
- Figura 4.13 Cinética de crescimento celular da célula Vero em microcarregadores em frascos spinner, cujos procedimentos de obtenção do inóculo celular compreenderam o uso de (◇) meio com SFB 5% (v/v) e (◻) meio condicionado para a inativação da Tripsina. Os resultados representam a média de 3 replicatas técnicas e seu desvio padrão. 45
- Figura 4.14 Microscopia do cultivo de células Vero em microcarregadores empregando spinners, cujo inóculo foi proveniente de processo de tripsinização utilizando meio condicionado e meio com SFB, conforme descrito na figura. 46
- Figura 4.15 Microscopia do cultivo de células Vero em frascos T estacionários utilizando inóculo cujo processo de tripsinização foi utilizado meio condicionado e meio com soro fetal bovino, conforme descrito na figura. 47
- Figura 4.16 Microscopia do cultivo de células Vero em frascos T estacionários utilizando inóculo cujo processo de tripsinização foi utilizado meio condicionado e empregada uma segunda etapa de lavagem. 48
- Figura 4.17 (◇) Cinética de crescimento celular da célula Vero em microcarregadores em frascos spinners, cujo procedimento de obtenção do inóculo celular se deu através do uso de meio condicionado para a inativação da Tripsina. Os resultados representam a média de 3 replicatas biológicas, 2 replicatas técnicas de cada uma delas e seu desvio padrão. 50
- Figura 4.18 Comparação do crescimento celular entre os sistemas de (◇) agitação contínua e (◻) intermitente. O momento da transferência e o início do processo de intermitência teve início em 72 horas de cultivo (↓) tendo duração de 7 horas com intervalos de 30 minutos de repouso e 30 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão. 51
- Figura 4.19 Determinação da concentração de (◇) glicose e (◻) lactato 52

no meio de cultivo para os spinners submetidos ao modo de agitação contínuo (A) e intermitente (B).

- Figura 4.20 *Determinação da concentração celular em processo de transferência bead-to-bead utilizando o modo de agitação intermitente durante 48 horas. Em 72 horas (↓) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (↓) e final em 120 horas (↓), em intervalos de 30 minutos de repouso e 30 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.* 53
- Figura 4.21 *Determinação da concentração de (◇) glicose e (□) lactato no meio de cultura. Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 48 horas, em intervalos de 30 minutos de agitação e 30 minutos de repouso e posteriormente seguido de agitação contínua.* 53
- Figura 4.22 *Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente ao experimento 2 do planejamento fatorial completo 2² empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (↓) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (↓) e final em 120 horas (↓), em intervalos de 15 minutos de agitação e 60 minutos de repouso. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.* 56
- Figura 4.23 *Determinação da concentração de glicose e lactato no meio de cultura referente ao experimento 2 do planejamento fatorial completo 2². Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 15 minutos de agitação e 60 minutos de repouso. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. A seta indica momento em que foi realizada a substituição de 100mL do meio.* 56
- Figura 4.24 *Microscopia do acompanhamento do processo de transferência, sendo 1A e 1B referentes ao segundo dia de cultivo do spinner de transferência; 2A e 2B ao terceiro dia de cultivo; 3A e 3B são referentes ao primeiro dia nos spinners submetidos à agitação intermitente; 4A e 4B ao segundo dia de agitação intermitente e 5A e 5B ao terceiro dia. As setas indicam onde pode ser visualizado o fenômeno de ponte.* 57 - 58
- Figura 4.25 *Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente ao experimento 1 do* 58

planejamento fatorial completo 2^2 empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (↓) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (↓) e final em 120 horas (↓), em intervalos de 45 minutos de repouso e 60 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

- Figura 4.26 *Determinação da concentração de glicose e lactato no meio de cultura referente ao experimento 1 do planejamento fatorial completo 2^2 . Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 60 minutos de agitação e 45 minutos de repouso e, posteriormente, seguido de agitação contínua.* 59
- Figura 4.27 *Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente ao experimento 3 do planejamento fatorial completo 2^2 empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (↓) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (↓) e final em 120 horas (↓), em intervalos de 30 minutos de repouso e 45 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.* 59
- Figura 4.28 *Determinação da concentração de glicose e lactato no meio de cultura referente ao experimento 3 do planejamento fatorial completo 2^2 . Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 45 minutos de agitação e 30 minutos de repouso e, posteriormente, seguido de agitação contínua.* 60
- Figura 4.29 *Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente ao experimento 4 do planejamento fatorial completo 2^2 empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (↓) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (↓) e final em 120 horas (↓), em intervalos de 30 minutos de repouso e 15 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.* 60
- Figura 4.30 *Determinação da concentração de glicose e lactato no meio de cultura referente ao experimento 4 do planejamento fatorial completo 2^2 . Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo* 61

utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 15 minutos de agitação e 30 minutos de repouso e, posteriormente, seguido de agitação contínua.

- Figura 4.31 *Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente aos experimentos 5, 6 e 7 do planejamento fatorial completo 2^2 empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (↓) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (↓) e final em 96 horas (↓), em intervalos de 45 minutos de repouso e 30 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.* 61
- Figura 4.32 *Determinação da concentração de glicose (A) e lactato (B) no meio de cultura referente aos experimentos 5, 6 e 7 do planejamento fatorial completo 2^2 . Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 30 minutos de agitação e 45 minutos de repouso e, posteriormente, seguido de agitação contínua.* 62
- Figura 4.33 *Determinação da concentração celular do processo de transferência bea-to-bead utilizando 5% (v/v) de SFB no meio de cultivo empregando o modo de agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (↓) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (↓) e final em 120 horas (↓), em intervalos de 60 minutos de repouso e 15 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.* 63
- Figura 4.34 *Microscopia do cultivo de células Vero em microcarregadores em frascos tipo spinner. Processo de tripsinização ocorreu com 72 horas de cultivo utilizando 50mL de solução tripsina/verseno e 3 lavagens prévias com Verseno.* 65
- Figura 4.35 *Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 50mL de solução tripsina/verseno com 3 lavagens prévias com verseno. A seta indica o momento da tripsinização. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.* 66
- Figura 4.36 *Microscopia do cultivo de células Vero em microcarregadores em frascos tipo spinner após término do processo de intermitência. Tripsinização ocorreu em 72 horas de cultivo sendo feita uma lavagem prévia com* 67

verseno e utilizando um volume de 25mL de solução tripsina/verseno, sendo então submetido a agitação intermitente por 24 horas.

- Figura 4.37* Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores sendo realizada uma lavagem prévia com verseno e utilizando um volume de 25mL de solução tripsina/verseno. A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão. 68
- Figura 4.38* Microscopia do cultivo de células Vero em microcarregadores em frascos tipo spinner. Processo de tripsinização ocorreu em 72 horas de cultivo utilizando 13mL de solução tripsina/verseno e uma lavagem prévia com Verseno, sendo então submetido à agitação intermitente por 24 horas. 69
- Figura 4.39* Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 13mL de solução tripsina/verseno com uma lavagem prévia com verseno. A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão. 70
- Figura 4.40* Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 6,5mL de solução tripsina/verseno com uma lavagem prévia com verseno. A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão. 71
- Figura 4.41* Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 13mL de solução tripsina/verseno e alcalinização prévia do meio de cultivo. A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão. 73
- Figura 4.42* Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 13mL de solução tripsina/verseno e alcalinização prévia do meio de cultivo em volume reduzido (63mL). A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão. 73

LISTA DE TABELAS

Número	Descrição	Página
<i>Tabela 1.1</i>	<i>Resumo das aplicações dos microcarregadores na indústria de vacinas (Adaptado GE Healthcare, 2005)</i>	<i>7</i>
<i>Tabela 1.2</i>	<i>Alguns microcarregadores comerciais e suas propriedades</i>	<i>9</i>
<i>Tabela 1.3</i>	<i>Classificação dos biorreatores segundo a homogeneidade do sistema (adaptado Chico et al. 2008)</i>	<i>15</i>
<i>Tabela 3.4</i>	<i>Condições experimentais do planejamento fatorial completo 2².</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 3.5</i>	<i>Matriz do planejamento fatorial completo 2².</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 4.6</i>	<i>Matriz do planejamento fatorial completo 2² para a determinação das melhores condições para transferência bead-to-bead. A matriz demonstra os pontos experimentais codificados, os valores iniciais e máximos da concentração celular observados e o seu percentual de incremento. O repouso foi avaliado entre 30 e 60 minutos e a agitação entre 15 e 45 minutos.</i>	<i>55</i>

RESUMO

Devido à necessidade crescente de desenvolvimento de bioprocessos de produção de vacinas virais empregando linhagens de células de mamíferos e sem utilizar componentes de origem animal, bem como de estabelecimento de uma nova metodologia para a produção de uma vacina inativada contra a febre amarela, é de grande importância investigar o desenvolvimento de um novo processo, baseado na propagação do vírus amarílico em linhagens celulares cultivadas em biorreatores sob condições monitoradas e controladas que permitam uma maior reprodutibilidade, ao invés do uso de ovos embrionados. Para isso, a ampliação da escala de produção é uma etapa importante no desenvolvimento de um produto, pois deve ser executada de forma que todos os resultados obtidos em escala de laboratório possam ser reproduzidos também na escala industrial de produção prevista.

No entanto, esse procedimento apresenta desafios a serem resolvidos, como, por exemplo, quando se faz o uso de microcarregadores, precisamente no procedimento de transferência celular entre microcarregadores, em escala industrial. Para esse fim, inicialmente foi avaliada a técnica de tripsinização com o objetivo de não se utilizar soro fetal bovino durante o processo de inativação da tripsina, já que foram utilizadas células Vero adaptadas ao meio sem soro, sendo, portanto, adotado o meio condicionado para inativação da tripsina. Em seguida, utilizando microcarregadores, foi avaliado o perfil cinético e metabólico das células Vero, em frascos estáticos do tipo T e frascos agitados do tipo spinner. Conhecendo o perfil de crescimento, foi possível empregar a técnica de transferência bead-to-bead, utilizando agitação intermitente em diferentes intervalos de tempo. Observou-se que apenas no intervalo de 1 hora de agitação e 15 minutos de repouso houve crescimento celular significativo, tendo-se observado claramente, através de microscopia óptica invertida, o fenômeno de formação de pontes entre as células. Outra alternativa testada foi a tripsinização das células Vero nos microcarregadores, de forma que estas se soltassem e pudessem servir de inóculo tanto para os novos microcarregadores quanto para os antigos e, conseqüentemente, se multiplicassem. Foram testadas diferentes concentrações de soluções de tripsina, tendo-se observado que as células tripsinizadas apresentaram capacidade de aderir novamente aos microcarregadores, porém sem proliferação significativa. Para obtenção de melhores resultados, foi adicionado à etapa de tripsinização um tratamento prévio do meio de cultivo com NaOH, alcalinizando-o até que atingisse um pH entre 8 – 9. As células, além de mostrarem capacidade de aderir novamente aos microcarregadores, também se multiplicaram nos mesmos, indicando que a otimização da técnica torna-se válida e aplicável na ampliação de escala do bioprocessos.

ABSTRACT

Due to the increasing need of developing production processes for viral vaccines using mammalian cell lines in the absence of animal components, as well as a new method for the production of an inactivated vaccine against yellow fever, it is very important to develop a new process based on more controlled conditions. One way to achieve such demand is the propagation of yellow fever virus in cell lines grown in bioreactors using microcarriers and under monitored and controlled conditions in order to enable greater reproducibility. For this reason, the expansion of the production scale is an important step in the development of a product, since it must be performed in such a way that all the results obtained at laboratory scale can be reproduced at industrial scale.

However, this procedure presents challenges to be faced, for instance, when using microcarriers, precisely in the cell transfer operation among microcarriers at industrial scale. For this purpose, the commonly used technique of trypsinization was evaluated aiming the removal of fetal bovine serum during the process of inactivation of trypsin, substituting it by conditioned medium, since Vero cells adapted to serum-free medium were used. The metabolic and growth profile of Vero cell cultures in static T-flasks and stirred spinner flasks using microcarriers was also evaluated. Knowing the growth profile, it was possible to use the technique of bead-to-bead transfer, under intermittent stirring in different intervals. It was observed that only with 1 hour of stirring and 15 minutes of resting, there was significant growth and that bridges among cells on beads were formed, as shown by microscopic analyses. Alternatively, trypsinization of the cells on microcarriers was tested aiming the releasing of the cells and their inoculation to cultures containing new and old microcarriers. Different concentrations of trypsin were tested and it was observed that trypsinized cells showed ability to adhere to microcarriers, but without significant proliferation. For better results, a pretreatment of the medium with an alkalizing agent was added to the trypsinization step until it reached a pH between 8-9. Under these conditions the cells showed ability to adhere again to the microcarriers and to proliferate, indicating that such pretreatment is valid and applicable on a seed train strategy in microcarrier based processes.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vacinas Virais

O uso de vacinas foi introduzido a partir do início do século passado e contribuiu de forma significativa para a redução da incidência das doenças infecciosas. Nas últimas duas décadas o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas da imunologia e da biologia molecular, contribuiu de forma expressiva na implementação de novas vacinas e de novas estratégias de vacinação em todo mundo (Schatzmayr, 2003).

O objetivo principal das imunizações é prevenir o desenvolvimento do quadro clínico no indivíduo e, ao se alcançar um nível de imunidade elevada em grandes grupos populacionais, se obter o controle ou a eliminação de determinada virose. Essa eliminação foi alcançada nas Américas com a varíola, por exemplo (Schatzmayr, 2003).

Sabe-se que poucas políticas de saúde pública apresentam uma relação custo-benefício tão favorável como a utilização de vacinas em uma população. Neste caso, podemos citar o custo de uma imunização completa de três doses para a hepatite B com o custo do tratamento, ao longo de vários anos, de um caso clínico da doença que venha evoluir ao estado crônico. No Brasil a imunização básica para as viroses inclui a poliomielite, o sarampo, a caxumba e a rubéola, além da hepatite B e da febre amarela em regiões endêmicas (Schatzmayr, 2003).

As vacinas virais podem ser dos tipos atenuadas e vacinas inativadas. As vacinas inativadas são utilizadas rotineiramente na prevenção de inúmeras doenças, como a influenza (Plosker, 2012), poliomielite (vacina tipo Salk) (Callaway, 2013), raiva (Hicks et al. 2012) e hepatite A (Wu et al. 2012). Os vírus são inativados por vários métodos químicos, em particular o formol ou detergentes, ou físicos que eliminam a capacidade do vírus se multiplicar no hospedeiro.

As vacinas inativadas oferecem como grande vantagem uma maior segurança, pois não há multiplicação do agente no organismo do vacinado, porém, tendem a induzir uma imunidade menos duradoura e a exigir, com isso, a aplicação

de mais de uma dose no esquema de imunização, bem como a repetição das imunizações ao longo dos anos (Schatzmayr, 2003).

Nas vacinas virais atenuadas o vírus é capaz de se multiplicar nos vacinados e tiveram como trabalho pioneiro aquele desenvolvido por Jenner, em torno do final do século XVIII, quando utilizou material obtido de lesões de pele de animais para imunizar contra a varíola. Essa prática permaneceu por um determinado período até que começou a ser substituída por técnicas mais aprimoradas, como por exemplo o cultivo dos vírus em animais através de sucessivas passagens e, posterior tratamento por métodos químicos, tal técnica foi utilizada por Pasteur em coelhos para a produção da vacina anti-rábica (Schatzmayr, 2003).

O ovo embrionado de galinha, introduzido na década de 1930, também permitiu o cultivo de alguns vírus, tais como o vírus da febre amarela, cuja vacina é até hoje preparada através desse sistema (Silva et al. 2010).

As vacinas atenuadas apresentam algumas vantagens importantes sobre as vacinas inativadas. Sendo a principal delas, o desenvolvimento de uma resposta imune completa e que se mantém por longos períodos, reproduzindo muito fielmente a resposta à infecção natural (Jang e Seong, 2012). Entre as desvantagens das vacinas atenuadas destaca-se a possibilidade de efeitos adversos que podem vir a surgir como consequência da multiplicação no hospedeiro, seja por fatores individuais, seja por uma reversão genética da amostra vacinal, tornando-a mais virulenta (Jang e Seong, 2012). Outro problema que ocorre com as vacinas atenuadas é a possibilidade de sua deterioração durante o processo de transporte e armazenagem, tornando imprescindível, para aquelas que não podem ser liofilizadas, a montagem de uma rede de refrigeração, de forma a possibilitar que o produto chegue ao receptor em perfeitas condições de uso (Schatzmayr, 2003).

1.1.1. A Vacina Amarílica

Estima-se que cerca de 200.000 pessoas sejam infectadas pelo vírus da febre amarela anualmente e que 15% delas evolua para a forma grave da doença e mais da metade chega a óbito (WHO, 2013). Não há um tratamento antiviral específico para a infecção pela febre amarela e, conseqüentemente, uma terapia de suporte é necessária. Assim sendo, a vacinação é o modo mais eficiente de evitar e controlar a doença, além de prevenir o seu retorno aos centros urbanos.

A vacina utilizada atualmente no Brasil foi desenvolvida por Theiler e Smith em 1937 e duas subcepas da 17D (17D-204 e 17DD) são usadas atualmente no mundo para a produção de vacinas. Atualmente, existem quatro produtores mundiais da vacina anti Febre Amarela (Instituto Pasteur em Dakar, Senegal; Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Brasil; Sanofi Pasteur nos Estados Unidos e França), os quais totalizam de 20 a 25 milhões de doses produzidas anualmente (Gardner e Ryman, 2010), sendo Bio-Manguinhos o maior produtor.

Apesar de o Brasil dispor de uma vacina eficaz contra a Febre Amarela desde o final da década de 1930, a tecnologia usada na sua manufatura pouco mudou, sendo ainda baseada no processamento de ovos embrionados de galinhas (Barrett, 1997). Esse tipo de tecnologia limita a capacidade dos produtores de obter grandes quantidades de vacina em um curto espaço de tempo devido a um processo produtivo lento, por exemplo. Esta limitação pode representar um problema em atender a demanda em casos de surtos, como aconteceu no Paraguai em 2008, que ainda teve como agravante o fato dos estoques globais disponíveis estarem defasados devido a uma epidemia ocorrida na África no mesmo ano (Gardner e Ryman, 2010). É evidente a necessidade imediata de desenvolvimento de uma nova tecnologia de produção visando o fornecimento de um produto em escala suficiente para atender a demanda de vacinação das áreas endêmicas, bem como os surtos da doença que possam acontecer no futuro.

A segurança da vacina contra a febre amarela era considerada indiscutível (Pugachev et al. 2005) até que com o advento da vacinação em massa em várias regiões do país em um curto período de tempo, observou-se o surgimento de reações adversas graves até então desconhecidas, inclusive com casos de óbito, sendo: um em Goiânia (GO), 1999; um em Americana (SP), 2000; um em Jaboticatubas (MG), 2001; e um em Três Passos (RS), 2001 (Tauil, 2010). Na literatura, também são reportados outros casos de mortes relacionados à vacina, identificados nos Estados Unidos e Austrália (Marianneau et al. 2001). Os fatores que levam algumas pessoas a apresentarem severos efeitos adversos após a vacinação ainda não está totalmente esclarecido.

Se, por um lado, há argumentos sólidos contrários a uma política de expansão da rotina de vacinação contra a febre amarela devido ao risco de sérios eventos adversos, por outro lado, há o fato de que recentemente tem ocorrido uma expansão das áreas de transmissão do vírus da Febre Amarela e,

consequentemente, o surgimento da necessidade de uma ampliação da cobertura vacinal no país.

Assim sendo, uma alternativa para solucionar esse problema seria minimizar os riscos de eventos adversos provocados pelo vírus amarelo vacinal atenuado através da imunização com uma vacina inativada, por exemplo.

A produção da vacina amarela atualmente está inserida em um projeto estratégico de Bio-Manguinhos que tem a finalidade de produzir uma vacina com baixo índice de reações ou eventos adversos nos pacientes e que esteja alinhada às mais recentes tendências mundiais do setor, dentro de uma nova plataforma de produção atendendo à uma crescente inclinação para produção de vacinas virais utilizando células animais.

1.1.2. Cultivo celular para produção de vacinas

Atualmente, algumas vacinas sofreram ou estão em processo de alteração do processo de fabricação (Josefsberg e Buckland, 2012). Nos últimos anos, tem-se observado uma tendência mundial de desenvolvimento de novos processos de produção de vacinas virais empregando linhagens de células de mamíferos utilizando meios de cultivo livre de soro fetal bovino (SFB). A utilização de linhagens estabelecidas de células animais na produção de vacinas está, dentre outras vantagens, na melhor reprodutibilidade do bioprocessos, homogeneidade e estabilidade lote a lote, assim como a possibilidade de cultivo sob condições monitoradas e controladas em biorreatores, que podem propiciar melhores condições para a replicação viral e consequentemente, maior rendimento de produção. Atualmente, o cultivo de linhagens celulares tem sido extensivamente utilizado na fabricação de uma ampla variedade de produtos voltados para a saúde humana, em especial para a produção de proteínas terapêuticas e vacinas (Barrett et al. 2009).

Dentre as linhagens celulares contínuas utilizadas para a produção de vacinas virais de uso humano, a linhagem celular Vero vem sendo amplamente estudada (Frazzati-Gallina et al. 2001), sendo aprovada pela OMS para a produção de imunobiológicos de uso humano (Mendonça e Pereira, 1995). A célula Vero é uma linhagem aderente, oriunda de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus*

aethiops) e passível de ser infectada por uma ampla variedade de vírus (Doyle e Griffiths, 1998).

A produção de diversas vacinas virais de uso humano tem sido estudada empregando o cultivo de células Vero: influenza (Chan e Tambyah, 2012), raiva (Yu et al. 2012), poliomielite (Simizu et al. 2006), sarampo (Langfield et al. 2011), encefalite japonesa (Srivastava et al. 2001), dengue (Mantel et al. 2011), enterovírus (Wu et al. 2004) e hepatite A (Sun et al. 2004) e hantavírus (Choi et al.2003). Em escala comercial, células Vero cultivadas em microcarregadores vêm sendo empregadas na produção das vacinas inativadas contra a poliomielite (Butler et al. 2000) e encefalite japonesa (Schuller et al. 2011).

Devido à necessidade crescente de desenvolvimento de bioprocessos para a produção de vacinas virais empregando linhagens de células de mamíferos, bem como de novas metodologias para a produção de vacinas inativadas, como a vacina contra Febre Amarela, que não ofereça risco de reações adversas graves ao ser utilizada na imunização, é de grande importância investigar o desenvolvimento de novos bioprocessos com tecnologia otimizada, baseados na propagação do vírus amarílico em linhagens celulares passíveis de serem cultivadas em biorreatores, sob condições monitoradas e controladas, como substitutos futuros e adequados ao atual uso de ovos embrionados infectados para a produção da vacina contra a febre amarela (Souza, 2007).

1.1.3. Cultivo celular em meio livre de soro

O soro animal é um suplemento que vem sendo utilizado por várias décadas nos meios para cultivo de células animais (Kadouri, 1994). Este suplemento é rico em hormônios, fatores de crescimento e elementos que favorecem o crescimento celular (Butler, 2005).

A presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo possui várias funções importantes, como auxiliar na adesão das células à superfície e também fornecer fatores de crescimento e hormônios que promovam a proliferação celular (Himes e Hu, 1987). No entanto, apesar de todas essas vantagens, o soro fetal bovino possui elevado custo, pode dificultar a purificação do produto e apresenta uma grande variabilidade de um lote para o outro, já que não possui composição quimicamente definida, além de ser fonte de possíveis contaminações por vírus, micoplasmas ou príons (Genzel et al. 2006).

Dessa forma, tem-se procurado evitar o emprego de componentes de origem animal nos processos de produção (Butler et al. 2000; Lubiniecki, 1998), visando garantir a qualidade e segurança do produto vacinal final (Dellepiane et al. 2000). Várias agências regulatórias têm encorajado os fabricantes de biofármacos e imunobiológicos a reduzirem ou eliminarem o uso de substâncias de origem animal em seus processos de fabricação (Kallel et al. 2002). O desenvolvimento de meios de cultivo livres de soro fetal bovino e de outros componentes de origem animal possibilita esta eliminação, além de facilitar o processo de recuperação e purificação do produto para a obtenção do grau de pureza exigido (Souza, 2007).

Não obstante, apesar da disponibilidade de grande variedade de meios de cultivo isentos de componentes de origem animal no mercado, deve-se ressaltar a necessidade de adaptação linhagens celulares a esses meios de cultivo, inclusive a linhagem Vero, que, apesar de na literatura ser descrita a sua utilização para produção de vírus em meio livre de soro fetal bovino, tais como reovírus (Butler et al. 2000), influenza (Kistner et al. 1998) e raiva (Frazzati-Gallina et al. 2004), requer uma adaptação ao meio de cultivo.

1.1.4. Cultivo em microcarregadores

Uma das características da célula Vero é ser uma célula aderente e, conseqüentemente, necessitar de um suporte para se proliferar. Apesar da dificuldade da adaptação de células Vero à suspensão, tal técnica já foi reportada (Daelliet al. 2009), porém, atualmente, não existe no mercado nenhum produto proveniente dessa tecnologia. Dessa forma, considerando a linhagem aderente, há a necessidade de utilização de um suporte para o seu cultivo, fato que pode ser um fator limitante do método a ser empregado no cultivo celular em larga escala, pois a quantidade de células obtida está diretamente relacionada à área superficial disponível para o seu crescimento, o que tornaria imprescindível a utilização de um grande número garrafas do tipo roller ou frascos T para atingir altas concentrações celulares. Uma forma de solucionar esse problema foi através do desenvolvimento dos microcarregadores por Van Wezel em 1967 (Van Wezel, 1967), permitindo a realização de cultivos de células aderentes em altas concentrações, empregando sistemas agitados. Neste caso, as células crescem aderidas aos microcarregadores, os quais, devido à sua densidade relativamente baixa, podem ser mantidos em

suspensão mesmo a baixas velocidades de agitação. Com isto, é possível não apenas o crescimento das células em sistemas agitados, como nos casos dos biorreatores de grande volume (Montagnon, 1989), mas também obter cultivos com concentrações celulares bem superiores às obtidas em frascos estáticos.

São inúmeras as vantagens do uso de microcarregadores. Além das já citadas anteriormente, pode-se destacar: (i) Não são tão onerosos levando em consideração a relação preço/m²; (ii) a tecnologia proporciona um sistema de cultivo homogêneo e passível de ser ampliado; (iii) apresenta uma grande área superficial, (iv) sua matriz fornece suporte às células permitindo a organização do citoesqueleto e organelas intracelulares (GE Healthcare, 2005).

A utilização de microcarregadores na produção de vacinas virais é bastante citada na literatura, conforme mostrado na tabela 1.1. As vantagens do uso de microcarregadores nos processo de produção incluem, além do aumento da produtividade, menor risco de contaminação quando comparado com outros métodos que exigem intensa manipulação, tais como frascos estáticos e garrafas do tipo roller. Sinskey e colaboradores (1981) observaram que a produtividade na obtenção de vírus Sindbis em microcarregadores é 50 vezes maior se comparado com garrafas roller. Von Seefried e Chun relataram rendimentos bastante altos na produção do vírus da poliomielite quando usaram fibroblastos humanos (MRC-5) crescendo em Cytodex (1981 Apud GE Healthcare 2005, p.33).

Tabela 1.1: Resumo das aplicações dos microcarregadores na indústria de vacinas (Adaptado de GE Healthcare, 2005).

Companhia	Produto	Microcarregador
Baxter, Austria	Vacina contra Influenza	Cytodex 3
Baxter, Austria	Vacina contra Hepatite A	Cytopore 2
NVI, Holanda	Vacina inativada contra Poliomielite	Cytodex 3
Xenova	Vacina contra o vírus Herpes simplex tipo 2	Cytodex 3
Instituto Pasteur	Vacina contra Raiva	Cytodex 1
Aventis	Vacina contra Encefalite Japonesa	Cytodex 1
GSK	Vacina contra a Poliomielite	Cytodex 3
Solvay Pharmaceuticals, Holanda	Vacina contra Influenza	Cytodex 3

Atualmente, há vários tipos de microcarregadores disponíveis comercialmente e diferentes aplicabilidades para cada um deles, podendo ser macroporosos ou

microporosos. Basicamente, os microcarregadores macroporosos diferem dos microporosos pela dimensão dos poros que permite que as células entrem e colonizem o interior dos microcarregadores proporcionando um aumento na área superficial. Já nos microporosos, seus poros possuem dimensões tão pequenas que não permitem que as células penetrem no seu interior, desta forma, a colonização ocorre apenas em sua superfície. A presença de poros pode representar vantagens e desvantagens dependendo do cultivo e do objetivo. Se, por um lado, com microcarregadores macroporosos é possível obter uma maior quantidade de células, utilizar velocidades de agitação mais altas e obter maior proteção das células contra situações adversas (Nikolai e Hu, 1992; Kadouri, 1994), por outro lado, há limitações no uso para a replicação de vírus devido à menor acessibilidade dos mesmos às células presentes no interior dos poros dos microcarregadores (Berry et al. 1999).

Os microcarregadores são confeccionados com diferentes tipos de materiais, os quais conferem características específicas para cada um deles. A superfície dos microcarregadores têm sido revestidas com materiais como gelatina, colágeno, vidro, ProNectina e Poli-L/D-lisina e novos materiais para as matrizes das microesferas vêm sendo desenvolvidos. Dessa forma, é de grande importância escolher o microcarregador mais apropriado para cada tipo de trabalho de acordo com as células utilizadas, produto de interesse e tipo de processo, por exemplo. A tabela 1.2 apresenta uma lista dos principais tipos de microcarregadores disponíveis comercialmente, bem como suas propriedades e fabricantes.

A figura 1.1 mostra uma representação esquemática de quatro tipos de microcarregadores utilizados. Os microcarregadores Cytodex 1 são microesferas microporosas formadas por uma matriz polimérica de dextrana contendo grupamentos DEAE (N,N-dietilaminoetil) carregados positivamente. Os microcarregadores Cytodex 3 são microesferas microporosas formadas por uma matriz polimérica de dextrana coberta por uma fina camada de colágeno. Os microcarregadores Cytopore 1 são microesferas macroporosas formadas por matriz polimérica de celulose contendo grupamentos DEAE (N,N-dietilaminoetil) carregados positivamente. Já os microcarregadores macroporosos Cytoline são formados por uma matriz de poliestireno de alta densidade, contendo sílica (GE Healthcare 2005).

Tabela 1.2: Alguns microcarregadores comerciais e suas propriedades.

Microcarregador	Fabricante	Tipo	Matriz	Densidade (g/mL)	Tamanho (µm)	Área (cm ² /g)	Referência
Cytodex 1	GE Healthcare	Microporoso	DEAE-dextrana	1,03	147-248	4400	GE Healthcare Life Sciences Cytodex 1, Cytodex 3.
Cytodex 3	GE Healthcare	Microporoso	DEAE-dextrana	1,04	141-211	2700	
Collagen	SoloHill	Microporoso	Poliestireno	1,03	150-210	325	
Plastic	SoloHill	Microporoso	Poliestireno	1,03	150-210	325	SoloHill Microcarriers: Innovative Solutions for Cell-Based Research & Manufacturing
FACT III	SoloHill	Microporoso	Poliestireno revestido com colágeno tipo 1 de origem suína, com carga positiva	1,022-1,030	125-212	360	
ProNectin®F-COATED	SoloHill	Microporoso	Poliestireno revestido com proteína recombinante (RDG)	1,022-1,030	125-212	360	
Plastic Plus	SoloHill	Microporoso	Poliestireno	1,03	150-210	325	
Cultispher-G	Thermo Scientific	Macroporoso	Gelatina	1,04	170-270	*	Thermo Scientific: HyClone CultiSpher G Microcarriers
Cultispher-GL	Thermo Scientific	Macroporoso	Gelatina	1,04	170-270	*	Thermo Scientific: HyClone CultiSpher GL Microcarriers
Cultispher-S	Thermo Scientific	Macroporoso	Gelatina	1,04	170-270	*	Thermo Scientific: HyClone CultiSpher S Microcarriers
Cytopore 1	GE Healthcare	Macroporoso	Celulose	1,03	200-280	11000	GE Healthcare Life Sciences Cytopore™ – macroporous microcarriers
Cytopore 2	GE Healthcare	Macroporoso	Celulose	1,03	200-280	11000	
Cytoline 1	GE Healthcare	Macroporoso	Poliétileno e sílica	1,32	1700-2500	>3000	GE Healthcare Life Sciences, Cytoline™ 1 microcarrier
Synthemax® II	Corning	Microporoso	Poliestireno	1,026 ± 0,004	125-212	360	Corning® Synthemax® II Microcarriers
HILLEX® CT	SoloHill	*	Poliestireno modificado fornecido úmido	1,090-1,150	160-200	515	SoloHill Microcarriers: Innovative Solutions for Cell-Based Research & Manufacturing
HILLEX® II	SoloHill	*	Poliestireno modificado	1,090-1,150	160-200	515	
Fibra-Cel® Disks	New Brunswick	*	Poliéster /Polipropileno	*	6000	1200	New Brunswick Fibra-Cel® Microcarrier Disks
Nunc® 2D MicroHex™	Thermo Scientific	*	Poliestireno	1,05	125	760	Thermo Scientific : Nunc® 2D MicroHex™ Microcarriers

* - Não informado

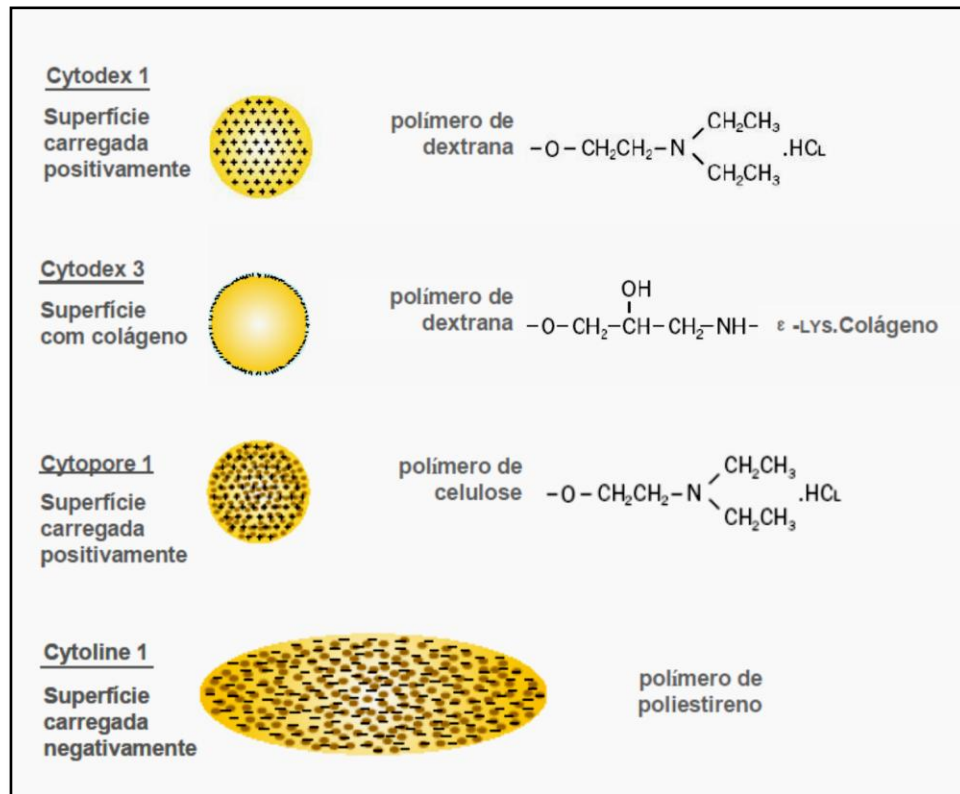


Figura 1.1: Representação esquemática dos microcarregadores Cytodex 1, Cytodex 3, Cytopore 1 e Cytoline 1 (Adaptado de GE Healthcare, 2005).

Além da escolha do microcarregador mais adequado para o processo, há vários fatores que necessitam ser otimizados para garantir que o processo de adesão das células seja eficiente, tais como a velocidade de agitação, concentração de microcarregador, condições e concentração do inóculo, relação entre a concentração de inóculo celular inicial e a concentração de microcarregadores, composição do meio de cultivo, pH, hidratação dos microcarregadores, e estado fisiológico das células (Sun et al. 2000; GE Healthcare, 2005).

1.2. Sistemas de cultivo de células de mamíferos

Dentre os inúmeros sistemas de cultivo celular disponíveis, podem ser exemplificados os cultivos de células em frascos do tipo T, cultivos celulares em frascos do tipo spinner, garrafas roller e biorreatores tipo tanque agitado, os quais são empregados conforme suas características de manuseio, condições fisiológicas celulares e obtenção do produto de interesse com a qualidade requerida para diferentes propósitos.

1.2.2. Frascos tipo T

Os frascos do tipo $T75\text{cm}^2$ e $T175\text{cm}^2$, por exemplo, são frascos utilizados em cultivo de células que consistem em um sistema de cultivo estático muito comum e difundido, utilizado principalmente para o cultivo de células aderentes em escala laboratorial. Normalmente são de poliestireno, com tampas rosqueáveis, podendo ser ventiladas ou não, conforme mostrado na figura 1.2. O cultivo de células em frascos estáticos do tipo T se caracteriza por apresentar rendimento limitado pela superfície de adesão celular (Falkenberg et al. 1995), sendo inviável a sua utilização em escala industrial devido ao grande número de frascos necessários para alcançar a quantidade requerida de células para a produção, das excessivas manipulações que aumentariam o risco de contaminação tornando o sistema oneroso e desgastante quanto ao manuseio.



Figura 1.2: Frascos T para cultivo celular em sistema estático (fonte Greiner Cellstar® Tissue Culture Flasks with plug or filter cap closures)

1.3.2. Frascos do tipo spinner

O frasco do tipo spinner é normalmente feito de vidro borossilicato e possui fixado, em sua tampa, um eixo que em sua outra extremidade, possui uma barra magnética coberta de teflon, silicone ou vidro que serve como sistema de agitação do cultivo. A barra magnética não deve encostar no fundo do frasco, nem em sua parede, para evitar danos às células, sendo chamado de frasco tipo spinner com eixo fixo de agitação (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000).

A tampa superior do frasco pode possuir um filtro hidrofóbico que permite a troca de gases entre o meio de cultivo e o ambiente. Possuem duas aberturas laterais (braços), mantidas fechadas com tampas rosqueáveis, que são utilizadas para trocas de meio de cultivo, retirada de amostra de células e sobrenadante, introdução do inóculo celular e outras funções, conforme mostrado na figura 1.3. Os frascos spinner são posicionados sobre um agitador magnético (que permite o controle da velocidade de agitação), e mantidos dentro de incubadora com temperatura, umidade e atmosfera de CO₂ controlados (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000). Esse sistema não é de grande interesse industrial visto que não permite um controle efetivo sobre o cultivo, além de não permitir o uso de grandes volumes de trabalho já que a oxigenação do sistema pode ser comprometida, pois a transferência de oxigênio para o meio líquido é limitada pela área de interface gás-líquido. Como a área aumenta quadraticamente e o volume de forma cúbica, é previsível que haja um limite de volume de trabalho nesses sistemas. No entanto, sua utilização torna-se importante para se estabelecer as condições de cultivo em sistemas agitados e para se conhecer o comportamento celular, por exemplo.



Figura 1.3: Frasco Spinner (fonte: Tri Stars Laboratory Glassware & Scientific Equipment)

1.2.3. Garrafas rotatórias (roller)

As garrafas rotatórias, ou garrafas tipo roller, são frascos cilíndricos de vários tamanhos de acordo com a área de superfície disponível para o crescimento (850cm² e 1750cm², por exemplo), que permite a adesão de células em toda a sua superfície interna com tampas rosqueáveis (ventiladas ou não por filtros hidrofóbicos de poro 0,22µm). O volume de meio de cultivo utilizado pode variar de 200 a 450mL, conforme o tamanho da garrafa e a área disponível para o crescimento celular. A

garrafa é mantida na posição horizontal sobre um suporte giratório sob rotação constante e controlável, permitindo que o meio de cultivo entre em contato com as células no decorrer da agitação giratória. (Kumar et al. 2004).

Esse sistema apresenta vantagens como o uso de uma pequena quantidade de meio de cultivo em relação à superfície de crescimento, obtenção de concentrações celulares maiores que nos frascos "T" e maior oxigenação do meio devido ao processo de rotação (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000). No entanto, apesar de ainda ser utilizado por algumas indústrias (Chico et al. 2008), os custos de operação desse tipo de sistema são altos devido à intensiva mão-de-obra, justificada pela grande quantidade de garrafas, e os riscos de contaminação também, devido a necessidade de manipulação das mesmas (Doyle e Griffiths, 1998; Freshney, 2000). Alguns avanços tecnológicos têm simplificado esse processo através do uso de sistemas mecanizados, no entanto, torna-se mais caro e ainda sem a possibilidade de monitorar as condições ambientais internas do cultivo celular de cada garrafa, tais como o pH e oxigênio dissolvido (Meignier, 1979).

1.3.4. Biorreatores

A produção de diversas vacinas virais, anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes em biorreatores está estabelecida, sendo que a utilização deste sistema para a obtenção de produtos biológicos está bem relatada na literatura vigente (Lubniecki, 1990; Tokashiki e Yokoyama, 1997; Wang et al. 2005). O cultivo em biorreatores possui inúmeras vantagens em relação ao frasco estático tipo "T" e as garrafas roller, e tem sido utilizado predominantemente na indústria, principalmente por proporcionar sistemas de cultivo celular mais homogêneos e permitir o controle e monitoramento constante dos bioprocessos.

O principal desafio operacional dos biorreatores é garantir um ambiente físico-químico homogêneo para toda a população celular, evitando o surgimento de condições inapropriadas para o seu desenvolvimento resultando em morte ou queda no rendimento do processo produtivo. Desta forma, os biorreatores dispõem de sistema de monitoramento e controle que através de sensores específicos permitem o controle do pH do meio de cultivo, temperatura, velocidade de agitação, concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, entre outras variáveis.

Apesar das suas inúmeras vantagens, a agitação e a aspersão de gases produzem tensões de cisalhamento que podem prejudicar o cultivo celular, já que as

células animais não possuem parede celular e, portanto, são mais frágeis. Contudo, tais danos podem ser reduzidos mudando a forma e o diâmetro das pás de agitação (impelidores) ou adicionando ao meio de cultivo substâncias que promovam a proteção das células, como dextrana ou um surfactante não iônico, como por exemplo, Pluronic F-68[®] (Wang et al. 2005). O Pluronic F-68[®] possui capacidade de proteger as células animais contra danos provocados pelas tensões de cisalhamento gerado pelos impelidores durante a agitação, pela aspensão de gases e a consequente formação de bolhas, cujo rompimento na superfície do meio de cultivo provoca morte celular (Kilburn e Webb, 1968; Handa et al. 1987; Handa-Corrigan et al. 1989; Passini e Goochee, 1989; Reuveny et al. 1986; Radlett et al. 1971).

Para explicar o efeito protetor do Pluronic F-68[®], dois mecanismos gerais são propostos. O primeiro está relacionado às propriedades físicas e o segundo, ao efeito provocado nas células alterando propriedades intrínsecas das mesmas. O mecanismo físico está amparado por uma série de observações experimentais que indicam que o Pluronic F-68[®] afeta as propriedades do meio de cultivo. Além disso, tem sido demonstrado que o Pluronic F-68[®] estabiliza a camada de espuma e diminui a velocidade de ascensão das bolhas, consequentemente reduzindo as forças de cisalhamento, às quais as células são submetidas em biorreatores com sistema de aspensão de gases (Jordan et al. 1994; Handa-Corrigan et al. 1989; Michaels et al. 1995). Esses efeitos podem ser atribuídos a mudanças nas características do meio de cultivo, como, por exemplo, na tensão superficial.

Também tem sido mostrado que o Pluronic F-68[®] é capaz de reduzir a capacidade de adsorção das células às bolhas devido à redução da hidrofobicidade na superfície das mesmas, assim evitando o dano à célula provocado pela ruptura da bolha na superfície do líquido (Michaels et al. 1995; Wu et al. 1997). Em relação às propriedades biológicas, alguns autores indicam que o Pluronic F-68[®] afeta propriedades intrínsecas das células. No caso de hibridomas TB/C3, observou-se o aumento da resistência das membranas, da tensão de rompimento da membrana e do módulo de compressibilidade da área elástica, tornando-os mais tolerantes ao estresse hidrodinâmico (Zhang et al. 1992).

1.3.3.1. Tipos de biorreatores

Baseados nas especificidades de cada sistema, uma grande variedade de biorreatores foi desenvolvida com o objetivo de alcançar altas concentrações

celulares e aumentar a produtividade dos bioprocessos. Os biorreatores podem ser classificados de diferentes formas, no entanto, uma das mais úteis é aquela que se refere à homogeneidade do sistema, podendo ser homogêneo ou heterogêneo. Um sistema é dito homogêneo quando as células estão uniformemente suspensas na fase líquida, e heterogêneo quando não estão distribuídas homogeneamente (Chico et al. 2008). A tabela 1.3 lista os diferentes tipos de biorreatores e sua classificação segundo a homogeneidade do sistema.

Tabela 1.3: Classificação dos biorreatores segundo a homogeneidade do sistema (adaptado de Chico et al. 2008)

Biorreatores homogêneos
• Biorreatores do tipo tanque agitado
• Biorreatores do tipo <i>air-lift</i>
• Biorreatores de ondas
Biorreatores heterogêneos
• Sistemas com microcarregadores
• Biorreatores de leito empacotado
• Biorreatores de leito fluidizado
• Biorreatores de fibras ocas
• Biorreatores com crescimento sobre superfícies

Os biorreatores do tipo onda ou “wave” são constituídos de duas partes principais: uma bolsa estéril de plástico específico e uma plataforma móvel sobre a qual esta bolsa fica apoiada conforme mostrado na figura 1.4. Essa plataforma móvel proporciona um movimento oscilatório que gera ondas na interface gás-líquido no interior da bolsa, o que deu origem ao nome do sistema. Esse sistema possui várias vantagens: (i) o movimento evita o surgimento de zonas mortas garantindo a homogeneidade, (ii) baixas tensões de cisalhamento, (iii) a bolsa plástica já é fornecida estéril e descartável e, portanto, não há necessidade de limpar e esterilizar o biorreator garantindo praticidade ao sistema (Chico et al. 2008). Apesar das vantagens, a ampliação de escala é restrita devido à limitação de transferência de oxigênio que é em função do movimento oscilatório uma vez que este sistema não utiliza agitadores e aspersores submersos que injetam gás diretamente na fase líquida como no caso dos biorreatores do tipo tanque agitado.



Figura 1.4: Biorreator de ondas com capacidade de 100 a 500 litros (fonte: GE Healthcare Life Sciences).

Os biorreatores do tipo air-lift são caracterizados pela elevada razão altura/diâmetro e pela existência de um cilindro concêntrico em seu interior (figura 1.5). Na região central inferior, há um tubo que injeta uma corrente gasosa no biorreator e as bolhas formadas ascendem e fazem com que o líquido circule para cima pela região interna do cilindro e retorne para baixo pela região externa, formando uma recirculação vertical. Isso confere um menor dano celular comparado com os biorreatores de tanque agitado devido à ausência dos agitadores mecânicos (Chico et al. 2008). Sua principal desvantagem é a capacidade limitada de ampliação de escala, sendo descritos biorreatores desse tipo de até 5000 litros. Este tipo de biorreator já foi bastante utilizado para produção de anticorpos monoclonais para uso terapêutico e diagnóstico (Bugarski et al. 1989; Kwong et al. 1989).

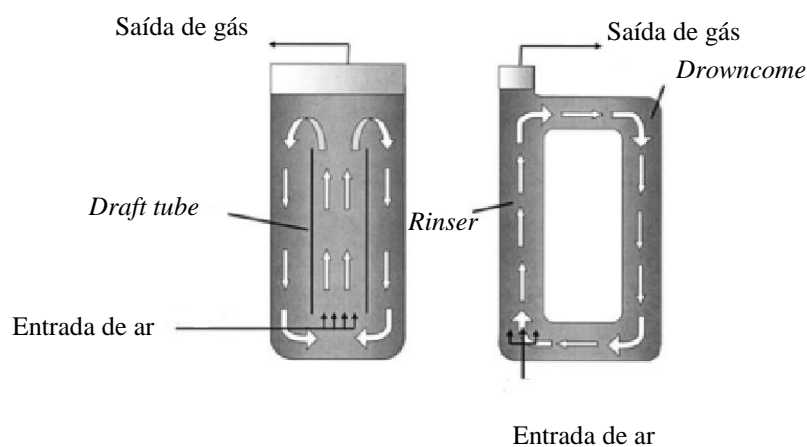


Figura 1.5: Representação esquemática de um biorreator air-lift com recirculação interna (esquerda) e recirculação externa (direita) (adaptado de Warnock e Al-Rubeai, 2006).

Os biorreatores de leito empacotado foram reportados para a produção de vários produtos biológicos, tais como, anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes, como, por exemplo, a proteína HIV-1 gp120 (Hu et al. 2000; Wang et al. 1992).

Nos biorreatores de leito empacotado, as células são mantidas em um leito fixo e o meio é circulado através desse leito, transportando nutrientes, metabólitos e produtos de interesse (figura 1.6). O meio é enriquecido com oxigênio antes de passar pelo leito empacotado e à medida que este passa pelo leito, sua concentração de oxigênio decresce (Fassnacht e Pörtner, 1999). Uma desvantagem desse tipo de biorreator é a dificuldade de monitoramento da quantidade de células viáveis devido à inacessibilidade aos carreadores utilizados.

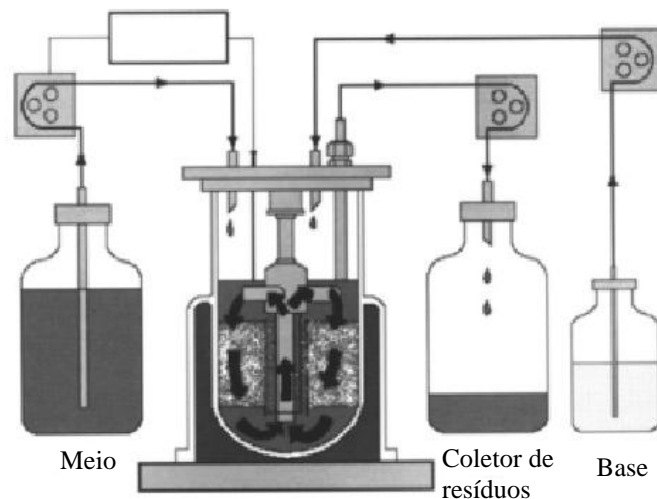


Figura 1.6: Representação esquemática de um biorreator de leito empacotado da CelliGen Plus (Adaptado de Warnock e Al-Rubeai, 2006).

Nos biorreatores de leito fluidizado geralmente são utilizados microcarregadores de elevada densidade, sendo que uma dada quantidade é fluidizada em um compartimento do biorreator como consequência da circulação do meio de cultivo (figura 1.7). O processo de oxigenação do meio acontece fora do sistema, de forma a não gerar bolhas, cuja explosão poderia provocar danos às células. Esses biorreatores são, em geral, operados em perfusão (Warnock e Al-Rubeai, 2006).

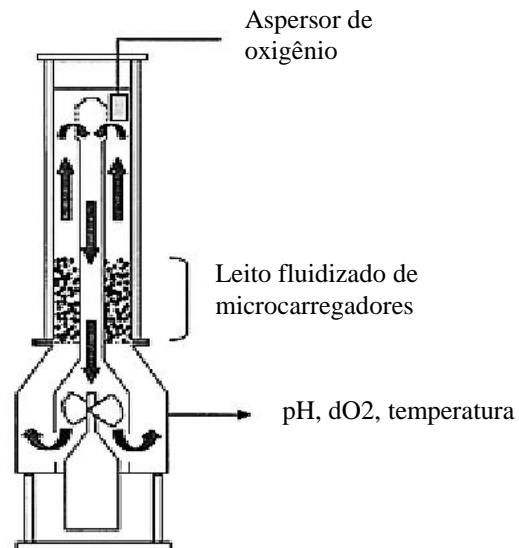


Figura 1.7: Representação esquemática do biorreator de leito fluidizado Cytopilot mini (Adaptado de Warnock e Al-Rubeai, 2006).

Embora os biorreatores de tanque agitado sejam extensivamente utilizados para culturas de células em suspensão sem microcarregadores, neste tipo de biorreator também podem ser cultivadas linhagens de células dependentes de ancoragem, utilizando-se de suportes sólidos, tais como os microcarregadores.

Os biorreatores do tipo tanque agitado são bastante utilizados atualmente e uma variedade de produtos é produzida através dessa tecnologia devido à menor complexidade de escalonamento e controle do bioprocessamento (Chu e Robinson, 2001; Birch e Racher, 2006). São constituídos basicamente de um vaso, válvulas e um motor ligado a um eixo de agitação para promover a mistura do meio de cultivo e das células, cuja velocidade de agitação deve ser suficiente para garantir a uniformidade do sistema. Nos biorreatores de tanque agitado, a forma de aeração mais comum é através do borbulhamento de gases no meio de cultivo, normalmente a uma taxa de 0,005 - 0.2 vvm (volume de gases por volume de meio por min) (Oh et al. 1992).

Para o sucesso do cultivo de células animais existem alguns desafios a serem vencidos, já que, devido ao fato de não possuírem parede celular, são mais frágeis e, portanto, mais susceptíveis a danos. A forma de aeração e as tensões de cisalhamento podem contribuir significativamente para o dano fisiológico e morte celular (Al Rubeai et al. 1993), porém isso pode ser reduzido através da adição de surfactantes tais como a Metilcelulose e o Pluronic F-68®.

Os sistemas agitados de cultivo de células podem ser realizados, basicamente, de quatro formas distintas: batelada, batelada alimentada, contínuo simples e em perfusão (contínuo com retenção celular). Estes sistemas de cultivo de células se diferem basicamente no que diz respeito ao modo de alimentação dos nutrientes e remoção dos metabólitos. A escolha dependerá das características da linhagem celular utilizada (perfil de crescimento celular, padrão de secreção, estabilidade da proteína de interesse, capacidade de resistência às concentrações de metabólitos tóxicos, resistência à tensões de cisalhamento), capacidade de produção para atender à demanda, experiência da equipe no desenvolvimento do processo, demanda esperada, da eficiência e do rendimento do processo de purificação e a aplicação dos conhecimentos sobre os aspectos regulatórios (Chico et al. 2008).

1.4. Escalonamento

O escalonamento de produtos biotecnológicos requer uma compreensão de mecanismos que governam a fisiologia celular e das características biofísicas e bioquímicas dos respectivos produtos e, devido à complexidade dessas variáveis, o escalonamento torna-se um desafio. Um conhecimento aprofundado das etapas do processo e suas limitações, juntamente com um planejamento cuidadoso e controle de processo, é possível obter rendimentos consideráveis.

Nos últimos anos, tem havido um aumento significativo na demanda por produtos biofarmacêuticos a partir de células animais (Butler, 2005; Warnock e Al-Rubeai, 2006; Walsh, 2010).

Para satisfazer a demanda de uma vacina no mercado, é necessário aumentar a produtividade do bioprocessamento e/ou ampliar a escala de produção. Essa ampliação pode ser realizada aumentando o número de biorreatores em operação ou o volume de trabalho. Porém, economicamente, o aumento de volume é uma opção vantajosa já que os custos com operação e manutenção de vários equipamentos de pequeno porte podem ser muito maiores do que com um único de grande volume (Chico et al. 2008). Operacionalmente, facilita o controle e monitoramento do processo produtivo, podendo propiciar um lote homogêneo do produto de interesse com um único bioprocessamento (Chico et al. 2008).

O escalonamento torna-se uma etapa fundamental para que os resultados de bancada sejam aplicados em escalas industriais com possibilidade de comercialização. A ampliação da escala de cultivo celular pode ser realizada a partir de um sistema de cultivo de menor porte que posteriormente poderá ser transferido para um sistema de cultivo de maior porte.

Uma parte fundamental da ampliação de escala é a multiplicação celular em cada etapa do processo. O objetivo da expansão do inóculo é aumentar o número de células de forma a se alcançar a biomassa necessária que servirá de inóculo para o sistema seguinte. É recomendável a utilização de uma concentração celular mínima de inóculo para diminuir o período de fase lag e também uma concentração celular máxima, para evitar a perda do cultivo devido a falta de nutrientes ou acúmulo de metabólitos tóxicos.

O ideal é que se alcance uma alta densidade celular de forma a se obter um fator de multiplicação alto, como por exemplo, em um cultivo com uma concentração celular inicial de 10^4 células/mL atingindo concentrações finais na faixa de 10^6 células/mL, obtém-se um fator de multiplicação em torno de 100 vezes. Quanto maior o fator de multiplicação em cada etapa do escalonamento na produção do volume final, uma menor quantidade de etapas será necessária para se alcançar a biomassa necessária (Blüml, 2007).

No caso de células aderentes, o escalonamento poderia ser feito a partir de frascos estacionários e, posteriormente, as células poderiam ser inoculadas em garrafas roller, no entanto, esse sistema pode se tornar extremamente laborioso à medida que é necessária a manipulação de um grande número de garrafas para se atingir as concentrações celulares ideais. Uma alternativa pode ser a utilização de um biorreator de pequeno volume, empregando microcarregadores como suporte de adesão celular, para posteriormente ampliar para biorreatores de maior volume. Comparativamente, biorreatores de 250L a 500L são equivalentes a aproximadamente 10000 garrafas roller de 850cm^2 (figura 1.8).

Essa alternativa gera uma melhor operacionalidade do sistema, contudo, sistemas que utilizam microcarregadores em larga escala apresentam um desafio na etapa de propagação do inóculo, já que as células que estão aderidas aos microcarregadores em uma escala intermediária precisam colonizar novos microcarregadores para iniciar o cultivo em maior escala.

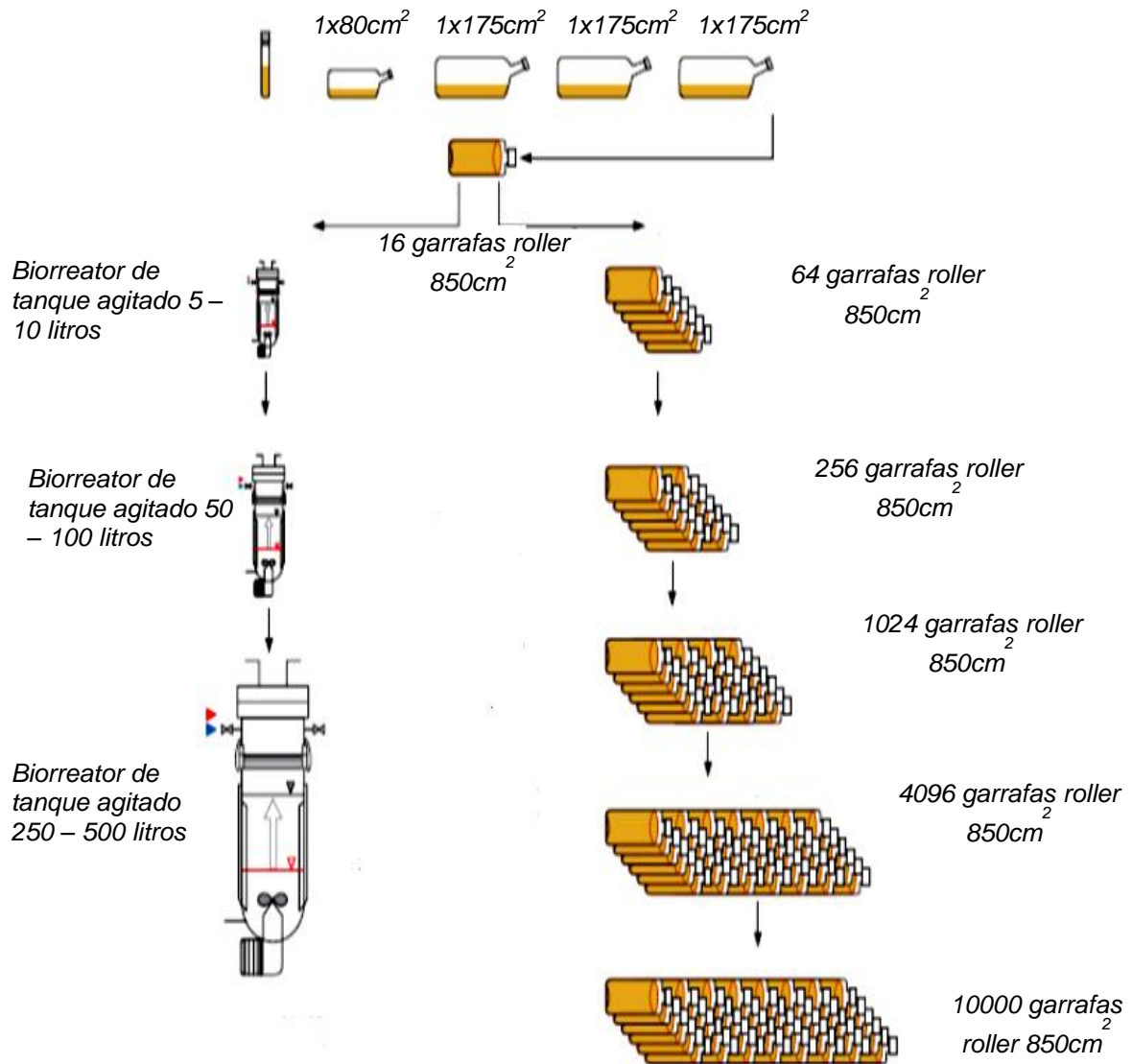


Figura 1.8: Representação esquemática de formas de ampliação de escala (Adaptado de GE Healthcare, 2005) onde, partindo de garrafas estacionárias T175cm², é possível inocular 16 garrafas roller de 850cm² que, por sua vez, são usadas para inocular outras 64 garrafas, ou então, um biorreator de 5 a 10 litros. Esse biorreator servirá de inóculo para um segundo biorreator de maior volume podendo chegar a um volume de trabalho final de 250 a 500 litros, o qual equivaleria a aproximadamente 10.000 garrafas roller de 850cm².

A ampliação e escala no cultivo de células aderentes utilizando microcarregadores como suporte de adesão pode ser feito através do aumento do volume do vaso ou da concentração de microcarregadores no sistema (Blüml, 2007).

Geralmente, há duas formas de transferência das células de um microcarregador já colonizado para um não colonizado: através do desprendimento das células do microcarregador de forma que fiquem livres no meio de cultivo para colonizar outros microcarregadores ou através da transferência bead-to-bead,

possível através da formação de pontes de células entre os microcarregadores (Kong, 1998).

A primeira alternativa pode ser feita empregando diferentes técnicas, tais como métodos enzimáticos (tripsina e colagenase), agentes quelantes, tratamento hipotônico, baixa temperatura e sonicação, por exemplo. Esses métodos podem ser utilizados isoladamente ou conjugados. No entanto, eles podem apresentar algumas desvantagens, como o comprometimento do crescimento celular ou da concentração do produto (Wang e Ouyang, 1999), maior complexidade operacional, necessidade de equipamentos especiais (no caso da sonicação), utilização de reagentes que podem encarecer ainda mais o processo, envolvimento de muitas etapas, tornando-o mais laborioso, e o aumento da probabilidade de contaminação.

A transferência *bead-to-bead* pode ser mais vantajosa, por tornar o escalonamento menos complexo, consistindo na adição de novos microcarregadores, minimizando os danos fisiológicos que muitas vezes caracterizam alguns métodos de desprendimento das células dos microcarregadores (Wang e Ouyang, 1999). No entanto, existem variáveis que afetam a eficiência de formação das pontes de células, as quais permitem que haja transferência de células de um microcarregador para outro e, dentre as principais variáveis, pode-se citar a velocidade e modo de agitação (contínuo ou intermitente).

Durante o escalonamento, alguns parâmetros permanecem os mesmos, independentes da escala de operação, tais como, o pH, temperatura e oxigênio dissolvido. No entanto, existem outros parâmetros que são dependentes da escala de operação e, conseqüentemente, podem variar conforme a escala em que se está trabalhando (Cacciuttolo et al. 2001). Dentre eles, podemos destacar a agitação, taxa de aeração e pressão hidrostática. As taxas de agitação e aeração estão diretamente relacionadas à qualidade da mistura, à taxa de transferência de massa gás-líquido e ao estresse hidrodinâmico ao quais as células são submetidas. Uma mistura ineficiente pode resultar em um pH não homogêneo, concentração de nutrientes e metabólitos tóxicos devido à formação de microambientes.

O problema básico no escalonamento ao se utilizar biorreatores de tanque agitado trabalhando com células animais, é que em grandes escalas a qualidade da mistura, taxa de transferência de massa gás-líquido e estresse hidrodinâmico, podem não permanecer idênticos às escalas menores (Cacciuttolo et al. 2001). Embora muitas correlações possam ser feitas, elas devem ser tomadas como uma diretriz em vez de um preditor do desempenho do biorreator em larga escala, e além

disso, eles raramente podem prever precisamente os parâmetros de controle do biorreator sob condições reais. Por exemplo, medidas da concentração de glicose e lactato em culturas com hibridoma murino mostraram uma alteração do metabolismo anabólico em uma escala de 300 litros, que não foi observada em uma escala de 3 litros (Cacciuttolo et al. 2001). Essa observação indica que a limitação de oxigênio é um fator a ser considerado ao se operar em grandes escalas. No entanto, este problema poderia ser resolvido através do aumento da velocidade de agitação ou através do aumento do set point para o oxigênio dissolvido.

1.4.1. Estratégias de escalonamento utilizando microcarregadores

Há uma grande variedade de métodos usados para desprender células de microcarregadores, sendo importante optar pelo procedimento que provocará o mínimo de dano às células, de forma que não comprometa o cultivo celular e, conseqüentemente o bioprocessos, pois essas células servirão de inóculo para cultivos subsequentes em maior escala. Normalmente, a escolha de determinada estratégia de escalonamento é baseada na linhagem celular e em possíveis características particulares da cultura, como, por exemplo, a dependência de suporte para o crescimento, crescimento em suspensão e a cinética de crescimento celular.

No caso da utilização de agentes quelantes, como a ligação das células ao substrato é dependente de íons divalentes, a lavagem com tampão (PBS) contendo ácido cítrico ou EDTA 0,2% (m/v) pode ajudar a desprender as células. Geralmente, quando são utilizados somente reagentes quelantes, estes não são suficientes para remover a maioria das células, sendo recomendada a utilização de uma solução com algumas enzimas proteolíticas (GE Healthcare, 2005). No entanto, longos períodos de exposição ao EDTA podem ser prejudiciais para algumas células, principalmente algumas linhagens de fibroblastos (Blüml, 2007).

Enzimas, como a tripsina e a colagenase, são utilizadas rotineiramente no processo de desprendimento de células aderidas a superfícies rígidas para a realização de subcultivos celulares em uma grande variedade de células. O tempo de tripsinização é um parâmetro crítico, pois, se o tempo de incubação da enzima com as células for muito curto, nem todas as células se desprenderão dos microcarregadores, resultando em um processo ineficiente, não havendo células desprendidas no sobrenadante em concentração suficiente para entrarem contato com os novos microcarregadores para colonizá-los.

Caso o tempo de tripsinização seja longo, pode provocar morte celular e a não colonização de novos microcarregadores ou a diminuição significativa na concentração de células viáveis e, conseqüentemente, o aumento do tempo necessário para a adesão da célula ao novo microcarregador e da duração da fase Lag do cultivo subsequente (Zecchini et al. 2000). O longo tempo de incubação das células com a enzima também pode provocar aglomeração entre elas, impossibilitando que os microcarregadores sejam colonizados de forma homogênea.

Para otimizar o processo de tripsinização celular, pode ser realizada uma lavagem prévia das células com um agente quelante, normalmente EDTA, empregando agitação contínua a uma velocidade ligeiramente maior do que a normalmente usada nos cultivos (GE Healthcare, 2005).

No caso de células mais sensíveis, esse processo pode ocorrer a uma temperatura de 4°C (Ham, 1980), porém, pode haver um aumento do tempo necessário para o desprendimento das células e uma tendência à agregação. O método de tripsinização favorece a distribuição celular e a taxa de crescimento, porém envolve muitas etapas, incluindo o descarte do meio de cultura, lavagem com tampão, tripsinização e inativação da tripsina, tornando o processo mais demorado.

A colagenase somente pode ser empregada ao se utilizar o microcarregadores cuja superfície seja revestida com colágeno, tal como o Cytodex 3. Esta enzima é capaz de digerir a superfície do microcarregador em vez da superfície celular, evitando a remoção de moléculas presentes na superfície da célula (Blüml, 2007). Geralmente a utilização da colagenase proporciona uma maior viabilidade celular e maior integridade de membrana quando comparada à tripsina. Agentes quelantes não devem ser utilizados já que a colagenase requer a presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e não necessita de etapa de inativação, diferentemente da tripsina (Blüml, 2007).

Algumas enzimas recombinantes também têm sido empregadas em substituição à tripsina e à colagenase, ambas de origem animal. Podemos citar a TrypLE Select (Invitrogen) e a Accutase (PAA Laboratories) utilizadas no processo de obtenção do vírus influenza (GE Healthcare, 2011).

O tratamento hipotônico também pode ser utilizado, sendo mais adotado no caso de células que não possuem fortes propriedades de adesão. O choque osmótico faz com que as células adotem uma morfologia mais arredondada e se soltem mais facilmente dos microcarregadores (GE Healthcare, 2005). Uma vantagem deste tipo de método é a não utilização de proteínas exógenas no processo.

O tratamento a baixas temperaturas também pode promover o desprendimento de algumas células, sendo observado que células aderidas em microcarregadores, incubadas a uma temperatura de 4°C por 8 horas, apresentaram uma proporção significativa de células desprendidas (GE Healthcare, 2005). A queda brusca de temperatura promove uma alteração da morfologia celular, de forma que a célula apresente uma morfologia mais arredondada e se solte mais facilmente. Contudo, esse método geralmente acarreta em viabilidade celular baixa, sendo indicado quando outras alternativas não são aplicáveis com sucesso (GE Healthcare, 2005).

A sonicação pode promover uma melhora no rendimento, mas geralmente não é empregada como método único, sendo combinada com outros métodos para o desprendimento das células (GE Healthcare, 2005). A utilização de agentes quelantes, enzimas proteolíticas, sonicação, tratamento hipotônico e emprego de baixa temperatura são alternativas para desprender as células dos microcarregadores, de modo que estas células desprendidas possam colonizar novos microcarregadores, servindo de inóculo para um segundo e subsequente cultivo.

Após a utilização de métodos que promovam o desprendimento celular dos microcarregadores para iniciar um cultivo subsequente, é necessário que haja a separação das células dos microcarregadores caso não haja o interesse de reutilizar os mesmos. Várias metodologias podem ser aplicadas, variando de acordo com o objetivo e volume de trabalho utilizado. Pode-se citar a sedimentação diferencial, filtração e a centrifugação por gradiente de densidade (Blüml, 2007).

A sedimentação diferencial é uma metodologia bastante simples, já que tem como vantagem o fato das células e os microcarregadores possuírem diferentes taxas de sedimentação. Entretanto, permite a recuperação de apenas 80% das células na suspensão (Blüml, 2007). Já a filtração pode ser utilizada quando se deseja obter maior rendimento na recuperação das células. Normalmente, são utilizados filtros com diâmetro de 100µm. A centrifugação se baseia no princípio de diferença de densidade entre células e microcarregadores permitindo a separação.

O método de transferência bead-to-bead, ou seja, transferência de células de um microcarregador colonizado para microcarregadores novos e não colonizados, torna-se uma alternativa diferente das demais, não sendo necessário que as células se desprendam totalmente dos microcarregadores cheios de células para que ocorra a adesão de células em novos microcarregadores não colonizados. Essa transferência depende do contato entre microcarregadores cheios e vazios e a consequente

formação de pontes de células entre eles (Cherry e Papoutsakis, 1998). No entanto, há várias variáveis que afetam a eficiência da formação das pontes de células que precisam ser melhor estudados, tais como a velocidade de agitação, o tempo de agitação e o tempo de repouso (no caso da agitação intermitente), as interações entre esses fatores, a concentração de inóculo inicial de células, a concentração e o tipo de microcarregadores, por exemplo (Luo et al. 2008; Dürschmid et al. 2003).

Wang e Ouyang (1999) estudaram o cultivo de células Vero utilizando 0,4g de microcarregadores do tipo Cytodex 3 em 200mL de meio de cultura com concentração celular inicial de $1,2 \times 10^5$ células/mL. No quarto dia de cultivo, quando as células atingiram 90% de confluência nos microcarregadores, alcançando uma concentração celular de $9,1 \times 10^5$ células/mL, foram adicionados mais 0,8g de novos microcarregadores no mesmo cultivo celular, o qual foi mantido sob agitação intermitente com 1 hora de agitação e 30 minutos de repouso por dois dias. Após esse período, foi restabelecida a agitação contínua e, no oitavo dia de cultivo, foi observado que não houve diferença entre os microcarregadores novos dos microcarregadores antigos, com um aumento significativo na densidade celular, concluindo-se que o modo operacional é crítico para o sucesso da transferência bead-to-bead de células.

Alguns autores afirmam que este método é mais indicado ao se trabalhar com células que não possuem fortes propriedades de adesão ou que se desprendam facilmente durante a mitose (Blüml, 2007).

Além disso, as características do material que compõe a superfície do microcarregador podem influenciar fortemente na eficiência da adesão celular. Um exemplo é a utilização de fatores de adesão celular, tais como a vitronectina ou fibronectina para aumentar a eficiência desse processo (Ohlson et al. 1994).

A reutilização de microcarregadores por mais de um ciclo de cultivo, normalmente não é aconselhável. Ao se empregar etapas de lavagens dos microcarregadores com soluções muito ácidas ou básicas para remoção de debris celulares, pode-se modificar a matriz do microcarregador devido à alteração do pH, comprometendo a adesão subsequente de outras células (Blüml, 2007). A reutilização de microcarregadores por mais de 3 ciclos é impraticável (Blüml, 2007). É importante que se mantenha íntegra as características da superfície do microcarregador, principalmente a densidade de carga, pois pode comprometer cultivos subsequentes influenciando na capacidade de adesão das células ao microcarregador.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é o estabelecimento de um protocolo escalonável de propagação de células Vero em microcarregadores do tipo Cytodex 1 para uso em biorreatores de tanque agitado, visando posterior infecção com o vírus da Febre Amarela 17DD e futura aplicação na produção de uma vacina inativada contra Febre Amarela.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- 1) Avaliar a cinética de crescimento das células Vero provenientes do banco de células de trabalho, adaptadas ao cultivo em meio livre de soro fetal bovino, em sistemas de cultivo estático e agitado, utilizando frascos do tipo "T" e spinners.*
- 2) Avaliar o consumo de substrato, formação de metabólitos e determinar o tempo de duplicação dos cultivos celulares realizados.*
- 3) Estudar a dinâmica de transferência de células entre microcarregadores e verificar as melhores condições de cultivo para obtenção de uma alta eficiência de transferência celular entre microcarregadores.*
- 4) Estudar o processo de tripsinização celular em microcarregadores verificando a eficiência do processo de desprendimento celular, capacidade de readesão e multiplicação das células nos microcarregadores.*
- 5) Sugerir uma estratégia de propagação celular na etapa de transferência de células Vero em microcarregadores para o futuro emprego no processo de produção do vírus da febre amarela.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, são apresentados os materiais e a metodologia analítica utilizados nos experimentos para o estabelecimento de um protocolo de propagação de células Vero utilizando microcarregadores passível de ampliação de escala.

3.1. Materiais

3.1.1. Linhagem Celular

*Foi utilizada a linhagem celular Vero, estabelecida a partir do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto normal (Yasumara e Kawakita, 1963). Células Vero obtidas da European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) são aceitas como adequadas para a produção de vacinas virais de uso humano. As células Vero utilizadas nos experimentos estão adaptadas ao cultivo em meio livre de soro fetal bovino (SFB) e pertencem ao banco de células de trabalho do Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, RJ.*

3.1.2. Microcarregadores

Os microcarregadores microporosos Cytodex1 (GE Healthcare) na concentração de 3g/L foram utilizados como suporte para a adesão das células Vero nos cultivos em frascos agitados do tipo spinner. Os microcarregadores foram pesados em tubos cônicos de 50mL e hidratados com PBS através de 3 lavagens (30 a 50mL de PBS por grama de microcarregador), sendo que, na primeira, os microcarregadores permaneceram por no mínimo 3 horas em contato com a solução. Após a autoclavagem (121°C durante 15 minutos), o PBS foi removido e os microcarregadores lavados 3 vezes com meio de cultivo VP-SFM (Gibco Invitrogen).

3.1.3. Meios de Cultivo

O meio de cultivo utilizado foi o VP-SFM (Gibco Invitrogen) que consiste em um meio de cultivo totalmente livre de soro fetal bovino, fabricado sem componentes de origem animal, com teor de proteínas ultra baixo (5µg/mL). Este meio de cultivo é indicado especificamente para o crescimento celular e produção de vírus em células Vero (Jayme et al. 1999). No momento da utilização, o meio de cultivo VP-SFM foi suplementado com uma solução de glutamina a 200mM em volume suficiente para obter uma concentração final de uso igual a 4mM. Nos cultivos em sistema agitado utilizando spinners, o meio de cultivo também foi suplementado com Pluronic F-68® (Sigma Aldrich) a 10% (v/v) para uma concentração final de uso no meio de cultivo a 0,01% (v/v), e solução de sulfato de gentamicina a 4g/L de concentração final de uso no meio de cultivo de 1% (v/v).

3.1.4. Solução de tripsina/verseno

A partir de uma solução estoque de verseno (5% de EDTA e 1% de vermelho de fenol em solução aquosa, pH 7,6), foram preparadas soluções de trabalho de verseno 0,1% (v/v) em PBS. Após ajuste do pH para 7,6, a solução de verseno foi fracionada em alíquotas de 50mL, esterilizada a 121°C por 20 minutos e estocada à temperatura ambiente. Na solução de verseno foram adicionados 500µL de solução estoque de tripsina 1/250 derivada de pâncreas suíno (Gibco Invitrogen) preparada na concentração de 5%(m/v).

3.1.5. Solução de azul de trypan

A solução azul de trypan continha o corante azul de trypan (Sigma) a 0,5% (m/v) em solução salina a 0,9% (m/v) tamponada com tampão fosfato (PBS) a 0,1M, pH 7,1 a 7,3. Após a dissolução do azul de trypan, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm (Kuchler, 1977).

3.1.6. Solução de cristal violeta

A solução de Cristal Violeta foi preparada com o reagente cristal violeta (Sigma) 0,1% (m/v) em ácido cítrico (Sigma) 0,1 M. Após a dissolução de todos os componentes, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 μ m (Sanford et al. 1951).

3.1.7. Solução inibidora de tripsina

A solução estoque inibidora de tripsina de soja (Sigma Aldrich) foi preparada em PBS, sendo utilizada uma massa de 0,8g de inibidor de tripsina de soja para cada litro de PBS. A solução estoque inibidora de tripsina foi submetida a uma dupla filtração esterilizante e possui pH 7,4 \pm 0,2 e osmolaridade de 280 \pm 20 mOsm/kg, sendo armazenada a temperatura de -20°C. Partindo da solução estoque descongelada, foi feita uma diluição de 1/25 em meio de cultivo VP-SFM para sua utilização na inativação da tripsina sobre as células.

3.2. Equipamentos

3.2.1. Frascos estáticos do tipo T

Frascos estacionários para cultivo de células dos tipos T75cm² e T175 cm² com tampas ventiladas foram utilizados no cultivo das células Vero em monocamada empregando um volume de trabalho de 20mL e 40mL, respectivamente. Os frascos do tipo T utilizados no cultivo de células Vero em monocamada foram incubados à temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. As células cultivadas em monocamada em frascos do tipo “T”, ao atingirem 90% de confluência, foram tripsinizadas, ressuspendidas em meio VP-SFM e utilizadas como inóculo celular inicial para os cultivos em frascos spinner.

3.2.2. Frascos tipo spinner

Frascos agitados do tipo spinner, com volume nominal de 250mL, foram utilizados nos experimentos com células Vero em microcarregadores, com um volume de trabalho de 150mL. Para a agitação dos spinners foi utilizado agitador

magnético para quatro frascos com controle de agitação, modelo MCS-104S (Techne), o qual foi instalado no interior de uma estufa incubadora à temperatura de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade controlada. Nos experimentos onde diferentes modos de agitação foram empregados, foi conectado ao agitador um temporizador, modelo TM-22(Elcon), de forma a permitir o controle do tempo de agitação e repouso dos microcarregadores e das células. Os frascos tipo spinner foram previamente tratados com silicone líquido Sigmacote® (Sigma Aldrich) para evitar a aderência dos microcarregadores e das células em suas laterais de vidro.

3.3. Metodologia Experimental

Nesta seção estão apresentados os procedimentos experimentais para o cultivo das células Vero em microcarregadores e a análise das variáveis físico-químicas que podem influenciar na transferência das células entre as escalas de propagação de inóculo em frascos agitados do tipo spinner.

3.3.1. Crescimento Celular

Os experimentos realizados durante essa dissertação foram feitos em replicatas técnicas e/ou biológicas. A replicata biológica se dá quando o mesmo tipo de organismo é cultivado e tratado sob as mesmas condições, como por exemplo, diferentes frascos contendo o mesmo tipo de célula (preferencialmente a mesma linhagem e passagem) que tenham sido cultivados e mantidos sob condições idênticas. Já a replicata técnica acontece quando exatamente a mesma amostra é analisada várias vezes, tendo por objetivo principal estabelecer a variabilidade da técnica de análise (erro experimental).

3.3.1.1. Descongelamento e propagação das células em monocamada

A partir de um criotubo proveniente do banco de células de trabalho, as células Vero adaptadas em meio de cultivo livre de SFB foram descongeladas em banho de água a 37°C. As células foram transferidas para um tubo estéril cônico de centrífuga contendo 10mL de meio de cultivo VP-SFM a 37°C e submetidas à centrifugação a 220g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado para a remoção

do DMSO sendo as células ressuspensas em um volume adequado de meio de cultivo VP-SFM e transferidas para frascos de cultivo estéreis estáticos para subsequentes cultivos celulares, os quais foram mantidos em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Após o estabelecimento de uma monocamada celular confluyente, o sobrenadante das culturas foi recolhido, armazenado em frasco estéril e as células foram lavadas com meio de cultura VP-SFM para aumentar a eficiência da tripsinização, removendo proteínas livres. Posteriormente, a monocamada foi lavada com 4mL (no caso de frascos T175cm²) com solução 0,1% (v/v) de verseno acrescida de 500µL de tripsina e, em seguida, foram removidos 3 mL dessa solução, mantendo 1mL da solução de tripsinização dentro do frasco com as células. As células foram mantidas em contato com a solução de tripsinização a 37°C, por 4 minutos ou até o início do desprendimento da monocamada celular dos frascos T175cm², visualizados em microscópio óptico invertido. Os frascos T175cm² foram submetidos a suaves batidas com as mãos para facilitar o desprendimento da monocamada de células aderidas em sua parede.

Para inativar a ação da tripsina, foi utilizado um volume de 10mL de meio condicionado separado de etapas de subcultivos celulares anteriores, ou meio VP-SFM contendo SFB 5% (v/v), ou 16mL de solução inibidora de tripsina (obtida da solução inibidora de tripsina estoque diluída em meio VP-SFM na proporção de 1/25) para a lavagem das células após a tripsinização. Após homogeneização da suspensão celular e centrifugação a 200g por 6 minutos, o sobrenadante celular com resíduos de tripsina foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultivo VP-SFM, sendo que o procedimento de lavagem das células foi realizado duas vezes.

3.3.2. Propagação das células em microcarregadores em frascos agitados do tipo spinner

Os microcarregadores foram transferidos para um frasco do tipo spinner, juntamente com 100mL de meio de cultivo VP-SFM, sendo mantidos em estufa incubadora à temperatura de 37°C e 5% de CO₂ sob agitação de 60rpm durante as 24 horas anteriores à adição do inóculo celular. A concentração de células utilizada como inóculo foi de $2,1 \times 10^5$ células/mL.

Após a adição do inóculo celular, foi utilizado um volume de trabalho de 100mL e velocidade de agitação de 40rpm durante 24 horas, de forma a facilitar o processo de adesão celular (GE Healthcare, 2005). Após esse período, o volume foi completado com meio de cultivo VP-SFM para 150mL e a velocidade ajustada para 60rpm.

3.3.3. Transferência *bead-to-bead*

Para a etapa de transferência entre partículas de microcarregador, as células Vero foram previamente cultivadas em um spinner (denominado spinner de transferência) conforme descrito na etapa 3.3.2. Após 3 dias de cultivo, todo o volume contido no spinner de transferência foi homogeneamente dividido de forma que 50mL desse meio contendo microcarregadores colonizados servissem de inóculo para um segundo spinner, o qual continha previamente 3g/L de microcarregadores não colonizados em 100mL de meio de cultivo, totalizando um volume final de trabalho de 150mL (onde 1/3 dos microcarregadores estavam colonizados e 2/3 não estavam colonizados). O segundo spinner foi submetido a dois tipos de agitação (intermitente e contínua) por diferentes intervalos de tempo, conforme condições do planejamento experimental apresentados na tabela 3.4.

3.3.4. Tripsinização de células aderidas a microcarregadores

As células Vero foram cultivadas em frascos do tipo spinner utilizando microcarregadores na concentração de 3g/L e meio VP-SFM por 3 dias. Após esse período, as mesmas foram submetidas à tripsinização para que todo o conteúdo de células fosse utilizado como inóculo para um segundo spinner, o qual continha previamente 50mL de meio de cultivo VP-SFM e microcarregadores na concentração de 3g/L.

Após cessar a agitação e com a decantação das células e dos microcarregadores, houve a remoção de 100 mL do sobrenadante para descarte e a adição de 50mL de solução de verseno a 0,1% (v/v). A mistura de verseno, meio VP-SFM, células e microcarregadores foi levemente homogeneizada e novamente deixada em repouso até que os microcarregadores decantassem. Após este passo, diferentes volumes de solução tripsina/verseno foram testados na tripsinização dos

microcarregadores, de modo que foi removido um volume de meio de cultivo correspondente a um volume de solução tripsina/verseno que seria adicionada no spinner considerando o volume total de 100mL nesta etapa. A tripsinização ocorreu durante 10 minutos em estufa de CO₂ sob agitação de 80rpm. Após esse período, o conteúdo deste spinner foi dividido entre outros dois frascos spinners, os quais continham previamente 50mL de meio VP-SFM suplementado com 5% (v/v) de SFB já contendo microcarregadores na concentração de 3g/L, totalizando um volume final de 100mL. Os spinners que receberam as células tripsinizadas provenientes do cultivo anterior foram submetidos à agitação intermitente por 24 horas, sendo 5 minutos de agitação a 60rpm e uma hora de repouso. Após 24 horas, foi removido 50mL do meio de cultivo VP-SFM antigo e adicionado 100mL de meio VP-SFM sem soro fetal bovino totalizando um volume de trabalho de 150mL e a agitação contínua foi restabelecida a uma velocidade de 60rpm. A concentração final de microcarregadores no sistema foi de 3,5g/L.

3.4. Metodologia Analítica

3.4.2. Determinação do crescimento celular em frascos estáticos

As amostras obtidas de cultivos em monocamada foram submetidas a ensaios de contagem do número de células e a viabilidade celular determinada através do método de exclusão do corante azul de trypan (Doyle e Griffiths, 1998). Este método baseia-se na incorporação do corante azul de trypan nas células mortas, devido ao comprometimento da integridade da membrana plasmática. A contagem do número de células totais e de células coradas (mortas) foi realizada em câmara de Neubauer, após as diluições necessárias.

3.4.3. Determinação da concentração de células nos cultivos com microcarregadores

Nos cultivos celulares com microcarregadores, foi realizada a determinação da concentração de células nos microcarregadores empregando o método de coloração dos núcleos celulares com cristal violeta (Sanford et al. 1951). Amostras de 1mL de suspensão de células em microcarregadores foram recolhidas

diariamente dos experimentos e transferidas para um microtubo de 1,5mL. Após centrifugação por 3 minutos a 100g, descartou-se 850µL do sobrenadante e acrescentou-se o mesmo volume removido de uma solução de cristal violeta 0,1% (m/v) em ácido cítrico 0,1 M. Após homogeneização, as amostras foram mantidas durante 1 hora a 37°C. A contagem dos núcleos corados com cristal violeta foi realizada em câmara de Neubauer, após as diluições necessárias.

3.4.4. Determinação da concentração de glicose e lactato

Nos cultivos de células Vero, tanto nos experimentos em frascos estáticos como em frascos agitados tipo spinner, foram monitorados o consumo do substrato glicose, bem como a formação do metabólito lactato, o qual, dependendo da concentração no meio de cultivo, pode ser tóxico às células. A análise da concentração de glicose e lactato presente no sobrenadante do meio de cultivo foi realizada utilizando-se o analisador bioquímico YSI modelo 2700 (Yellow Springs Instruments) com membranas próprias para detecção de ambas as substâncias. Brevemente, a concentração de glicose e lactato baseia-se na utilização de uma sonda contendo uma membrana onde as enzimas glicose oxidase e lactato oxidase, respectivamente, estão imobilizadas. A reação enzimática gera peróxido de hidrogênio, que é detectado em um eletrodo de platina, sendo proporcional à concentração de ambas as substâncias presentes na amostra.

3.4.5. Microscopia óptica

Estudos de microscopia óptica foram realizados para observação da confluência da monocamada celular em frascos estáticos do tipo T e, também, para análise da estrutura dos microcarregadores bem como a colonização celular em sua superfície durante o cultivo em frascos do tipo spinner. Foi utilizado o microscópio óptico invertido de modelo DM IRB (marca Leica).

3.5. Planejamento experimental para avaliação do protocolo de agitação

Para definir a melhor estratégia de escalonamento para o cultivo de células Vero em microcarregadores, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 , onde, na etapa de transferência de células de um microcarregador para outro, a variável agitação foi estudada no modo intermitente, bem como os intervalos de intermitência e o respectivo tempo de duração para determinar a ocorrência da formação de pontes de células entre os microcarregadores, como forma de avaliara eficiência da transferência de células entre os microcarregadores. Para determinar o erro experimental, o ponto central foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão apresentadas na tabela 3.4 e a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com as combinações das variáveis estabelecidas está apresentada na tabela 3.5. A velocidade de agitação durante o cultivo não foi alterada, sendo mantida em 60rpm e o tempo de intermitência foi de 24 horas. Em todos os experimentos, amostras diárias foram retiradas por um período mínimo de sete dias consecutivos, sendo determinada a concentração de células totais, a qual foi a variável resposta analisada.

Tabela 3.4: Condições experimentais do planejamento fatorial completo 2^2 .

Variáveis	-	0	+
Repouso	30 minutos	45 minutos	60 minutos
Agitação	15 minutos	30 minutos	45 minutos

Tabela 3.5: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 .

Experimento	Repouso	Agitação
1	+	+
2	+	-
3	-	+
4	-	-
5	0	0
6	0	0
7	0	0

3.6. Avaliação de parâmetros representativos do metabolismo celular

Para a avaliação das condições de cultivo, foram calculados alguns parâmetros importantes relacionados ao metabolismo celular: concentração máxima de células ($X_{máx}$), taxa específica de crescimento celular (μ), tempo de duplicação (t_d) e coeficiente de rendimento de glicose em células ($Y_{X/Glc}$), calculados conforme as equações 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Equação 1

$$\mu_{exp} = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1);$$

onde μ_{exp} é a taxa específica de crescimento durante a fase exponencial, sendo X_n concentração celular no tempo n (t_n).

Equação 2

$$t_d = (\ln 2) / \mu$$

Onde t_d é o tempo de duplicação celular durante a fase exponencial.

Equação 3

$$q_{Glc} = 1/X \cdot (-dS/dT) \cong [-(Glc_2 - Glc_1) / (t_2 - t_1)] \cdot (X_1 - X_2) / 2$$

Equação 4

$$q_{Lac} = 1/X \cdot (dS/dT) \cong [(Lac_2 - Lac_1) / (t_2 - t_1)] \cdot (X_1 - X_2) / 2$$

Onde q_{Glc} é a taxa específica de consumo de glicose, q_{Lac} a taxa específica de formação de lactato e Glc_n e Lac_n são as concentrações do componente no momento n .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivo de células Vero em meio livre de soro fetal bovino

Nesta seção são apresentados e discutidos os perfis de crescimento das células Vero provenientes do banco de trabalho, adaptadas ao cultivo em meio livre de soro fetal bovino, tanto em sistema estático quanto em frascos do tipo spinner. A partir da determinação, para o sistema estacionário, dos períodos de cada fase do crescimento (fase lag, exponencial e estacionária), bem como as concentrações celulares máximas obtidas e a taxa específica de consumo de glicose para as duas condições iniciais de inóculo utilizadas, foi possível estabelecer as condições favoráveis (tempo de cultivo, volume de meio empregado e inóculo celular) para o subcultivo em frascos spinner das células Vero aderidas a microcarregadores.

4.1.1. Cinética de crescimento celular em frascos estacionários

Para caracterizar e avaliar o desempenho das células adaptadas ao meio de cultivo sem SFB, 42 frascos T75cm² foram inoculados com células Vero em duas diferentes concentrações, 30.000 células/cm² e 60.000 células/cm², sendo 21 frascos para cada concentração de inóculo. Diariamente, por sete dias consecutivos (168 horas), a concentração celular de três garrafas de cada inóculo celular foi determinada. Os valores médios com seus respectivos desvios padrão são mostrados na figura 4.11. Cultivos iniciados com concentração celular de 30.000 células/cm² alcançaram a fase estacionária após 96 horas de cultivo, sendo que a fase de maior atividade proliferativa (fase exponencial do crescimento) aconteceu no intervalo entre 24 e 96 horas.

Os cultivos iniciados com maior concentração celular (60.000 células/cm²) alcançaram a fase estacionária em 72 horas, apresentando uma fase de maior atividade proliferativa (fase exponencial do crescimento) no intervalo entre 24 e 72 horas, conforme mostrado na figura 4.9. As concentrações celulares máximas, ao

final da fase exponencial, foram $270.000 \pm 2,5$ células/cm² e 293.000 ± 3 células/cm², para os inóculos de 60.000 e 30.000 células/cm², respectivamente.

As velocidades específicas de crescimento celular foram calculadas por regressão para ambas as concentrações celulares na fase exponencial de crescimento. Os valores encontrados foram $0,0281 \text{ h}^{-1}$ para o inóculo de 30.000 células/cm² e $0,0273 \text{ h}^{-1}$ para o inóculo de 60.000 células/cm². Com base nesses dados, o tempo de duplicação celular foi calculado, sendo de 24,7 horas para o inóculo de 30.000 células/cm² e de 25,4 horas para o de 60.000 células/cm².

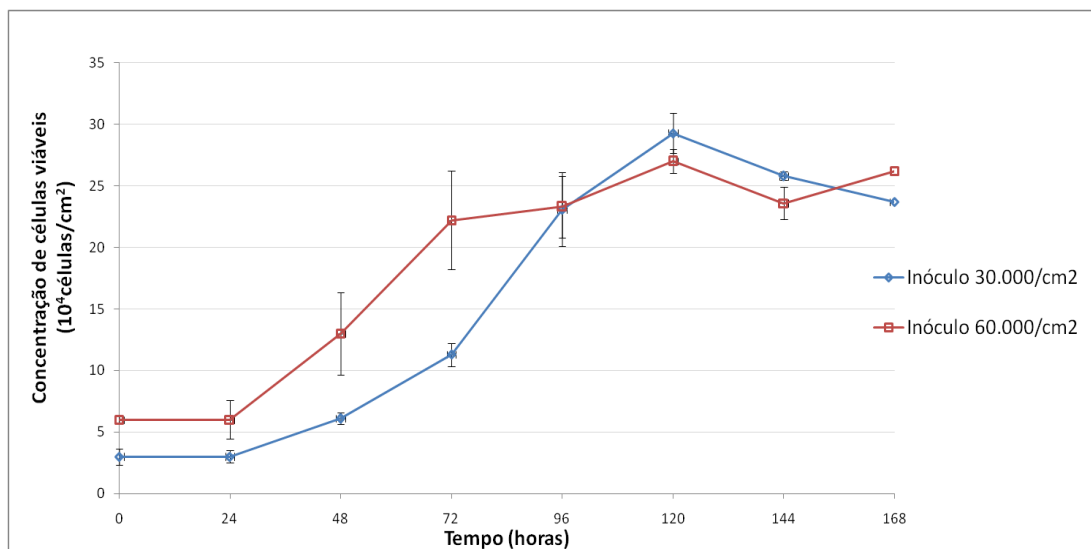


Figura 4.9: Cinética de crescimento celular de células Vero com diferentes concentrações de inóculo: (\diamond) 30.000 células/cm² e (\square) 60.000 células/cm². Os resultados representam a média de 3 replicatas biológicas e seu desvio padrão.

De acordo com os resultados, foi observado que a menor concentração de inóculo pode ser a mais indicada para a rotina de manutenção celular, pois permitiu passagens a cada 4 dias sem alongar demasiadamente a fase lag. A microscopia dos cultivos foi acompanhada diariamente (Figura 4.10) e mostrou que a densidade celular na superfície de crescimento da cultura com o maior inóculo apresentou um grau de ocupação elevado em 24 horas de cultivo, além de monocamada totalmente confluenta em 72 horas, corroborando para alcance da fase estacionária após este período.

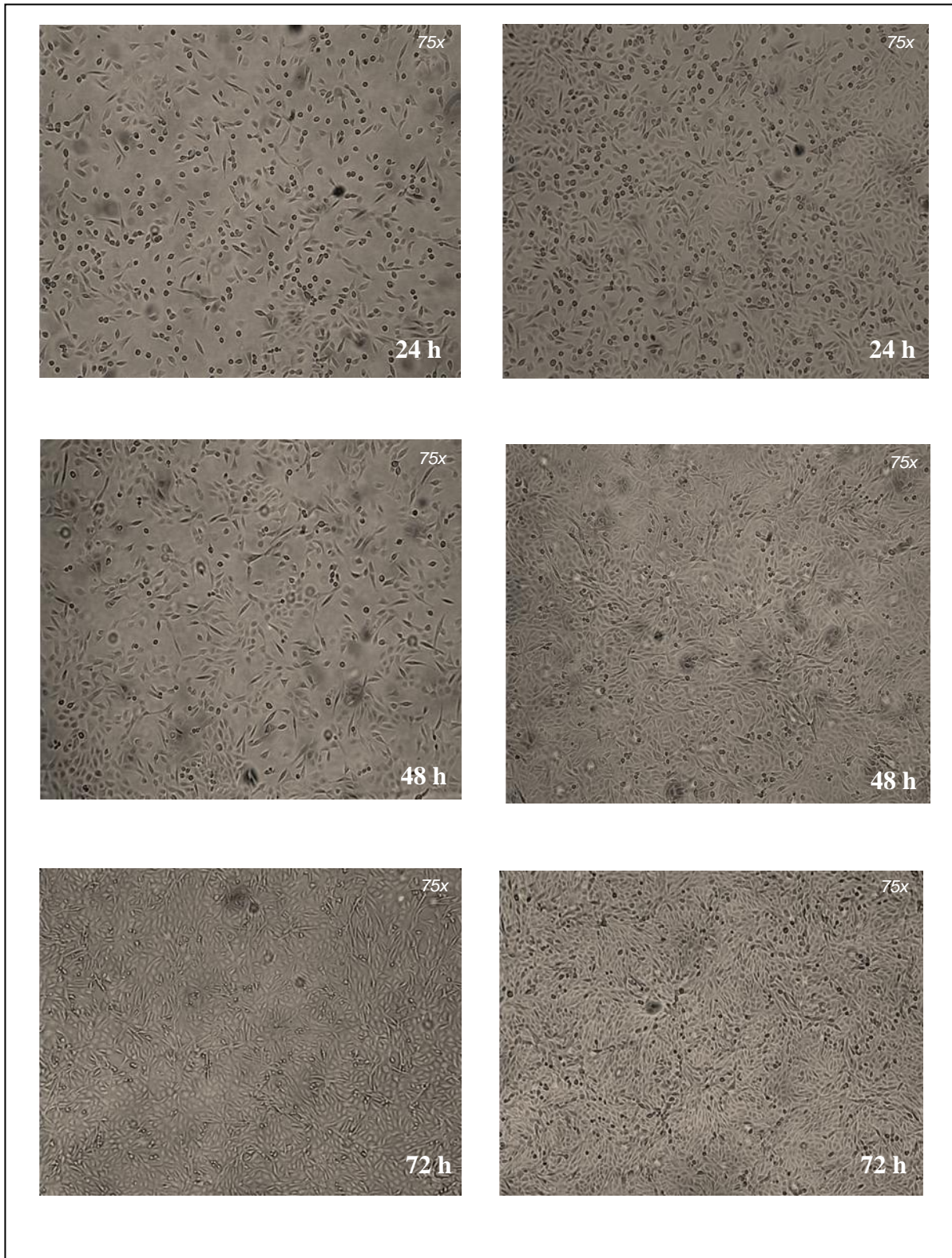
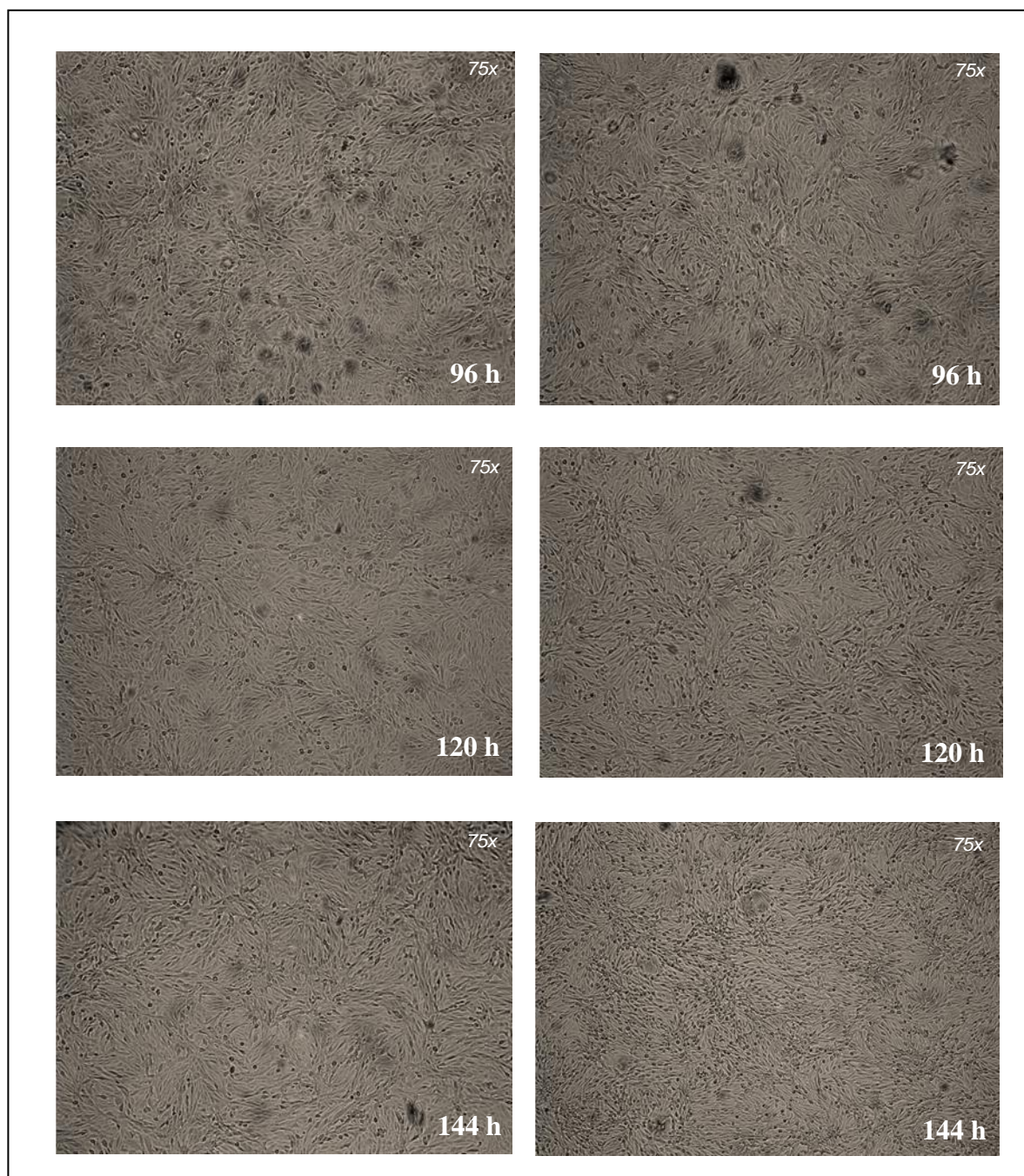
30.000 células/cm²60.000 células/cm²

Figura 4.10: Microscopia dos cultivos de 30.000 células/cm² e 60.000 células/cm².

30.000 células/cm²60.000 células/cm²

Continuação da Figura 4.10: Microscopia dos cultivos de 30.000 células/cm² e 60.000 células/cm².

O consumo de glicose e formação de lactato nos cultivos de células Vero adaptadas ao meio livre de SFB inoculadas em sistema estático nas concentrações 30.000 células/cm² e 60.000 células/cm² foram determinados e estão apresentados, respectivamente, nas figuras 4.11A e 4.11B.

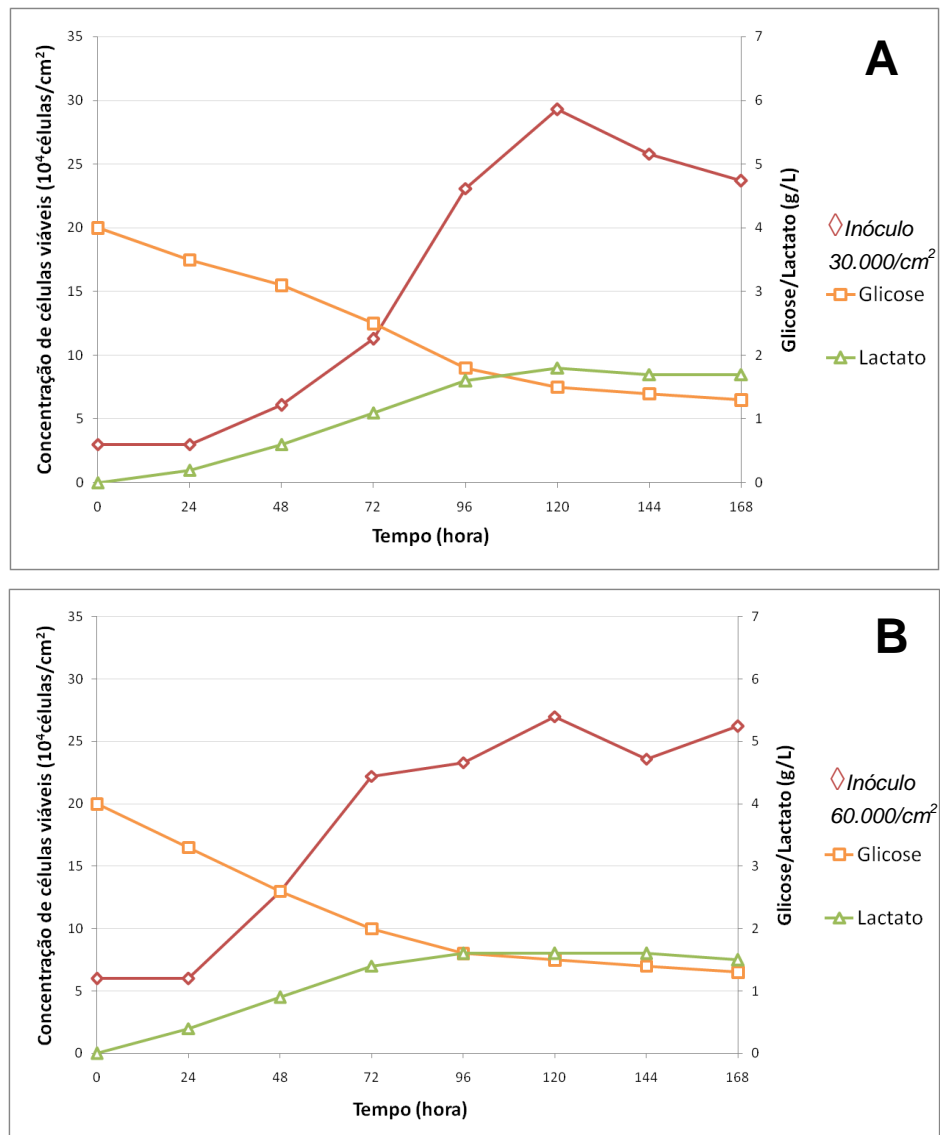


Figura 4.11 A e B: (□) Consumo de glicose, (▲) formação de lactato e (◇) concentração de células Vero viáveis cultivadas em sistema estático, para inóculo inicial de 30.000 células/cm² (A) e 60.000 células/cm² (B) utilizando meio de cultivo VP-SFM.

Tanto para a condição de cultivo com menor concentração inicial de células, como para a de maior concentração, durante todo o período de cultivo, as concentrações de glicose não se esgotaram. As concentrações de lactato formadas durante o mesmo período para as duas condições de inoculação celular também não atingiram níveis inibitórios, sendo os níveis de lactato acima de 2g/L (Ozturk et al. 1992). Os níveis de glicose foram superiores ao K_s (coeficiente de Monod) reportado para hibridomas. Este parâmetro do modelo de Monod representa a concentração de substrato em que o μ é diminuído pela metade do seu máximo e foi reportado para hibridomas na faixa de 0,2g/L a 0,6g/L (Ozturk et al. 1997). Desta forma, conclui-se que o crescimento celular não foi comprometido nem por esgotamento nutricional nem por inibição por formação de lactato.

A Figura 4.12 apresenta a taxa específica de consumo de glicose observada para as células Vero adaptadas ao meio livre de SFB, inoculadas em sistema estático com concentrações iniciais de 30.000 células/cm² e 60.000 células/cm². Durante o período de 96 horas pós-inóculo, o cultivo com menor concentração inicial de células apresentou uma maior taxa específica de consumo de glicose. Durante a fase exponencial de crescimento da cultura de menor inóculo (24 a 96 horas), as taxas específicas de consumo de glicose se assemelharam às respectivas taxas do cultivo de maior inóculo, quando essas culturas apresentaram um grau semelhante de ocupação da superfície de crescimento. Por exemplo, com 48 horas de cultivo na condição inoculada com 60.000 células/cm², a taxa específica de consumo de glicose ($7,41 \times 10^{-11}$ g/h/célula) assemelhou-se à taxa ($7,08 \times 10^{-11}$ g/h/célula) na condição inoculada com 30.000 células/cm², com 72 horas de cultivo. Nestes dois tempos, o espalhamento e ocupação das células na superfície dos frascos encontraram-se semelhantes, conforme apresentado na Figura 4.10. O mesmo fenômeno foi observado para o período de 72 e 96 horas de ambos os cultivos.

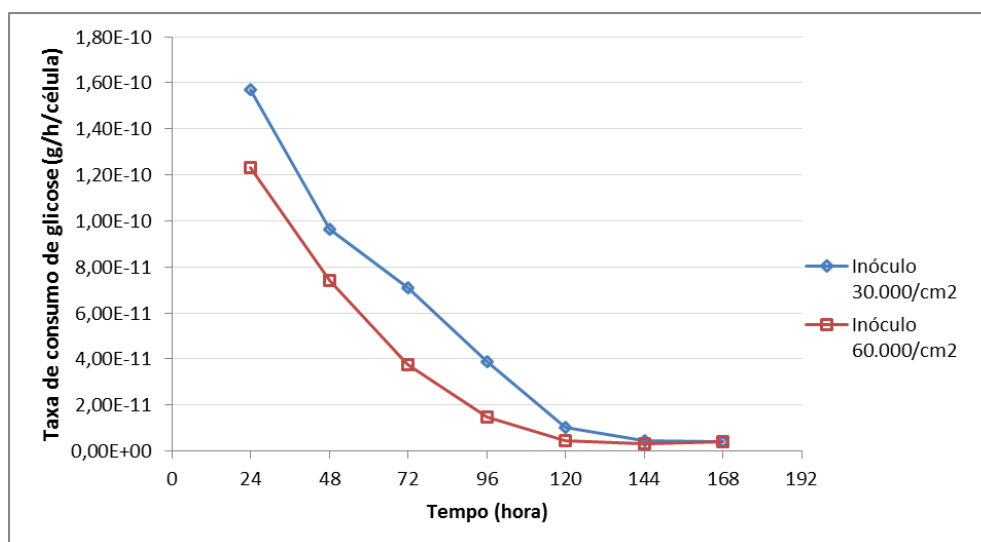


Figura 4.12: Determinação da taxa específica de consumo de glicose das diferentes concentrações de inóculo em frascos T: (\diamond) 30.000 células/cm² e (\square) 60.000 células/cm².

4.1.2. Comparação do uso de meio com soro fetal bovino e meio condicionado na etapa de tripsinização de células Vero

O crescimento de células animais utilizando meios totalmente livres de SFB e de proteínas de origem animal é de extrema importância na obtenção de produtos voltados para a saúde humana. Isto se deve à constante pressão por parte das

agências regulatórias para a eliminação de insumos de origem animal, que possam representar fonte de contaminação por agentes adventícios, como é o caso da *Encefalite Bovina Espongiforme* (Lubniecki, 1998).

O SFB contém inibidores de proteases que fazem com que ele seja utilizado no processo de tripsinização, inativando a tripsina empregada neste procedimento (Lundgren e Blüml, 1998; Doyle e Griffiths, 1998). O cultivo de células animais em meios livres de SFB exige alternativas para sua substituição no processo de inativação da tripsina, de forma que em nenhuma etapa do processo este insumo seja utilizado, garantindo mais segurança e melhor qualidade ao produto vacinal final. O uso de inibidores de tripsina é uma alternativa para a neutralização da atividade desta enzima nos procedimentos de tripsinização. No entanto, em escala industrial, a utilização de um insumo de alto custo como os inibidores de tripsina pode aumentar os custos de produção. Uma alternativa seria a inativação da atividade da tripsina utilizando meio condicionado, ou seja, o próprio meio onde as células foram cultivadas. No meio condicionado há uma série de componentes, inclusive proteínas secretadas pelas células, que podem contribuir no processo de inativação da tripsina. Estas duas alternativas de inativação citadas acima foram comparadas com a inativação da tripsina utilizando meio VP-SFM com 5% (v/v) de SFB, sendo avaliadas através dos experimentos de passagem das células Vero tanto de frascos estacionários para frascos agitados do tipo spinner empregando microcarregadores, como de frascos estacionários para frascos estacionários.

Apesar do uso de inibidor de tripsina ser eficaz no processo de inativação da tripsina (Zhou et al. 1989) e ser utilizado em garrafas estacionárias (Allikmets et al. 2009), neste trabalho, o uso do inibidor se mostrou inviável na etapa de tripsinização quando se faz uso de microcarregadores, porque suspensões celulares provenientes de uma etapa de tripsinização empregando inibidor de tripsina não foram capazes de se aderir ao microcarregador Cytodex 1. Além da não colonização dos microcarregadores, as células inoculadas formaram grumos celulares que prejudicaram e impossibilitaram o cultivo. No entanto, é encontrada na literatura a utilização do inibidor de tripsina de soja em células Vero na produção de vírus para fabricação de vacinas com resultados satisfatórios. Em um desses trabalhos, para a produção do vírus influenza, é utilizado o inibidor de tripsina em células Vero utilizando microcarregadores Cytodex 1, porém não é utilizada tripsina de origem animal (pâncreas suíno) para o desprendimento as células e sim proteases recombinantes, a TrypLE Select (Invitrogen) ou a Accutase (PAA Laboratories) (GE

Healthcare, 2011). Durante esse processo de tripsinização, as células foram mantidas por 2 minutos a 37°C em contato com uma destas proteases e, em seguida, as células foram transferidas para um biorreator do tipo wave com meio de cultivo já contendo inibidor de tripsina, sendo 20mg de inibidor de tripsina para cada 100mL de TrypLE Select em 2 litros de meio de cultivo (GE Healthcare, 2011).

A figura 4.13 compara o crescimento de células Vero em microcarregadores em frascos spinner, cujos procedimentos de obtenção do inóculo celular compreenderam o uso de meio com SFB e meio condicionado para a inativação da tripsina. Não houve diferença significativa no crescimento das células entre os spinners cujo processo de inativação utilizou meio com 5% (v/v) de SFB e os spinners onde foi utilizado meio condicionado. As imagens do cultivo em spinners também não apontam diferenças significativas na colonização dos microcarregadores pelas células Vero, quando meio condicionado ou meio contendo SFB foram utilizados na etapa de obtenção de uma suspensão celular por tripsinização, conforme observado na figura 4.14.

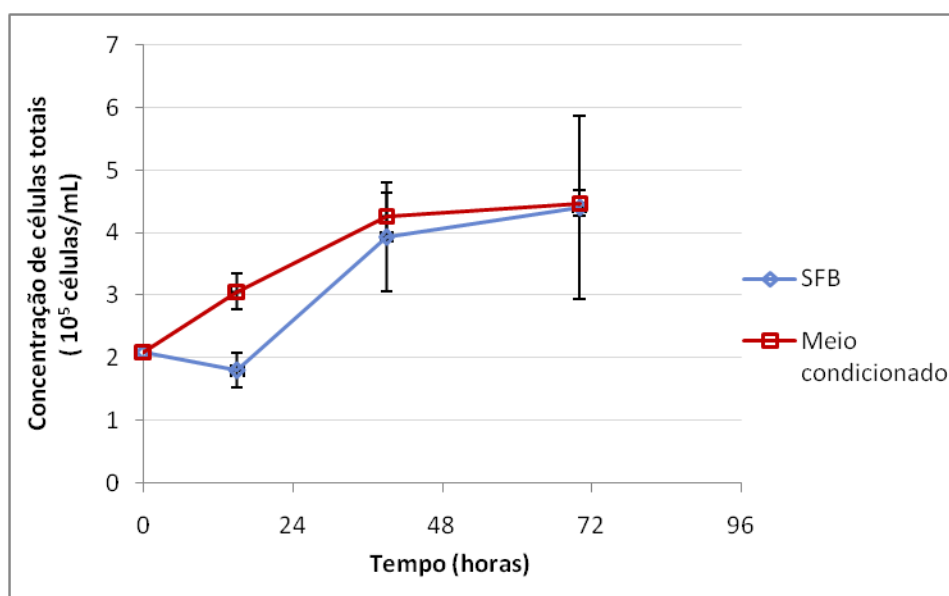


Figura 4.13: Cinética de crescimento celular da célula Vero em microcarregadores em frascos spinner, cujos procedimentos de obtenção do inóculo celular compreenderam o uso de (\diamond) meio com SFB 5% (v/v) e (\square) meio condicionado para a inativação da tripsina. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 3 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

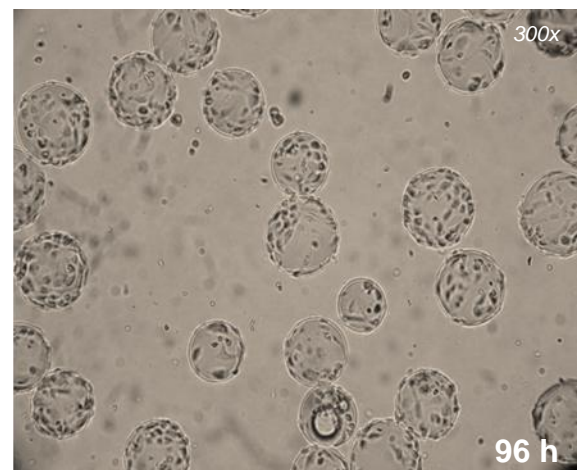
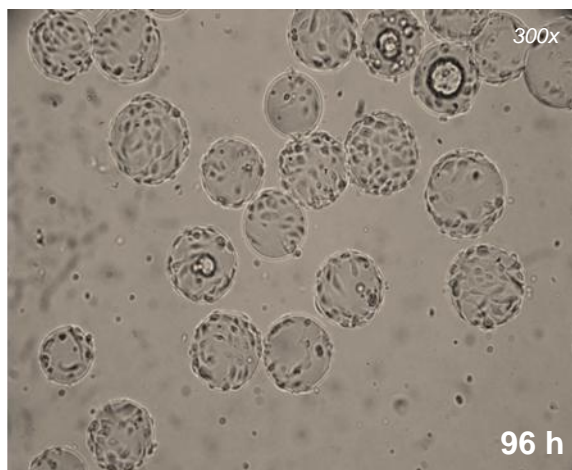
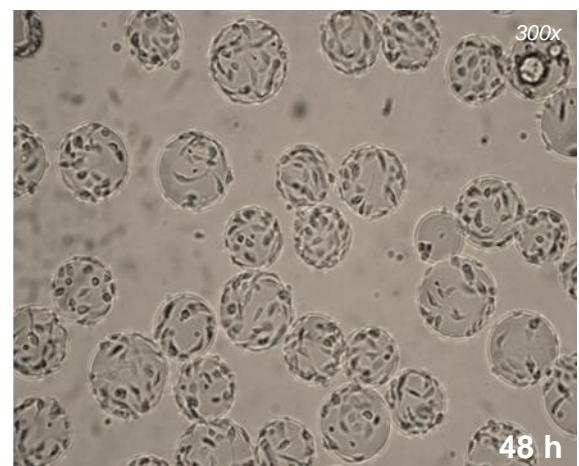
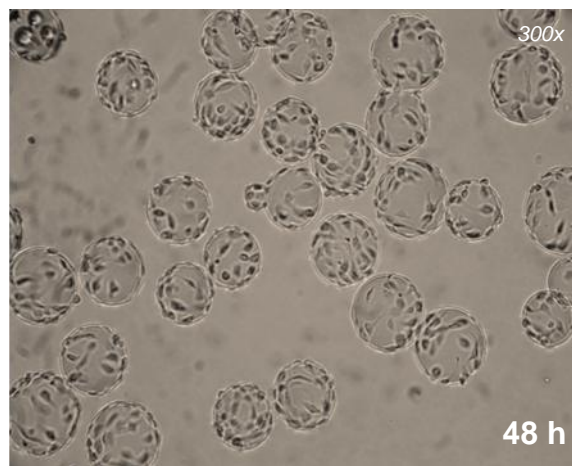
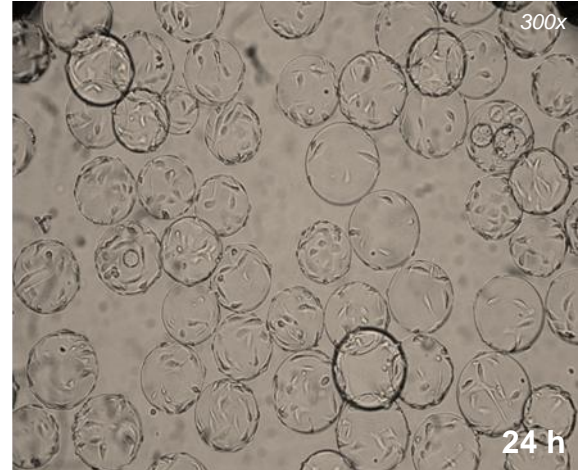
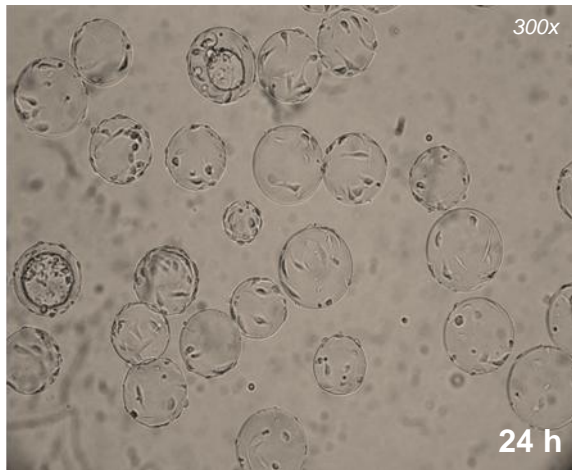
Meio com SFB**Meio condicionado**

Figura 4.14: Microscopia do cultivo de células Vero em microcarregadores empregando spinners, cujo inóculo foi proveniente de processo de tripsinização utilizando meio condicionado e meio com SFB, conforme descrito na figura.

No entanto, as mesmas suspensões de células provenientes da etapa de neutralização da atividade da tripsina empregando o meio condicionado, quando utilizadas na inoculação em frascos T, promoveram a formação de uma monocamada celular não homogênea, com falhas ou espaços não colonizados, diferentemente daquelas em que se utilizou meio suplementado com SFB. A presença de falhas na monocamada celular torna-se mais evidente à medida que a população celular aumenta, cobrindo toda a área do frasco, como pode ser observado na figura 4.15.

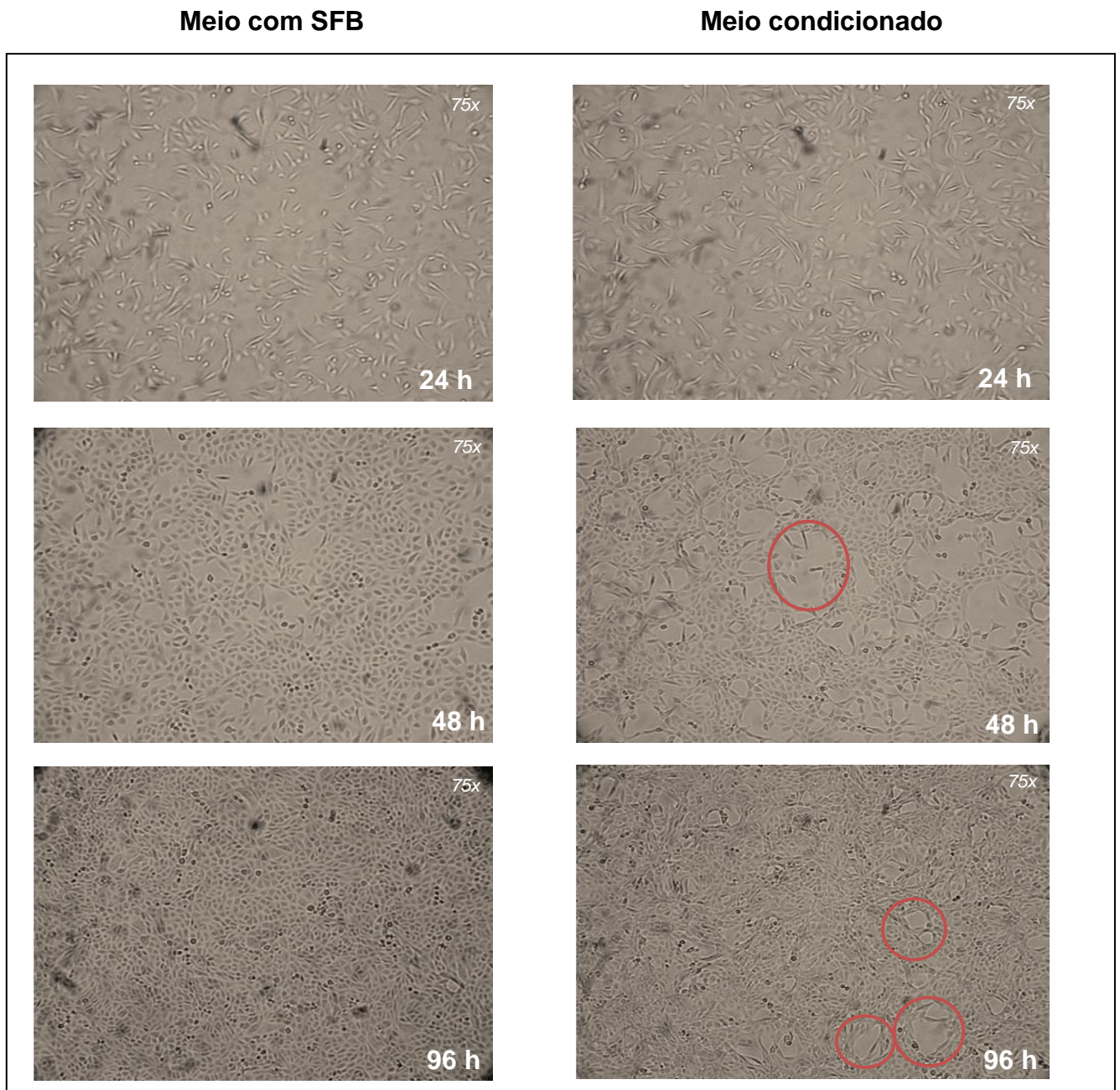


Figura 4.15: Microscopia do cultivo de células Vero em frascos T estacionários utilizando inóculo cujo processo de tripsinização foi utilizado meio condicionado e meio com soro fetal bovino, conforme descrito na figura.

Visando estabelecer uma metodologia que não empregasse o uso de soro fetal bovino na etapa de tripsinização das células, a condição experimental empregando meio condicionado para a inativação da tripsina foi modificada. Supondo que as falhas na monocamada celular pudessem ser provenientes de uma inativação parcial da atividade da tripsina, foi incluída uma etapa extra de lavagem da suspensão celular com meio condicionado. A figura 4.16 mostra que a introdução de uma segunda etapa de lavagem com meio condicionado reduziu significativamente a ocorrência desse evento, apresentando uma monocamada homogênea e confluenta.

Este protocolo utilizando meio condicionado para neutralizar a atividade da enzima tripsina apresentou algumas vantagens em relação ao uso de soro fetal bovino e do inibidor de tripsina. Além da eliminação do soro animal, uma outra vantagem seria o baixo custo, pois é utilizado o próprio meio de cultivo em que as células foram cultivadas e não são requeridos suplementos adicionais, como o inibidor de tripsina, reduzindo os custos com insumos. Além disso, o não uso do soro fetal bovino ou do inibidor de tripsina pode facilitar o processo de recuperação e purificação do produto final.

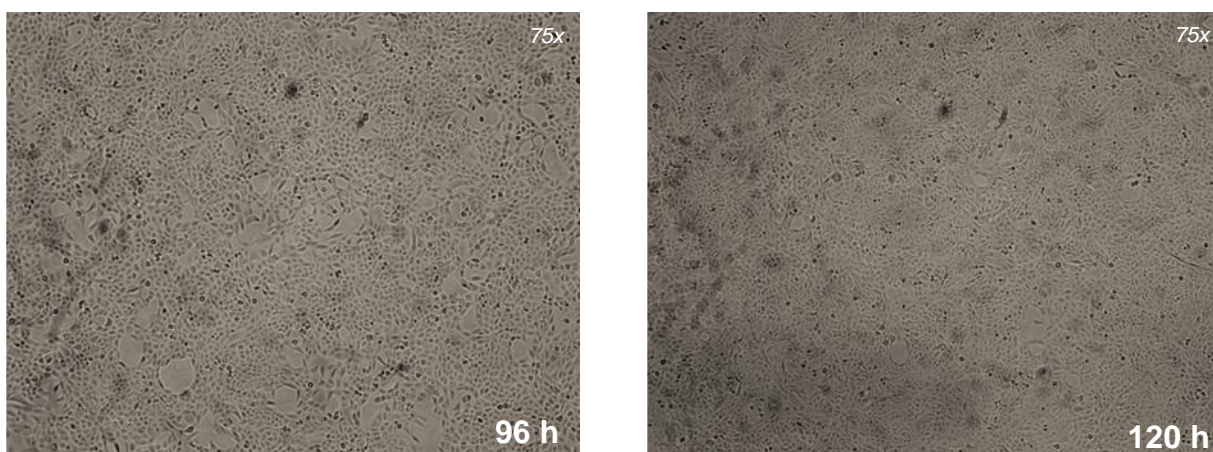


Figura 4.16: Microscopia do cultivo de células Vero em frascos T estacionários utilizando inóculo cujo processo de tripsinização foi utilizado meio condicionado e empregada uma segunda etapa de lavagem.

4.1.3. Cinética de crescimento celular em *spinners*

Uma vez conhecidos os períodos para cada fase do crescimento (fase lag, exponencial e estacionária) das células Vero adaptadas ao cultivo em meio livre de

SFB em frascos T e também tendo-se estabelecido o método de inativação da tripsina mais apropriado para a obtenção da biomassa necessária para o inóculo dos spinners, foi realizado um estudo cinético para conhecer o perfil de crescimento dessas células em sistema agitado utilizando microcarregadores e assim, determinar as condições a serem utilizadas nos estudos de escalonamento da etapa de inoculação das células. As células Vero na concentração inicial de 30.000 células/cm², foram cultivadas em meio livre de SFB em frascos T durante quatro dias (96 horas). Após tripsinização das células, a atividade da tripsina foi neutralizada com duas lavagens com meio condicionado e as células foram utilizadas como inóculo dos spinners contendo 3g/L de microcarregadores.

A figura 4.17 mostra o perfil de crescimento das células e indica que o final da fase exponencial está em 72 horas. A taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação durante a fase exponencial de crescimento foram calculados por regressão e os valores encontrados foram 0,025 h⁻¹ e 27,72 horas, respectivamente. Petriot e colaboradores também realizaram um estudo sobre o perfil cinético de células Vero adaptadas ao meio livre de SFB (meio de cultivo não especificado no estudo) em microcarregadores utilizando frascos tipo spinner, sendo inoculadas 2.75 x10⁵ células/mL (Petriot et al. 2010). Nessa condição de cultivo, as células Vero foram capazes de atingir uma taxa específica de crescimento de 0,021 h⁻¹ e uma concentração celular máxima de 9,6x10⁵ células/mL após 90 horas de cultivo (Petriot et al. 2010). Um crescimento similar em meio de cultivo livre de SFB também foi registrado por outros pesquisadores (Quesney et al. 2003; Rourou et al.2009; Trabelsi et al. 2006). O perfil cinético encontrado na literatura se assemelha ao que foi demonstrado neste trabalho, embora sejam ligeiramente inferiores ao obtido no presente trabalho.

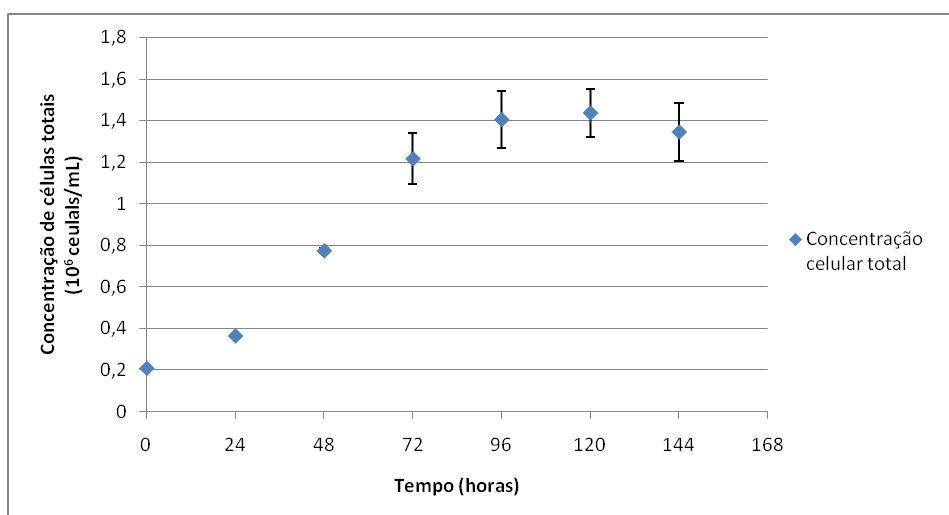


Figura 4.17: (\diamond) Cinética de crescimento celular da célula Vero em microcarregadores em frascos spinner, cujo procedimento de obtenção do inóculo celular se deu através do uso de meio condicionado para a inativação da Tripsina. Os resultados representam a média de 3 replicatas biológicas, 2 replicatas técnicas de cada uma delas e seu desvio padrão.

4.2. Ensaios de transferência de células Vero pela metodologia *bead-to-bead*

4.2.1. Transferência *bead-to-bead* utilizando agitação intermitente e contínua

Uma vez conhecida a cinética de crescimento das células Vero em meio de cultivo VP-SFM sem soro fetal bovino utilizando sistema agitado e microcarregadores, foram estudadas as formas de obtenção de inóculo para a ampliação de escala.

A transferência *bead-to-bead* propõe uma solução simples para o escalonamento de processos que utilizam células aderentes em microcarregadores. Normalmente, essa transferência acontece quando as células se soltam de microcarregadores confluentes e aderem em microcarregadores vazios (Cong et al. 2001; Kong et al. 1998) ou, então, através da formação de pontes celulares entre os microcarregadores (Cherry e Papoutsakis 1998; Dürrschmid et al. 2003). No entanto, Wang e Ouyang (1999) demonstraram que a transferência em células Vero acontece da segunda forma e que o contato direto fornecido pela agitação intermitente poderia promover a formação de pontes de células, contudo, as variáveis que afetam o fenômeno de pontes ainda precisam ser melhor estudadas. Dessa forma, foi realizada uma série de experimentos para se investigar algumas dessas variáveis, tais como o tempo de agitação e de repouso durante o período de intermitência.

Segundo Wang e Ouyang (1999), a agitação intermitente é a forma mais simples de se promover uma ampliação de escala, pois permite que as células tenham tempo suficiente para entrar em contato com um microcarregador vazio, migrar para o mesmo e se multiplicar. A metodologia empregada é o ponto de partida desta etapa do trabalho. A comparação da agitação intermitente e contínua foi proposta, sendo que a intermitência se deu por 7 horas, já que não se dispunha de um temporizador, com 30 minutos de repouso e 30 minutos de agitação.

Na figura 4.18, observa-se que o spinner de transferência, representado pela primeira curva do gráfico (em verde), alcançou concentrações de aproximadamente 7×10^5 células/mL, sendo então, realizada a transferência bead-to-bead com 72 horas de cultivo. Observa-se que não houve crescimento celular significativo após o procedimento de transferência, independentemente do modo de agitação ao qual o sistema foi submetido. A figura 4.19 mostra que as concentrações de glicose e lactato no meio de cultivo foram bastante semelhantes em ambos os modos de agitação e não alcançaram níveis inibitórios, concluindo que não contribuíram para o impedimento do crescimento celular.

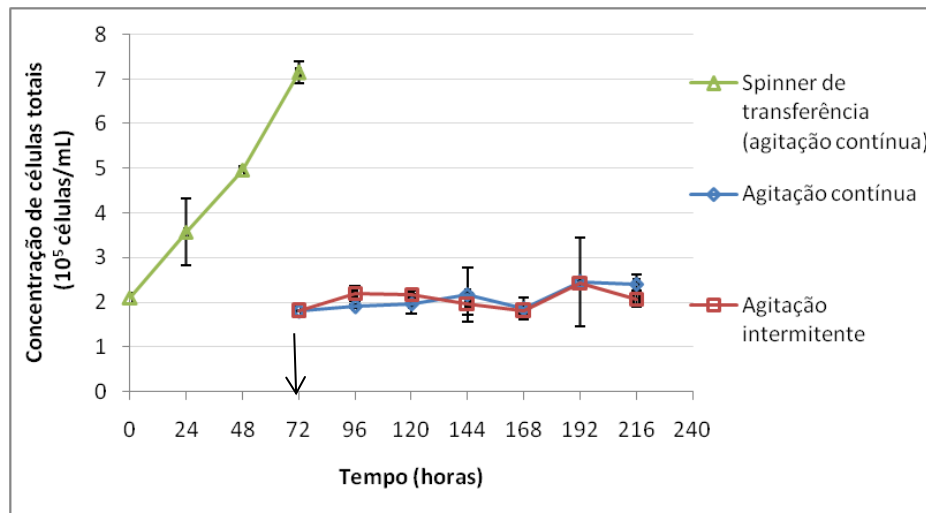


Figura 4.18: Comparação do crescimento celular entre os sistemas de (\diamond) agitação contínua e (\square) intermitente. O momento da transferência e o início do processo de intermitência se deram com 72 horas de cultivo (\downarrow) tendo duração de 7 horas com intervalos de 30 minutos de repouso e 30 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

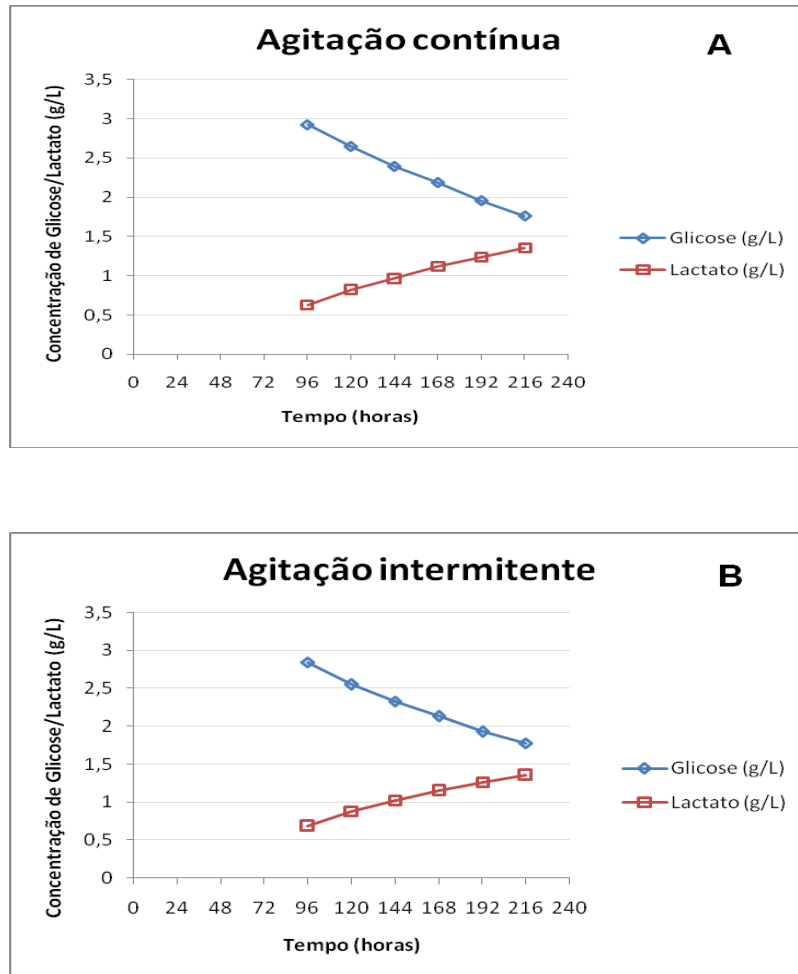


Figura 4.19: Determinação da concentração de (\diamond) glicose e (\square) lactato no meio de cultivo para os spinners submetidos ao modo de agitação contínuo (A) e intermitente (B).

Utilizando um temporizador, foi feito um ensaio utilizando um tempo de intermitência de 48 horas conforme proposto por Wang e Ouyang (1999). Contudo, diferentemente destes autores, empregaram-se intervalos de 30 minutos de agitação e 30 minutos de repouso. A figura 4.20 mostra que não houve crescimento significativo após a transferência e que as concentrações de glicose e lactato (figura 4.21) não foram fatores limitantes no processo, já que não se encontravam em níveis inibitórios.

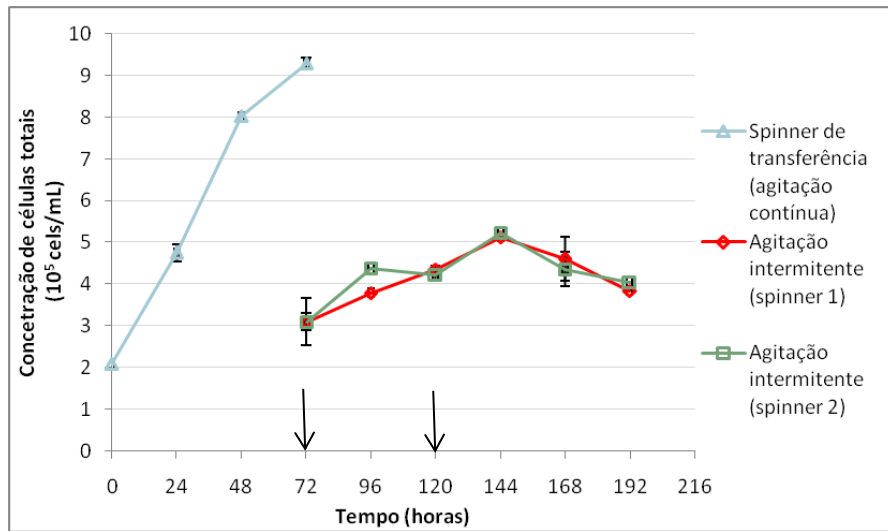


Figura 4.20: Determinação da concentração celular em processo de transferência bead-to-bead utilizando o modo de agitação intermitente durante 48 horas. Em 72 horas (\downarrow), foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (\downarrow) e final em 120 horas (\downarrow), com intervalos de 30 minutos de repouso e 30 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e 2 replicatas biológicas e seu desvio padrão.

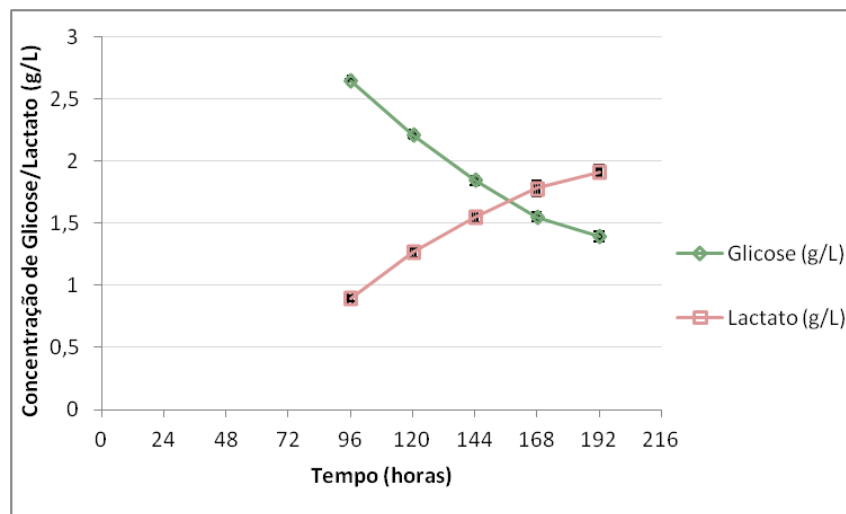


Figura 4.21: Determinação da concentração de (\diamond) glicose e (\square) lactato no meio de cultura. Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 48 horas, em intervalos de 30 minutos de agitação e 30 minutos de repouso e posteriormente seguido de agitação contínua.

4.2.2. Transferência *bead-to-bead* empregando planejamento experimental

Baseando-se nas referências bibliográficas (Luo et al. 2008; Wang e Ouyang, 1999) que obtiveram sucesso na transferência bead-to-bead através da agitação intermitente, foram estudadas as condições de intermitência e repouso, visando alcançar a transferência de células de microcarregadores colonizados para os vazios, condição essencial para o escalonamento do processo. Com este objetivo, foi realizado um planejamento experimental e, conseqüentemente, foi feita uma programação dos experimentos considerando algumas variáveis (tabela 3.5 – Materiais e Métodos).

Luo e colaboradores (2008) empregaram o método de Taguchi L8 para a determinação de alguns parâmetros críticos que pudessem interferir na eficiência da formação das pontes de células entre microcarregadores colonizados e não colonizados na transferência bead-to-bead utilizando células Vero (sendo empregadas 8 horas de agitação intermitente, seguidas de agitação contínua durante o restante do cultivo). Neste artigo, quatro variáveis foram estudadas: tempo de agitação e repouso, velocidade de agitação e a presença de SFB 5% (v/v) no meio de cultivo. Análises estatísticas indicaram que os tempos de repouso e agitação bem como a interação entre eles, são muito importantes. Desta forma, no presente trabalho, foram estudados apenas os tempos de agitação e repouso, já que a influência da presença do soro fetal bovino é bastante complexa na formação das pontes de células e não apresentou resultados significativos. A velocidade de agitação também é complexa pois, caso seja muito alta, tanto pode favorecer a formação das pontes devido ao aumento do número de colisões entre os microcarregadores confluentes e vazios, mas também destruir essas pontes já que são interações fracas (Luo et al. 2008).

De forma resumida, a tabela 4.6 mostra a matriz de experimentos utilizada para avaliar o crescimento de células Vero nos microcarregadores microporosos Cytodex 1, contendo as condições experimentais testadas e os resultados obtidos em termos de concentração celular máxima. Os cultivos foram avaliados por um período mínimo de sete dias, sendo computadas as máximas concentrações celulares obtidas em cada experimento, independentemente do tempo de cultivo que foi necessário para obtê-las.

Tabela 4.6: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 para a determinação das melhores condições para transferência bead-to-bead. A matriz demonstra os pontos experimentais codificados, os valores iniciais e máximos da concentração celular observados e o seu percentual de incremento. O repouso foi avaliado entre 30 e 60 minutos e a agitação entre 15 e 45 minutos.

Experimento	Repouso	Agitação	Concentração celular inicial (10^5 células/mL)	Concentração celular máxima (10^5 células/mL)	Aumento da concentração celular (%)
1	60 minutos (+)	45 minutos (+)	2,33	3,84	64,8
2	60 minutos (+)	15 minutos (-)	2,38	7,15	200,4
3	30 minutos (-)	45 minutos (+)	2,32	2,86	23,3
4	30 minutos (-)	15 minutos (-)	3,18	3,40	7,0
5	45 minutos (0)	30 minutos (0)	3,53	3,9	10,5
6	45 minutos (0)	30 minutos (0)	2,80	3,05	8,9
7	45 minutos (0)	30 minutos (0)	2,60	2,98	14,6

Inicialmente o intervalo de intermitência foi 60 minutos de repouso e 15 minutos de agitação (experimento 2) por 24 horas e a velocidade de agitação mantida a 60 rpm. Pode-se observar, na figura 4.22, que, nestas condições, houve um crescimento celular relevante comparado com os resultados anteriores, porém sem observar duplicação da concentração celular a cada dia. A figura 4.23 representa a determinação das concentrações de glicose e lactato no meio de cultivo.

Fotografias ao microscópio, referentes a todo o processo de transferência, desde o spinner de transferência, o qual serviu de inóculo, até o segundo, que foi submetido ao processo de agitação intermitente, estão apresentadas na figura 4.24. As imagens mostram de forma clara a formação de pontes de células, mostrando que muitos dos microcarregadores vazios foram colonizados, fato que poderia justificar o crescente aumento do número de células já que estariam se multiplicando nos novos microcarregadores.

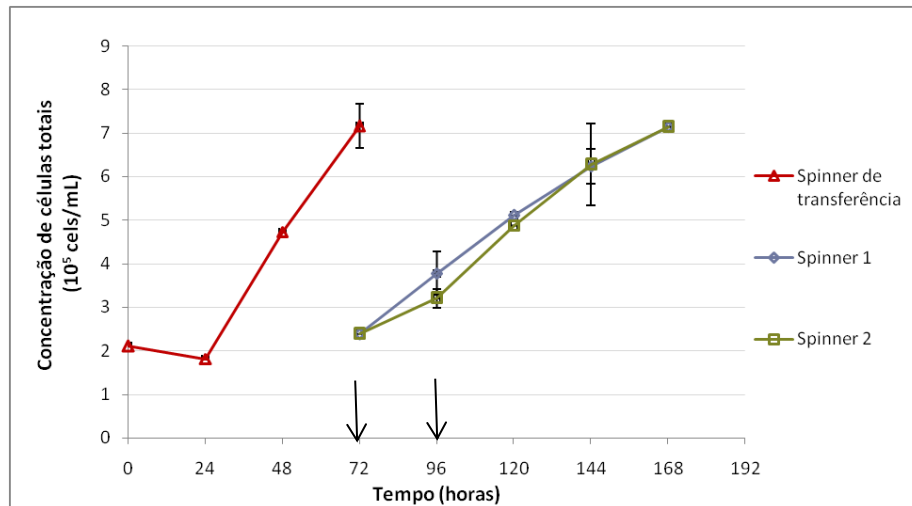


Figura 4.22: Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente ao experimento 2 do planejamento fatorial completo 2^2 empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (\downarrow) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (\downarrow) e final em 96 horas (\downarrow), em intervalos de 15 minutos de agitação e 60 minutos de repouso. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

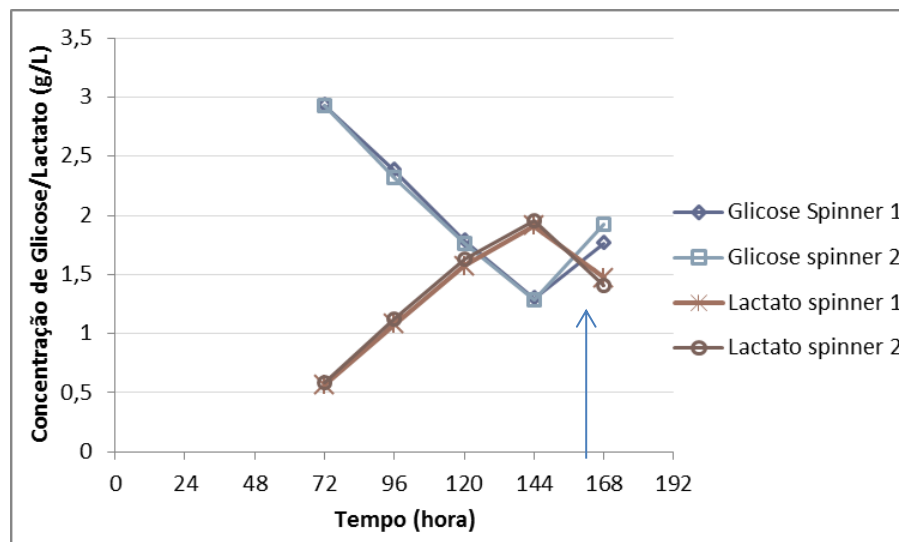


Figura 4.23: Determinação da concentração de glicose e lactato no meio de cultura referente ao experimento 2 do planejamento fatorial completo 2^2 . Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 15 minutos de agitação e 60 minutos de repouso. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. A seta indica momento em que foi realizada a substituição de 100mL do meio.

Seguindo o planejamento experimental cuja sequência de experimentos se deu de forma aleatória, em nenhum dos demais experimentos foi observado um crescimento celular expressivo. O experimento 1, o qual foi submetido a 45 minutos de agitação e 60 minutos de repouso, está representado na figura 4.25, bem como a

determinação das concentrações de glicose e lactato no meio de cultivo, na figura 4.26.

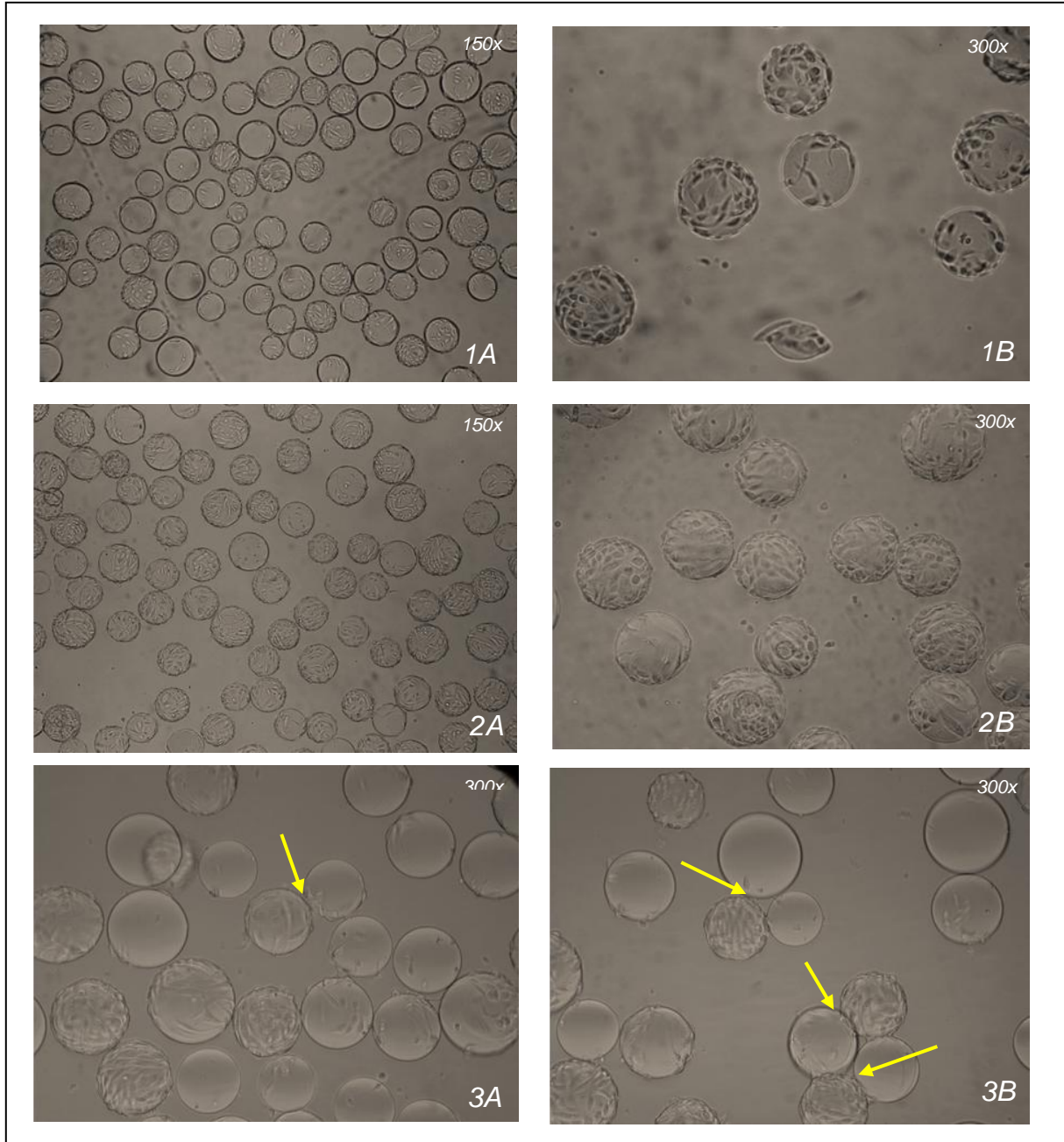
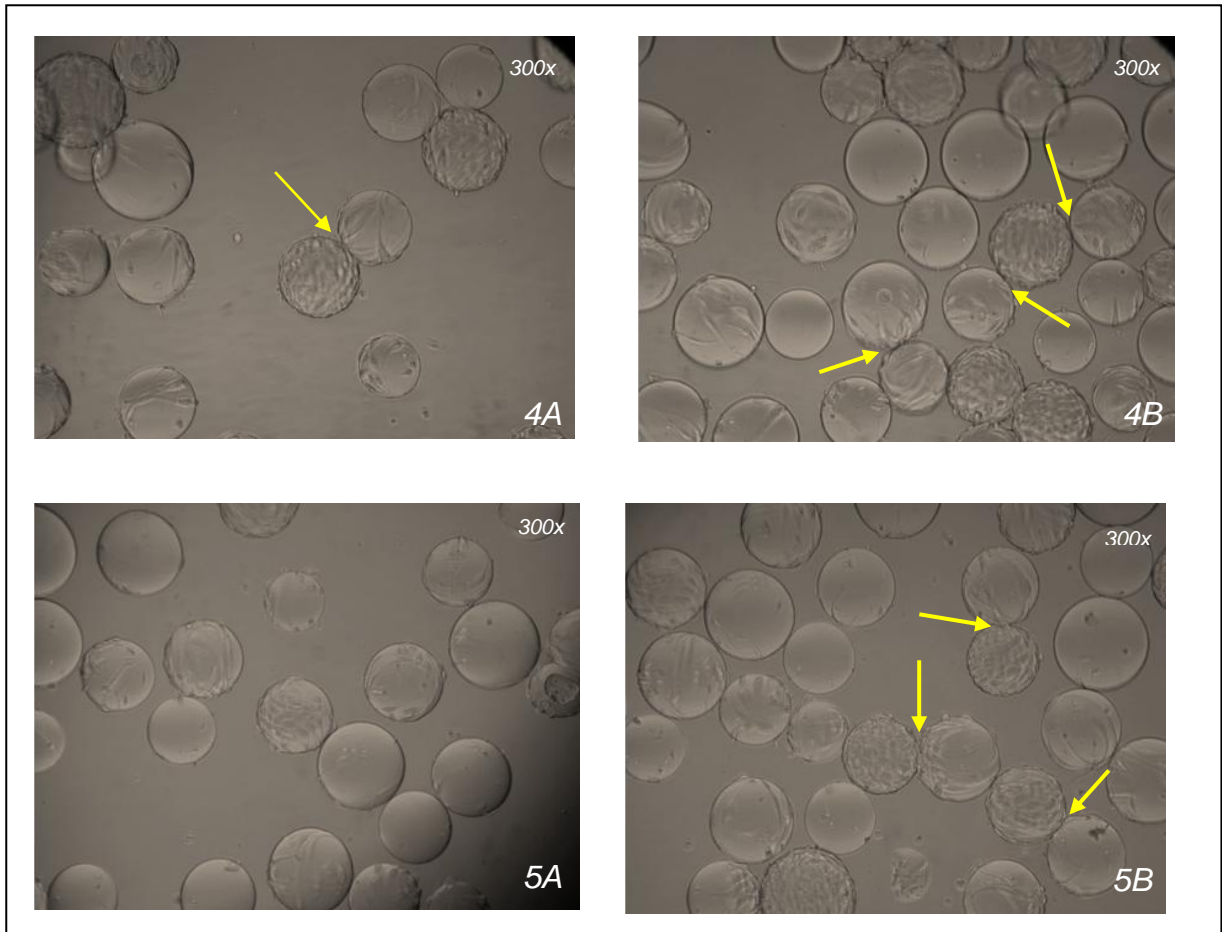


Figura 4.24: Microscopia do acompanhamento do processo de transferência, sendo 1A e 1B referentes ao segundo dia de cultivo do spinner de transferência; 2A e 2B ao terceiro dia de cultivo; 3A e 3B são referentes ao primeiro dia nos spinners submetidos à agitação intermitente; 4A e 4B ao segundo dia de agitação intermitente e 5A e 5B ao terceiro dia. As setas indicam onde pode ser visualizado o fenômeno de ponte.



Continuação da Figura 4.24: Microscopia do acompanhamento do processo de transferência, sendo 1A e 1B referentes ao segundo dia de cultivo do spinner de transferência; 2A e 2B ao terceiro dia de cultivo; 3A e 3B são referentes ao primeiro dia nos spinners submetidos à agitação intermitente; 4A e 4B ao segundo dia de agitação intermitente e 5A e 5B ao terceiro dia. As setas indicam onde pode ser visualizado o fenômeno de ponte.

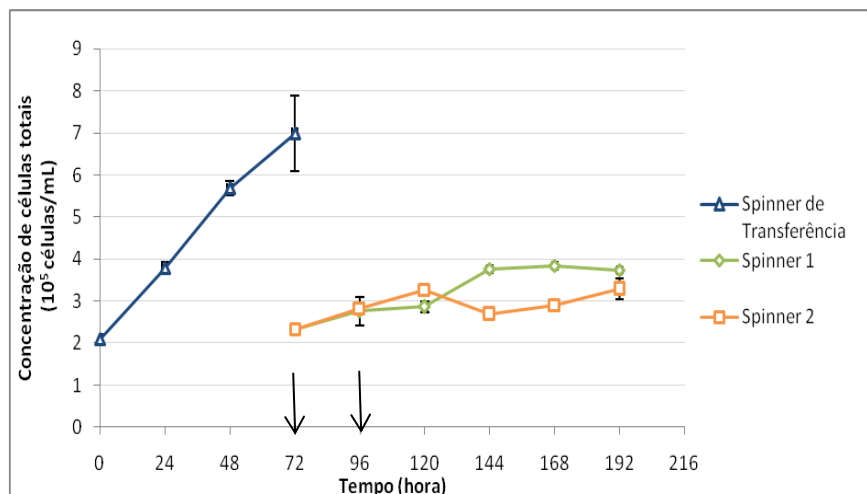


Figura 4.25: Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente ao experimento 1 do planejamento fatorial completo 2^2 empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (↓) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (↓) e final em 96 horas (↓), em intervalos de 60 minutos de repouso e 45 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

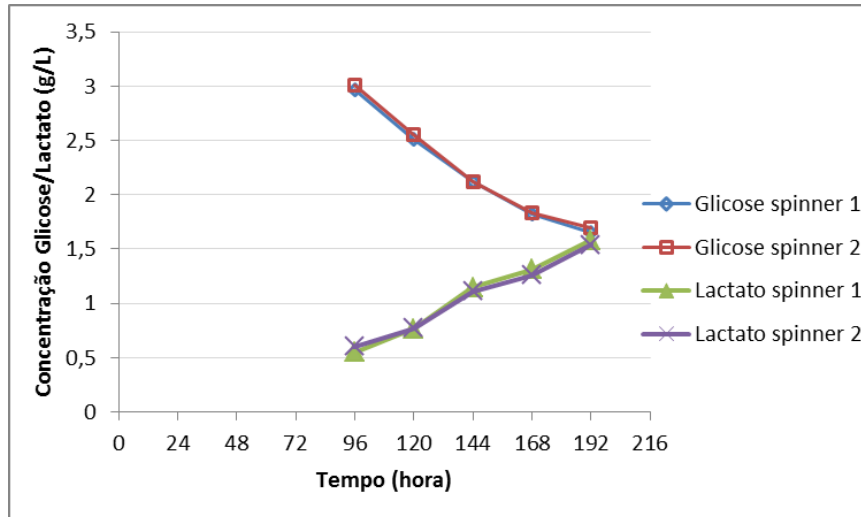


Figura 4.26: Determinação da concentração de glicose e lactato no meio de cultura referente ao experimento 1 do planejamento fatorial completo 2^2 . Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 60 minutos de agitação e 45 minutos de repouso e, posteriormente, seguido de agitação contínua.

O experimento 3, submetido a 45 minutos de agitação e 30 minutos de repouso, também não apresentou resultados positivos quanto à eficiência da transferência de células de um microcarregador para outro, tomando por base a avaliação do crescimento celular conforme indicado na figura 4.27. As concentrações de glicose e lactato no meio de cultivo (figura 4.28) não demonstraram ser a causa desse fenômeno.

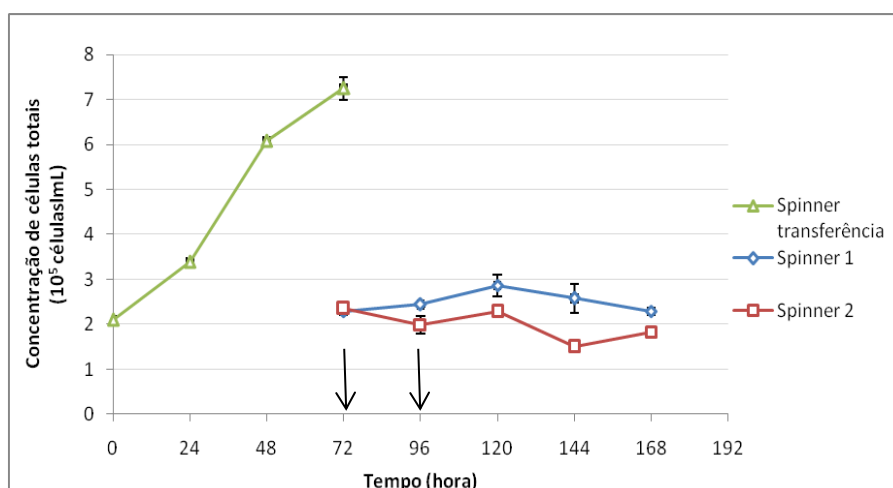


Figura 4.27: Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente ao experimento 3 do planejamento fatorial completo 2^2 empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (\downarrow) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (\downarrow) e final em 96 horas (\downarrow), em intervalos de 30 minutos de repouso e 45 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

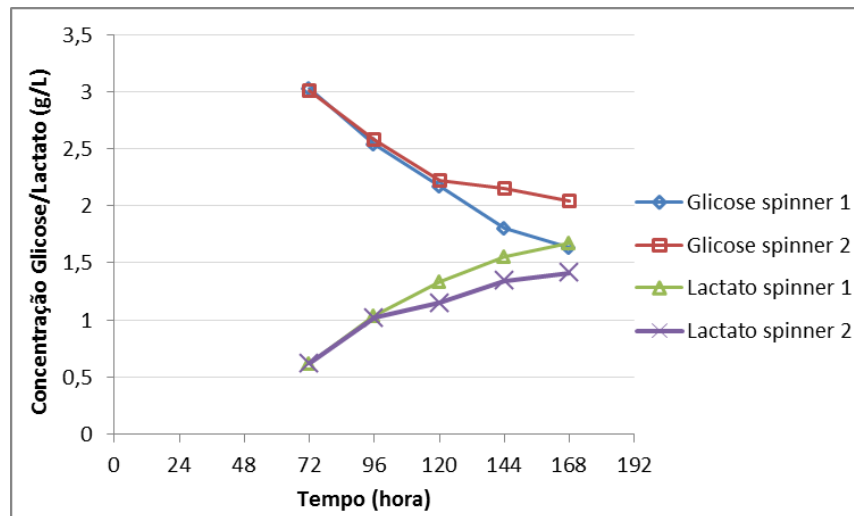


Figura 4.28: Determinação da concentração de glicose e lactato no meio de cultura referente ao experimento 3 do planejamento fatorial completo 2^2 . Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 45 minutos de agitação e 30 minutos de repouso e, posteriormente, seguido de agitação contínua.

O experimento 4, cujo resultado é mostrado nas figuras 4.29 e 4.30, também é inexpressivo em relação à concentração celular e as concentrações de glicose e lactato no meio de cultivo não foram fatores limitantes.

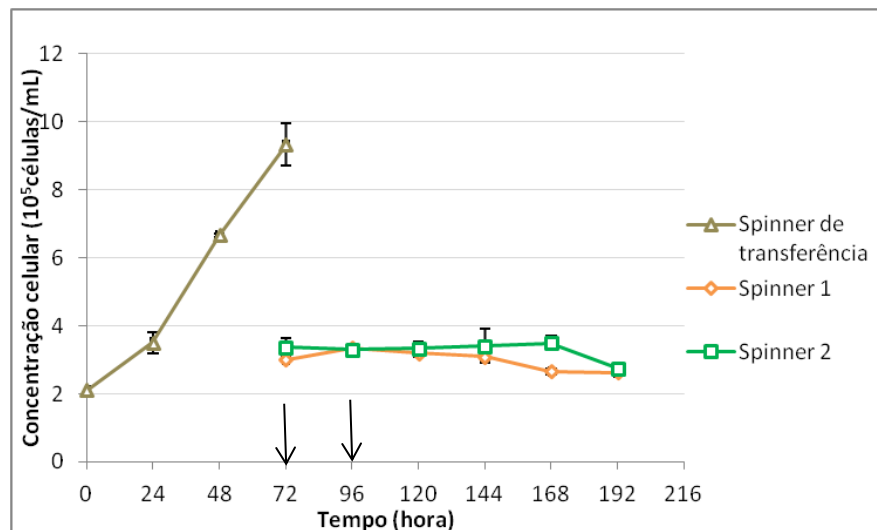


Figura 4.29: Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente ao experimento 4 do planejamento fatorial completo 2^2 empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (\downarrow) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (\downarrow) e final em 96 horas (\downarrow), em intervalos de 30 minutos de repouso e 15 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

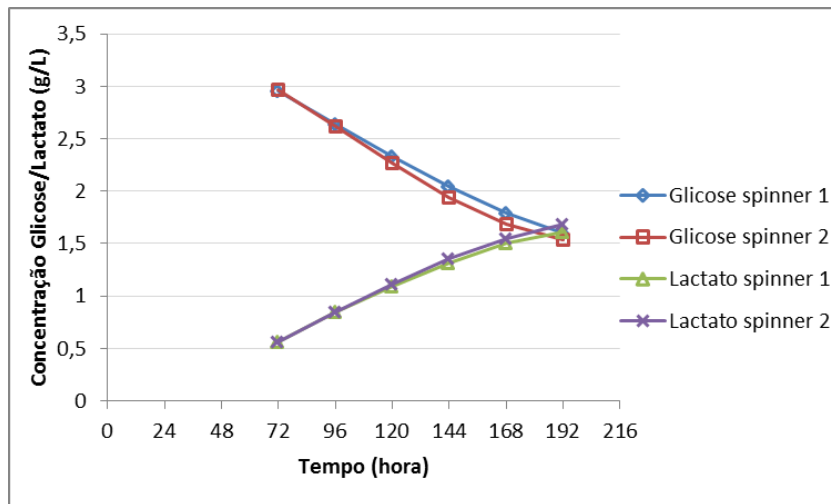


Figura 4.30: Determinação da concentração de glicose e lactato no meio de cultura referente ao experimento 4 do planejamento fatorial completo 2^2 . Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 15 minutos de agitação e 30 minutos de repouso e, posteriormente, seguido de agitação contínua.

Os experimentos 5, 6 e 7 são referentes ao ponto central, o crescimento celular é representado pela figura 4.31 e as respectivas concentrações de glicose e lactato no meio de cultivo ao longo do processo é representado pela figura 4.32. O ponto central representa os experimentos nos quais as variáveis estão em seus valores médios, os quais, neste trabalho, correspondem aos níveis testados previamente ao planejamento experimental. Além disso, devido ao elevado número de replicatas biológicas, evidencia repetibilidade do processo.

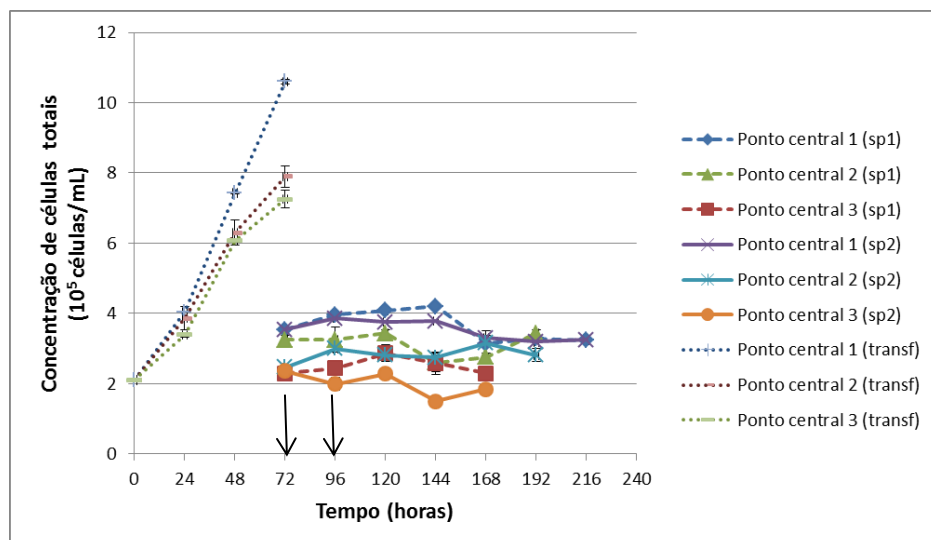


Figura 4.31: Determinação da concentração celular do processo de transferência bead-to-bead referente aos experimentos 5, 6 e 7 do planejamento fatorial completo 2^2 empregando agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (\downarrow) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (\downarrow) e final em 96 horas (\downarrow), em intervalos de 45 minutos de repouso e 30 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

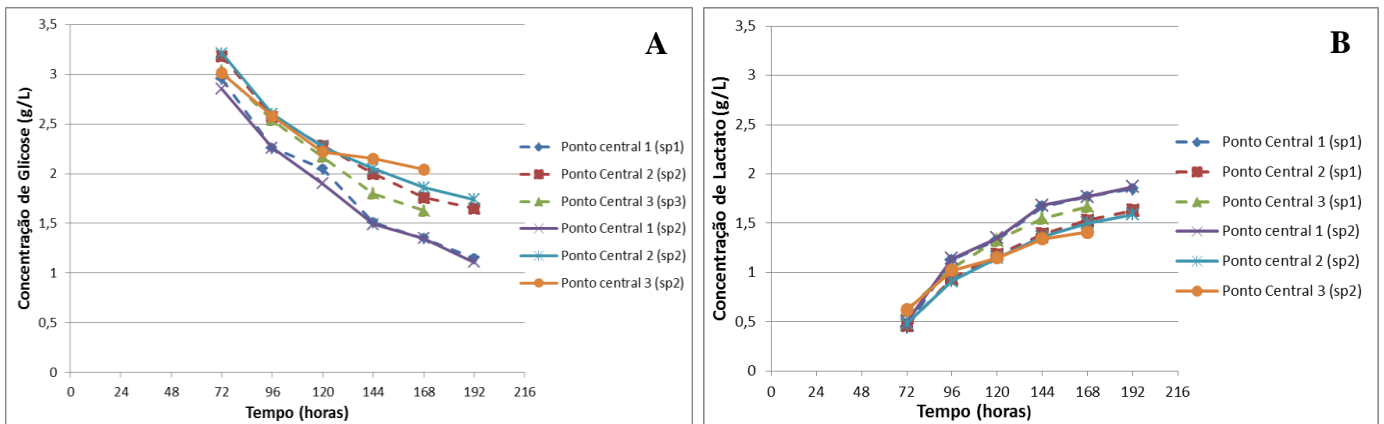


Figura 4.32: Determinação da concentração de glicose (A) e lactato (B) no meio de cultura referente aos experimentos 5, 6 e 7 do planejamento fatorial completo 2^2 . Glicose e lactato foram medidos diariamente durante o período de transferência em processo utilizando o modo de agitação intermitente por 24 horas, em intervalos de 30 minutos de agitação e 45 minutos de repouso e, posteriormente, seguido de agitação contínua.

Com exceção do experimento 2, todos os outros, conforme as observações realizadas ao microscópio, apresentaram pouca ou nenhuma formação de pontes de células, fato que pode justificar a não migração das mesmas para outros microcarregadores e, conseqüentemente, a ausência de crescimento celular. A não utilização das ferramentas estatísticas para análise desses resultados é justificada pelo fato dos valores de concentração celular nos experimentos, que seriam utilizadas como valores de resposta do planejamento, serem baixos e próximos, exceto por um ponto (experimento 2), inviabilizando tal análise.

Dessa forma, apesar da expectativa de que os pontos analisados proporcionassem melhores resultados, os valores de resposta obtidos no ponto 2, em termos de crescimento celular, sugerem que, dentre todas as condições experimentais testadas, esta seria a mais favorável para a transferência das células cultivadas em microcarregadores Cytodex 1.

Sendo assim, pode-se inferir que a proporção entre o tempo de repouso e agitação é importante para proporcionar tempo de contato suficiente entre as células, favorecendo a formação das pontes de células conforme já relatado por Wang e Ouyang (1999).

4.2.3. Transferência *bead-to-bead* empregando soro fetal bovino

Com o objetivo de investigar a influência do soro fetal bovino sobre a transferência *bead-to-bead*, foi feito um experimento suplementando o meio de cultivo com 5% (v/v) de SFB e adotando as mesmas condições do experimento 2 (60 minutos de agitação e 15 minutos de repouso), conforme mostrado na figura 4.22. Comparando os experimentos do ponto 2 com e sem SFB 5% (v/v), ambos apresentaram crescimento significativo, alcançando concentrações celulares na faixa $7,15 \times 10^5$ células/mL e $9,6 \times 10^5$ células/mL após a transferência celular, nos experimentos sem suplementação e com suplementação de SFB, respectivamente.

No entanto, apesar desta suplementação estar relacionada a uma melhor proliferação celular devido aos fatores mitogênicos presente no soro fetal bovino, o experimento utilizando esta estratégia alcançou um percentual de incremento da concentração na faixa de 95,5% em relação à sua concentração inicial, enquanto o experimento livre de SFB alcançou cerca de 200,4%, como mostrado na tabela 4.6.

Sugere-se que a utilização do SFB como suplemento ao meio VP-SFM não influencie significativamente a proliferação celular após a transferência, uma vez que o percentual de incremento da concentração atingido na sua ausência foi superior, apesar da concentração celular máxima alcançada, que pode ser explicada pela maior concentração celular inicial utilizada como inóculo.

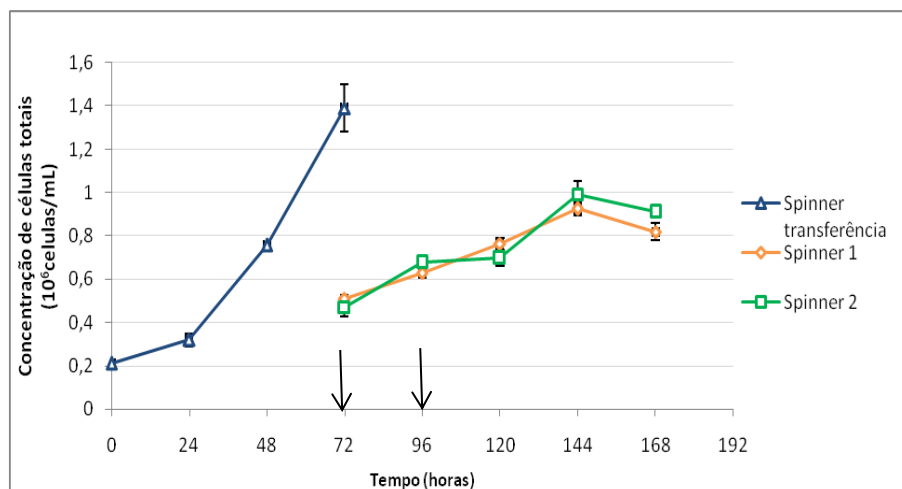


Figura 4.33: Determinação da concentração celular do processo de transferência *bead-to-bead* utilizando 5% (v/v) de SFB no meio de cultivo empregando o modo de agitação intermitente por 24 horas. Em 72 horas (↓) foi realizada a transferência celular, com o início da agitação intermitente em 72 horas (↓) e final em 96 horas (↓), em intervalos de 60 minutos de repouso e 15 minutos de agitação. Após este período, o cultivo foi mantido sob agitação contínua. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

4.2.4. Tripsinização celular em microcarregadores

Uma vez que os resultados obtidos no planejamento experimental não se mostraram tão eficientes, investigou-se uma nova estratégia que parte do princípio do desprendimento das células dos microcarregadores para que estas possam aderir novamente tanto aos novos microcarregadores quanto aos antigos provenientes do inóculo anterior. Para isso, foi utilizada a metodologia de tripsinização das células aderidas aos microcarregadores, utilizando tripsina.

Diferentes volumes de solução tripsina/verseno foram testados para se determinar o volume que proporcionasse um processo de tripsinização eficaz. A princípio, como o objetivo foi apenas determinar o volume ideal de solução tripsina/verseno a ser utilizado, a inativação dessa tripsina foi feita com meio VP-SFM suplementado com 5% (v/v) de SFB. Mendonça e colaboradores (1999) mostraram, em trabalhos utilizando o soro fetal de bezerro (FCS), que a habilidade das células Vero de se espalhar sobre a superfície dos microcarregadores é totalmente dependente da presença deste insumo e que a taxa de espalhamento diminui progressivamente com a adição retardada do mesmo ao meio de cultura. Quando as células Vero em suspensão cultivadas em meio de cultura suplementado com FCS 5% (v/v) entraram em contato com microcarregadores (também previamente incubados com meio de cultivo suplementado), o espalhamento celular se iniciou após uma hora do contato inicial e atingiu 87% das células após 8 horas de cultivo. Em culturas sem FCS, o espalhamento celular começou somente após 2 horas, atingindo cerca de 82% das células em 8 horas (Mendonça et al. 1999). Dessa forma, além de inativar a tripsina (GE Healthcare, 2005), o soro parece ser importante no espalhamento das células na superfície dos microcarregadores (Mendonça et al. 1999) e também na adesão celular devido a presença de proteínas tais como a fibronectina (Luo et al. 2008), reforçando os motivos para a utilização de soro fetal bovino nessa etapa.

Partindo do spinner de transferência contendo células Vero aderidas a microcarregadores Cytodex 1 em meio sem SFB por 3 dias (quando as mesmas alcançaram o final da fase exponencial), foram realizadas três lavagens prévias com uma solução de verseno, visto que tal procedimento poderia otimizar o processo de tripsinização, e em seguida, foi realizada tripsinização utilizando um volume de 50mL de tripsina/verseno. O sistema foi submetido a uma agitação contínua de 80rpm por 3 minutos durante este procedimento. Apesar de ter sido eficiente em desprender

as células dos microcarregadores, a figura 4.34 mostra que, após 24 horas de cultivo, não houve adesão celular, resultado que foi confirmado na figura 4.35, mostrando que não houve crescimento celular após a transferência.

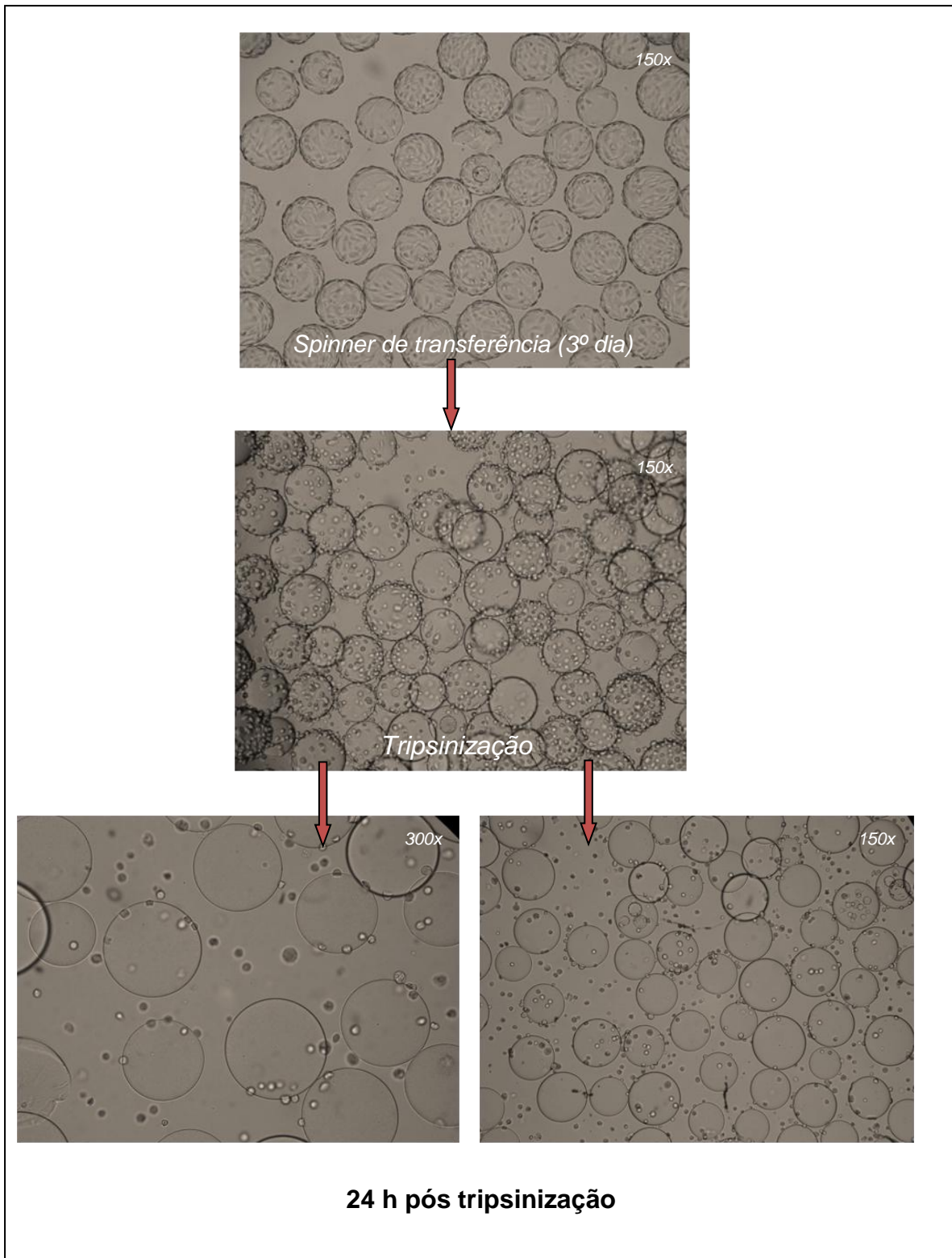


Figura 4.34: Microscopia do cultivo de células Vero em microcarregadores em frascos tipo spinner. Processo de tripsinização ocorreu com 72 horas de cultivo utilizando 50mL de solução tripsina/verseno e 3 lavagens prévias com verseno.

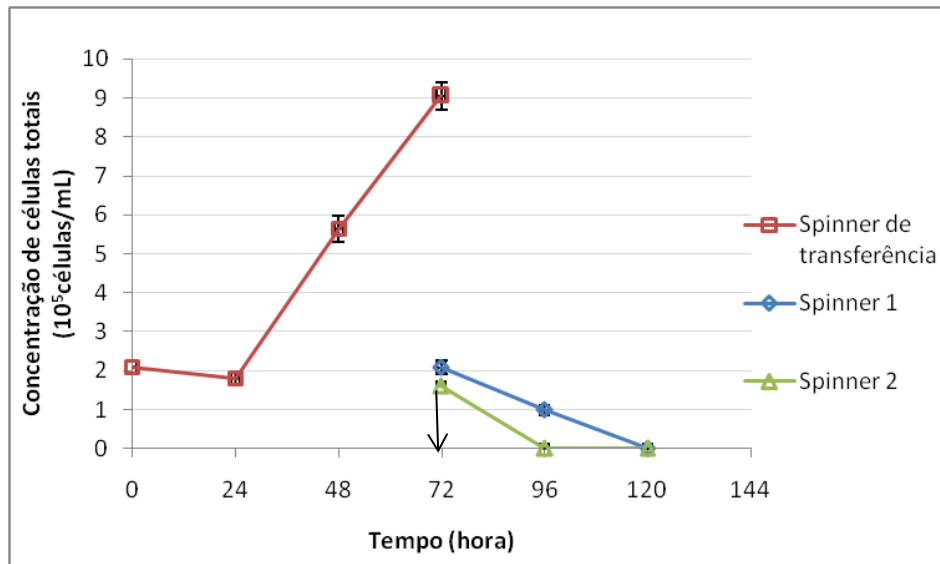


Figura 4.35: Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 50mL de solução tripsina/verseno com 3 lavagens prévias com verseno. A seta indica o momento da tripsinização. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

Duas hipóteses ajudam a explicar este resultado. A primeira seria a concentração de soro fetal bovino no meio ser insuficiente para inativar a elevada concentração de tripsina utilizada, causando a morte celular. Mendonça e colaboradores (1999) mostraram que as células Vero submetidas ao processo de tripsinização em microcarregadores demonstraram viabilidade baixa e pouca capacidade de aderir novamente aos microcarregadores. A segunda hipótese estaria amparada na incapacidade das células de aderir aos microcarregadores devido à diminuição de íons cálcio no meio, consequência das lavagens com quelante, afetando a sua capacidade de adesão e, conseqüentemente, impossibilitando o seu crescimento. Considerando essas duas hipóteses, foi feita apenas 1 lavagem com verseno e o volume da solução tripsina/verseno foi reduzido para 25mL. Após a tripsinização, que se deu por 10 minutos a 80rpm, o sistema foi submetido a uma agitação intermitente por 24 horas com um volume de trabalho de 100mL, sendo 5 minutos de agitação e 1 hora de repouso. Após esse período, foram retirados 50mL do meio de cultivo VP-SFM antigo e adicionado 100mL de meio VP-SFM sem SFB.

A figura 4.36 mostra que as células aderiram aos microcarregadores, porém, com o decorrer do cultivo, se desprenderam totalmente dos mesmos chegando a níveis de concentração celulares mínimos (figura 4.37)

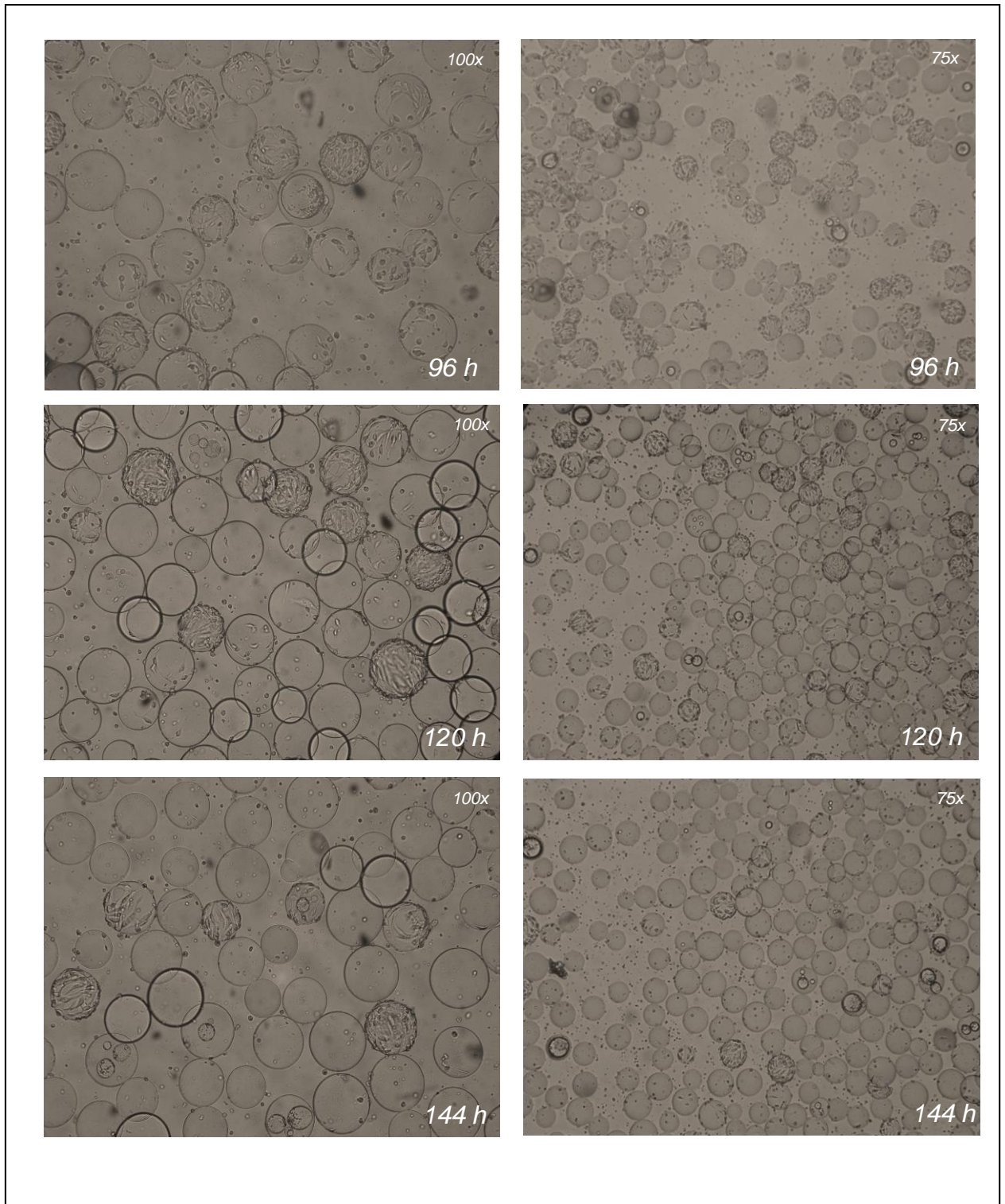


Figura 4.36: Microscopia do cultivo de células Vero em microcarregadores em frascos tipo spinner após término do processo de intermitência. Tripsinização ocorreu em 72 horas de cultivo sendo feita uma lavagem prévia com verseno e utilizando um volume de 25mL de solução tripsina/verseno, sendo então submetido a agitação intermitente por 24 horas.

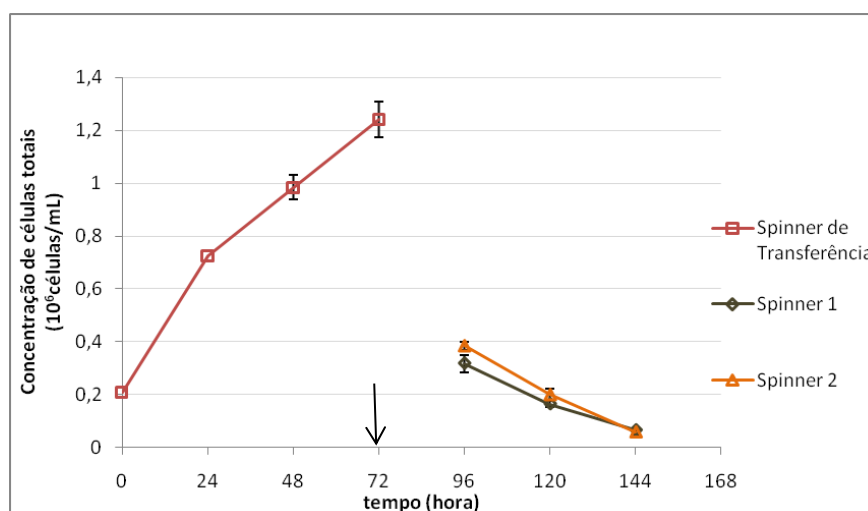


Figura 4.37: Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores sendo realizada uma lavagem prévia com verseno e utilizando um volume de 25mL de solução tripsina/verseno. A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

Supondo a necessidade de ajuste da concentração de tripsina empregada para as condições experimentais propostas, mais uma vez o volume da solução tripsina/verseno foi reduzido, sendo adotado um volume de 13mL. Porém, mais uma vez os resultados se repetiram, sendo possível observar que houve adesão (figura 4.38), mas as células não permaneceram aderidas aos microcarregadores ao longo do cultivo nem se multiplicaram (figura 4.39). Também é possível observar que há uma distribuição heterogênea de microcarregadores, distinguindo-se microcarregadores amplamente colonizados e outros praticamente livres de células aderidas. Hu e colaboradores (1985) através de experimentos observaram que células FS-4 em meio de cultivo DME (Dulbecco's Modified Eagle's) suplementado a 10% (v/v) com soro de cavalo (HS – horse serum) crescem melhor nos novos microcarregadores (microcarregadores Sephadex modificados com grupo DEAE) do que nos reutilizados, resultando em uma população desigual de microcarregadores. Segundo estes autores, esse fenômeno poderia ser explicado por 2 mecanismos, sendo o primeiro a adesão preferencial das células aos novos microcarregadores e o segundo a diminuição da capacidade de crescimento das células em microcarregadores que serviram anteriormente de substrato para outras células. Eles concluíram que a taxa de adesão celular aos novos microcarregadores era significativamente mais rápida do que nos antigos. Também é importante ressaltar que este fato pode afetar o crescimento celular subsequente, já que é necessário um número apropriado de células por microcarregador para que ocorra um crescimento

normal sem afetar o comportamento cinético da cultura, especialmente durante a fase exponencial de crescimento.

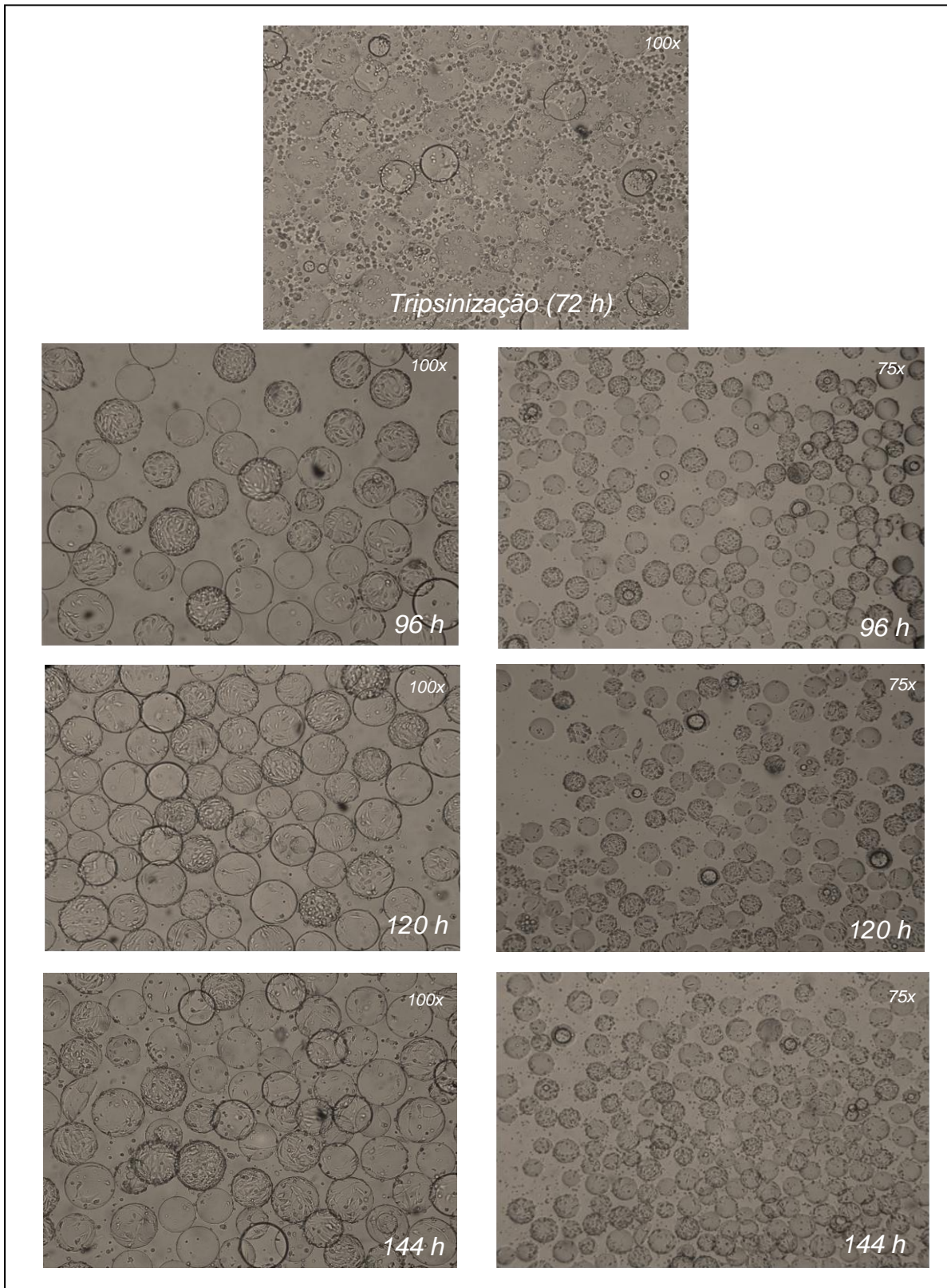


Figura 4.38: Microscopia do cultivo de células Vero em microcarregadores em frascos tipo spinner. Processo de tripsinização ocorreu em 72 horas de cultivo utilizando 13mL de solução tripsina/verseno e uma lavagem prévia com verseno, sendo então submetido à agitação intermitente por 24 horas.

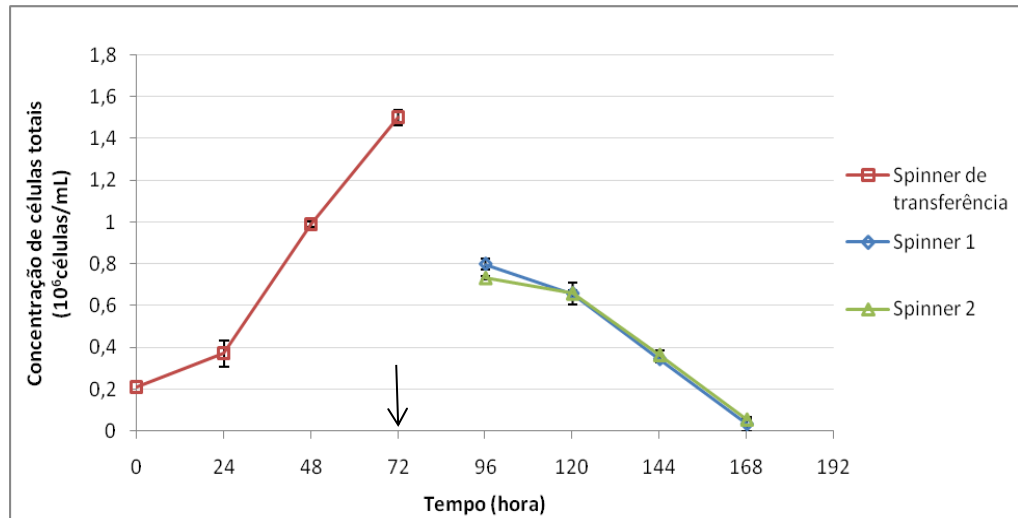


Figura 4.39: Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 13mL de solução tripsina/verseno com uma lavagem prévia com verseno. A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

Visando a utilização de uma concentração mínima de tripsina, mas que ainda fosse eficiente no processo de desprendimento das células, novamente o volume da solução tripsina/verseno foi reduzido para 6,5mL. No entanto, uma mudança foi introduzida na metodologia. Após a transferência, no spinner 1 foram mantidas as mesmas condições dos experimentos anteriores, onde, após as 24 horas de agitação intermitente foram retirados 50mL do meio de cultivo antigo e adicionados 100mL de meio VP-SFM sem SFB. No entanto, ao spinner 2, após esse período foram adicionados 100mL de meio VP-SFM suplementado com 5% (v/v) de SFB. Apesar da tripsinização não ter sido tão eficaz, resultando em um grande número de células ainda aderidas aos microcarregadores, quando comparado com os volumes testados anteriormente onde quase a totalidade das células se desprenderam, o spinner 2 manteve sua concentração celular estável ao longo do cultivo diferentemente do spinner 1 (figura 4.40).

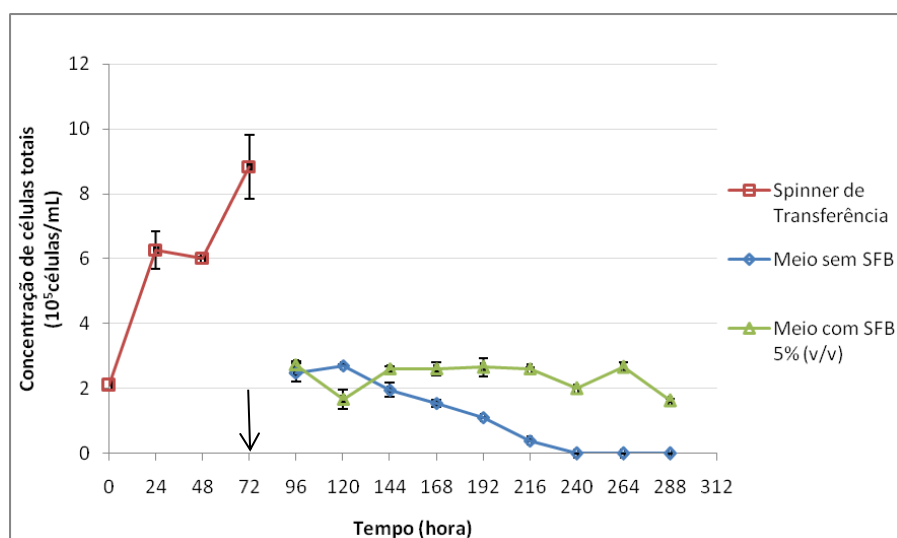


Figura 4.40: Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 6,5mL de solução tripsina/verseno com uma lavagem prévia com verseno. A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

4.2.4.1. Tripsinização celular em pH alcalino

Tendo por base a informação de que o pH ótimo de atuação da tripsina se encontra entre 7 e 9 (Sipos e Merkel, 1970), optou-se pelo ajuste do pH do meio de cultivo antes da adição da tripsina, já que o mesmo se encontrava bastante ácido devido à formação do metabólito lactato. Essa medida teve por objetivo otimizar o processo de tripsinização. Outro fato importante que deve ser considerado ao realizar o procedimento de tripsinização é a característica da superfície do microcarregador. Sabe-se que a presença de grupos DEAE na superfície do microcarregador desempenham um papel importante, tornando mais difícil e/ou impedindo que as células adquiram uma conformação mais arredondada e se soltem com facilidade do microcarregador (Hu et al. 1985). Se a densidade de carga impede a dissociação celular dos microcarregadores, então reduzi-la durante a tripsinização poderia facilitar o processo de desprendimento das células dos microcarregadores. A afinidade entre DEAE e moléculas carregadas que se ligam aos microcarregadores pode ser alterada variando o pH (Hu et al. 1985). Estes autores observaram que, na tripsinização de células FS-4 com pH elevado, a morfologia celular era modificada, mudando da forma alongada para uma forma arredondada e retraída, havendo uma melhora progressiva no processo de desprendimento das células e mantendo a sua capacidade de adesão aos microcarregadores (Hu et al.

1985). Este mesmo procedimento foi testado em células Vero em pH 9 e também foi observado um aumento da eficiência no processo de tripsinização sem aumento da fase Lag ou diminuição da taxa de crescimento. Mendonça e colaboradores (1999) também mostraram que melhores resultados de desprendimento celular da superfície dos microcarregadores, viabilidade e readesão foram obtidos com tripsinização em pH 8 em vez de pH 7.

Sendo assim, o pH do meio de cultivo do spinner de transferência foi ajustado de forma a permanecer dentro da faixa de 8 a 9 através da adição de NaOH e, em seguida, removeu-se 63mL de meio e adicionou-se 13mL de solução tripsina/verseno totalizando um volume final de 100mL. A tripsinização se deu por 10 minutos a 80rpm e, em seguida, o conteúdo deste spinner de transferência foi distribuído igualmente entre os spinners 1 e 2, ou seja, um volume de 50mL para cada spinner. Ambos os spinners continham previamente 50mL de meio de cultivo suplementado com 5% (v/v) de SFB e microcarregadores na concentração de 3g/L, totalizando um volume final de 100mL. O sistema foi mantido sob agitação intermitente (5 minutos de agitação e 1 hora de repouso) por 24 horas e, após esse período, foi removido 50mL e adicionado 100mL de meio suplementado com 5% de SFB. Conforme observado na figura 4.41, houve crescimento celular significativo chegando a concentrações celulares similares ao spinner de transferência ao final de sua fase exponencial (apenas no spinner 2, já que o spinner 1 foi descartado devido a problemas técnicos).

Um segundo experimento foi realizado adotando-se as mesmas condições do anterior (com 5% de SFB), no entanto, a tripsinização foi feita com um volume reduzido, ou seja, foram removidos 100mL do meio de cultivo, foi feita a alcalinização com NaOH do conteúdo restante no spinner e, em seguida, foram adicionados 13mL da solução tripsina/verseno, totalizando um volume final de 63mL em vez de 100mL. Essa alteração teve o objetivo de remover o máximo possível de meio condicionado de forma a minimizar a interferência das proteínas que se encontram presentes nesse meio e, assim, otimizar ainda mais o processo de tripsinização. Conforme a figura 4.42, houve crescimento celular significativo atingindo concentrações máximas de 9.05×10^5 células/cm² em 192 horas de cultivo.

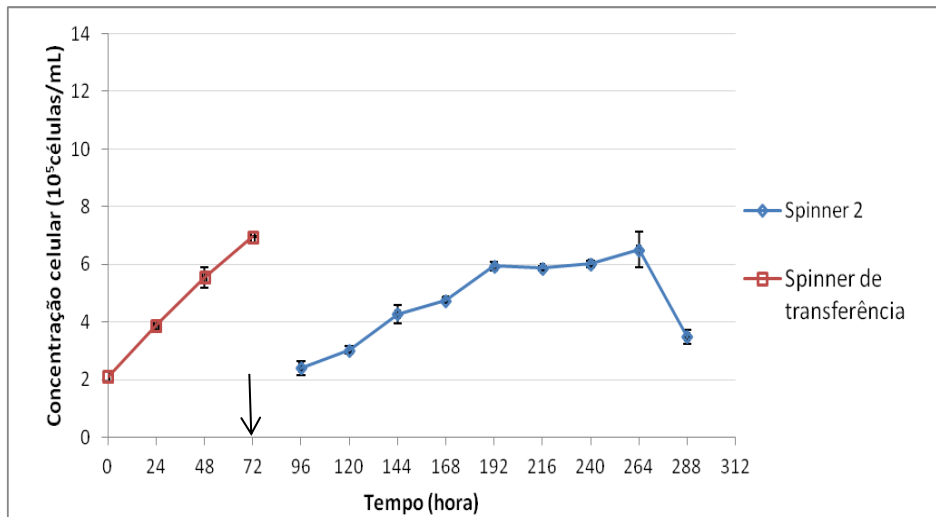


Figura 4.41: Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 13mL de solução tripsina/verseno e alcalinização prévia do meio de cultivo. A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

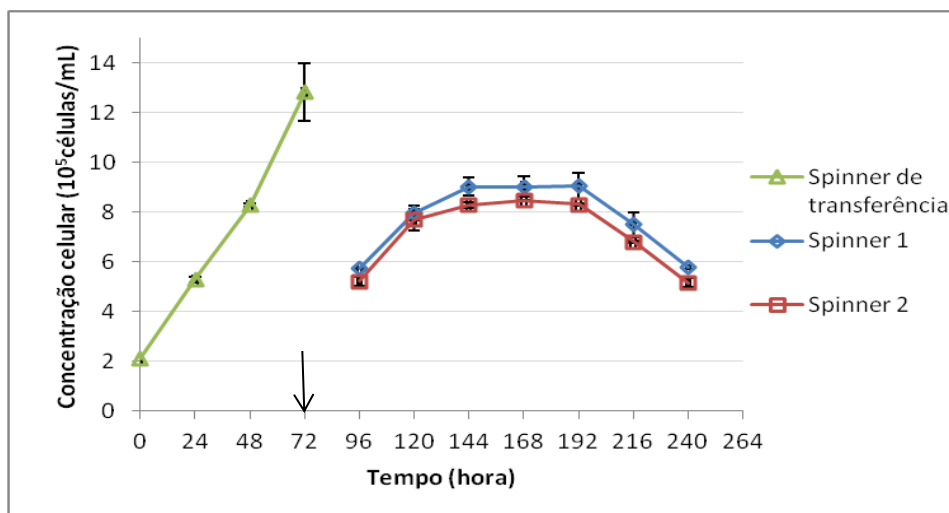


Figura 4.42: Determinação da concentração celular em processo de tripsinização de células em microcarregadores utilizando 13mL de solução tripsina/verseno e alcalinização prévia do meio de cultivo em volume reduzido (63mL). A seta indica o momento da tripsinização e o início do processo de intermitência com duração de 24 horas. Os resultados representam a média de 2 replicatas técnicas e seu desvio padrão.

Dessa forma, os resultados que se mostraram mais promissores foram aqueles em que houve a alcalinização do meio de cultivo antes da etapa de tripsinização, que além de promover um bom desprendimento das células da superfície dos microcarregadores não interferiu nas propriedades de adesão e espalhamento das mesmas e, conseqüentemente, no seu crescimento, permitindo que essas células possam ser utilizadas como inóculo em outro sistema posteriormente.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

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

- 1. Diferentes concentrações iniciais de células Vero, 30.000 células/cm² e 60.000 células/cm², foram empregadas como inóculo de cultivos em frascos estacionárias e de acordo com os resultados observados, foi possível concluir que a menor concentração de inóculo é a mais aconselhada para a rotina de manutenção celular.*
- 2. Devido a impossibilidade do uso do inibidor de tripsina, outra alternativa foi testada para inativar o efeito da tripsina: o meio condicionado. Este se mostrou viável no trabalho com microcarregadores e demonstrou resultados equivalentes ao meio suplementado com soro fetal bovino ao se adotar 2 lavagens da suspensão celular.*
- 3. Nos ensaios de transferência bead-to-bead somente na condição 2 do planejamento experimental (60 minutos de repouso/15 minutos de agitação) ocorreu a transferência de células entre microcarregadores e subsequente proliferação.*
- 4. Empregando a metodologia de transferência através da tripsinização observou-se que a manutenção de um pH ideal para a atividade da enzima é crítico para o processo.*

Com base nos resultados e conclusões obtidos no presente trabalhos, são feitas as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- ✓ De forma a complementar os experimentos de tripsinização sugere-se avaliar a utilização de tripsina recombinante e sua inativação com inibidor de tripsina,*

devido aos bons resultados reportados na literatura e à vantagem da não utilização de componentes de origem animal no processo.

- ✓ *No caso da transferência bead-to-bead, estudar outras variáveis, como, por exemplo, a alteração da proporção na concentração de microcarregadores vazios inseridos no cultivo.*

- ✓ *Aplicar a melhor condição de transferência encontrada neste trabalho e associá-la aos novos estudos propostos para uma aplicação futura em experimentos de ampliação de escala em biorreatores para produção de antígenos virais, como, por exemplo, o da Febre Amarela.*

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Rubeai M, Emery AN, Chalder S, Goldman MH. **A flow cytometric study of hydrodynamic damage to mammalian cells.** *Journal of Biotechnology.* 1993;31(2):161-77.

Allikmets E, Nichols HA, Plummer JD, inventors; Wyeth Incorporated assignee. **Serum-free Vero cell banking process.** *US patent 20090246868 A1.* 2009 Oct 1.

Barrett AD. **Yellow fever vaccines.** *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization.* 1997;25(1):17-25.

Barrett AD, Monath TP. **Epidemiology and ecology of yellow fever virus.** *Advances in Virus Research.* 2003;61:291-315.

Barrett AD, Teuwen DE. **Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place?** *Current Opinion in Immunology.* 2009;21(3):308-13.

Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. **Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines.** *Expert Review of Vaccines.* 2009;8(5):607-18.

Berry JM, Barnabe N, Coombs KM, Butler M. **Production of reovirus type-1 and type-3 from Vero cells grown on solid and macroporous microcarriers.** *Biotechnology and Bioengineering.* 1999;62(1):12-9.

Birch JR, Racher AJ. **Antibody production.** *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2006;58(5-6):671-85.

Blüml G. **Microcarrier Cell Culture Technology.** In: Pörtner R (ed). **Animal Cell Biotechnology Methods and Protocols vol. 24.** Editora Humana Press 2nd edition, 2007.

Bugarski B, King GA, Jovanovic G, Daugulis AJ, Goosen MFA. **Performance of an external loop air-lift bioreactor for the production of monoclonal-antibodies by**

immobilized hybridomas cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989; 30(3): 264-9.

Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2005;68(3):283-91.

Butler M, Burgener A, Patrick M, Berry M, Moffatt D, Huzel N, et al. Application of a serum-free medium for the growth of Vero cells and the production of reovirus. *Biotechnology Progress*. 2000;16(5):854-8.

Cacciuttolo MA, Shane E, Oliver C, Tsao E e Kimura R. Scale-up Considerations for Biotcnology-Derived Products. In: Levin M (ed), **Pharmaceutical Process Scale-up.** Editora Marcel Dekker, New York; 2001.

Callaway E. Vaccine switch urged for polio endgame. *Nature*. 2013;493:285.

Chan CY, Tambyah PA. Preflucel®: a Vero-cell culture-derived trivalent influenza vaccine. *Expert Review of Vaccines*. 2012;11(7):759-73.

Cherry RS, Papoutsakis ET. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 1988;32(8):1001-14.

Chico E, Rodríguez G, Figueiredo A. Biorreatores para Células Animais. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. (eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica.** Editora Roca, São Paulo; 2008.

Choi Y, Ahn CJ, Seong KM, Jung MY, Ahn BY. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. *Vaccine*. 2003;21(17-18):1867-73.

Chu L, Robinson DK. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001;12(2):180-7.

Cong C, Chang Y, Deng J, Xiao C, Su Z. A novel scale-up method mammalian cell culture in packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*. 2001;23(11):881-5.

Corning® Synthemax® II Microcarriers. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: [http://catalog2.corning.com/Lifesciences/en-US/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=3781\(Lifesciences\)&categoryname=CeII+Culture+and+Bioprocess\(Lifesciences\)%7cMicrocarriers\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/Lifesciences/en-US/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=3781(Lifesciences)&categoryname=CeII+Culture+and+Bioprocess(Lifesciences)%7cMicrocarriers(Lifesciences))

Daelli MG, Forno AG, Kratje R, Etcheverrigaray M, Paillet C, inventors; Zelltek S.A. assignee. Vero cell line which is adapted to grow in suspension. *US patent*

2009/0203112A1.2009Aug13.

Dellepiane N, Griffiths E, Milstien JB. **New challenges in assuring vaccine quality.** *Bulletin of the World Health Organization.* 2000;78(2):155-62.

Doyle A, Griffiths J. **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.** England: John Wiley & Sons; 1998.

Durr Schmid M, Landauer K, Simic G, Bluml G, Doblhoff-Dier O. **Scalable inoculation strategies for microcarrier-based animal cell bioprocesses.** *Biotechnology and bioengineering.* 2003;83(6):681-6.

Falkenberg FW, Weichert H, Krane M, Bartels I, Palme M, Nagels HO, et al. **In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular minifermenter.** *Journal of Immunological Methods.* 1995;179(1):13-29.

Fassnacht D, Pörtner R. **Experimental and theoretical considerations on oxygen supply for animal cell growth in fixed-bed reactors.** *Journal of Biotechnology.* 1999;72(3):169-84.

Franco O. **[History of the Yellow fever in Brazil].** *Revista brasileira de malariologia e doencas tropicais. Publicacoes avulsas.* 1969;21(2):315-512.

Frazzati-Gallina NM, Paoli RL, Mourao-Fuches RM, Jorge SA, Pereira CA. **Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers.** *Journal of Biotechnology.* 2001;92(1):67-72.

Frazzati-Gallina NM, Mourao-Fuches RM, Paoli RL, Silva ML, Miyaki C, Valentini EJ, et al. **Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium.** *Vaccine.* 2004;23(4):511-7.

Freshney RI. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques.** 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc; 2000.

Gardner CL, Ryman KD. **Yellow fever: a reemerging threat.** *Clinics in Laboratory Medicine.* 2010;30(1):237-60.

Genzel Y, Fischer M, Reichl U. **Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture.** *Vaccine.* 2006;24:3261-72.

Greiner Cellstar® Tissue Culture Flasks with plug or filter cap closures. [acesso em 12/03/2012]. Disponível em: http://scientiis.com/laboratorium/catalog/popup_image.php?plD=5341

GE Healthcare / Amersham. **Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods.** In: *Technical Literature Series.* 2005.

GE Healthcare Application note: **Propagation of influenza virus in Vero cells using Cytodex microcarriers in WAVE Bioreactor systems.** 28-9992-69, Edition AA, 2011.

GE Healthcare Life Sciences [online]. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/wave_bioreactor_home~wave_bioreactor~system_500_1000

GE Healthcare Life Sciences [online]. Cytoline™ 1 microcarrier. Instructions 18-1060-62 Edition AE. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1345544158899/litdoc18106062_20120821122950.pdf

GE Healthcare Life Sciences [online]. Cytopore™ – macroporous microcarriers. Data file 18-1132-68 AE. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424814/litdoc18113268_20111214164017.pdf

GE Healthcare Life Sciences [online]. Cytodex 1, Cytodex 3. Instructions 18-1119-79 AD. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18111979_20111214164006.pdf

Griffiths JB. **Perfusion systems for cell cultivation.** In: Lubiniecki AS. **Large-scale mammalian cell culture technology.** New York: Dekker; 1990. p 217.

Ham RG. **Dermal fibroblasts.** In: Harris CC. **Methods in Cell Biology.** New York: Academic Press; 1980. Vol 21A: p 255–76.

Handa A, Emery AN, Spier RE. **On the evaluation of gas-liquid interfacial effects on hybridoma viability in bubble column bioreactors.** *Developments in Biological Standardization.* 1987;66:241-53.

Handa-Corrigan A, Emery AN, Spier RE. Effect of gas liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells: mechanisms of cell damage by bubbles. Enzyme and Microbial Technology 1989; 11(4): 230-235.

Hicks DJ, Fooks AR e Johnson N. Developments in rabies vaccines. Clinical and Experimental Immunology. 2012;169(3):199-204.

Himes, VB, Hu, WS. Attachment and growth of mammalian cells on microcarriers with different ion exchange capacities. Biotechnology and Bioengineering. 1987; 29(9): 1155-63.

Hu YC, Kaufman J, Cho MW, Golding H, Shiloach J. Production of HIV-1 gp120 in packed-bed bioreactor using the vaccinia virus/T7 expression system. Biotechnology Progress. 2000;16(5):744-50.

Hu WS, Giard DJ, Wang DI. Serial propagation of mammalian cells on microcarriers. Biotechnology and Bioengineering. 1985;27(10):1466-76.

Jang YH e Seong BL. Principles underlying rational design of live attenuated influenza vaccines. Clinical Experimental Vaccine Research. 2012;1 (1):35-49.

Jayme DW, Price PJ, Plavsic MZ, Epstein DA. Low serum and serum-free cultivation of mammalian cells used for virus production applications. In: Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F (eds), Animal cell Technology: Products from cells, cell as products. Editora Kluwer Academic Publishers, New York; 1999.

Jordan M, Eppenberger HM, Sucker H, Widmer F, Einsele A. Interactions between animal cells and gas bubbles: The influence of serum and pluronic F68 on the physical properties of the bubble surface. Biotechnology and Bioengineering. 1994;43(6):446-54.

Josefsberg JO, Buckland B. Vaccine process technology. Biotechnology and Bioengineering. 2012;109(6):1443-60.

Kallel H, Jouini A, Majoul S, Rourou S. Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. Journal of Biotechnology. 2002; 95(3):195-204.

Kadouri A. Cultivation of anchorage-dependent mammalian cells and production of various metabolites. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 1994; 2:265-72.

Kilburn DG, Webb FC. The cultivation of animal cells at controlled dissolved oxygen partial pressure. Reprinted from Biotechnology and Bioengineering Vol. X,

Issue 6, Pages 801-814 (1968). *Biotechnology and Bioengineering*. 2000;67(6):657-70.

Kistner O, Barret PNO, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S et al. **Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine.** *Vaccine*. 1998;16(9-10):960-68.

Kong D, Gentz R, Zhang J. **Long-term stable production of monocyte-colony inhibition factor (M-CIF) from CHO microcarrier perfusion cultures.** *Cytotechnology*. 1998;26(2):131-8.

Kwong CW, Hsieh JH, Syu MJ, Chou SS. **Anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibody IgM production in suspension and immobilized cell bioreactors.** *Biotechnology Letters*. 1989;11(6):377-82.

Kuchler RJ. **Biochemical methods in cell culture and virology.** Stroudsburg: Dowden, Hutchinson & Ross; 1977.

Kumar S, Wittmann C, Heinzle E. **Minibioreactors.** *Biotechnology Letters*. 2004;26(1):1–10.

Kwong CW, Hsieh JH, Syu MJ, Chou SS. **Anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibody IgM production in suspension and immobilized cell bioreactors.** *Biotechnology Letters*. 1989; 11(6): 377-82.

Langfield KK, Walker HJ, Gregory LC, Federspiel MJ. **Manufacture of measles viruses.** *Methods in Molecular Biology*. 2011;737:345-66.

Lubiniecki AS. **Historical reflections on cell culture engineering.** *Cytotechnology*. 1998;28(1-3):139-45.

Lubiniecki AS. **Large-scale mammalian cell culture technology.** New York: Dekker; 1990.

Lundgren B, Blüml G. **Microcarriers in cell culture production.** In: Subramanian G. *Bioseparation and Bioprocessing, v.II, chapter 7*, New York: John Wiley and Sons; 1998.

Luo F, Sun H, Geng T, Qi N. **Application of Taguchi's method in the optimization of bridging efficiency between confluent and fresh microcarriers in bead-to-bead transfer of Vero cells.** *Biotechnology Letters*. 2008;30(4):645-9.

Mantel N, Girerd Y, Geny C, Bernard I, Pontvianne J, Lang J, et al. **Genetic stability of a dengue vaccine based on chimeric yellow fever/dengue viruses.** *Vaccine*. 2011;29(38):6629-35.

Marianneau P, Georges-Courbot M, Deubel V. **Rarity of adverse effects after 17D yellow-fever vaccination.** *Lancet*. 2001;358(9276):84-5.

Meignier B. **Cell culture on beads used for the industrial production of foot-and-mouth disease virus.** *Developments in Biological Standardization*. 1979;42:141–5.

Mendonça RZ, Ioshimoto LM, Mendonça RM, De-Franco M, Valentini EJ, Becak W, et al. **Preparation of human rabies vaccine in Vero cell culture using a microcarrier system.** *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1993;26(12):1305-17.

Mendonça RZ, Pereira CA. **High density Vero cell culture on microcarriers in a cell bioreactor.** *Bioprocess Engineering*. 1995; 12: 279-282.

Mendonça RZ, Prado JCM, Pereira CA. **Attachment, spreading and growth of Vero cells on microcarriers for the optimization of large scale cultures.** *Bioprocess Engineering*. 1999; 20:565- 71.

Michaels JD, Nowak JE, Mallik AK, Koczo K, Wasan DT, Papoutsakis ET. **Analysis of cell-to-bubble attachment in sparged bioreactors in the presence of cell-protecting additives.** *Biotechnology and Bioengineering*. 1995;47(4):407-19.

Montagnon BJ. **Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line.** *Developments in Biological Standardization*. 1989;70:27-47.

New Brunswick Fibra-Cel® Microcarrier Disks. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: <http://newbrunswick.eppendorf.com/en/products/bioreactors/fibra-cel/>

Nikolai TJ, Hu WS. **Cultivation of mammalian cells on macroporous microcarriers.** *Enzyme and Microbial Technology*. 1992;14(3):203-8.

Oh SK, Nienow AW, al-Rubeai M, Emery AN. **Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging.** *Journal of Biotechnology*. 1992;22(3):245-70.

Ohlson S, Branscomb J, Nilsson K. **Bead-to-bead transfer of Chinese hamster ovary cells using macroporous microcarriers.** *Cytotechnology*. 1994;14(1):67-80.

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

Ozturk SS, Thrift JC, Blackie JD, Naveh D. **Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor.** *Biotechnology and Bioengineering.* 1997;53(4):372-8.

Passini CA, Goochee CF. **Response of a mouse hybridoma cell line to heat shock, agitation, and sparging.** *Biotechnology Progress.* 1989; 5(4):175-188.

Petiot E, Guedon E, Blanchard F, Gény C, Pinton H, Marc A. **Kinetic Characterization of Vero Cell Metabolism in a Serum-Free Batch Culture Process.** *Biotechnology and Bioengineering.* 2010;107(1):143-53.

Plosker GL. **A/H5N1 prepandemic influenza vaccine (whole virion, vero cell-derived, inactivated) [Vepacel®].** *Drugs.* 2012; 72 (11): 1543-1557.

Pugachev KV, Guirakhoo F, Monath TP. **New developments in flavivirus vaccines with special attention to yellow fever.** *Current Opinion in Infectious Diseases.* 2005;18(5):387-94.

Quesney S, Marc A, Gerdil C, Gimenez C, Marvel J, Richard Y, Meignier B. **Kinetics and metabolic specificities of Vero cells in bioreactor cultures with serum-free medium.** *Cytotechnology.* 2003; 42(1):1–11.

Radlett PJ, Telling RC, Stone CJ, Whiteside JP. **Improvements in the growth of BHK-21 cells in submerged culture.** *Applied Microbiology.* 1971;22(4):534-7.

Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'Age-Stehr J. **Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection.** *Journal of Medical Virology.* 1998;56(2):159-67.

Reuveny S, Velez D, Macmillan JD, Miller L. **Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody production in stirred reactors.** *Journal of Immunological Methods* 1986;86(1): 53-59.

Rourou S, van der Ark A, Majoul S, Trabelsi K, van der Velden T, Kallel H. **A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor.** *Applied Microbiology Biotechnology.* 2009; 85(1):53–63.

Sanford KK, Earle WR, Evans VJ, Waltz HK, Shannon JE. **The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei.** *Journal of the National Cancer Institute.* 1951;11(4):773-95.

Schatzmayr HG. **Novas perspectivas em vacinas virais.** *História, Ciências, Saúde Manguinhos*, vol. 10 (suplemento 2): 655-69, 2003.

Schuller E, Klingler A, Dubischar-Kastner K, Dewasthaly S, Muller Z. **Safety profile of the Vero cell-derived Japanese encephalitis virus (JEV) vaccine IXIARO®.** *Vaccine.* 2011;29(47):8669-76.

Silva ML, Espírito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Magalhães VP. **Clinical and Immunological Insights on Severe, Adverse Neurotropic and Viscerotropic Disease following 17D Yellow Fever Vaccination.** *Clinical and Vaccine Immunology.* 2010, 17(1):118–126

Simizu B, Abe S, Yamamoto H, Tano Y, Ota Y, Miyazawa M, et al. **Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains.** *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization.* 2006; 34(2):151-4.

Singh V. **Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation.** *Cytotechnology.* 1999;30(1-3):149-58.

Sinsky AJ, Fleischaker RJ, Tyo MA, Giard DJ, Wang DI. **Production of cell-derived products: virus and interferon.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1981;369:47-59.

Sipos T, Merkel JR. **An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin.** *Biochemistry.* 1970;9(14):2766-75.

SoloHill *Microcarriers: Innovative Solutions for Cell-Based Research & Manufacturing.* [acesso em 17/05/2013]. Disponível em: http://www.solohill.com/files/microcarrier_beads.pdf

Souza MCO. **Produção do vírus da Febre Amarela em células Vero utilizando biorreatores agitados.** Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Engenharia Química] – Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2007.

Srivastava AK, Putnak JR, Lee SH, Hong SP, Moon SB, Barvir DA, et al. **A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells.** *Vaccine.* 2001;19(31):4557-65.

Sun MB, Jiang YJ, Li WD, Li PZ, Li GL, Jiang SD, et al. **A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor.** *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2004;10(17):2571-3.

Sun X, Zhang Y, Tan W, Zhou Y, Hua P. **Attachment kinetics of Vero cells onto CT-3 microcarriers.** *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2000;90(1):32-6.

Tauil PL. **Critical aspects of yellow fever control in Brazil.** *Revista de Saúde Pública.* 2010;44(3):555-8.

Theiler M, Smith HH. **The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization.** *J. Exp. Med.* 65, 787-800 (1937). *Reviews in Medical Virology.* 2000;10(1):6-16; discussion 3-5.

Thermo Scientific: HyClone CultiSpher G Microcarriers. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: http://www.thermoscientific.com/ecommservlet/productsdetail_11152_L10663_92065_13096667_-1

Thermo Scientific: HyClone CultiSpher GL Microcarriers. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: http://www.thermoscientific.com/ecommservlet/productsdetail_11152_L10663_92065_13096668_-1

Thermo Scientific: HyClone CultiSpher S Microcarriers. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: http://www.thermoscientific.com/ecommservlet/productsdetail_11152_L10663_92065_13096669_-1

Thermo Scientific: Nunc* 2D MicroHex* Microcarriers. [acesso em 24/03/2012]. Disponível em: http://www.thermoscientific.com/ecommservlet/productsdetail_11152_L10663_92065_11953309_-1

Trabelsi K, Rourou S, Loukil H, Majoul S, Kallel H. **Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor.** *Journal of Biotechnology.* 2006; 121(2):261–271.

Tri Stars Laboratory glassware & Scientific Equipment. [acesso em 12/03/2012]. Disponível em: http://tristars.4t.com/images/spinner_flasks.jpg

Tokashiki M, Yokoyama, S. **Bioreactors designed for animal cells.** In: Hauser H, Wagner R. **Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production.** Berlin: Walter de Gruyter; 1997. p 279–317.

Van Wezel AL. **Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture.** *Nature.* 1967;216(5110):64-5.

Ventini D, Damiani R, Sousa APB, Oliveira JE, Peroni CN, Ribela MTCP et al. **Improved bioprocess with CHO-hTSH cells on higher microcarrier concentration provides overall biomass productivity for rhTSH.** *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2011; 164(4):401-9.

Walsh G. **Biopharmaceutical benchmarks 2010.** *Nature Biotechnology.* 2010;28(9):917-24.

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

Wang G, Zhang W, Jacklin C, Freedman D, Eppstein L, Kadouri A. **Modified CelliGen-packed bed bioreactors for hybridoma cell cultures.** *Cytotechnology.* 1992;9(1-3):41-9.

Wang Y, Ouyang F. **Bead-to-bead transfer of Vero cells in microcarrier culture.** *Cytotechnology.* 1999;31(3):221-4.

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

World Health Organization, 2013 [online]. [acesso em 17/05/2013]. Disponível: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/yellow_fever_20130517/en/

Wu SC, Liu CC, Lian WC. **Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development.** *Vaccine.* 2004;22(29-30):3858-64.

Wu J, Ruan Q, Lam YP. **Effects of surface-active medium additives on insect cell surface hydrophobicity relating to cell protection against bubble damage.** *Enzyme Microbial Technology* 1997; 21(5):341–48.

Wu JY, Liu Y, Chen JT, Xia M e Zhang XM. **Review of 10 years of marketing experience with Chinese domestic inactivated hepatitis A vaccine Healive®.** *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2012;8(12):1836-1844.

Yasumara Y, Kawakita M. **The research for the SV40 by means of tissue culture technique.** *Nippon Rinsho*. 1963;21:1201-19.

Yu P, Huang Y, Zhang Y, Tang Q, Liang G. **Production and evaluation of a chromatographically purified Vero cell rabies vaccine (PVRV) in China using microcarrier technology.** *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2012;8(9):1230-5.

Zecchini TA, Wright PA, Smith RJ. **Method for the passaging of microcarrier cultures to a production scale for producing high titre disabled infectious single cycle-herpes simplex virus type-2.** *Biotechnology Bioprocess Engeneering* 2000; 5:118-122.

Zhang Z, al-Rubeai M, Thomas CR. **Effect of Pluronic F-68 on the mechanical properties of mammalian cells.** *Enzyme and Microbial Technology*. 1992;14(12):980-3.

Zhou JM, Liu C, Tsou CL. **Kinetics of trypsin inhibition by its specific inhibitors.** *Biochemistry*. 1989;28(3):1070-6.