

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Cultura de células de mamíferos: dos princípios básicos ao escalonamento industrial

Diego Fernandes Livio

Orientadora: Daniela Leite Fabrino

Co-Orientador: Igor José Boggione Santos

Ouro Branco
Dezembro/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Cultura de células de mamíferos: dos princípios básicos ao escalonamento industrial

Diego Fernandes Livio

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em cumprimento às exigências do Curso de Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei.

Orientadora: Daniela Leite Fabrino
Co-Orientador: Igor José Boggione Santos

Ouro Branco
Dezembro/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Cultura de células de mamíferos: dos princípios básicos ao escalonamento industrial

Diego Fernandes Livio

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

_____
Nome 1 – Orientador

_____
Nome 2 – examinador 1

_____
Nome 3 – examinador 2

Ouro Branco, ___/___/_____

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela força durante este trabalho. À UFSJ por esta oportunidade. À minha família e Michelle pelo incentivo e carinho. Minha total admiração à Prof. Dra. Daniela Fabrino pela inspiradora orientação, sendo um exemplo de dedicação e confiança que ultrapassaram este trabalho, se extendendo em minha imensa gratidão. Agradeço ao Prof. Igor Santos pela co-orientação que se deu de boa vontade e prontidão. Agradeço também aos professores envolvidos, Sandra e Totola, pela disposição e ensinamentos constantes.

Sumário

1. Introdução 7
2. Justificativa 9
3. Breve histórico da técnica 10
4. Parâmetros de uma cultura celular animal 12
5. Tipos de linhagens celulares 15
6. Técnicas de isolamento de células para a cultura 17
7. Cuidados pré-cultura 18
8. Criopreservação 21
9. Monitoramento de uma cultura celular 22
10. Efeitos de passagem 24
11. Estabelecimento da linhagem.....25
12. Contaminação 25
13. Meios de cultura 28
14. Variáveis determinantes a cultura 31
    14.1 Temperatura 31
    14.2 pH 31
    14.3 Atmosfera gasosa 32
15. Locais de cultivo de células de mamíferos 33
    15.1 Escala laboratorial 33
    15.2 Escala semi-piloto 34
    15.3 Escala industrial 34
16. A ampliação de escala na cultura celular 37
17. Ampliação de escala através dos biorreatores 40
18. Conclusão 44
19. Referências bibliográficas 45

Resumo: A cultura de células trata-se de um método que permite a manutenção de células vivas em laboratório, amplamente utilizada nos estudos biológicos e na produção de bioprodutos. Ela possibilita executar testes direto sobre as células garantindo maior rapidez e eficiência dos resultados e melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos. A cultura de células animais permite avanços científicos no que se refere à bioprocessos, atuando como importante ferramenta de pesquisa biotecnológica como na produção de produtos biotecnológicos como vacinas, hormônios e proteínas terapêuticas, devido a sua maquinaria pós traducional proteica. Para isso, a cultura utilizada deve ser bem estabelecida, garantindo um padrão e uma homogeneidade nas variáveis do processo que a abrangem de modo a se obter confiabilidade nos resultados, tanto na produção em escala laboratorial quanto na sua ampliação para a indústria. Para que a cultura celular possa ser difundida no mercado é importante o papel de profissionais como o engenheiro de bioprocessos para estabelecer a melhor técnica de cultivo em relação à produtividade, elaborar e padronizar uma correta ampliação de escala, com um escalonamento que remeta ao melhor tanque de cultivo (biorreator), meios de cultura e técnicas de manutenção, garantindo a eficiência nos resultados laboratoriais e a otimização do processo industrial.

Palavras-chave: biorreator, células, ampliação, bioprocessos.

1. Introdução

As células animais podem ser induzidas a crescer fora do seu tecido de origem após serem isoladas e cultivadas em recipientes apropriados, de modo a serem manipuladas e observadas do ponto de vista microscópico, bioquímico e molecular (SOUZA, 2007; MORALES, 2008). Por meio desta técnica se torna possível realizar um elevado número de testes num pequeno intervalo tempo, dinamizando a resposta de um experimento, por permitir uma análise mais ampla e detalhada com repetições simultâneas de uma mesma cultura, através do emprego de vários biorreatores, como, por exemplo, garrafas de cultivo (filhas), derivadas de uma mesma garrafa matriz (mãe) (BRUCE *et al*., 2002). Cada garrafa filha possui uma amostra homogênea e padronizada, o que leva a um aumento na confiabilidade dos resultados, em um menor intervalo de tempo, em média, até 24 horas de intervalo de duplicação dependendo da linhagem, além de uma significativa redução dos ensaios em animais (SOUZA *et al*., 2004; MORALES, 2008; SINHA *et al.,* 2008; ALBERTS, 2010).

São amplamente utilizadas como ferramentas para a produção e pesquisa de bioprodutos como vacinas e proteínas terapêuticas voltados para a saúde animal e humana (NIKFARJAM, 2011). Seu maquinário interno é capaz de reproduzir mudanças pós-traducionais de proteínas como glicosilações, metilações, fosforilações, etc., fato este que não ocorre em organismos procariontes que não possuem a maquinaria celular necessária para tais processos de modificação (ALBERTS *et al.*, 2010; BUTLER *et al*., 2014; PAIS *et al*., 2014; VINCI, 2003).

Devido às grandes possibilidades de aplicação da cultura celular em processos relacionados às áreas biomédicas e biotecnológicas, conforme mostrado na figura 1, tal técnica despertou o interesse industrial se estabelecendo como uma das principais ferramentas para pesquisa e produção na academia e indústria (BRANCO, 2010; CARRONDO, 2012; SBRANA, 2012).

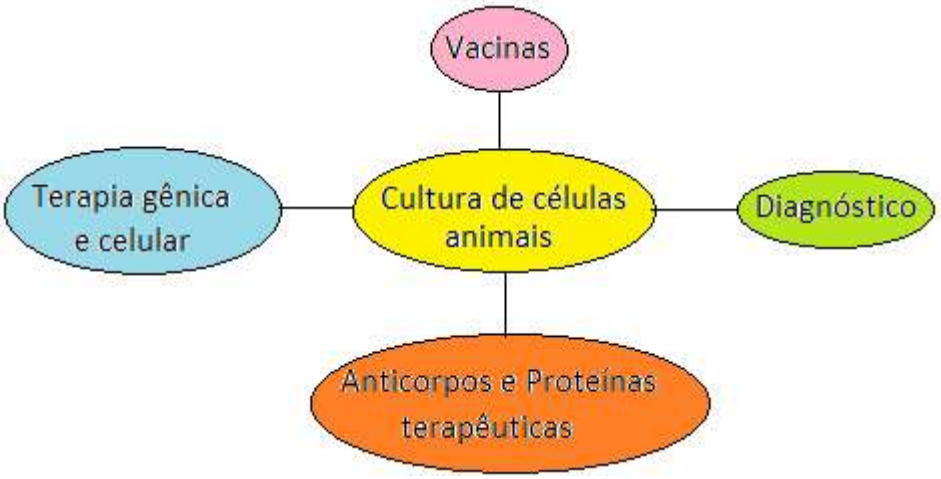


Figura 1: Utilidades da cultura de células animais.

Já em 2003 a utilização de células animais na indústria biofarmacêutica representava 60% do mercado de biofármacos norte-americano e europeu (WALSH, 2003). Como exemplos, se pode citar a produção de vacinas de uso humano, que ocorre com a propagação de vírus em linhagens celulares Vero, aderentes, oriundas de rim de macaco verde africano (FRAZZATI-GALLINA *et al.*, 2001; SOUZA *et al*., 2004; BARRET, 2009; BUTLER *et al*., 2014); e a produção de proteínas terapêuticas na qual a lihagem celular de mamífero é mais usada, como a CHO, proveniente do ovário de hamster chinês (WALSH, 2003; WARNOCK *et al.,* 2006; BUTLER *et al*., 2014; DORAI *et al*. 2014; PAIS *et al*., 2014).

Porém os desafios encontrados na cultura celular são muitos, uma vez que é preciso fazer com que as células cultivadas *in vitro* se desenvolvam e respondam em um meio similar ao que se encontravam *in vivo*, considerando que as células cultivadas possam responder de modo diferente de acordo com o meio em que se encontram, por receberem estímulos variados (ALBERTS, 2010). Tais células devem interagir similarmente com o meio de cultura e umas com as outras, influenciando o resultado (SBRANA, 2012).

Além disso, o aumento do uso da tecnologias de cultura de células animais na indústria passou a exigir um projeto e otimização do processo de cultivo que atenda a alta demanda de produção, melhor elaborado e monitorado, sendo necessário a ampliação de escala, mas ainda mantendo a padronização do procedimento e os resultados obtidos no laboratório de pesquisa (DOYLE, 1999; SCHMIDELL, 2001; BUTLER, 2005; CARRONDO *et al*., 2012). Para isso, se utiliza os biorreatores de grande escala que

proporcionam sistemas de cultivo celular mais homogêneos e permitem o monitoramento constante dos bioprocessos, por disporem de um sistema de controle de parâmetros como pH, temperatura, velocidade de agitação, concentração de oxigênio dissolvido no meio, entre outras variáveis (BRANCO, 2010).

Assim, a cultura de células se tornou um desafio para as comunidades acadêmica e industriais que cada vez mais procuram e formam profissionais capacitados para saná-los, como os engenheiros de bioprocessos (BRANCO, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2013). Nas últimas décadas a engenharia de bioprocessos avançou, se consolidando dentres as áreas que trabalham com bioprocessos, elaborando, padronizando e ampliando a produção de bioprodutos, transferindo a eficiência nos resultados laboratoriais para a escala industrial por meio da otimização dos processos (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Visto isso, cabe ao profissional envolvido nessa área trabalhar no desenvolvimento de técnicas que permitam o melhor rendimento de produção e melhores condições de manutenção das culturas de células (BRANCO, 2010; VALK *et al*., 2010).

2. **Justificativa**

Os profissionais que podem lidar com culturas de células de mamíferos como médicos, biólogos, farmacêuticos e engenheiros, inclusive os alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado acadêmicos, precisam ter uma visão geral do assunto antes de entrarem nos trabalhos práticos. Entretanto, a literatura disponível hoje apresenta-se, muitas das vezes, dispersa, dificultando o acesso à informações sobre as técnicas de cultura celular. Artigos tratando de situações experimentais específicas e livros com conteúdo muito vasto e segmentado dificultam a acesso rápido à informação básica e uma visão geral sobre assunto. Este trabalho pretende preencher essa lacuna abordando de forma geral a cultura de células desde a escala laboratorial até a industrial. Para tal, é preciso abordar os passos básicos da técnica, discutir seus prós e contras e observar os desafios da ampliação de escala para a cultura de células animais, para que a produção de bioprodutos seja alta e de qualidade.

3. Breve histórico da técnica

Ross Granville Harrisson (1870-1959), a quem esta técnica foi primeiramente atribuída, em 1907, trabalhou com tecidos de embriões de sapo e os colocou imersos em uma gota de sua linfa vedados entre uma lamínula e uma lâmina de vidro, observando o crescimento celular neste fluido linfático. Entretanto, o nome mais proeminente nesta área é o de Alex Carrel (1873-1944) que, em 1910, baseado nas pesquisas de Harrison, aprimorou a técnica de cultura de células não só cultivando-as *in vitro*, mas também mantendo-as fora do organismo, adicionando banhos seriados em soluções salinas nas culturas e substituindo o meio de cultura de linfa de anfíbio por plasma de galinha (WITKOWSKI, 1979; UNCHERN, 1999; FERREIRA, 2011). Carrel também aplicou técnicas de assepsia rigorosas, revolucionárias para a época, em suas culturas *in vitro* e se tornou o precursor das modernas garrafas de cultura de tecido (recipiente de Carrel), adequada à manutenção do meio de cultura (WITKOWSKI, 1979).

Ao longo de seus cultivos celulares, Carrel constatou que células que se aglomeravam em blocos e se mantinham no centro, isoladas do contato com o meio de cultura, tornavam-se inviáveis por não receberem a quantidade suficiente de nutrientes. Para resolver o problema ele pegou um pedaço de seda e colocou em uma tampa de vidro, umedecido com uma gota de plasma para que as células se aderissem e se desenvolvessem através do contato tridimensional com o meio de cultura e entre elas mesmas, sendo esse, talvez, o primórdio das técnicas em culturas tridimensionais (3D) (AMARAL *et al*., 2011; BRUCE *et al*., 2002).

Até 1951, entretanto, a cultura celular ainda não era uma técnica estabelecida, sendo o cientista George Otto Gey quem, a partir do isolamento de células cancerígenas de um tumor da paciente Henrietta Lacks, deu origem a linhagem denominada HeLa, estabelecendo a técnica (SINHA *et al*., 2008).

Nos anos seguintes, os experimentos realizados por Johannes Holtfreter, Aron Arthur Moscona e Joseph Leighton difundiram a cultura de células tridimensionais (3D) no meio científico, que se mostrou ser um ambiente mais próximo ao *in vivo*, tendo

algumas características e traços preservados do ambiente de origem quando comparada com a cultura em 2D (DOYLE, 1999; AMARAL *et al*., 2011; MACEDO *et al*., 2012; CESARZ *et al*., 2015).

Em 1955, Earle e Eagle elaboraram um meio de cultivo que atendia as exigências nutricionais de células cultivadas *in vitro*, utilizando o soro sanguíneo como um de seus constituintes (EAGLE, 1955). Tal descoberta somada ao desenvolvimento de linhagens celulares permanentes e que se desenvolvem em suspensão marcou o início da cultura em larga escala (KRETZMER, 2002).

Em 1986, Martin e Evans isolaram e cultivaram células-tronco pluripotentes de embrião de camundongo. Dez anos mais tarde, James Thomson isolou e cultivou células-tronco embrionárias humanas provenientes da fase de blastocisto. John Gearhart, por sua vez, conseguiu derivar células-troncos embrionárias humanas de uma população de células-tronco fetais, oriundas de fetos abortados (ROCHA, 2008; Alberts, 2010).

Atualmente, a cultura de células animais ainda é uma área em franca expansão no estudo e produção biotecnológica, sendo as culturas em suspensão as mais eficientes, otimizadas pelo uso de técnicas adequadas de cultivo, que permitam a ampliação de escala através do uso dos biorreatores, que tentam manter as condições de cultivo mais ideais possível (FRESHNEY, 2005; OKAFOR, 2007).

Os primeiros biorreatores para células de mamíferos derivaram dos fermentadores, os quais foram, há muitas décadas, desenvolvidos para cultivo de fungos e bactérias com fins industriais, sendo o primeiro de maior proporção utilizado para a produção de penicilina (OKAFOR, 2007). Inicialmente, os biorreatores eram empregados com pouca ou nenhuma modificação para todos os tipos de cultivos.

Em 1956, foi registrada a primeira cultura de células animais em escala industrial realizada por Jonas Salk na produção da então vacina Salk contra poliomielite, com o uso de células primárias de rim de macaco (GRIFFITHS, 2000). Já o primeiro fator recombinante produzido em larga escala em células de mamíferos (CHO) foi o ativador do plasminogênio tecidual (WALSH, 2003).

Hoje em dia existem diferentes modelos de biorreatores próprios para cada tipo de cultivo e suas especificidades, com ajustes na transferência de gases (O_2, CO_2),

no formato do tanque, na forma de agitação, dentre outros; sejam eles destinados a células animais, vegetais, fungos ou bactérias (VINCI, 2003).

4. Parâmetros de uma cultura celular animal

Antes do início de uma cultura celular é preciso conhecer a fisiologia da célula que se pretende cultivar para entender o comportamento da cultura e conseguir atender suas necessidades de cultivo. A avaliação da proliferação celular pode produzir informações valiosas sobre a resposta de uma cultura a um estímulo. Mudanças bruscas no crescimento com repentinas quedas, ou aumentos, são um alerta de que algo pode estar errado com a cultura (COBO *et al.*, 2007; ATCC–A, 2010; ATCC-D, 2010).

A análise morfológica das células é um elemento importante para monitorar o desempenho de uma cultura. No geral, células aderentes saudáveis apresentam um formato alongado quando instaladas. Já as células em suspensão possuem formato esférico (RYAN, 2008).

Também é importante realizar uma análise metabólica da cultura através de sua "performance" fisiológica. Glicose e glutamina são os nutrientes essências consumidos durante o metabolismo celular, como principais fontes energéticas das células animais (ALTAMIRANO, 2007; GÓDIA *et al.*, 2002). Assim, são limitantes no crescimento celular, sendo consumidas, como a glicose durante a fosforilação oxidativa ou glicólise anaeróbica, e a glutamina na produção de amônio e nitrogênio para a célula. A glutamina está envolvida em diferentes funções, tais como a proliferação e desenvolvimento de células, o balanço acidobásico, o transporte da amônia entre os tecidos, a doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese. Com isso, há geração de compostos tóxicos como o ácido lático e íon amônio (GÓDIA *et al.*, 2002; ALTAMIRANO, 2007; Cruzat, 2009). Por isso, há a necessidade de troca do meio de cultura de modo a maximizar a concentração celular mantendo o nível de glicose e glutamina distante dos níveis limitantes (SHI *et al.*, 2010).

Para determinar o melhor momento de produzir subculturas (repique) e fazer uma diluição ideal, gera-se uma curva de crescimento e densidade celular dividida em

fases que ajudarão a determinar os tempos de duplicação da população cultivada, a concentração de inóculo mais adequada, o intervalo dos experimentos e produção, dentre outros, devendo ser gerada rotineiramente quando uma análise funcional ou enzimática for iminente (UNCHERN, 1999; MORAES, 2008; ATCC-D, 2010).

As fases de crescimento celular são regidas de acordo com a disponibilidade de nutrientes, condições ambientais e, no caso de células aderentes, ao suporte de ancoragem nos quais as células estão sujeitas (UNCHERN, 1999; ATCC, 2014). Assim, tais fases são um indicativo para a realização do repique e a adição de nutrientes, podendo ser expressas em um gráfico conforme ilustrado na figura 2 a seguir:

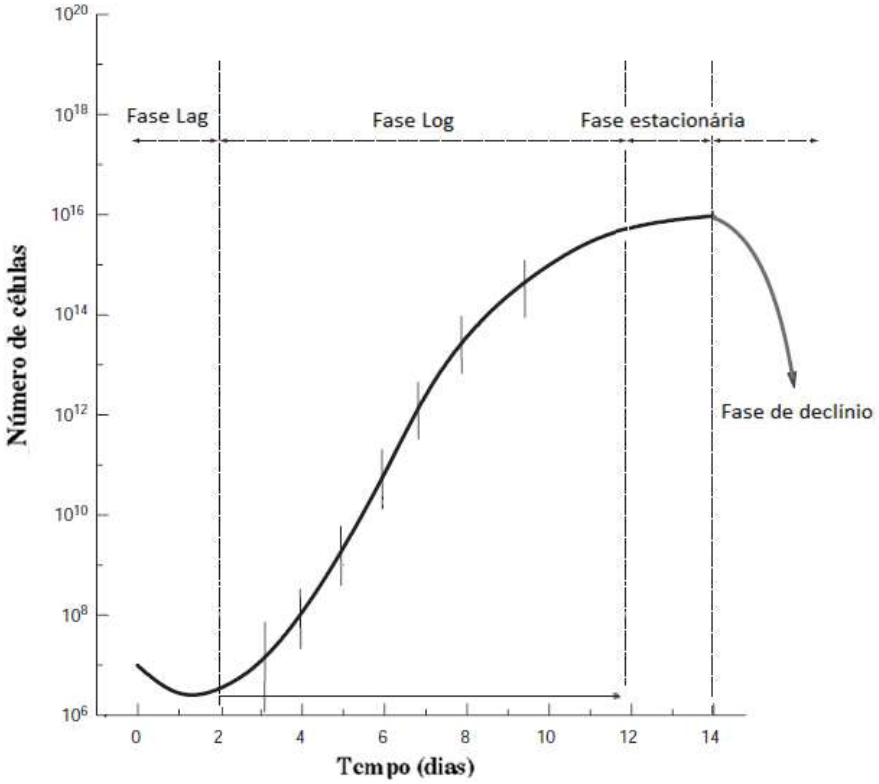


Figura 2: gráfico da curva de crescimento celular. Adaptada de FRESHNEY, 2005; SINHA *et al*., 2008; TORTORA *et al*., 2012.

As fases de crescimento celular podem ser divididas da seguinte maneira (HAYFLICK, 1961; UNCHERN, 1999; FRESHNEY, 2005; SINHA *et al*., 2008; TORTORA *et al*., 2012):

Fase Lag – As células recém inseridas no frasco de cultivo contendo meio de cultura estão se adaptando ao novo ambiente. Tal fase é dependente da densidade

celular, pois as células necessitam de espaço e nutrientes para se instalarem e proliferarem, gerando um aumento de proteínas estruturais e enzimas. Nesta fase, em culturas de células aderentes, as células buscam atingir uma densidade suficiente para cobrir o fundo do frasco de cultivo e tocam umas as outras formando um´´tapete`` ou, no caso de células não aderentes, suficiente para tornar o meio de cultivo mais turvo (denso) devido ao seu grande número de células em suspensão, devendo ser contada uma pequena amostra de modo a calcular a densidade celular através de técnicas como a espectrometria e câmaras de contagem em microscopia ótica. Assim, se sabe o momento exato do repique, quando a densidade celular for superior àquela padronizada como sendo ideal a quantidade de nutrientes disponíveis no meio (HAYFLICK, 1961; DOYLE, 1999; PEREIRA e*t al*., 2008).

Fase Log – As células já se encontram adaptadas possuindo um crescimento celular exponencial devido à maior viabilidade e atividade metabólica. Nesta fase, as células animais possuem alta taxa de síntese proteica com mudanças pós-traducionais que tornam tal cultivo tão visado na indústria biofarmacêutica (BUTLER *et al*., 2014). Para manter a viabilidade celular é preciso manter a cultura nessa fase, sendo necessário realizar o repique da cultura, isto é, retirar uma pequena fração do biorreator (frasco de cultivo mãe) contendo a densidade de células ideal (essa verificação é feita conforme descrito acima) e passar para outra garrafa ou biorreator (filha) contendo apenas meio de cultivo novo, onde as células têm nutrientes e espaço apropriados para se propagarem, antes que se gere um estresse metabólico e consequente perda das características originais das células (GUERRA *et al.,* 2006; ATCC, 2014). Através do repique é possível expandir a população de células até que se reproduza uma quantidade ideal delas, permitindo a geração de culturas (filhas) que sejam réplicas da original (mãe), sendo possível selecionar as células de interesse através do uso de um meio seletivo e preservá-las por congelamento para práticas futuras (FRESHNEY, 2006).

Fase Estacionária – As células cultivadas já consumiram boa parte dos nutrientes e produziram produtos tóxicos liberados no meio, gerando um decréscimo na sua atividade metabólica. A repicagem deve ser realizada antes do início dessa fase, quando ainda há divisão celular, sem a geração de estresse que pode liberar sinais de

morte, tornando o processo irreversível. Por isso, é importante conhecer a linhagem celular adotada, monitorar sua morfologia, tempo de duplicação, exigências nutricionais, dentre outras características, pois estes podem ser indicativos da necessidade em se realizar um repique (ATCC, 2010; ATCC, 2014).

Fase de Declínio – O número de células viáveis diminui drasticamente após consumirem os nutrientes e super povoar o frasco de cultura.

5. Tipos de linhagens celulares

Cada linhagem de células é uma fonte potencial de estudos, pois mesmo quando submetidas aos mesmos estímulos físicos podem gerar respostas biológicas diferenciadas (FRESHNEY, 2006). Hoje existem milhares de linhagens celulares estabelecidas e isoladas de diferentes espécies de células. Por isso, é importante conhecer a linhagem com a qual se deseja trabalhar de modo a estabelecer padrões vitais de cultivo como ciclo celular e necessidades nutricionais, organização, caracterização e estabelecimento de protocolos padronizados, afim de que se possam estabelecer cuidados específicos àquela linhagem adotada (DOYLE, 1999; LYNN, 2002; ALMEIDA, 2013).

Pode-se classificar as linhagens tomando-se por base diferentes características das mesmas como, por exemplo, sua necessidade de ancoragem para estabelecimento. As linhagens tidas como aderentes são aquelas que, para se proliferarem, dependem da fixação a base dos frascos ou placas de cultura, crescendo em monocamadas, possuindo as características do tecido de origem (TAVEIRA, 2007; ALVES *et al*., *2010*). Já as em suspensão não necessitam de ancoragem para sua proliferação (TAVEIRA, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2013). As imagens 3 e 4 a seguir ilustram ambos tipos de linhagem.

Figura 3: Linhagem aderente MA 104

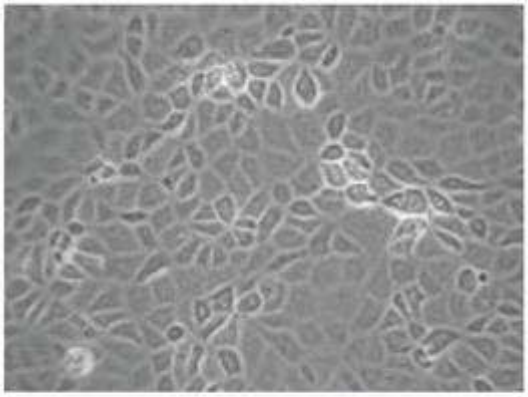
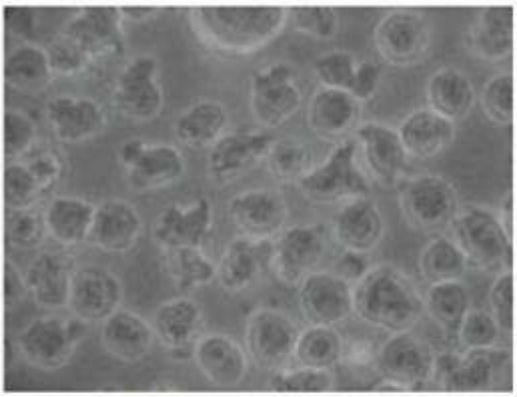


Figura 4: Linhagem não aderente MM6



Fonte: ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R.; Cultivo Celular. Capítulo 5. Imagens cedidas pelo setor de Cultura de Células do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde, FIOCRUZ.

As células também podem ser classificadas de acordo com seu potencial de vida finito, tais como células diplóides humanas, ou aparentemente infinito, tais como as células derivadas de um tecido tumoral (PETRICCIANI, 2008). As linhagens ainda podem ser agrupadas em primárias, secundárias, ou contínuas (SINHA *et al.,* 2008). Denomina-se uma linhagem como primária quando esta provém de células diretamente isoladas de um pedaço de tecido de um organismo, obtido por desagregação mecânica ou enzimática (FRESHNEY, 2006; PETRICCIANI, 2008; OLIVEIRA, 2009). Já as linhagens secundárias são oriundas das linhagens primárias pré-modificadas geneticamente, podendo ser imortalizadas para melhor reprodutibilidade e padronização, abrindo a possibilidade de práticas de subcultura (repique) bem estabelecidas (SINHA *et al*., 2008). Quando tais células ditas secundárias atingem uma estabilidade ao longo das passagens, apresentam rápido crescimento e se tornam robustas elas são denominadas contínuas (AUGUSTO, 2001).

A observação de que a linhagem HeLa exibia altos níveis da enzima telomerase, que barra o encurtamento dos telômeros ao longo de muitas divisões impedindo assim fenômenos mutagênicos, levou à prática de transformação de muitas linhagens celulares primárias para a expressão acentuada de telomerase (BRYAN *et al*., 1995; SHERR *et al.*, 2000; FRESHNEY, 2006; XIE *et al*., 2011). Desta forma, foram estabelecidas diferentes linhagens celulares que exibem características genotípicas e fenotípicas estáveis por vários ciclos de divisão (REPIQUE CELULAR (on line)).

Dentre tantos tipos de linhagens celulares se tornou indispensável a obtenção e o uso de linhagens de fontes autenticadas que usam técnicas padronizadas para validar os resultados de pesquisa, de modo a garantir a qualidade e prevenir a contaminação interlinhagens, que se dá quando uma linhagem x está contaminada com outra linhagem y (COBO *et al.,* 2007; ATCC-A, 2010).

Bancos internacionais armazenam tais linhagens (criopreservação) e realizam testes bioquímicos para comprovar autenticidade através de diferentes técnicas, tais como busca, através de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), de sequências repetidas do genoma que apresentem as mesmas daquela linhagem celular; verificação do perfil enzimático da célula (proteoma); cariotipagem; análise do crescimento populacional; presença ou não de agentes contaminantes, suscetibilidade celular a diferentes amostras virais, identificação por viabilidade, morfologia e pureza (BERNARDI, 2007; HAY *et al*., 2003; ATCC, 2011). Vale ressaltar que tais técnicas devem ser feitas regulamente ao longo dos cultivos de modo a assegurar a autenticidade da linhagem. Também se deve atentar para o número correto de passagens, que varia de linhagem para linhagem, pois depois de determinada taxa de repique as células perdem suas características originais (HUGHES, 2007).

Dentre estes bancos se tem a Coleção Americana de Culturas (American Type Culture Collection ou ATCC) e o depósito de Células de Coriell (Coriell Cell Repositories) nos Estados Unidos, a Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares (Deutsche Sammling von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ou DSMZ), a Coleção Européia de Culturas de Células Animais (European Collection of Animal Cell Cultures ou ECACC) no Reino Unido, o Banco de Recursos para Pesquisa Científica em Saúde (Health Science Research Resources Bank ou HSRRB) no Japão e o Banco Nacional de Células do Iran (National Cell Bank of Iran ou NCBI) (BRETAS, 2011).

6. **Técnicas de isolamento de células para a cultura**

Para se iniciar uma cultura de células é preciso extraí-las do tecido as quais o constituem, formando-se uma suspensão de células e pequenos agregados capazes de

se ligarem a um substrato sólido, formando uma monocamada. Para isso, se pode utilizar técnicas de desagregação mecânica, como raspagem, lavagem, maceração ou enzimática, como tripsina e colagenase (FRESHNEY, 2006; LÉO, 2008; OLIVEIRA, 2009; FERREIRA, 2011; ALVES *et al*., *2010*; ATCC , 2014).

O procedimento mais utilizado é a lavagem de órgão de interesse que pode ser feito injetando-se líquido e concentrações salinas fisiológicas no interior de uma cavidade como medulas ósseas, peritônio ou espaço pleural; massagear ou sacudir e sugar tal líquido de volta com o auxílio de uma pipeta, extraindo o líquido já contendo as células de interesse. No caso de células aderentes, é necessário após as lavagens e plaqueamento deixar a cultura em descanso, já em meio adequado, para que as células consigam se aderir à superfície do seu local de cultivo (FRESHNEY, 2006; FERREIRA, 2011).

A tripsina (0,05%), é uma enzima utilizada no repique para catalizar a hidrólise de ligações peptídicas entre aminoácidos, degradando a matriz protéica que une as células, gerando suspensões de células individuais (FRESHNEY, 2006). Algumas células são mais difíceis de se separarem do que os outras, por isso as soluções de tripsina são frequentemente suplementadas com enzimas, como a colagenase, ou agentes quelantes, tais como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para melhorar sua ação.

7. **Cuidados pré-cultura**

Antes de iniciar o trabalho com a cultura celular se deve tomar alguns cuidados de modo a otimizar o processo, evitar contaminação, manter a segurança do operador e garantir resultados satisfatórios e verídicos (SOUZA, 2007). Para isso, existem medidas que são necessárias e protocoladas em qualquer laboratório de cultivo celular como certificação da linhagem adotada, análise da melhor forma de cultivo para as células adotadas, limpeza do laboratório e equipamentos (desinfecção e esterilização), uso de equipamentos de proteção individual, práticas de segurança, uso de técnicas de cultivo padronizadas e manuseio adequado dos materiais (TAVEIRA, 2007; NIKFARJAM, 2011).

Ao entrar em um laboratório de cultura de células (e somente dentro dele) se deve trajar jaleco para evitar a contaminação operador-experimento e vice-versa, prender os cabelos longos, retirar acessórios, lavar as mãos com detergente em água corrente com atenção para as unhas e pulsos, calçar luvas e em certos casos, colocar óculos de segurança (SOUZA, 2007; NIKFARJAM, 2011).

Todo o material a ser usado deve ser sanitizado com álcool 70%, sendo que alguns, como pipetas e demais vidrarias utilizadas, devem ser autoclavadas (UNCHERN, 1999; TAVEIRA, 2007). O álcool 100% deve estar diluído para que, estando a 70%, consiga adentrar nos microrganismos e lezá-los devido à sua ação desidratante e coaguladora de proteínas (VINCI, 2003). A luz ultra-violeta, usada no fluxo laminar, também deve ser empregada antes e após os procedimentos com, no mínimo, 20 minutos de exposição (OKAFOR, 2007).

Esterilização é a destruição ou remoção de todos os microrganismos, patogênicos ou não, de um dado material. Uma esterilização mal feita é a principal causa de contaminação biológica (NIKFARJAM, 2011). Para efetuar a esterilização existem vários métodos, que devem ser utilizados de acordo com o tipo de material a se esterilizar. A tabela 1 a seguir escrita de acordo com OKAFOR, 2007 e TAVEIRA, 2007 aborda os principais métodos de esterilização.

Estufas	Para a esterilização de materiais resistentes a altas temperaturas como vidro, utiliza-se o calor seco, a 160-180ºC.
Incineração ou queima direta pelo fogo	Para a eliminação de lixos patogênicos sólidos
Autoclave	Para os materiais como os meios de cultura, ricos em umidade, que não podem ser esterilizados pelo calor seco. O calor úmido destrói rapidamente os microrganismos por coagulação das suas proteínas e evita a evaporação excessiva
Filtração	Para a esterilização de antibióticos e

	vitaminas, por serem termosensíveis. Os microrganismos são removidos por passagem do líquido ou do ar através de uma membrana filtrante de poro inferior ao tamanho dos menores microrganismos.
Radiações	Para esterilização de superfícies. Os raios gama, os raios x e a radiação ultra-violeta, modificam molecularmente os microrganismos, impedindo sua proliferação.

Tabela 1: principais métodos de esterilização. Adaptado de OKAFOR, 2007.

O tempo de morte térmica é o intervalo necessário para destruir células vegetativas ou esporos até ao nível pretendido, sendo inversamente proporcional à temperatura. A conjugação dos fatores tempo-temperatura depende das características do produto a se esterilizar e da sua estabilidade térmica. O tempo de tratamento térmico está relacionado com a temperatura, mas também com o volume que se pretende esterilizar, sendo que, para a mesma temperatura, os tempos de tratamento térmico aumentam com o aumento do volume a se esterilizar (OKAFOR, 2007).

Após finalizar o trabalho é preciso sanitizar novamente todo o material utilizado com álcool 70% antes de retirá-lo da cabine de segurança e autoclavar o que for necessário (UNCHERN, 1999; ALVES *et a.l, 2010*). O material de descarte deve ser separado de modo específico, sendo os materiais que necessitam ser autoclavados separados dos demais. Já os outros materiais biológicos devem ser sanitizados com água sanitária comercial (2% a 5% de cloro) diluída 10 vezes, por ser um agente oxidante e agir sobre os constituintes da membrana, levando os microorganismos à morte de modo a se evitar contaminação. Ao fim do trabalho, a luz ultra-violeta

também deve ser novamente empregada com pelo menos 20 minutos de exposição (OKAFOR, 2007; ALVES *et al., 2010)*.

Culturas realizadas em biorreatores de maior porte (litros) podem exigir procedimentos de assepsia mais rigorosos para certos tipos de pesquisa, exigindo salas com fluxo de ar e entrada de pessoas e de materiais controlados e vestimenta mais completas com máscaras, calças e protetores para os pés. Sistemas de cultivo celular desta proporção normalmente possuem um sistema de esterelização via vapor ou sendo até mesmo o tanque de cultivo autoclavado (UNCHERN, 1999; OKAFOR, 2007; QIN, 2014). Hoje há uma tendência a utilizar grande parte do material de trabalho descartável e pré-esterilizado, principalmente quando se trata de uma escala menor, no qual o custo-benefício é compensatório (SILVA, 2012).

Para o sucesso da cultura é primordial que a responsabilidade com a biossegurança envolva não apenas o operador, mas também todos os usuários do laboratório que são a principal fonte de contaminação (ISHAK *et al*., 1989; NIKFARJAM, 2011).

8. **Criopreservação**

Após estabelecida e bem expandida (por volta do quinto ao décimo ciclo de divisão) a cultura deve ser preservada para futura utilização, gerando estoques (DOYLE, 1999; UNCHERN, 1999). A preservação das células por congelamento (-130 °C a -180 °C) irá permitir protegê-las contra os problemas de envelhecimento, contaminação, falha da incubadora ou falta de meio de cultura e soro, além de fornecer um estoque valioso, reduzindo alterações ou perda de características da cultura. No geral, as células animais podem ser criopreservadas por volta de 40 anos a temperaturas de – 130 ºC (COBO, 2007; KUMAR *et al*., 2008; SINHA, 2008; SIMIONE, 2009; ATCC-B, 2010).

Para isso, faz-se a coleta das células sendo necessário ajustar a quantidade que se deseja para níveis que assegurem uma adequada recuperação. A suspensão de células deve ser inicialmente preparada a uma concentração duas vezes superior ao desejado para a preservação (SIMIONE, 2009). Em seguida se realiza a contagem, centrifugação

e ressuspensão dessas células em solução criorgânica (solução contendo agentes criopreservantes como DMSO ou alta concentração de soro fetal) (SINHA, 2008; ATCC-B, 2010). Os criopreservantes, como o DMSO, minimizam o ponto de congelamento, reduzindo o teor de água da célula, evitando que cristais de gelo se formem dentro do citoplasma, resultando em ruptura da membrana celular por lesão mecânica (SINHA, 2008). O DMSO é uma molécula pequena e solúvel em lipídios e, assim, entra rapidamente na célula por difusão através da bicamada lipídica da membrana plasmática. A maioria dos criopreservantes são tóxicos em temperaturas acima de 4 °C, desta forma, tão logo a ampola é descongelada seu conteúdo deve ser imediatamente diluído em um meio de cultura fresco para minimizar seus efeitos (RYAN – CORNING (*on line*)).

Feito isso, acondiciona-se as células em tubos específicos para armazenagem em nitrogênio líquido. Se deve manter culturas originais criopreservadas para garantir seu padrão inalterado em relação ao seu genótipo e fenótipo (FRESHNEY, 2006; SINHA, 2008; ATCC-B, 2010; ATCC, 2014).

Quando a cultura for reativada é vital descongelar as células de maneira adequada para manter sua viabilidade e permitir que a cultura se estabeleça de modo saudável. As células devem ser descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 ° C (para minimizar os efeitos dos agentes criopreservantes), e em seguida centrifugadas de modo suave para eliminar a ação congelante do meio. Feito isso, eles devem ser diluídas com meio de crescimento e repicadas num frasco de cultura contendo meio de crescimento completo (RYAN – CORNING (*on line*).

No geral, as células, mesmo com diferentes números de passagens, quando descongeladas e recultivadas, crescem igualmente bem, mantendo a mesma morfologia como aquelas mantidas continuamente em cultura (RAY, 1992).

9. **Monitoramento de uma cultura celular**

Para observar se uma cultura celular está bem estabelecida é preciso analisar seu aspecto visual como a cor do meio de cultura e verificar se ele está com coloração intensa ou turva. Caso o meio esteja turvo pode significar que os nutrientes já foram consumidos e o repique já poderá ser necessário, pois o pH de uma cultura geralmente

diminui à medida em que as células vão consumindo o substrato, devido a produção de ácido lático, alterando a cor do meio de cultura (HANSON *et al*., 2007; ATCC, 2014).

No caso de células aderentes quando a cultura está bem estabelecida, as células saudáveis deverão se aderir ao fundo do frasco para se dividirem, deixando-o opaco, formando o tapete celular homogêneo (DOYLE, 1999; PEREIRA e*t al*., 2008).

Também se deve observar as células no microscópio de luz invertido se atentando para sinais de componentes diferentes às células cultivadas indicando contaminação como a presença de bactérias e fungos (DOYLE, 1999). Para se certificar de que células estão em divisão se deve procurar por duplas arredondadas (final de telófase) e observar indícios da organização dos cromossomos. Células com tamanho superior ao padrão (células gigantes) indicam que a cultura está saudável, porém, envelhecida. Em uma cultura saudável e jovem o número de células gigantes deve ser baixo e constante.

Um dos modos para se saber esta densidade ideal é através da quantificação direta em um hemocitômetro (câmera de Neubauer) com auxílio de um microscópio de luz clara (FERREIRA, 2011). A figura 5 a seguir ilustra uma câmera de Neubauer.

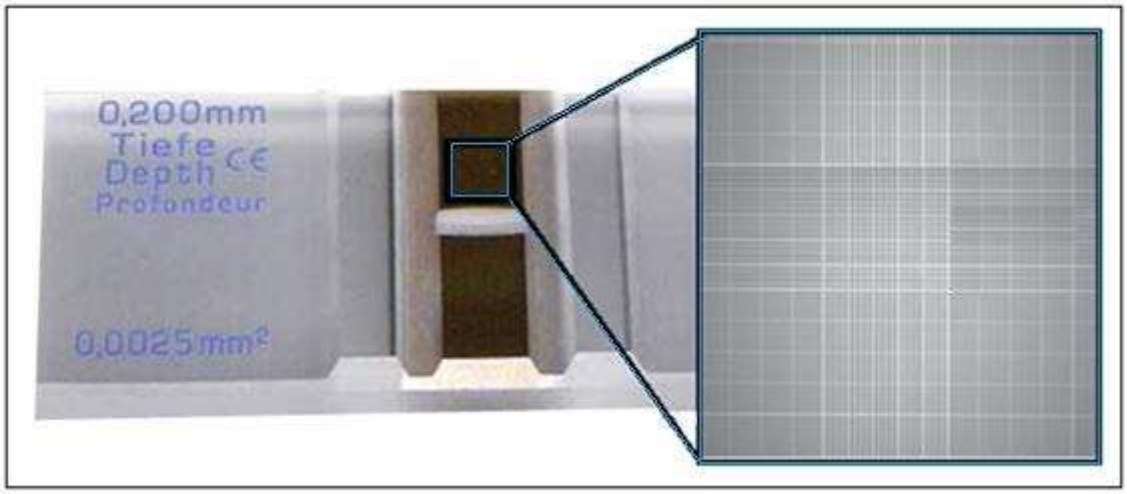


Figura 5: Câmara de Neubauer. Adaptado de ROUGE, 2002; PROLAB (*on line*).

As células devem ser diluídas (fator de diluição determinado que deve ser levado em conta nos cálculos finais) e colocadas na câmara para contagem (FERREIRA, 2011). Nesta técnica, as células devem estar totalmente individualizadas. Para células

aderentes, é necessário fazer uma tripsinização prévia para que as células se desprendam do frasco de cultura (ATCC, 2014). As quantidades de tripsina utilizadas devem se adequar proporcionalmente ao volume da cultura inicialmente repicada, como por exemplo, 2 mL para garrafas pequenas (5 mL) (LYNN, 2002; ALBERTS, 2010; ATCC, 2014). A exposição das células à tripsina/EDTA deve durar apenas o tempo necessário para as células se soltarem do fundo do frasco, geralmente em uma incubação de 3 minutos, estando a temperatura ambiente (25 graus Celsius), devendo ser removida em seguida, pois a exposição prolongada irá danificar receptores de superfície das células (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Caso as células não se soltem, um método de desprendimento celular mais vigoroso deve ser utilizado, como a raspagem mecânica. Tal técnica consiste em utilizar um raspador tipo rodo que deverá ser introduzido dentro do frasco de cultura e raspar o seu fundo, desprendendo ali o tapete de células aderidas. Entretanto, tal procedimento pode ser agressivo para as células (ATCC, 2014).

10. **Efeitos de passagem**

O número de passagens remete a quantas vezes as células foram subcultivadas em novos frascos de cultivo, estando sujeitas, com o passar do número de repiques, a perda das características fenotípicas de origem como, por exemplo, capacidade de diferenciação e adesão; Assim como a contaminação, o erro humano durante o repique e rotulagem, a deriva genética causadora de mutações (benéficas ou maléficas) e a seleção de linhagens errôneas também são uns desses efeitos (COIMBRA, 2008; KRETLOW, 2008; ATCC-D, 2010; XIE *et al.*, 2011).

Para se determinar as problemáticas que envolvem estas passagens vários estudos envolvendo diferentes tipos de linhagens de células são realizados, de modo a analisar uma vasta gama de funções e comportamentos, tais como a morfologia celular, as taxas de crescimento, a expressão proteica e a sinalização celular (ATCC-D, 2010).

11. **Estabelecimento da linhagem**

As células utilizadas para a cultura *in vitro* são retiradas a partir de tecidos *in vivo*, de modo que essas permanecem sob um enorme estresse por se encontrarem fora do seu ambiente natural, estando sujeitas a perda de sinais causados por citocinas, moléculas de adesão, hormônios, dentre outras, podendo ocorrer à perda de suas características fenotípicas (FRESHNEY, 2006; ATCC-D, 2010).

No caso de raspagem, maceração e corte de tecidos, métodos de coleta considerados mecânicos, as células sofrem estresse considerável (TAVEIRA, 2007). Isto pode influenciar o começo da cultura negativamente, pois as moléculas liberadas pelas células que se romperam e morreram irão entrar em contato com os receptores celulares de células saudáveis, podendo disparar uma cascata metabólica interna indesejável, causando uma onda de sinais de morte (HARELL, 1977; SHERR *et al.*, 2000; FRESHNEY, 2006; SINHA, 2008). Por isso é necessário aumentar o número de lavagens que estas células terão que passar antes de serem colocadas em placas ou garrafas de cultivo para posterior manutenção, porém sem excessos, pois a lavagem também pode estressar as células. Para se evitar esse tipo de problema podem-se usar componentes que vão apenas romper as interações celulares-teciduais, como as enzimas proteolíticas e quelantes de Ca^{2+}, gerando um dano celular menor. Entretanto, o número de células obtidas dessa maneira é inferior (FRESHNEY, 2006; MICROCARRIER - GE, 2013).

É importante lembrar que este estresse celular nem sempre é maléfico fora do contexto de cultura celular, podendo servir como pressão seletiva permitindo que microorganismos e células se adaptem a esse estresse, criando uma pressão evolutiva que permita que evoluam genotipica e fenotipicamente (ATCC-D, 2010).

12. **Contaminação**

A cultura de células está sujeita a diversos tipos de contaminação como a presença de microorganismos, vírus, outras linhagens celulares ou até mesmo compostos químicos (íons metálicos, por exemplo), sendo a contaminação microbiana, em especial o micoplasma, a de maior expressão e o principal problema na pesquisa de

centros que trabalham com o cultivo celular (LYNN, 2002; MIRJALILI, 2005; COBO *et al.*, 2007; RYAN, 2008).

As contaminações realizadas por bactérias e fungos são bastante problemáticas em cultura de células animais devido sua alta taxa de proliferação que é superior à da própria cultura, inibindo seu crescimento por interferir nas características bioquímicas das células e, consequentemente, fenotípicas (DOYLE, 1999; COBO *et al.*, 2007).

Estas contaminações podem, em certos casos, ser evidenciadas através da alteração macroscópica do meio. Deve-se examinar o conteúdo do frasco de cultura a olho nú para evidenciar mesmo que macroscopicamente uma possível contaminação microbiana (ATCC-C, 2010). Sinais como mudanças inesperadas de pH devido alterações na coloração do meio, formação de aglomerados superficiais ("nata") e presença de filamentos são indícios de contaminação, assim como a presença de bactérias, geralmente na forma de pontos pretos com movimentos brownianos (SOUZA, 2007; GRAY *et al.*, 2010). Em células aderentes poderá ocorrer formação de buracos na camada de cultivo (tapete) e desprendimento das células. Também podem aparecer pequenas colônias de fungos flutuantes na superfície do meio (interface ar-meio) (ATCC-C, 2010).

Micoplasmas são bactérias intracelulares que ao contrário de outras contaminações bacterianas, fúngicas ou de leveduras, crescem de forma extremamente lenta em meio de cultura, sem destruir a cultura e devido ao seu pequeno tamanho e por não terem parede celular não podem ser detectados sob microscópio de contraste de fase e nem respondem à maioria dos antibióticos usados que são da classe dos β-lactamicos. Por serem de difícil identificação acabam sendo, muitas das vezes, negligenciadas pelos pesquisadores (CHEN, 1977; DOYLE, 1999; MIRJALILI, 2005; FRESHNEY, 2006; SOUZA, 2007; KUMAR *et al.*, 2008; RYAN, 2008; SIGMA, 2008; GRAY *et al.*, 2010; NIKFARJAM, 2011; GERAGHTY *et al.*, 2014). Eles são capazes de alterar a morfologia da célula, o metabolismo, a taxa de transformação do crescimento e a viabilidade, sendo seus efeitos percebidos devido a violações na integridade da membrana celular (DOYLE, 1999; SIGMA, 2008; NIKFARJAM, 2011). Numerosos kits comerciais estão disponíveis para identificar a contaminação por micoplasma através de técnicas de coloração ou crescimento em Agar, pois nas culturas por eles contaminadas, cada célula hospedeira pode ter várias centenas de

micoplasmas (CHEN, 1977; GRAY *et al.,* 2010; NIKFARJAM, 2011). Para evitar este tipo de contaminação, cada cultura e subcultura devem ser testadas, uma vez que seu potencial de infecção é elevado (BESTA, 2004). Também se deve adquirir células de fontes confiáveis, manter boas práticas assépticas, além de verificar o bom funcionamento dos equipamentos de trabalho (CHEN, 1977; COBO, 2007).

Outro tipo de contaminação é causada pela invasão de outros tipos celulares diferentes daquele que se deseja trabalhar (RYAN, 2008). É o caso da contaminação cruzada que tem sido um problema significativo desde os primeiros dias de culturas de células, podendo ocorrer em laboratórios que trabalhem com diferentes tipos de linhagens, tornando assim, um ambiente propício para a mistura errônia de células distintas (LYNN, 2002). Tal contaminação foi documentada já na década de 60. Atualmente estima-se que acima de 20 % das linhagens celulares disponíveis possam estar contaminadas com outras linhagens (KUMAR *et al*. 2008; MIRANDA, 2011).

Entretanto, todos estes indícios apresentados não são capazes de comprovar a existência de uma contaminação. Por isso, faz-se necessário o uso de técnicas de detecção a fim de confirmar a contaminação e identificar o contaminante, tais como, por exemplo, a realização de PCR para genes específicos e diagnósticos colorimétricos por meio de kits de coloração fluorescente (DOYLE, 1998; MIRJALILI, 2005; COBO *et al*, 2007; RYAN, 2008; SPADA, 2009; NIKFARJAM, 2011).

Para previmir as contaminações se deve elaborar boas práticas de operação dentro do laboratório de cultura celular com esterilização eficiente de toda linha de produção, identificações bem detalhadas sobre o trabalho executado, garantia de procedencia das células utilizadas e monitoramento constante (RYAN, 2008).

O histórico de origem das linhagens celulares recentemente adquiridas para um trabalho é importante para rastrear as características daquelas células adotadas e prevenir uma fonte de contaminação cruzada ou mesmo por microorganismos. Deste modo, os fornecedores de linhagens celulares devem proporcionar tal histórico e garantia de autenticidade e pureza (GERAGHTY *et al.*, 2014). Ainda assim, quando uma linhagem celular nova entra no laboratório ela deve ser observada em estado de quarentena (COBO *et al.*, 2007).

A maioria das bactérias e fungos são mais resistentes que as células animais, conseguindo crescer mais rápido que elas (tempo de duplicação de 1 hora, em média,

enquanto que as células animais levam 20 horas). Também são mais tolerantes a variações de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes (SMITH, 1985; FRESHNEY, 2005). Por isso em certos casos, o uso de antibióticos é indicado para a manutenção de linhagens, principalmente primárias, e apenas no início da cultura, por prevenir a contaminação, ou para manter a pressão seletiva sobre as células contaminadas. Entretanto, tal uso pode desenvolver microorganismos resistentes a esses antibióticos, gerando efeitos adversos sobre o crescimento e função celular (MIRJALILI, 2005; VALK, 2010; MICROCARRIE - GE, 2013). Quando a contaminação ocorre mesmo com o uso de antibióticos, como acontece com a maioria dos micoplasmas, se deve investigar as possíveis causas (falha asséptica, trabalhar com mais de uma linhagem ao mesmo tempo, etc.) a fim de eliminá-las e em seguida tratá-la (lavagem, uso de outro antibiótico ou até mesmo descarte) antes que a resistência do microorganismo ocorra ou que a contaminação se espalhe para outras culturas do laboratório (LYNN, 2002; MIRJALILI, 2005; FRESHNEY, 2006; NIKFARJAM, 2011; GERAGHTY *et al*., 2014).

13. **Meios de cultura**

Após escolher a linhagem de células que atenda às necessidades do emprego, obtidas de fontes confiáveis livres de contaminação e planejar a melhor forma e local de cultivo de acordo com as exigências das células adotadas e da densidade ideal de repique e da finalidade da cultura, se deve estimar o número de células que se pretende cultivar de modo a dosar a quantidade de meio a ser gasto, assim como os demais reagentes e acessórios necessários (DOYLE, 1998; PERES *et al*., 2005; FRESHNEY, 2006). É preciso garantir às células ambientes adequados, com condições de temperatura e gases controlados no meio de cultura, contendo uma formulação que atenda às necessidades daquelas células (ALVES *et al*. *2010;* ALMEIDA *et al.*, 2013).

As células animais necessitam de compostos para se nutrirem e realizarem suas atividades metabólicas (TAVEIRA, 2007). Para isso, utiliza-se os meios de cultura por conterem tais componentes como açúcares, nitrogênios, fósforo, sais minerais, vitaminas, hormônios reguladores de crescimento, tamponante de pH, sais, íons

metálicos como cálcio, potássio, magnésio, ferro, manganês, zinco, cobre, níquel, cobalto, sódio, azoto e aminoácidos, que são substâncias essenciais ao metabolismo celular (TAVEIRA, 2007; MORAES *et al*., 2008). Tal constituição é necessária para o crescimento e proliferação celular e é adequada a uma linhagem específica, de modo a manter as células ativas por períodos mais longos de tempo (BRUNNER *et al*., 2009; VALK, 2010). A água (ultra pura do tipo I: elevada resistividade com 18,2 MΩ.cm) é um componente importante dos meios de cultivo para células animais, permitindo que os nutrientes de baixa massa molar possam permear a membrana celular (MORAES *et al*., 2008).

Existem diferentes tipos de meio como o Dulbecco`s Modified Eagle´s medium (DMEM) que contém uma concentração de aminoácidos e vitaminas quatro vezes mais elevada que outros meios de cultura, como o Basal Medium Eagle´s (BME) e o Roswell Park Memorial Institute (RPMI), ambos ainda necessitando serem suplementados com soro fetal bovino a 10% (DOYLE, 1999; REYNA, 2003; BRUNNER *et al*., 2009; SOARES, 2011).

O quadro 1 a seguir mostra os principais componentes constituintes de um meio de cultura típico para células animais.

Aminoácidos	**Vitaminas**	**Sais**	**Outros**	**Proteínas para meios quimicamente definidos**
Arginina Cistina Glutamina Histidina Isoleucina Leucina Lisina Metionina Fenilalanina Treonina Triptofano Tirosina Valina	Biotina Colina Folato Nicotinamida Pantotenato Piridoxal Tiamina Riboflavina	NaCl KCl NaH_2PO_4 $NaHCO_3$ $CaCl_2$ $MgCl_2$	Glicose Penicilina Estreptomicina Vermelho de Fenol Soro	Insulina Transferrina Fatores de crescimento

Quardro 1: Composição básica de um meio de cultura típico. Adaptado de SINHA, 2008; ALVES *et al*., *2010*

O soro fetal de bovino (FBS – do inglês *Fetal Bovine Serum*) é utilizado como suplemento em meios de cultura celular correspondendo de 5 a 20 % do volume total por conter compostos essenciais para o crescimento e manutenção de células (SIGMA, 2008; BRUNNER *et al*., 2009; ALVES *et al*. *2010*). Tal soro é uma solução contendo nutrientes necessários como fatores de crescimento, proteínas, vitaminas, hormônios, dentre outros, sendo utilizado mesmo tendo restrições de uso devido sua composição variada e duvidosa, podendo até conter contaminações (DOYLE, 1999; BRUNNER *et al*., 2009). Assim, é importante evitar o uso do soro, pois o mesmo pode estar desprovido de algum composto essencial ou ainda conter contaminantes como o micoplasma, vírus ou elementos não bem definidos como citocinas. Além disso, é preciso checar a inativação das proteínas do complemento, pois estas, se estiverem ativas podem prejudicar a cultura (AUGUSTO, *et al*., 2001; NIKFARJAM, 2011). Os soros possuem sua forma de obtenção questionada, por provir de bovinos, equinos ou humanos, extraído do plasma, por punção cardíaca ou venosa (BUTLER, 2005; GENZEL *et al.*, 2006). Assim, o soro de origem animal vem sendo substituído por meios bioquimicamente definidos contendo proteínas específicas (fatores de crescimento, transferinas, sinalizadores, etc.) que as células requerem para sobreviver e proliferar em cultura (THAMALINGAN *et al*., 2008; ALVES *et al., 2010*). Vale ressaltar que a substituição completa por tais meios definidos, como a albumina sérica, ainda não foram bem sucedidas, sendo apenas possível suplementar parte do soro com estes novos produtos (COLLADO *et al*., 2014).

Embora alguns meios de cultura líquidos já sejam fornecidos prontos para uso, podendo precisar apenas de alguma suplementação, a maioria deles é fornecida em pó ou em grânulos e a sua preparação se faz pela adição de água destilada em proporção pré-determinada (TAVEIRA, 2007). Geralmente aquece-se meio para que sua dissolução seja completa. Em seguida o pH deve ser ajustado para valores compatíveis para cada tipo de cultura. No caso de células animais esse valor é aproximadamente 7, sendo que valores abaixo de 6,8 inibem o crescimento celular (MICROCARRIER – GE, 2013). Pode-se adicionar fosfato de sódio ou de potássio como tampão para manter o pH estável (OLIVEIRA, 2009). Após o preparo, é necessário esterilizar o meio para eliminar a presença de microrganismos contaminantes. Geralmente se utiliza filtração,

pois a composição de um meio de cultura contêm substâncias (como proteínas) que não podem sofrer com temperaturas elevadas. Para isso, utilizam-se filtros de membrana com poros de 0,2 μm de diâmetro que não permitem a passagem dos microrganismos, nem mesmo micoplasmas (MIRJALILI, 2005; OKAFOR, 2007).

14. **Variáveis determinantes a cultura**

13. 1. **Temperatura**

O crescimento celular depende diretamente de como a temperatura afeta as membranas, os ribossomos, as enzimas celulares e outros componentes. Cada linhagem celular requer um intervalo de temperatura limitado de acordo com a sensibilidade ao calor dos seus sistemas enzimáticos. A temperatura ideal para o cultivo de células animais é por volta de 37 ºC por possuírem melhor atividade enzimática (VINCI, 2003). Com o aumento da temperatura, a atividade enzimática aumenta até certo ponto a partir do qual ocorre desnaturação irreversível das estruturas proteicas. Por outro lado, à medida que a temperatura abaixa, ocorre inativação das enzimas e o metabolismo celular diminui gradualmente levando à inibição do crescimento celular ao cessar das reações bioquímicas (OKAFOR, 2007; ATCC-B, 2010).

13. 2. **pH**

O crescimento e sobrevivência da cultura celular é influenciado pelo pH do meio de cultura e cada espécie tem a capacidade de crescer dentro de um intervalo (mínimo, ótimo e máximo) específico (VINCI, 2003; ZHANG *et al*., 2011). O pH de uma cultura geralmente diminui à medida em que as células vão consumindo o substrato, devido a produção de ácido lático (HANSON *et al*., 2007). Assim, as alterações no pH do meio podem inibir o crescimento celular, pois as células perdem a viabilidade entre o pH 6,5 e o 6. Contaminações também diminuem o valor do pH, e consequentemente alteram a coloração do meio, que vai do vermelho, alaranjado e, posteriormente,

amarelo (solução turva), sendo necessário a troca do meio (FRESHNEY, 2005; MIRJALILI, 2005; SIGMA, 2008; ATCC, 2014).

Para evitar grandes variações de pH mantendo-o entre 7.2 a 7.7, intervalo de maior expressão do crescimento celular, os meios de cultura contêm tampões, tais como sais de ácidos fracos, sais de bases fracas ou aminoácidos, peptonas e proteínas (tampões naturais) (OLIVEIRA, 2009).

13.3. **Atmosfera gasosa**

As células animais necessitam do oxigênio livre (O_2) para executarem o processo de respiração celular, reoxidação de coenzimas na glicólise e ciclo de Krebs, apresentando uma grande diversidade em seu uso, o que reflete as diferenças nos sistemas enzimáticos bioxidativos da respiração (SILVA, 2012). A taxa de consumo de oxigênio é um fator importante para o aumento de escala em culturas celulares, uma vez que seu suprimento afeta diretamente o metabolismo das células e consequentemente a formação de bioprodutos, além de servir de parâmetro para estimar a quantidade de células viáveis (FLEISCHAKER, 1981; BLANCH *et al*., 1996).

O dióxido de carbono (CO_2) 5 % também é de suma importância em cultura de células animais por ajudar a manter o pH do meio estável (entre 7 e 7,6) agindo como um tampão, regulando o pH e a quantidade de íons HCO_3^- (FRESHNEY, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2013; MICROCARRIER – GE, 2013). Assim, é necessária a troca gasosa entre o meio cultivado e o CO_2 da estufa incubadora, onde as células são armazenadas. Algumas garrafas de cultura possuem abertura para ventilação na tampa, sendo as que não possuem colocadas na estufa com a tampa um pouco desenroscadas (RYAN, 2008). Os frascos de cultivo devem ser mantidos em estufa a 37º C, contendo umidade acima de 95%. Dependendo da linhagem ou do meio de cultura, as células não precisam ser incubadas em estufa de CO_2. A estufa também deverá manter a humidade elevada, reduzindo as perdas por evaporação em frascos de cultura não vedados (ATCC, 2014). Já em escala maiores, com o uso de biorreatores, a transferência de oxigênio se dá através do borbulhamento de ar e agitação do meio (BRANCO, 2010).

15. **Locais de cultivo de células de mamíferos**

15.1. **Escala laboratorial**

Diversos tipos de recipientes são utilizados para a cultura de células, sendo os mais comuns os frascos do tipo T, as placas de petri e as placas de poços (FERREIRA, 2011; MICROCARRIER - GE, 2013). No geral, consistem em sistemas de cultivo estáticos utilizados principalmente para o cultivo de células aderentes em escala laboratorial (ALMEIDA *et al.*, 2013). Normalmente são de poliestireno, podendo ser ventiladas ou não. A figura 6 ilustra os frascos de cultivo do tipo T.

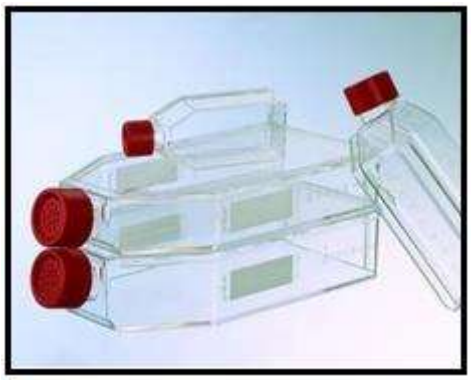


Figura 6: Frascos tipo T para cultivo celular em sistema estático. Fonte: CELLSTAR Cell Culture Flasks with Filter Cap, Sterile, Greiner Bio One.

Estes recipientes devem ser mantidos dentro da incubadora com temperatura, umidade e atmosfera de CO_2 controladas (DOYLE, 1999). Entretanto, o cultivo de células nestes recipientes apresenta, no geral, rendimento limitado pela superfície de adesão celular, sendo inviável a sua utilização em escala industrial devido ao grande número de recipientes necessários para alcançar a quantidade requerida de células para a produção e das excessivas manipulações exigidas que aumentam o risco de contaminação, tornando o sistema oneroso e desgastante quanto ao manuseio (DOYLE, 1999; WARNOCK *et al.,* 2006).

15.2. **Escala semi-piloto**

Os frascos do tipo Spinner são sistemas de cultivo de bancada utilizados para se estabelecer as condições de cultura agitadas em suspensões e para se conhecer o comportamento celular (DOYLE, 1999; MICROCARRIER - GE, 2013). É constituido de vidro borosilicato, tendo fixado em sua tampa um eixo que, em sua outra extremidade, possui uma barra magnética para agitação da cultura (DOYLE, 1999; MICROCARRIER - GE, 2013). A tampa superior pode possuir um filtro hidrofóbico para a troca de gases entre o ambiente interno e externo que deve ser uma incubadora com temperatura, umidade e atmosfera de CO_2 controladas (DOYLE, 1999). Possui duas aberturas laterais normalmente rosqueadas utilizadas para ter acesso ao interior do frasco para a manutenção da cultura. A figura 7 ilustra o frasco Spinner:



Figura 7: Frasco Spinner. Fonte: Disposable Spinner Flasks, Corning (*on line*).

Porém, este sistema não possibilita trabalhar com grandes volumes por problemas de oxigenação, nem um controle efetivo sobre a cultura e por isso não é de interesse industrial (ALBERTS, 2010; MICROCARRIER - GE, 2013).

15.3. **Escala industrial**

Os biorreatores são sistemas de cultura celular e microbiana mais elaborados que possibilitam o monitoramento sobre as variáveis de cultivo e maior controle em um ambiente adequado ao crescimento, empregados nas indústrias para a produção em maior escala (THOMASI, 2010). Isso se deve, em parte, aos sensores instalados que

verificam o pH do meio de cultivo, a temperatura, a velocidade de agitação, a concentração de oxigênio e CO_2 dissolvidos, a presença de espuma, entre outras variáveis determinantes no cultivo (ALMEIDA *et al.*, 2013; SMITH, 2014).

Existem diferentes tipos de biorreatores, sendo possível classificá-los como mostra a figura 8 a seguir:

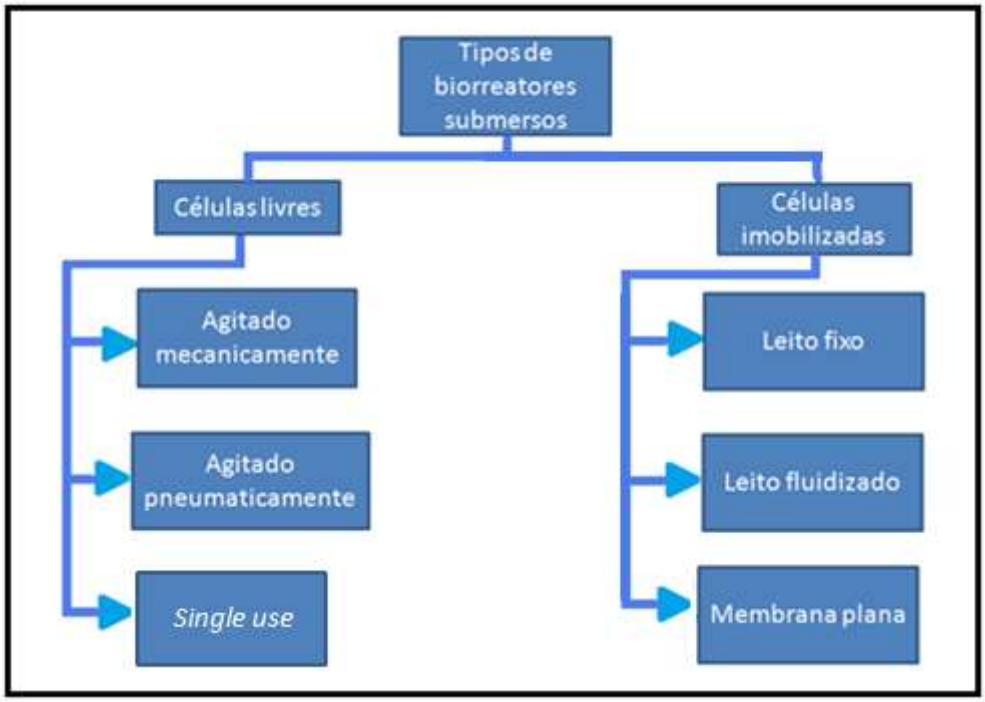


Figura 8: classificação dos biorreatores. Adaptado de FRESHNEY, 2006; SCHMIDELL, 2011.

Dentre os principais tipos de biorreatores utilizados industrialmente para a cultura de células animais encontra-se o biorreator de tanque agitado (STR – do inglês Stirred tank) mecanicamente por hélice e o pneumático (*airlift, por exemplo)*, agitado pelo fluxo de ar (bolhas) (KRETZMER, 2002; WARNOCK *et al.,* 2006; THOMASI, 2010).

São amplamente utilizados para culturas de células animais em suspensão, mas também podem ser cultivadas linhagens de células dependentes de ancoragem, utilizando-se de suportes sólidos, tais como os microcarregadores (MENDONÇA *et al*., 1995; FRAZZATI-GALLINA *et al.*, 2001; WARNOCK *et al.,* 2006; ALMEIDA *et al.*, 2013). Microcarreadores diminuem a razão de volume para a densidade de células, aumentando sua produção em maior escala, pois, além de garantir um aumento considerável da área para crescimento também reduz a exigência de meio de cultura e os riscos de contaminação, além de possibilitar uma alta concentração de células e de produto (MICROCARRIER - GE, 2013).

O biorreator (STR) consiste basicamente em um tanque cilíndrico com agitação mecânica via turbinas que podem ser de diferentes formatos, dependendo da finalidade do cultivo. São os mais empregados no cultivo de células animais suspensas em larga escala, podendo variar de 2 a 10.000 litros, devido a facilidade no aumento de escala, facilidade de homogenização e elevado custo-benefício (CHU *et al*., 2001).

Os biorreatores agitados pneumaticamente se caracterizam pela ausência do agitador mecânico, sendo a agitação efetuada pelo borbulhamento de um gás (normalmente ar) no biorreator, cuja indicação é para o cultivo de células que possuirem menor resistência às tensões de cisalhamento (CHICO *et al.,* 2008; CERRI, 2009; THOMASI, 2010). Entretanto, de acordo com (THOMASI, 2010) a velocidade de cisalhamento encontrada em biorreatores pneumáticos são maiores que os valores encontrados nos de tanque agitado mecanicamente, contradizendo a afirmação anterior. Iso se deve ao fato de algumas células acabarem se aderindo as bolhas de ar que, por densidade, sobem para a superfície e estouram gerando tensões cisalhantes que as rompem (MA *et al*., 2004).

Atualmente se busca desenvolver biorreatores de uso único (*sigle use*) que consistem em bolsas estéreis de plástico flexível e descartáveis posicionadas sobre uma plataforma móvel agitada que gera ondas de vibração que permitem a eficiente transferência de oxigênio e homogenização do meio, sem necessidade de turbinas ou

bolhas (SILVA, 2012). Estes biorreatores apresentarem maior flexibilidade e aeração do meio de cultura, ainda assim com menor custo, risco de contaminação e cisalhamento hidrodinâmico quando comparados com outros biorreatores (SHUKLA *et al*., 2010; CHON, 2011; LÖFFELHOLZ *et al*., 2014; OBOM *et al*., 2014).

Os biorreatores de leito fluidizado utilizam microcarregadores para imobilizar as células e são fluidizados devido a circulação do meio de cultivo que ocorre por perfusão devido a injeção de ar, gás inerte ou pela recirculação do líquido do biorreator (WARNOCK *et al.,* 2006; MICROCARRIER - GE, 2013). Já nos biorreatores de leito fixo não há movimentação dos microcarreadores (MAESTRI, 2007).

Os biorreatores de membranas planas e de fibra oca, que mantem as células confinadas, as quais permitem o fluxo de líquido (nutrientes e produtos), mas não o das células, preveêm a separação entre fluxos de nutrientes e produtos metabólicos, o que permite uma primeira operação de separação do produto desejado, contribuindo para o processo de purificação final do produto (SILVA, 2012).

16. **A ampliação de escala na cultura celular**

A ampliação de escala em bioprocessos (*scale-up*) é fundamental no desenvolvimento de processos biotecnológicos industriais, tornando-se um desafio para a bioengenharia de culturas de células de mamíferos que são, geralmente, mais vulneráveis aos efeitos da ampliação de escala do que as culturas microbianas (WARNOCK *et al.,* 2006; BRANCO, 2010; MANDENIUS *et al.,* 2012). Os grandes desafios ao se escalonar um bioprocesso são garantir a reprodutibilidade da cultura, compreender e simular os mecanismos que governam a fisiologia celular, com suas características biofísicas e bioquímicas dos respectivos produtos (ALMEIDA *et al.,* 2013; KAMI *et al*., 2013).

Quando a cultura de células se faz necessária em grande escala é preciso monitorar parâmetros como temperatura, pH, níveis de transferência de gases como o O_2 e o CO_2, dentre outros (MICROCARRIER - GE, 2013). Cabe a profissionais competentes como o engenheiro de bioprocessos projetar biorreatores que permitam controlar o cultivo e garantir o melhor desempenho da cultura. Tais necessidades

ampliam o uso de biorreatores cada vez mais sofisticados, como os em microescala, que usam técnicas precisas de microfluidica, e os robóticos que utilizam plataformas automatizadas para o cultivo celular (PAGUIRIGAN *et al.*, 2009; KAMI *et al*., 2013). Para isso, deve-se atentar às especificidades do cultivo trabalhado tais como o tipo de célula adotada e sua procedência, o tipo de agitação, as entradas e saídas no tanque de cultivo, as taxas de transferência de gases, a necessidade de aquecimento ou resfriamento, etc. (PAGUIRIGAN *et al.*, 2009; BRANCO, 2010; CARRONDO *et al.,* 2012).

Primeiramente se deve estabelecer a cultura de células em escala laboratorial (escala menor) para, em seguida, ampliá-la de modo a manter o mesmo padrão de resultados e certificar que o protocolo adotado é a melhor forma de procedimento em termos de rendimento e otimização (CARRONDO *et al.,* 2012; LI, 2015). Para o aumento de escala, a cultura em suspensão é o melhor método devido ao menor custo, facilidade de operação, menor espaço e bom monitoramento do crescimento celular (WURM, 2004; FRESHNEY, 2005; CHICO *et al.,* 2008). É preciso obter a expansão celular em cada etapa do processo que servirá como inóculo para a fase seguinte. A concentração de inóculo deve ser a mínima para diminuir a fase lag e a concentração celular máxima, previnindo a falta de nutrientes e o acúmulo de metabólitos tóxicos (ALMEIDA *et al.*, 2013). O objetivo é obter uma alta densidade celular com um alto fator de multiplicação, pois quanto maior ele for em cada etapa do escalonamento, menor será a quantidade de etapas para se alcançar a biomassa necessária (BLÜML, 2007).

O próximo passo para a ampliação de escala é o procedimento piloto (média escala) que ocorre em uma escala maior do que a realizada em bancada, com os mesmos parâmetros de controle daquele que se pretende ter na escala industrial (maior escala) de produção, sendo a fase de testes que ocorre entre o trânsito das fases laboratorial e industrial. Nessa fase se deve basear nos dados coletados no procedimento de bancada e entender o processo, mantendo um bom desempenho, visando menor custo de operação conciliado com o aumento na produção (BRANCO, 2010; SMITH, 2014).

Geralmente, antes de escalonar um bioprocesso, alguns parâmetros são inicialmente otimizados através de cultivo realizado em batelada de pequena escala como o tempo de mistura, a homogeneidade do sistema e os efeitos de tensão de

cisalhamento exercidas. Esta otimização tem de ser abordada em relação à produtividade e os rendimentos das culturas, considerando que não podem ser transferidos diretamente do volume pequeno para um maior por causa dos diferentes modos de cultivo (LI, 2015).

O aumento de escala pode ser ilustrado na figura 9 a seguir:

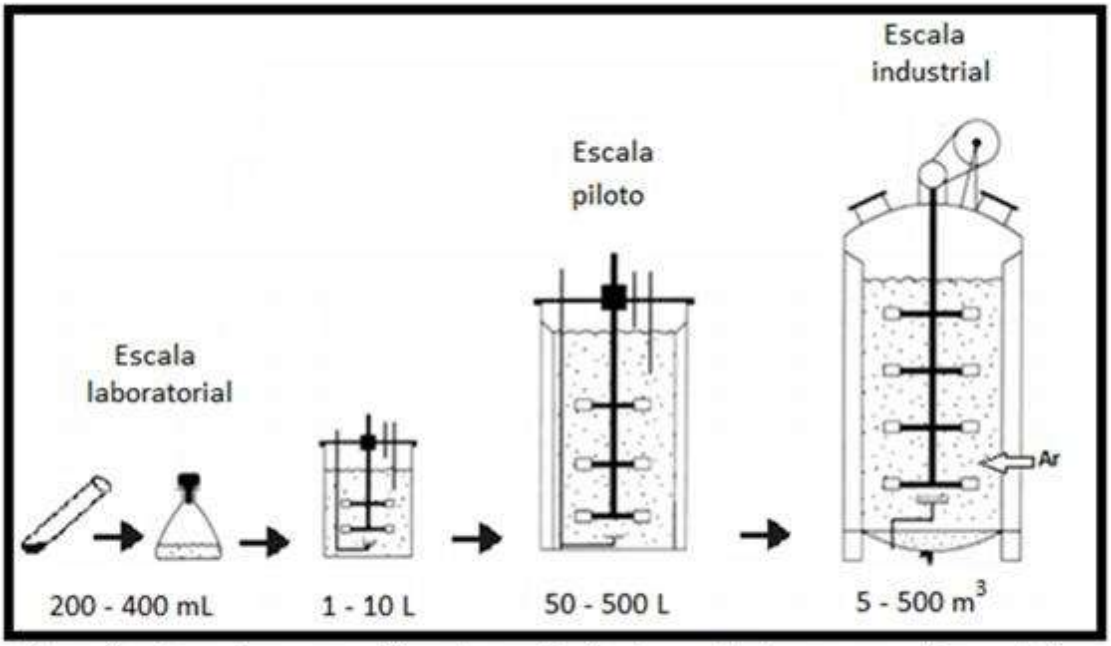


Figura 9 – Desenho esquemático da ampliação de escala de processos fermentativos
Adaptado de SCHMIDELL et *al.*,2001

Durante o escalonamento, alguns parâmetros permanecem constantes, baseados nos conhecimentos obtidos do processo, ou seja, algumas grandezas deverão ser as mesmas na escala piloto em relação à empregada na escala de bancada independente da escala de operação. Como exemplos se pode citar o pH, a temperatura, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (KLa), a velocidade na extremidade do impelidor, o tempo de mistura, a capacidade de bombeamento do impelidor, o número de Reynolds e a pressão parcial (SCHMIDELL, 2001; BRANCO, 2010).

Por outro lado existem certos parâmetros que são dependentes da escala de operação, como a taxa de agitação e aeração, a taxa de transferência de massa gás-líquido (O_2 e CO_2), a transferência de temperatura e o estresse hidrodinâmico submetido às células devido a agitação e bolhas (CACCIUTTOLO *et al.,* 2001; XING *et al*., 2009; MANDENIUS *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2013).

Os cultivos de células aeróbias ou aeróbias facultativas, assim como o de microrganismos, são processos que exigem um dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio eficiente para que ocorra a dissolução do oxigênio contido na fase gasosa para a fase líquida, de onde as células possam consumi-lo para a respiração (SCHMIDELL, 2001; BRANCO, 2010). A obtenção de elevadas concentrações do produto desejado depende enormemente da capacidade de se transferir o O_2 para a fase líquida, especialmente nos instantes mais avançados do processo, onde a concentração celular pode ser elevada (THOMASI, 2010). Tal transferência de oxigênio é um coeficiente denominado Kla que influencia diretamente na solubilidade do oxigênio na fase líquida, influenciado pelas condições operacionais como a agitação e as propriedades físico-químicas do meio como a viscosidade. Uma das formas de transferir oxigênio é através do borbulhamento direto de ar e da agitação do meio de cultivo (BRANCO, 2010). Uma agitação ineficiente pode resultar em um pH não homogêneo, concentração de nutrientes e metabólitos tóxicos devido à formação de microambientes (ALMEIDA *et al.*, 2013).

A má distribuição de oxigênio inserido no meio de cultura pode formar uma zona de alimentação preferencial em pontos específicos do biorreator que se caracteriza por uma elevada concentração de glicose ligada a uma alta atividade metabólica com concentrações celulares elevadas, afetando o fluxo através das vias bioquímicas, levando a diferentes rendimentos do produto (SHI *et al.*, 2010; LEMOINE *et al*., 2015; LI, 2015).

17. **Ampliação de escala através dos biorreatores**

A produção da cultura de células pode ser aumentada tanto por escala, com volumes maiores, quanto pela intensificação do processo, com volumes menores, mas com densidades celulares mais elevadas (MICROCARRIER, 2013).

A concepção e construção de biorreatores de cultura de células envolve questões de aumento de escala. Para isso, primeiro se deve considerar o produto a ser expresso e definir as necessidades de cada tipo de linhagem celular, buscando não alterar a capacidade das células de crescer e expressar produtos. Geralmente, os

principais componentes do biorreator, tais como impulsores, chicanas, aspersores e trocadores de calor são dimensionados com base nas experiências e descrições das propriedades desses elementos, baseado no tempo de escoamento necessário para atingir a mesma taxa de conversão encontrada em menor escala, da produção pretendida, das variáveis de composição (reagentes, solventes, catalisadores, aditivos, inerte), do regime de temperatura e pressão, da agitação (taxa de cisalhamento) e de outros aspectos como design, tipo de bombeamento, troca de calor, ventilação, segurança, dentre outros (SILVA, 2012). A variável de projeto usada normalmente é a razão entre a taxa de volume de fluxo e a potência do biorreator, que coincide com o tempo de residência médio, quando a densidade da mistura permanece constante (SCHMIDELL, 2001).

Para dimensionar um biorreator é preciso realizar a modelagem matemática do cultivo celular, representando-o por meio de equações. Se deve calcular a taxa de conversão do substrato em biomassa, os balanços molares, a taxa de crescimento celular, seguindo a estequiomentria da reação, a transferência de massa e energia do sistema, associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações se processam, considerando a todas as reações como ideais (DOYLE, 1999; CARRONDO *et al*, 2012; MICROCARRIER, 2013).

Biorreatores geralmete são feitos de vidro ou aço inoxidável, pois suportam serem autoclavados a uma temperatura de 121 ° C durante 15 a 30 minutos ou aceitem receber vapor para esterilização (QIN, 2014). O mais utilizado é o de aço inox de formato cilíndrico com bordas arredondadas e fundo côncavo para melhor escoamento do meio de cultura e melhor aeração (para culturas aerôbicas) e agitação. Um dos típicos modos de se homogenizar o meio de cultura e aerá-lo é com a injeção de um fluxo de ar a uma determinada pressão, ou com o movimento de uma hélice no interior do frasco de cultivo. O ar que entra no sistema é esterilizado ao ser forçado a passar através de uma membrana porosa (WARNOCK *et al.,* 2006).

O tamanho do biorreator depende da necessidade do cultivo. Geralmente, possuem duas entradas de reagentes na face superior, uma manta de aquecimento fixada na parede externa do tanque envolta por uma camisa de isolamento térmico, a fim de minimizar as perdas de calor por dissipação, sensores de temperatura, pH,

gases, e pressão localizados no interior do tanque de cultivo, chicanas, hélices, motor e aspersor, integrando o sistema de monitoramento e controle que será efetuado por um Controlador Lógico Programável (CLP). A figura 10 a seguir ilustra um biorreator (STR) e seus principais constituintes.

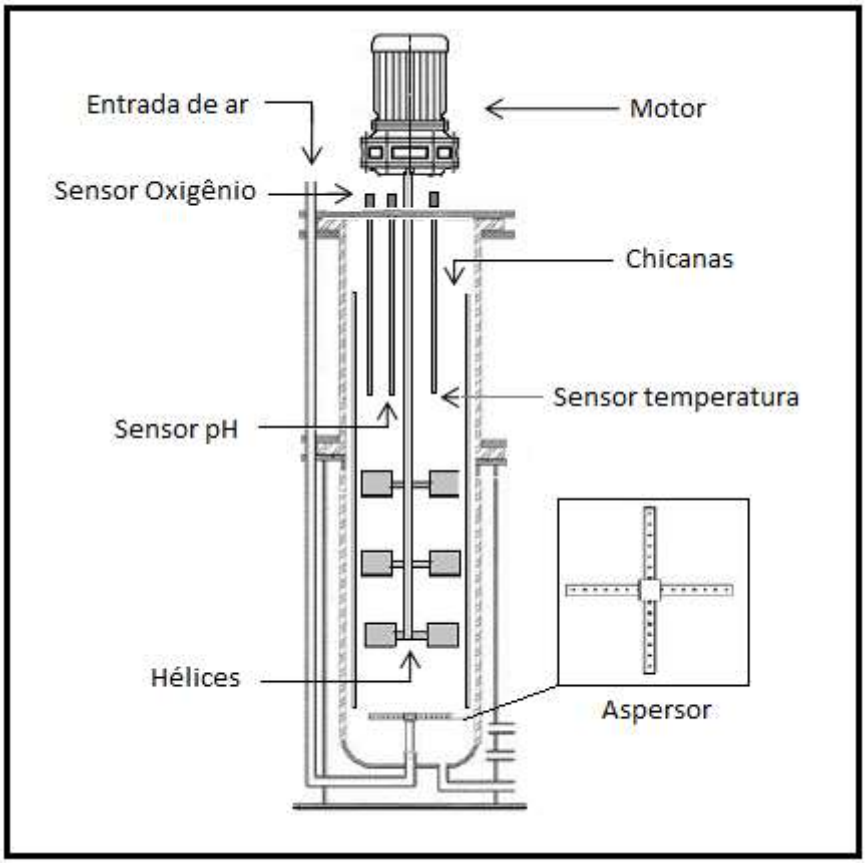


Figura 10: Ilustração do biorreator do tipo agitado e aerado mecanicamente. Adaptado de BRANCO, 2010; JCT Machinary (*on line*).

Inicialmente, para um biorreator agitado e aerado mecanicamente, conforme ilustra a figura 9, deve-se estabelecer qual o volume de trabalho do tanque e medir os diâmetros do tanque e do impelidor (turbinas ou hélices). Na construção destes biorreatores, de um modo geral, é preconizada a relação altura/diâmetro de 2:1 a 3:1. Tal biorreator, geralmente, utiliza duas turbinas de 6 pás planas para agitação do meio de cultura com espaçamento entre as turbinas pré-determinado de acordo com o diâmetro do impelidor. Já a altura do líquido no biorreator é calculada baseada no volume de meio de cultura reacional definido para o processo fermentativo e o diâmetro do tanque (BRANCO, 2010).

BRANCO (2010) ainda afirma que o biorreator também pode ser equipado com quatro chicanas (*buffles*) equidistantes, diametralmente opostas, posicionadas a 90 graus em relação à parede a fim de evitar a formação de vórtice devido a rotação do meio de cultivo e assim lesionar as células.

Existem algumas prioridades comuns relacionados ao aumento de escala em cultura de células realizado em biorreatores, como manter o volume da cultura homogêneo, proporcionar uma transferência de calor e gases eficientes, possibilitar uma agitação adequada e evitar contaminações (WARNOCK *et al.,* 2006). Todas estas necessidades devem ser bem controladas por serem chave no processo e poderem facilmente passar a ser problemáticas na cultura. A agitação e a aspersão de gases, por exemplo, podem produzir tensões cisalhantes que rompem as células animais, que são mais frágeis por não possuirem parede celular. Como forma de sanar tal problemática os engenheiros estudam formatos diversificados para os impelidores ou o uso de substâncias como a dextrana, inoculadas no meio de cultivo para proteger as células, por alterar a tensão superficial (CERRI, 2009). O tipo de fluxo do processo também deve ser analisado, podendo ele ser em batelada (conforme visto nos biorreatores de bancada), semi-batelada ou contínuo.

A produção em batelada ocorre quando o meio de cultura e as células a serem cultivadas são adicionadas no biorreator em uma única etapa do processo. Após aguardar o tempo de produção (residência), retira-se o produto formado (células duplicadas e/ou produtos por elas produzidos) e, em seguida, se executa as operações unitárias para a recuperação desse produto (VINCI, 2003). Com o fim de cada batelada o biorreator é esterilizado, para só depois receber um novo inóculo, evitando a contaminação. Entretanto, a cultura em batelada pode apresentar baixos rendimentos devido ao fato do substrato ser adicionado de uma só vez no início da cultura de células, podendo inibir o crescimento por repressão pelo excesso de substrato ou desviar o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO *et al*., 2001).

Uma alternativa para contornar essa limitação é alimentar o biorreator com o substrato ao longo do processo sob condições controladas através do processo de batelada alimentada (VINCI, 2003). Assim, os nutrientes são adicionados de forma controlada durante a cultura evitando que o metabolismo celular seja deslocado para

uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO *et al*., 2001). Já os produtos gerados permanecem no biorreator até o final do cultivo.

Nos biorreatores contínuos a alimentação do meio de cultura e dos nutrientes é realizada de forma contínua e constante, assim como o volume de reação que também se mantem constante pela retirada contínua dos produtos gerados (FACCIOTTI, 2001).

Nos três tipos de fluxo do processo citados o sistema deve atingir a condição de estado estacionário ou regime permanente, na qual as concentrações de células, de substrato limitante e de produto permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema. Para isso, deve-se manter constante o volume de líquido no biorreator (FACCIOTTI, 2001).

O alto rendimento em processos envolvendo o cultivo de células animais está, em geral, associado a alta concentração celular que é obtida através dos cuidados específicos de cada linhagem celular. Para isso, profissionais como os engenheiros de bioprocessos tem o desafio de desenvolver novos biorreatores que possibilitam o monitoramento e controle do cultivo de células mais preciso para cada tipo de célula, através de tecnologias mais efetivas, conciliando o conhecimento dos bioprocessos (modelagem cinética e transferência de massa) com o ajuste dos parâmetros de cultivo relacionados a cinética celular, fenômenos de transporte, otimizações de meios de cultivo, incremento das taxas de transferência de oxigênio, além da recuperação, separação e purificação de bioprodutos por meio de técnicas de seleção de células, bioinformática, biossegurança, dentre outras. A multi-disciplinaridade permite tal profissional atuar na otimização, análise de custo e manutenção de processos de cultivo de células animais, na purificação dos produtos obtidos, assim como no desenvolvimento e ampliação de escala de biorreatores e de equipamentos destinados a este fim (FREIRE *et al.,* 2005).

18. **Conclusão**

A demanda biotecnológica atual exige o aprimoramento da cultura de células animais não só na escala laboratorial, mas também industrial. Cada tipo de linhagem possui cuidados particulares, sendo assim, compreender a fisiologia das células, suas

exigências nutricionais, fisiológicas e limitações, tanto na manutenção quanto na expansão (repique) se tornaram importantes para o sucesso da técnica em grande escala. Os desafios atuais da ampliação da cultura exigem técnicas e protocolos mais padronizados e bem elaborados, trazendo a melhor forma de cultivo, cuidados com contaminação e melhor desempenho dos biorreator adotados.

De modo a lidar com estas questões relacionadas ao cultivo de células em grande escala, o engenheiro de bioprocessos lida com temáticas envolvendo a engenharia metabólica em uma combinação de métodos analíticos para a quantificação de fluxos metabólicos e o seu controle, que permitem identificar e sanar as possíveis limitações que restringem a produção de bioprodutos. Assim, tal profissional pode estar presente em todas as etapas do desenvolvimento de um bioprocesso, desde a sua concepção até a obtenção do produto final, ou seja, desde a a definição da linhagem celular mais adequada até nas decisões sobre as etapas de purificação e recuperação do bioproduto.

Referências bibliográficas

ALBERTS, B.; JOHNSON A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª edição, Artmed, Porto Alegre, 2010.

ALMEIDA, A. G. de. **Desenvolvimento de protocolo passível de ampliação de escala para a propagação de células vero em microcarreadores**. Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de tecnologia em imunobiológicos.Rio de Janeiro, 2013.

ALTAMIRANO, C.; GÓDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas in vitro. In: Moraes, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Editora Roca, p. 81-104, 2007.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Capítulo 5: Cultivo celular. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Vol 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, p. 215-253, 2010.

AMARAL J. B.; SANTELLI, G. M. M. **A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen**. Departamento de biologia celular e do desenvolvimento, Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo. Rio Claro, v.34, p. 1-20, 2011.

ATCC, **Animal cell culture guide. tips and techniques for continuous cell lines**. 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110, CB-0813-03, 2014. Disponível em: <http://www.atcc.org/en/Guides/Guides.aspx.>. Acesso em: 05/07/15.

ATCC, **Authentication of prokaryotes at ATCC.** Technical Bulletin no. 5. American Type Culture Collection. TB-0711-0-02), 2011. Disponível em: <https://www.atcc.org/~/media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb05.ashx.>. Acesso em: 05/07/15.

ATCC - A, **Cell Line Verification Test Recommendations**. Technical Bulletin no. 8. American Type Culture Collection. TB-0111-00-02, 2010. Disponível em: <https://www.atcc.org/~/media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb08.ashx>. Acesso em: 05/07/15.

ATCC - B, **Cryogenic Storage of Animal Cells.** Technical Bulletin no. 3. American Type Culture Collection (ATCC). TB-0910-0.1-02. University Blvd. Manassas, VA 20110, 2010. Disponível em: <https://www.atcc.org/~/media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb03.ashx>. Acesso em: 04/08/2015.

ATCC - C, **Guide to subculturing cell line monolayers.** Technical Bulletin no. 4. American Type Culture Collection. TB-0910-0.1-02. 10801 University Blvd.

Manassas, VA 20110, 2010. Disponível em: <http://www.atcc.org/en/Guides/Guides.aspx>. Acesso em: 05/07/15.

ATCC - D, **Passage number effects In cell lines.** Tech Bulletin. No. 7. American Type Culture Collection. University Blvd. Manassas, VA 20110, 2010. Disponível em: <https://www.atcc.org/~/media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb07.ashx>. Acesso em: 05/07/15.

AUGUSTO, E. F. P.; OLIVEIRA, M. S. Processos com células animais . In: SCHMIDELL, W. et al. (Ed.). Biotecnologia industrial. São Paulo: Edgar Blucher Ltda., v. 3, cap. 24, p.547-582, 2001.

BERNARDI, T. L. **Técnicas moleculares para a caracterização de Saccharomyces cerevisiae.** Associadas à produção de cachaça. Lavras, Minas Gerais, 2007.

BESTA, I. N. N. C. **Detection of Contaminants in Human Cell Culture**. L. P. f. H. C. Culture. Marina Mora, EuroBio Bank, 2004.

BLUNCH, H. W.; CLARCK, D. S. Biochemical Engineering. Marcel Dekker: New York, 1996.

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

BRANCO, L. S. C. **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de rhodotorula sp. cnpat02 em processo batelada para obtenção de carotenóides**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

BRETAS, R. M. **Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais.** Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Pós-Graduação em Tecnologia em Imunobiológicos. f. 123-134 Rio de Janeiro, 2011.

BRUCE, A.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER**. Molecular Biology of the cell**. Fourth edition. New York and London, Garland Science, 2002.

BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, SCHÖFFL, H. H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G.; **Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database.** Interfaculty Institute for Cell Biology, Dept. of Immunology, Tübingen, Germany; Vienna, Austria, 2009.

BRYAN, T. M.; ENGLEZOU, A.; GUPTA, J., BACCHETTI, S.;REDDELL, R. R. **Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity**. The EMBO Journal vol.14 no.17 pp.4240-4248, 1995.

BUTLER, M., **Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals**. Appl. Microbiol. Biotchnol., v,68, p.283-291, 2005.

BUTLER, M.; SPEARMAN, M. **The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering**. Current Opinion in Biotechnology, 2014.

CACCIUTTOLO M.A.; 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.

CARRONDO, M. J. T.; ALVES, P. M.; CARINHAS, N.; GLASSEY, J.; HESSE, FRIEDEMANN, MERTEN, O.; MICHELETTI, M.; NOLL, T.; OLIVEIRA, R.; REICHL,U; STABY, A.; TEIXEIRA, A. P.; WEICHERT, H.; MANDENIUS, C. **How can measurement, monitoring, modeling and control advance cell culture in industrial biotechnology?** Biotechnol. J., 2012.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua Alimentada** 2001b In: Schmidell et al Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquimica. São Paulo. Edgar Blucher, p 179-192. V.2, 2001.

VWR, Greiner Bio one, **Cellstar cell culture flasks with filter cap, sterile**. Disponível em: <https://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?product_id=8404488>. Acesso em: 07/08/2015.

CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. UFSC. São Carlos – SP, 2009.

CESARZ Z.; TAMAMA K. **Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells**, Hindawi Publishing Corporation, Stem Cells International, Article ID 837126, April, 2015.

CHEN, T. R. **In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent hoechst**. Experimental Cell Research 104, 255-262 ,33258, Medical Genetics Center, The University of Texas, Houston, USA, 1977.

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.

CHON, J. H.; ZARBIS-PAPASTOITSIS, G. **Advances in the production and downstream processing of antibodies**. New biotechnology, v. 28, p.458-463, 2011.

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

COBO F.; CORTES, J. L.; CABRERA C.; NIETO A.; CONCHA, A. **Microbiological contamination in stem cell cultures**. Stem Cell Bank of Andalucıa (Spanish Central Node), Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain, 11 March, 2007.

COIMBRA, U. **Noções básicas de cultura de células**, 2008. Disponível em: <https://woc.uc.pt/bioquimica/getFile.do?tipo=2&id=523>. Acesso em: 07/07/2015.

COLLADO, M. DEL.; SARAIVA, N. Z.; LOPES, F. L.; CRUZ, M. H.; GASPAR, R. C.; OLIVEIRA, C. S.; PERECIN, F.; GARCIA, J. M. **Efeitos da redução ou substituição do soro fetal bovino por outros compostos na maturação in vitro de oócitos bovinos.** Pesq. Vet. Bras. 34(7):689-694, julho, 2014.

CORNING, **Disposable spinner flasks**. Disponível em: <http://www.krackeler.com/catalog/product/4001/Corning-Costar-Disposable-Spinner-Flasks>. Acesso em: 02/03/15.

CRUZAT, V. F.; PETRY, E. R.; TIRAPEGUI, J. **Glutamina: Aspectos Bioquímicos, Metabólicos, Moleculares e Suplementação.** Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2009.

DORAI, H.; GANGULY, S. **Mammalian cell-produced therapeutic proteins: heterogeneity derived from protein degradation**, 2014.

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

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science, v. 130, n. 3373, p.432-7, 1959.

FACCIOTTI, M. C. R. **Fermentação Contínua**. In: Schmidell *et al*. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquimica. São Paulo. Edgard Blucher, p 179-192. V.2, 2001.

FERREIRA, T. F. **Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais – Revisão de literatura.** UFG**.** Goiânia, 2011.

FLEISCHAKER, R. J.; SINKEY, A. J. Oxygen demand and supply in cell culture. Applied Microbiology and Biotechnology,, v.12, p. 193-197, 1981.

FRAZZATI-GALLINA N.M.; PAOLI R.L.; MOURAO-FUCHES R.M.; JORGE S.A.; PEREIRA C.A. **Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers.** Journal of Biotechnology; 92(1):67-72, 2001.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA, G. L. **Engenharia Bioquímica & Biotecnologia**. Capítulo 3. p. 1-21. USP, 2005.

FRESHNEY RI. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques.** 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc, 2005.

FRESHNEY, R. I. **Basic Principles of Cell Culture. Culture of Cells for Tissue Engineering**. Editora John Wiley & Sons.Centre for Oncology and Applied Pharmacology, Cancer Research UK Beatson Laboratories, Garscube Estate, Bearsden, Glasgow G61 1BD, Scotland, UK, Cap. 1, p.3-22, 2006.

General Electric Company, **Microcarrier Cell Culture Principles and Methods**. Handbook. 18-1140.62 AB, 2013. Disponível em:< http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Microcarrier%20Cell%20Culture.pdf> Acesso em: 29/08/2015.

GENZEL Y.; FISCHER M.; REICHL U. **Serum-free influenza virus production avoiding washing steps andmedium exchange in large-scale microcarrier culture.** Vaccine. 24:3261-72, 2006.

GERAGHTY, R. J.; CAPES-DAVIS, A.; DAVIS, J. M.; DOWNWARD, J.; FRESHNEY, R. I.; KNEZEVIC, I.; LOVELL-BADGE, R.; MASTERS, J. R. W.; MEREDITH, J.; STACEY, G. N.; THRAVES, P.; VIAS, M. **Guidelines for the use of cell lines in biomedical research.** British Journal of Cancer, 111, 1021-1046,166, 2014.

GÓDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolic Engineering of Animal Cellls. Bioprocess and Biosystems Engineering. V. 24, p. 289-298, 2002.

GRAY, J. S.; BIRMINGHAM, J. M.; FENTON, J. I. **Got black swimming dots in your cell culture? Identification of Achromobacter as a novel cell culture contaminant.** Biologicals, 38, 273–277, 2010.

GRIFFITHS, J.B. **Animal Cell Products**, overview. In: SPIER, R.E. (Ed.) Encyclopedia of cell technology, New York: John Willey e Sons. V 1, p. 71-76, 2000.

HANSON, M. A. *et al*. Comparisons of optical pH and dissolved oxygen sensors with traditional electrochemical probes during mammalian cell culture. Biotechnology and Bioengineering. v.97, p. 833-841, 2007.

HARELL A.; DEKEL S.; BINDERMAN I. **Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells**. Calc Tiss Res. 22:202-207, 1977.

HAY, R. J.; MIRANDA-CLELAND, M.; DURKIN, S.; REID, Y. A. **Cell line preservation and authentication**. In: MASTERS, J. R. W. Animal cell culture – practical approach series. 3 ed. New York: Oxford University Press, p. 69-104, 2003.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. **The serial cultivation of human diploid cell strains**. Wistnr Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, Pa., USA, 1961.

HUGHES, P.; MARSHALL, D.; REID, Y.; PARKES, H.; GELBER, C. **The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?** BioTechniques 43:575-586, November, 2007.

ISHAK, R.; LINHARES, A. C.; ISHAK, M. O. G. **Biossegurança no laboratório**. Inst. Med. trop. 31 (2): 126-131, São Paulo, Abril, 1989.

JCT MACHINARY. JCT polimerização Reactor. Disponível em: <http://portuguese.alibaba.com/product-gs/polymerization-reactor-for-emulsion-resins-adhesives-making-1661492050.html > Acesso em: 15/10/15.

KAMI, D.; WATAKABE, K.; YAMAZAKI-INOUE, M.; MINAMI, K.; KITANI, T.; ITAKURA, Y.; TOYODA, M.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, A.; GOJO, S. **Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine**. BMC Biotechnology 13:102, 2013.

KRETLOW, J. D.; JIN, Y.; LIU, W.; ZHANG, W. J.; HONG. T.; ZHOU, G., BAGGETT, L. S.; MIKOS, A. G.; CAO, Y. **Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells**. Licensee BioMed Central Ltd. BMC Cell Biology 2008, 9:60 doi:10.1186/1471-2121-9-60, 2008.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. Applied Microbiology Biotechnology, v. 59, p. 135-142, 2002.

KUMAR. A.; YERNENI, L, K. **Semi-automated relative quantification of cell culture contamination with mycoplasma by Photoshop-based image analysis on immunofluorescence preparations.** Biologicals 37, 55-60 Cell Biology Laboratory, Institute of Pathology, India, October, 2008.

LEMOINE A.; MAYA M. N.; SPANN R.; NEUBAUER P.; JUNNE S. **Response of Corynebacterium glutamicum exposed to oscillating cultivation conditions in a two- and a novel three-compartment scaledown bioreactor**. Biotechnol Bioeng 112:1220–1231, 2015.

LÉO P.; GALESI A. L. L.; SUAZO C. A. T.; MORAES AM. **Células animais: conceitos básicos**. In: MORAES A. M.; AUGUSTO E. F. P.; CASTILHO L. R. (eds.). Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica. São Paulo: Roca; p. 15-41, 2008.

LI, J.; JAITZIG, J.; LU, P.; SÜSSMUTH, R. D.; NEUBAUER, P. **Scale-up bioprocess development for production of the antibiotic valinomycin in Escherichia coli based on consistent fed-batch cultivations**. Li *et al*. Microb Cell Fact 14:83 DOI 10.1186/s12934-015-0272-y, 2015.

LÖFFELHOLZ C.; KAISER S.C.; KRAUME M.; EIBL, R.; EIBL, D. **Dynamic Single-Use Bioreactors Used in Modern Liter- and m(3)- Scale Biotechnological Processes: Engineering Characteristics and Scaling Up**. Adv Biochem Eng. Biotechnol. 138:1-44, 2014.

LYNN, D. E. **Methods for Maintaining Insect Cell Cultures** USDA/ARS, Insect Biocontrol Lab, BARC-West, Bldg. 011A, Rm. 214, Beltsville, MD 20705-2350 USA, Received 15 March 2002, 20 May, 2002.

MA, N. N. et al. Quantitative studies of cell-bubble interactions and cell damage at different Pluronic F-68 and cell concentration. Biotechnol. Progr., v.20 , n.4, p. 1183-1191, 2004.

MACEDO, C. C.; Landim, F. da C. **Uso do sistema de cultivo bidimensional e tridimensional para diferenciacao de celulas-tronco espermatogoniais e inducao da espermatogenese *in vitro* em murinos**. Universidade Estadual Paulista Botucatu – SP, 2012.

MAESTRI, R. S. **Biorreator à membrana como alternativa para o tratamento de esgotos sanitários e reúso da água**. Universidade Federal de Santa Catarina.

Centro Tecnológico Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Florianópolis – SC. Março, 2007.

MANDENIUS, C.F.; BJÖRKMAN, M. **Scale-up of cell culture bioreactors using biomechatronic design**. Linköping University Post Print. Biotechnology Journal, (7), 8, 1026-1039, 2012.

MENDONÇA R. Z.; PEREIRA C.A. **High density Vero cell culture on microcarriers in a cell bioreactor.** Bioprocess Engineering. 12: 279-282, 1995.

MIRANDA, A. C. S. de; GONCALVES, C. R.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. **Padronização da técnica de eletroforese de isoenzimas para certificação de linhagens celulares,** Rev Inst Adolfo Lutz. 2011; 70(1):77-80, 2011.

MIRJALILI, A.; PARMOOR, E.; BIDHENDI, S, M.; SARKARI, B. **Microbial contamination of cell cultures: A 2 years study**. Biologicals, 33, 81-85. January, 2005.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Culture media for animal cells. In: CASTILHO, L. R. et al. (Ed.). Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy. London: Taylor e Francis Group. cap. 5. p. 111-128, 2008.

MORALES, Marcelo M. **Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica**: **mito ou realidade?** *Cienc. Cult.* vol.60, n.2, pp. 33-36. ISSN 2317-6660, 2008.

NIKFARJAM, L.; FARZANEH,P. **Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture**. Human and animal Cell Bank. Iranian Biological Resource Center, 2011.

OBOM, K.M.; CUMMINGS, P.J.; CIAFARDONI, J. A.; HASHIMURA, Y.; GIROUX, D.; **Cultivation of Mammalian Cells Using a Single-use Pneumatic Bioreactor System**. J Vis Exp (92): 52008. Exp., 2014.

OKAFOR N. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. 1a. ed. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 2007.

OLIVEIRA, B.; J. N. A. de. **Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais**. UFG. Programa de pós-graduação em ciência animal. Goiânia, 2009.

PAGUIRIGAN, A. L.; BEEBE. D. J. **From the cellular perspective: exploring differences in the cellular baseline in macroscale and microfluidic cultures.** Integr Biol (Camb).; 1(2): 182–195, 2009.

PAIS, D. A. M.; CARRONDO, M.J. T.; ALVES, P. M.; TEIXEIRA, A. P. **Towards real-time monitoring of therapeutic protein quality in mammalian cell processes.** Current opinion in biotechnology. Elsevier, 2014.

PEREIRA, I.S.O.; PONTES, P.; EÇA, L.P.; FERREIRA, A.T.; MAZZETTI, P.M.V.; SILVA, L.; SOUZA, F.C. **Protocolo piloto de separação e quantificação de células tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe**. Acta ORL , São Paulo, v.26, n.3, p.11-16, 2008.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

PROLAB – Materiais para laboratório. Disponível em: <http://www.prolab.com.br/produtos/vidrarias-para-laboratorio/camaras-de-contagem/camara-de-malassez-espelhada> Acesso em: 25/11/15.

QIN, W.; JUFENG, H. **Sterile charging device of animal cell suspension culture bioreactor.** Biological Engineering Co., Ltd. Jiangsu Luyang Electronic. CN 103911286 A, 2014.

REYNA, M.**Técnicas de estudio de líneas celulares**. Universidade de Barcelona, 2003.

ROCHA R. **O direito à vida e a pesquisa com células tronco: limites éticos e jurídicos**. 1th ed. Rio de Janeiro: Campus jurídico; 141p.2008.

RAY, J.; PETERSON, D. A.,; SCHINSTINE, M.;, GAGE, F. H.; **Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons.** Department of Neurosciences, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093-0627. Communicated by Roger Guillemin, 1992.

ROUGE, M. **Counting Cells with a Hemacytometer**. 2002 Acessado em: http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html. Visto em: 04/08/15

RYAN, F.; Mariano, J.;**How can I avoid mycoplasma contamination and other serious cell culture problems?** Bionique Testing Laboratories, 2008

RYAN, F.; **Understanding and Managing Cell Culture Contamination**. Technical Bulletin, Corning Incorporated. Life Sciences, 2008.

RYAN, J. A. **Cryogenic preservation and storage of animal cells**. Corning Incorporated. Life Sciences. Disponível em: http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/Cell_freezing_protocol.pdf. Acesso em10/09/15

SBRANA T.; AHLUWALIA, A. **Engineering Quasi-Vivo in vitro organ models.** Centro Interdipartimentale di Ricerca "E. Piaggio", University of Pisa, Italy. Adv Exp Med Biol., 2012.

SCHMIDELL W, LIMA UA, AQUARONE E, BORZANI W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Volume 2. Ed Edgard Blücher LTDA, Cap. 8 e 20. São Paulo, 2001. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/livro10/biotecnologia-industrial-vol-2-valter-borzani-1-ed-pt>. Acesso em: 09/07/2015.

SHI, B.; ZHANG, S.; WANG, Y.; ZHUANG, Y.; CHU, J.; ZHANG, S. et al. Expansion of mouse sertoli cells on microcarriers. Cell Proliferation, v.43, p.275-286, 2010.

SIGMA. **Fundamental Techniques in Cell Culture. A Laboratory Handbook**, SIGMA Laborartories. Second edition. European Collection of Cell Cultures (ECACC) and Sigma-Aldrich, 2008.

SILVA, B. G.; Avaliação de características cinéticas e metabólicas de doishibridomas para a produção de anticorpos monoclonais para tipagem sanguínea. UFSCar. São Carlos -SP. (Tese doutorado – CDD: 660.6), 2012.

SIMIONE, F. P.; **Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide.** American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Thermo Fisher Scientific, 2009. Disponível em: <https://www.atcc.org/~/media/PDFs/Cryopreservation_Technical_Manual.ashx> Acesso em: 06/09/2015.

SINHA, B. K.; KUMAR, R. **Principles of Animal Cell Culture.** International book distributing co. First Edition, 2008.

SMITH, C. **Scaling Up Your Cell cultures to Bioreactors.** Life Science Articles. Editorial Articles. July 14, 2014. Disponível em:

<http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/165203-Scaling-Up-Your-Cell-cultures-to-Bioreactors/>. Visto em: 25/10/15.

SMITH, J. E. Biotechnology Principles. Workingham: Van Nostrand Reinhold, 199 p. (Aspects of microbiology), 1985.

SOARES, R. G. P. **Protocolos de Técnicas de Biologia Molecular.** Laboratório de Farmacologia Molecular Faculdade de Ciências da Saúde – UnB, 2011.

SOUSA-HERMES, G.; SOUZA, C. O. ; PACHECO-SOARES, C. ; SILVA, N. S. **Estudo Comparativo entre Meios Sólidos em Cultura de Células Aderentes**. In: IV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação - Universidade do Vale do Paraíba, 2004, São José dos Campos. Programação e Anais de Trabalhos Completos VIII INIC e IV EPG 2004. São José dos Campos: JAC Gráfica e Editora. v. 1 , 2004.

SOUZA. F. T. S. **O efeito do micoplasma e do agente romovedor de micoplasma (MRA) sobre a medida da atividade de hidrolases lisossômicas, em culturas de fibroblastos humanos**. UFRGS. Porto Alegre, 2007.

SPADA, D. T. de A. **Detecção de bactérias do Complexo Mycobacterium tuberculosis em saliva/ muco ou escarro em Centro de Referencia Ambulatorial para Tuberculose na Cidade de São Paulo: Baciloscopia, cultura convencional e automatizada**. Universidade de São Paulo. ICB/SBIB0191, São Paulo, 2009.

SHERR, C. J.; DEPINHO, R. A. **Cellular Senescence: Mitotic Clock or Culture Shock**. Howard Hughes Medical Institute and Department of Tumor Cell Biology. Cell, Vol. 102, 407–410, Cell Press. August 18, 2000.

SHUKLA, A. A.; THOMES, J. **Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins**. Trend in biotechnology, v. 28, p. 253-261, 2010.

TAVEIRA, S. F. **Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamneto de tumores cutâneos: estudo in vitro em cultura de células tumorais.** Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.

THARMALINGAM, T. *et al*. Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells. Mol. Biotechnol. V. 39, n.2, p. 167-177, 2008.

THOMASI, S. S. **Avaliação de parâmetros de desempenho de três modelos de biorreatores pneumáticos de bancada**. Universidade Federal de São Carlos (UFSC), 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. **Crescimento microbiano**. In: TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 10.ed. São Paulo: Artmed, cap. 6, p. 156-186, 2012.

UFMG, **Repique Celular**. Departamento de Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http: //www. icb.ufmg.br/mic/diaadia>. Acesso em: 07/07/2015.

UNCHERN S. **BASIC TECHNIQUES IN ANIMAL CELL CULTURE.** Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences. Chulalongkorn University August 19-20, Bangkok. Thailand, 1999.

VALK, J. V. D.; BRUNNER, K. DE SMET, A. FEX SVENNINGSEN, P. HONEGGER, L.E. KNUDSEN, T. LINDL, J. NORABERG, A. PRICE, M.L. SCARINO, G. GSTRAUNTHALER. **Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods**. Elsevier Ltd. Toxicology in Vitro 24, 1053–1063, 2010.

VINCI, V. A.; PAREKH, S. R. **Handbook of industrial Cell Culture Mammalian, Microbial and Plant Cells.**Humana Pres. Totowa, 2003.

WALSH, G. **Biopharmaceutical benchmarks**. Nature Biotech. 21 (8): 865-870, 2003.

WARNOCK J.N.; AL-RUBEAI M. **Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells.** Biotechnology and Applied Biochemistry. 45(Pt 1):1-12, 2006.

WITKOWSKI J. A. **ALEXIS CARREL AND THE MYSTICISM OF TISSUE CULTURE**. Medical History, 23: 279-296, 1979.

WURN, F. M. **Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells**. Nature Biotecnology, v.22, n.11, 2004.

XIE, X.; HIONA, A.; LEE, A. S.; CAO, F.; HUANG, M.; LI, Z. CHERRY, A.; PEI, X.; WU, J. C. **Effects of Long-Term Culture on Human Embryonic Stem Cell Aging**. Stem cells and development. Volume 20, Number 1, 2011.

XING Z.; KENTY B. M.; LI, Z. J.; LEE S. S. **Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors**. Biotechnol Bioeng.; 103(4):733-46. Jul 1, 2009.

ZHANG, L.; PENG L.; WU, N.; LI, L. **Development of bone marrow mesenchymal stem cell culture in vitro.** Chin Med J 2012;125(9):1650-1655. Edited by HAO Xiu-yuan. Outubro, 2011.