



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAOPÉBA**

TAYSE ANDRADE RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO USO DA *Luffa cylindrica* COMO
SUPORTE PARA CULTURA DE HIBRIDOMAS.**

**OURO BRANCO-MG
FEVEREIRO - 2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL–REI
CAMPUS ALTO PARAOPÉBA**

TAYSE ANDRADE RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO USO DA *Luffa cylindrica* COMO
SUPORTE PARA CULTURA DE HIBRIDOMAS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Engenharia de Bioprocessos, da Universidade
Federal de São João del-Rei,

Orientador: Prof. Dr. Antônio Helvécio
Tótola

**OURO BRANCO–MG
FEVEREIRO - 2017**

TAYSE ANDRADE RODRIGUES

AVALIAÇÃO DO USO DA *Luffa cylindrica* COMO SUPORTE PARA CULTURA DE HIBRIDOMAS.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São João Del – Rei, Campus Alto Paraopeba, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado em: 17 / 02 / 2017

MEMBROS DA BANCA

Prof. Dr. Antônio Helvécio Tótola

Prof. Dr. José Carlos Magalhães

Prof. Dr. Edson Nucci

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos, primeiramente, de agradecer a Deus por interceder por nós, dando força e saúde para concluirmos mais essa etapa.

Agradecer também ao nosso professor orientador Dr. Antônio Helvécio Tótola por acreditar, confiar e por todo conhecimento repassado.

Agradecer aos nossos familiares por todo apoio, incentivo, força em todos os momentos difíceis do curso, e principalmente por acreditar em nós.

Agradecer a todos nossos amigos que ao longo de todo tempo estiveram presentes tanto nos momentos bons quanto nos momentos ruins e que muito contribuíram.

RESUMO

Os hibridomas fazem parte de um importante grupo de células com aplicações terapêuticas, principalmente da produção de biofármacos, diagnóstico de doenças e na tipagem sanguínea. Este trabalho teve como objetivo desenvolver o cultivo de células de hibridomas e células de mieloma utilizando a *Luffa cylindrica* como suporte para o crescimento celular. O parâmetro utilizado foi o crescimento de ambas as células no meio de cultura contendo a *Luffa cylindrica* pré-tratada. Este pré-tratamento mostrou-se necessário devido à mudança da cor da água após a fervura da *Luffa cylindrica*, a água tornou-se translúcida após a fervura. Observou-se que a célula de hibridoma cresceu em meio de cultura DMEM 20% de soro fetal bovino e mostrou-se arredondada e viável. Porém, o experimento com as células de hibridomas teve que ser interrompido devido a inúmeras quedas de energia elétrica da Universidade Federal de São João Del-Rei. Por outro lado, o experimento obteve continuidade com a célula de mieloma SP2/1 em meio de cultura DMEM 20% de soro fetal bovino utilizando a *Luffa cylindrica* como suporte sólido. Observou-se as células e elas se mostraram arredondadas e viáveis.

Palavras chave: Hibridomas; *Luffa cylindrica*; Mieloma; crescimento celular.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVOS GERAIS	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	CULTURA DE CÉLULAS	14
3.2	CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS	15
3.3	ANTICORPOS MONOCLONAIS	16
3.4	CULTURA DE HIBRIDOMAS	19
3.5	CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIA, ESTABELECIDAS E CÉLULAS TRANSFORMADAS.	20
3.6	CULTURA DE CÉLULAS ADERIDAS E EM SUSPENSÃO	21
3.7	DIFERENTES CULTURAS EM BIORREATORES	21
3.7.1	Biorreatores	21
3.8	<i>LUFFA CYLINDRICA</i>	27
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	CÉLULA UTILIZADA.....	31
4.1.1	Célula de Hibridoma.....	31
4.1.2	Célula de Mieloma	31
4.2	MANUTENÇÃO DA CULTURA	31
4.2.1	Meio de cultura DMEM.....	31
4.2.2	Manutenção de curto prazo	31
4.3	PREPARO DAS CULTURAS.....	32
4.3.1	Cultura de hibridomas	32
4.3.2	Cultura de mieloma	32
4.4	TRATAMENTO DA <i>LUFFA CYLINDRICA</i>	32
4.4.1	Tratamento para cultura de hibridomas	32
4.4.2	Tratamento para cultura de mieloma	33
4.5	MONTAGEM DOS EXPERIMENTOS	33

4.5.1	Cultura de hibridomas	33
4.5.2	Cultura de mieloma	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1	TRATAMENTO DA BUCHA.....	37
5.2	CULTURA DE HIBRIDOMA	37
5.3	CULTURA DE MIELOMA	38
6	CONCLUSÃO	42
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

Há 10.000 anos, antes mesmo de entender a biologia, o homem já utilizava os microrganismos para produção de vinhos e pães. A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais se iniciou em 6.000 a.C pelos sumérios e babilônicos. Entretanto, estes povos antigos não conheciam os mecanismos ou os organismos envolvidos no processo de fermentação, o que ficou oculto por mais de 6 milênios. Este desconhecimento perdurou até 1875, quando o cientista Louis Pasteur demonstrou que a fermentação era causada pelos microrganismos denominados leveduras. Anos depois, em 1928, um produto inovador marcou a medicina, foi a descoberta da penicilina pelo médico francês Alexander Fleming. Com a descoberta desses adventos a biotecnologia ganhou destaque e tornou-se importante e essencial em várias áreas da ciência (BRUNO, 2014; PEREIRA, 2008).

A biotecnologia é uma área que combina conhecimentos de diferentes campos e resulta em uma combinação de tecnologia e ciência. É um conjunto de atividades baseadas em conhecimento multidisciplinar, que utiliza organismos, células, organelas e moléculas, que são os agentes biológicos, para o desenvolvimento ou otimização de processos, tanto para construção de inovações quanto para resolução de problemas (BRUNO, 2014).

Desde a década de 60 do século passado, inúmeros avanços tecnológicos como a produção de anticorpos monoclonais, a metodologia do DNA recombinante e a criação de animais geneticamente modificados estabeleceram novos paradigmas científicos. Algumas destas tecnologias fizeram com que a imunologia se tornasse um ramo importante, deixando de ser descritiva para se tornar explicativa, em diferentes termos estruturais e bioquímicos (ABBAS *et al.*, 2005).

Sabe-se que o sistema imunológico é um dos mais complexos dentre os sistemas dos vertebrados. Ao serem infectados por vírus, bactérias ou parasitas o sistema imune é ativado, reconhecendo esses organismos e os eliminando. O sistema imune inato, defesa natural ou inata, é o primeiro a reconhecer e destruir organismos estranhos, é a defesa constituída pela barreira física e química do corpo, além das

células fagocíticas e células assassinas naturais. Já a defesa do sistema adaptativo, que é a defesa adquirida ou adaptativa, é composta pelos anticorpos, produzidos pelos linfócitos B (glóbulos brancos) com grande variedade de modelos moleculares e por linfócitos T, responsáveis pela regulação da resposta imunológica. Os anticorpos possuem a função específica de identificar antígenos, presentes nos organismos invasores, e são proteínas grandes também conhecidas por imunoglobulinas. Possuem o formato em “Y” e estão presentes na circulação do sangue e fluidos entre as células, ou seja, estão no lugar mais susceptível a encontrar agentes estranhos, e assim ativar o sistema imune (ABBAS *et al.*, 2005).

A partir das descobertas de Georges Koler e César Milstein em 1984, houve crescente interesse em pesquisas e produção de anticorpos, especificamente nos anticorpos monoclonais que são produzidos por linhagens de células híbridas de mamíferos. Estes anticorpos monoclonais possuem alta especificidade e reprodutibilidade reativa, e possuem aplicações como, análises de diagnósticos, reagentes de tipagem sanguíneas e análises biotecnológicas. Os hibridomas constituem na fusão de duas células, a célula de mieloma que são células que se multiplicam indefinidamente e o linfócito B, o resultado desta fusão é uma célula secretora de anticorpos monoclonais com alta especificidade ao antígeno de interesse e capaz de se multiplicar indefinidamente em meio de cultura apropriado (KOHLENER *et al.*, 1975; REICHERT *et al.*, 2005).

Desde os anos 90 foi observada a predominância da utilização de anticorpos monoclonais em diversos procedimentos, com crescente interesse pela utilização de formas humanizadas desses anticorpos, diminuindo a chance de imunogenicidade quanto ao uso destas moléculas “*in vivo*”. Entre os anos de 2010 – 2014 observou-se que entre os 54 biofarmacêuticos aprovados, 27% eram de anticorpos monoclonais. Isso demonstra a relevância e a aplicabilidade das células de hibridomas e sua importância na biotecnologia (WALSH, 2014).

Nos países desenvolvidos como EUA, Japão e vários países da Europa já existem plantas industriais instaladas para a produção de hibridomas e produção de

anticorpos monoclonais. No Brasil existem pesquisadores capazes de utilizar a tecnologia de fusão de células para a obtenção de hibridomas, mas o domínio do conhecimento para o desenvolvimento de Bioprocessos para a produção em larga escala ainda é muito incipiente. Para que este objetivo seja alcançado, são de suma importância estudos em escala laboratorial conciliado com conhecimento e inovação tecnologia (WALSH, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho é acompanhar o crescimento de cultura de células de hibridoma e mieloma usando a *Luffa cylindrica* como suporte sólido.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o crescimento de células de hibridomas pelo microscópio com a *Luffa* como matriz de suporte.
- Analisar o crescimento da célula de mieloma pelo microscópio usando a *Luffa* como matriz de suporte em diferentes condições de cultura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultura de células

No princípio do século XX se iniciou o cultivo de células animais “*in vitro*” como forma de avaliar o crescimento celular fora do organismo vivo. Os primeiros cultivos consistiam em cultivar tecidos fragmentados mecanicamente em frascos contendo os fluidos dos animais de onde provinham os tecidos. Essa técnica foi denominada de cultivo de tecidos e atualmente é usada genericamente para cultivo de célula, tecidos e órgãos (MOLINARO,2009).

Em 1907, Ross Harrison relatou pela primeira vez o crescimento e manutenção de células em suspensão do sistema nervoso por 30 dias, provando que as fibras nervosas são compostas por células nervosas. Durante o experimento, Harrison tentou mimetizar as necessidades básicas de uma célula e as condições assépticas. (MOLINARO,2009).

Tendo como base os experimentos de Harrison, Alexis Carrel em 1912 realizou o cultivo de células cardíacas de embrião de galinhas, onde demonstrou que a troca de nutrientes é essencial para manutenção das células em cultura por um período maior. Já Gerorge Gey, em 1951 estabeleceu o cultivo de uma linhagem de células de tecido tumoral humano chamada de HeLa, sendo a mais utilizada até hoje. A partir de então os cientistas passaram a se interessar por esta área e assim foi introduzido o uso de cultura de células em inúmeras pesquisas (MOLINARO,2009).

Atualmente a cultura celular é definida como um conjunto de técnicas que permite a manutenção de células ou tecidos “*in vitro*” sob condições controladas de pH, temperatura, oxigenação e nutrientes básicos. Uma vez disponibilizados estes nutrientes básicos, como por exemplo, sais inorgânicos, aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas e glicose, as células podem se adaptar as condições “*in vitro*” e passam a sintetizar os outros nutrientes necessários ao seu desenvolvimento (KRETZMER, 2002).

O cultivo “*in vitro*” possui algumas desvantagens relacionadas à perda de características durante seu desenvolvimento. A principal delas é a perda da adesão célula-célula, alterando características da heterogeneidade e arquitetura tridimensional do tecido “*in vivo*”. Contudo, o cultivo celular “*in vitro*” também possui vantagens, uma vez que pode ser utilizado como modelo experimental substituindo o uso de animais, o que favorece um maior controle das condições de cultura e homogeneidade das amostras além da redução de custos (KRETZMER, 2002).

3.2 Cultura de Células de mamíferos

O cultivo de células de animais teve início no final do século XX com a tentativa de manter pedaços de tecidos em plasmas por dias ou semanas, porém não obteve sucesso devido à qualidade do meio de cultura utilizado e as condições estéreis dos experimentos (KRETZMER *et al.*, 2002).

A cultura de células de mamíferos é limitada em vários aspectos, entre elas destacam-se o tamanho da célula e a ausência de parede celular rígida. Essas particularidades tornam estas células sensíveis e vulneráveis para trabalho, isso ocorre devido a forças mecânicas a que elas podem ser expostas (KRETZMER, 2002).

Outro aspecto de dificuldade é o crescimento em biorreatores com agitação mecânica, uma vez que a agitação inibe esse crescimento. Células em suspensão nestes reatores podem ser danificadas pela presença das bolhas de ar na superfície do líquido e a velocidade de drenagem do filme em torno da interface gás-líquido (PAPOUTSAKIS, 1991).

Apesar dessas dificuldades, as células de mamíferos possuem a vantagem de permitirem a síntese de produtos que não seriam possíveis por meio de microrganismos. Para manter suas funções biológicas, muitas proteínas precisam passar por uma série de modificações pós-traducionais, que os microrganismos não são capazes de realizar, como por exemplo, glicosilação, fosforilação e carboxilação (MAINS *et al.*, 1987).

Atualmente, a capacidade de manipulação desse tipo de cultura se expandiu amplamente. A aplicação bem sucedida desta tecnologia possibilita a produção, por exemplo, de proteínas terapêuticas e complexas e tem despertado crescente interesse das empresas biotecnológicas (PAVLOU *et al.*, 2005; REICHERT *et al.*, 2005).

3.3 Anticorpos monoclonais

Imunoglobulinas ou anticorpos são proteínas produzidas naturalmente pelo sistema imunológico sintetizado pelas células do linfócito T em resposta à exposição a moléculas estranhas, que são denominados antígenos. Estes antígenos possuem os epítomos, que são porções menores e bem definidas dos antígenos reconhecidos pelo sistema imunológico. Anticorpos que reconhecem mais de um epítomo são classificados como anticorpos policlonais, ou seja, são populações heterogêneas de anticorpos que identificam diferentes antígenos utilizando diferentes receptores. Por outro lado, anticorpos monoclonais reconhecem apenas um epítomo, sendo de especificidade única. Por deste reconhecimento, o sistema imune desenvolve a resposta humoral, assim as células B se ativam e se diferenciam liberando anticorpos de mesma especificidade (ABBAS *et al.*, 2005; MURRAY *et al.*, 2014).

Os estudos sobre o reconhecimento individual de epítomos iniciou-se em 1975 com os pesquisadores Jerne, Milstein e Köhler, que descobriram os anticorpos monoclonais. Estes anticorpos são produzidos por células híbridas obtidas a partir da fusão de células B de mamíferos e de células de mieloma. Esta descoberta revolucionou as pesquisas em imunologia (MURRAY *et al.*, 2014; KÖHLER *et al.*, 1975).

A técnica de produção de células híbridas consiste em imunizar o animal com um antígeno específico. Após imunizações seriadas o sistema imunológico dos mesmos produzem linfócitos B específicos para o antígeno de interesse (MURRAY *et al.*, 2014)

Os linfócitos B são isolados do baço e fundidos com células de mieloma, que são células que se multiplicam indefinidamente. Após a fusão três situações podem ocorrer que é a presença de células fundidas, células não fundidas e células iguais fundidas entre si. Para eliminar o crescimento de células indesejáveis a fusão é transferida para um meio seletivo, meio HAT (Hipoxantina-aminopterina-timidina), onde apenas células híbridas crescem como clones de células únicas (ABBAS *et al.*, 2015).

Para a produção de um único clone é realizada uma ou mais diluições seriadas em placas de poços para que em cada poço seja isolado apenas um hibridoma. Em seguida, cada poço é testado para a presença do anticorpo desejado, normalmente através do teste ELISA indireto (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Esta produção requer monitoramento constante em todas etapas de produção, principalmente os parâmetros como temperatura, pH e tempo (MION, 2014).

Varias etapas laboratoriais são necessárias para a produção de hibridomas produtores de um determinado anticorpo monoclonal, específico contra um antígeno de interesse, como ilustra a figura 1 abaixo.

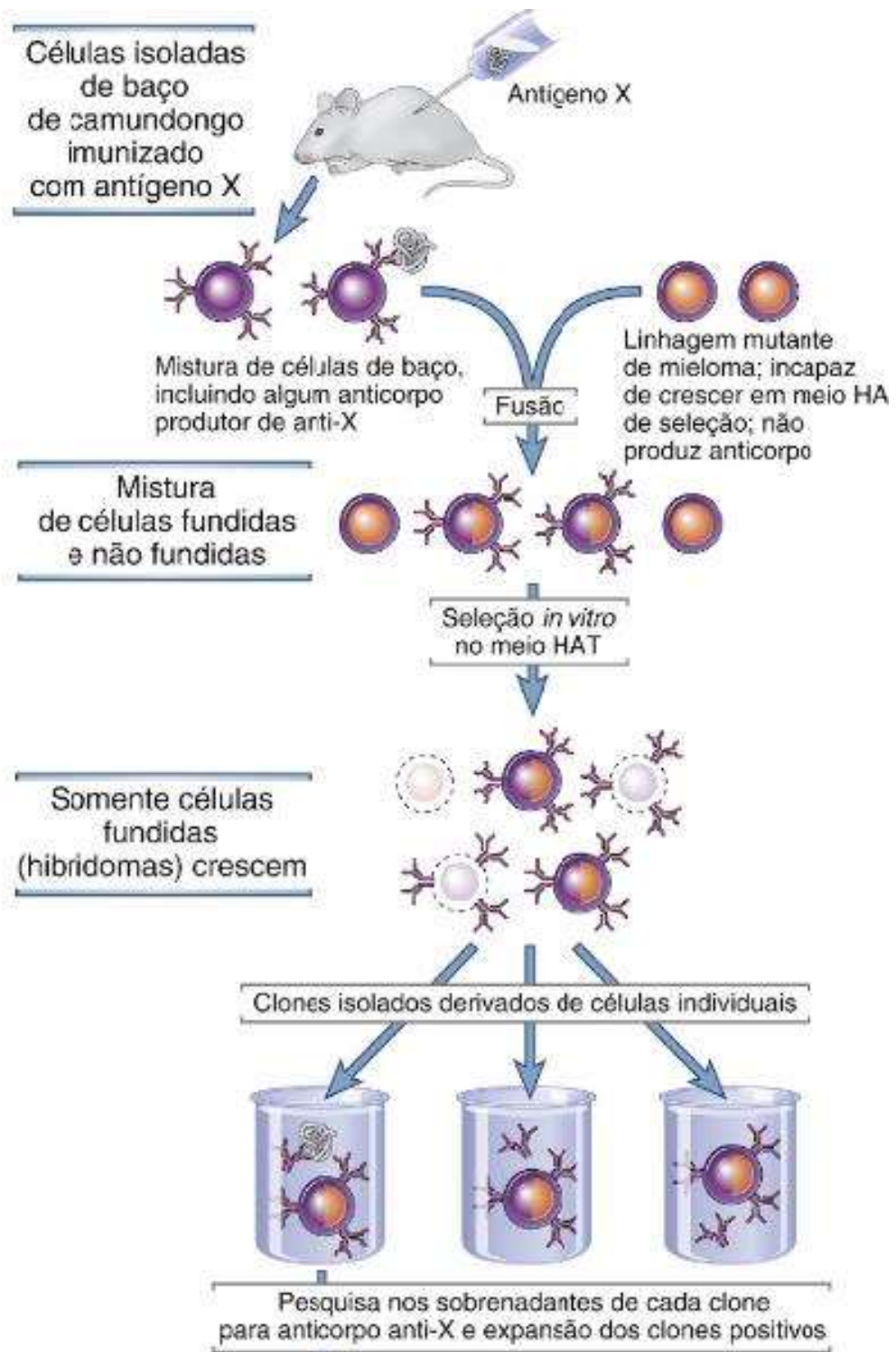


Figura 1: Protocolo de produção de anticorpo monoclonal.
Fonte: ABBAS et al., 2005 (modificado).

3.4 Cultura de hibridomas

O estudo de cultura de células de hibridomas vem ocorrendo há décadas (Kohler, 1975) para que assim possa ser encontrada a melhor forma de crescimento de células com a produção de níveis significativos de anticorpos monoclonais. Desde a descoberta do anticorpo monoclonal por Jerne, Milstein e Köhler, pesquisadores estudam a melhor composição do meio e a cinética de crescimento de culturas de hibridomas em reatores agitados para fins terapêuticos, montagem de kits e diagnósticos de doenças autoimunes (MION, 2014).

Hibridomas são células que crescem em suspensão, por isso é interessante o crescimento em agitação, o que possibilita um maior crescimento em menor tempo de cultura, garantindo maior economia na produção (MION, 2014).

A cultura de hibridomas pode ser realizada “*in vitro*”, em frascos de cultura ou em reatores, ocorre normalmente em suspensão, porém alcançam rendimentos relativamente baixos quando comparados com o crescimento “*in vivo*”, que são realizadas em culturas ascite, que é o crescimento celular realizado na cavidade peritoneal de camundongos. Essa desvantagem ocorre principalmente pela dificuldade de cultivar hibridomas em reatores devido à sensibilidade da célula a tensão de cisalhamento e aos danos causados a parede celular motivado pela formação de bolhas no sistema (S.-T.YANG *et al.*, 2004).

A cinética de crescimento de células é particular para cada cultura e vários autores apresentam a agitação como uma influência para o crescimento de hibridomas tendo como vantagem a melhora no transporte de nutrientes ao longo da cultura e oxigênio para as células, além de remover CO_2 mais facilmente, comparado com culturas estáticas. Porém células com ausência de parede celular são mais sensíveis a choques mecânicos podendo ocasionar estresse mecânico e fenômeno de cavitação, que é a formação de bolhas no líquido levando a ruptura celular (LEGAZPI *et al.*, 2005).

Devido à aplicabilidade terapêutica dos anticorpos monoclonais produzidos a partir de cultura de células de hibridomas, estudos estão sendo realizados para que se possa produzi-los não apenas em escala laboratorial, mas sim em larga escala. Com isso é indispensável o conhecimento da morfologia, metabolismo e viabilidade de crescimento dessa cultura (LEGAZPI *et al.*, 2005).

3.5 Cultura de células primárias, estabelecidas e células transformadas.

A cultura primária é aquela que utiliza células provenientes da degradação mecânica ou enzimática de tecidos. A monocamada formada neste cultivo é constituída pelas células que sobreviveram ao processo de degradação e permaneceram em cultivo por um determinado período de tempo. Esta técnica é empregada para o estudo do comportamento celular, uma vez que, elas ainda possuem as características genótípicas e fenotípicas do tecido de origem. Devido a manutenção das características, este cultivo possui um período de tempo de vida relativamente curto, uma vez que as células entram no processo de morte celular devido ao mecanismo de renovação tecidual (MORAES *et al.*, 2008).

A cultura de células estabelecidas é proveniente da manutenção das células que conseguiram ser mantidas após alguns repiques da cultura primária. A propagação dessas células até aproximadamente 80 repiques, permite que o cultivo ainda mantenha grande parte das características do tecido original. Essas células são empregadas em pesquisas e produção de vacinas (MORAES *et al.*, 2008).

A partir do momento em que as células perdem algumas características próprias do tecido da qual são originadas, ou seja, quando elas perdem a semelhança morfológica e genética, elas passam a ser denominadas células transformadas. A transformação pode ocorrer pela utilização de substâncias químicas, vírus ou agentes físicos, permitindo que ocorram mutações nos genes que controlam o ciclo celular. Outra forma de se obter as células transformadas é utilizando o tecido já mutado, como ocorre em tecidos tumorais. Essa técnica pode ser empregada em estudos de citotoxicidade e controle de qualidade (MORAES *et al.*, 2008).

3.6 Cultura de células aderidas e em suspensão.

O cultivo de células pode se apresentar de duas formas: aderidas ou não aderidas. As células aderidas são aquelas que necessitam de adesão a uma superfície de contato para sua proliferação. Um exemplo de adesão é o cultivo em garrafinhas, onde para que ocorra a ligação entre célula e superfície é necessário à presença de cargas opostas para que ocorra a ligação eletrostática célula-superfície, geralmente a célula possui carga positiva, além de proteínas de adesão e proteoglicanos. As células aderidas formam as culturas em monocamadas e os nutrientes são fornecidos pelo meio líquido onde elas estão imersas (MORAES *et al.*, 2008, Molinaro,2009).

As células não aderidas ou em suspensão são cultivos que não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver, mas precisam estar imersas no meio de cultura que fornece os nutrientes. Estas culturas são as mais indicadas para aumento de escala, pois possuem algumas vantagens quando comparadas as culturas em monocamadas. Uma delas é a não necessidade de um suporte para crescer, elas não são limitadas pela superfície de aderência, podendo crescer ao longo das três dimensões. Segundo Freshney (1994), possuem outras vantagens como, menor custo, melhor monitoramento de crescimento celular e facilidade de controlar parâmetros (MORAES *et al.*, 2008; MOLINARO, 2009).

3.7 Biorreatores empregados em culturas de células

3.7.1 Biorreatores

Biorreatores podem ser classificados em dois grupos por alguns autores, os que operam com reações químicas na ausência de células, sendo denominados reatores enzimáticos ou os que operam com reações que ocorrem na presença de células vivas podendo ser denominados reatores bioquímicos. Esses reatores podem conter biocatalisadores, que tem a função de acelerar as reações químicas envolvidas, podem ser enzimas, células microbianas, animais ou vegetais. No geral, reatores são vasos projetados para conter reações. Esses reatores são desenvolvidos para

aumentar e aperfeiçoar processos, tanto laboratoriais quando industriais (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.7.1.1 Classificação

Os biorreatores podem ser classificados pela literatura de várias formas, mas segundo Schmidell *et al.*, (2001) eles podem ser classificados quanto ao tipo de biocatalizador, a configuração deste biocatalizador ou quanto à forma de agitação. Dentre as várias classificações a mais abrangente é a de Kleinstreuer, que classifica com base no tipo de biocatalisador, sendo microrganismo aeróbio ou anaeróbio e na configuração de imobilização ou confinamento em membrana.

I. Os reatores em fase aquosa são classificados:

Células/enzimas livres:

- Reatores agitados mecanicamente;
- Reatores agitados pneumaticamente;
- Reatores de fluxo pistonado.

Células/enzimas imobilizadas em suportes:

- Reatores em leito fixo;
- Reatores com leito fluidizado.

Células/enzimas confinadas entre membranas:

- Reatores com membranas planas;
- Reatores de fibra oca.

II. Reatores em fase não-aquosa – fermentação semissólida

- Reatores estáticos;
- Reatores com agitação;
- Reatores com leito fixo;
- Reatores com leito fluidizado gás-sólido.

Biorreatores em fase aquosa são processos submersos e imersos em um meio livre que transita por toda cultura do reator. O primeiro biorreator é o de tanques agitados, ou tanques de mistura, são reatores agitados mecanicamente e são os reatores mais utilizados na indústria, consiste em um reator de tanque cilíndrico que possui agitação por inserção de gás, como mostra a figura 2 (a). A ausência da agitação mecânica é uma vantagem, pois diminui as tensões de cisalhamento causadas pela agitação mecânica da turbina de pás planas (SCHMIDELL et al., 2001).

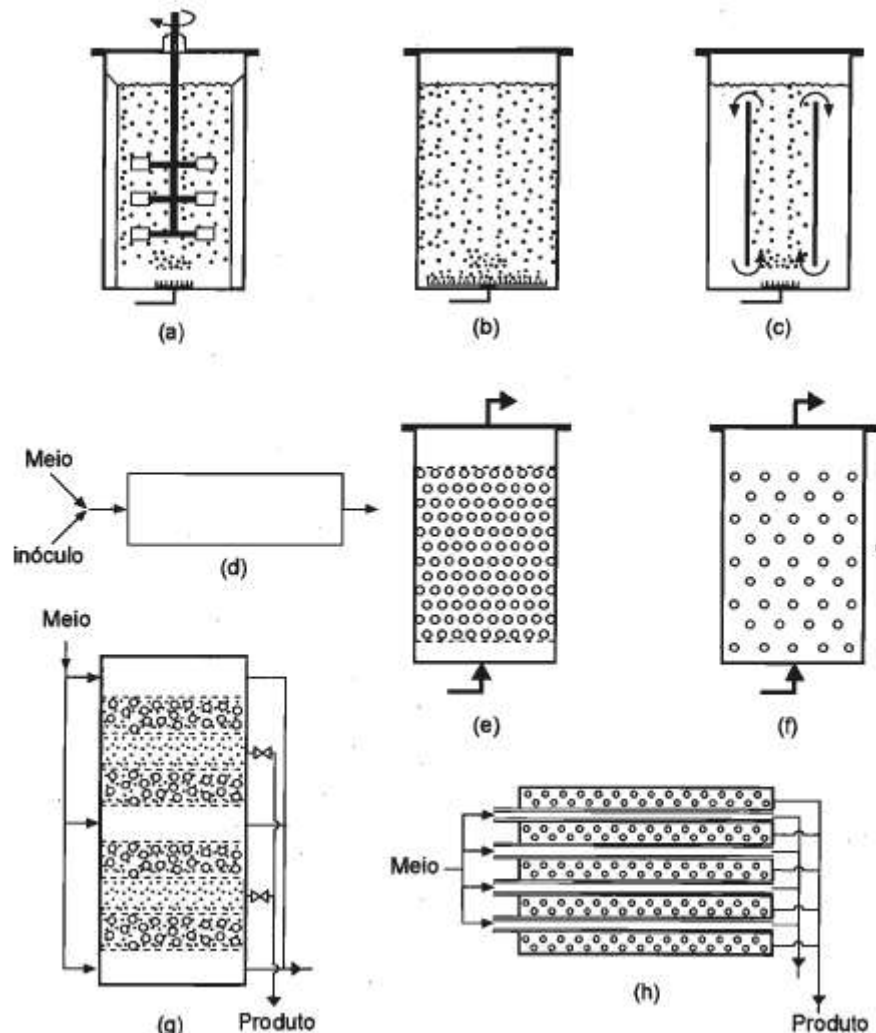


Figura 2: Tipos de biorreatores: (a) STR; (b) Coluna de bolhas; (c) Air-lift; (d) Fluxo pistonado; (e) Leito fixo; (f) Leito fluidizado; (g) Reator com membranas planas; (h) Reator de fibra-oca.

Fonte: SCHMIDELL et al., 2001.

O tipo airlift são reatores de circulação pneumática e possuem duas formas de escoamento, uma direcionada para cima e outra direcionada para baixo. Possui injeção de gás e as bolhas formadas por essa injeção deslocam o líquido ao longo do reator. Existem dois tipos de reator airlift, o de circulação interna e externa, sendo que a principal diferença entre eles é o desenho do separador de gás que pode ser extensão sem obstáculos ou com obstáculos ao longo do reator, representado na figura 2 (b e c), respectivamente (PEDRINI, 1997).

No reator de fluxo pistonado, figura 2 (d), ocorre mistura do inóculo e do meio de cultura no início do sistema, sendo que o mecanismo é que o fluxo de cultura ocorra com velocidade constante, sem mistura no sentido longitudinal. Sem um sistema de homogeneização ocorre grande variação de concentração de nutrientes de células e produto ao longo do reator (SCHMIDELL et al., 2001).

Outra subdivisão é a de reatores de forma imobilizada, que são muito utilizados devido à separação entre nutrientes e produtos metabólicos, que já permite uma separação inicial do processo, mas implicam em uma manutenção de uma elevada concentração celular. Possui elevada produtividade, e tem como vantagem a diminuição das tensões de cisalhamento e de formação de bolhas causada pela injeção de ar ou gás inerte (SCHMIDELL et al., 2001).

O reator de leito fixo, PBR (*Packed Bed Bioreactor*), consiste em um reator com movimentação quase inexistente, figura 2 (e), pois possui o recipiente cilíndrico preenchido de partículas fixas, como o nome indica, formando assim um leito poroso por onde o meio reacional escoar, sem ocorrer movimentação das partículas empacotadas. Em contrapartida, os reatores de leito fluidizado não possuem as partículas fixas nem empacotadas ao longo do cilindro, assim as partículas se movimentam com a passagem do meio, formando o meio fluidizado, figura 2 (f) (Hill, 1977; Fillis, 2001).

A última subdivisão é a de reatores de fase aquosa tendo células ou enzimas confinadas, podendo ser em lâminas de membrana planas ou em fibra oca. No reator de membranas planas, figura 2 (g), há um confinamento físico na fase sólida,

ocasionando a redução dos obstáculos difusionais, quando comparado aos reatores com imobilização. Por outro lado, o reator de fibra oca, figura 2 (h), possui vantagens comparadas com tanques agitados, pois utiliza membranas semipermeáveis confinando as células e diminuindo as tensões de cisalhamento causadas pelo fluxo de ar no sistema, permitindo fluxo de líquido, mas não o fluxo de células. Esse tipo de reator é composto por feixes de tubos capilares semipermeáveis, no qual ocorre fluxo laminar do meio de cultura que diminuem os obstáculos difusivos, sendo ideais para cultura de células sensíveis a cisalhamento (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Por último, têm-se os reatores de fase semissólida, que possuem ausência de meio livre, possuindo apenas umidade, de acordo com a retenção do substrato sólido. Esses reatores são mais econômicos, devido à economia de água, mas apresenta mais dificuldade no controle das condições operacionais, isso quando comparados aos reatores de fase aquosa (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Os reatores de fase semissólida, que são os estáticos ou reatores de bandejas, são reatores onde a reação ocorre em bandejas, sendo mais difícil controlar a taxa de transferência de oxigênio e as condições ambientais do processo. Com isso, os reatores de bandejas são substituídos por reatores agitados, para suprir essa deficiência. Os reatores de leito fixo e de leito fluidizado são semelhantes ao de fase aquosa, a diferença é apenas o meio reacional pela passagem de gás inerte ao longo do reator (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Esses tipos de biorreatores são utilizados em diferentes ambientes de crescimento e diferentes modos de operação que contribuem para diferentes rendimentos da linhagem de cultura estabelecida. De acordo com essa classificação, S.-T. Yang *et al.*, (2004) afirma que o cultivo de células de hibridomas pode ser realizado de forma suspensa em fase aquosa em biorreatores do tipo: tanques agitados e airlift, e de forma imobilizada por fibra oca e leito fixo. Na tabela 1 abaixo, observa-se a comparação realizada entre esses modos de operação (S.-T. Yang *et al.*, 2004).

Tabela 1: Comparação de quatro tipos diferentes de reatores usados para cultura de células.

	Tanque Agitado	Air-lift	Fibra oca	Leito fixo
Oxigenação	Agitação mecânica e inserção de gás.	Inserção de gás.	Difusão e media recirculação.	Difusão e media recirculação.
Densidade celular (ml^{-1})	10^6 - 10^7	10^6 - 10^7	$>10^8$	$>10^8$
Danos celulares por tensão de cisalhamento	Alta, por causa da agitação e inserção de gás.	Media	Baixa	Baixa
Estabilidade da cultura	Alta para cultura de perfuração contínua.	Alta para cultura de perfuração contínua.	Deterioração por causa da obstrução da membrana, obstrução da célula e acúmulo de células mortas.	Deterioração por causa da obstrução de células e acúmulo de células mortas.
Potencial para alta escala	Alta	Alta	Baixa, mas limitada pelo fornecimento de oxigênio.	Alta, mas pode ser limitada pelo fornecimento de oxigênio.

Fonte: S.-T. Yang et al 2004 (modificado).

3.8 *Luffa cylindrica*

A *Luffa cylindrica* é uma planta da família das Cucurbitáceas, que produz um fruto cilíndrico, alongado e liso, com comprimento que pode variar entre 15 - 100 cm e diâmetro entre 8 – 10 cm. Acredita-se que ela é proveniente da Ásia, mas foi trazida pelos portugueses e passou a ser cultivada e utilizada em quase todo território brasileiro. Seu fruto, quando seco é conhecido como bucha vegetal, esponja, bucha lisa ou bucha egípcia (TANOBE *et al.*, 2002; BAL *et al.*, 2004; LUI, *et al.*, 1998).

Os frutos desenvolvem uma matriz vascular de rede fibrosa, onde o entrelaçamento é caracterizado por uma estrutura micro celular com canais contínuos de micro poros ocos, medindo de 10 a 20 μm . No início da frutificação ainda não há a presença dessa rede fibrosa, com a diferenciação das células do parênquima, as células se alongam, paralelamente às futuras fibras. Com o crescimento dos frutos, as células se alongam tanto, que chegam a se conectar com as contíguas, resultado na formação de fibras. A rede fibrosa propriamente dita é desenvolvida no final do amadurecimento, quando as fibras começam a ser lignificadas e há o desaparecimento gradual da polpa e suco, dando origem à esponja. Nestas mudanças de fase, o fruto seco se torna amargo, tóxico e de acordo com a literatura, observa-se a presença de flavonoides, taninos, saponinas e esteroides que possuem o efeito antimicrobiano.(FLAMBÓ, 2013; CHEN *et al.*, 2014; ZAMPIERI *et al.*, 2006; BARROSO *et al.*, 2014).



Figura 3: Fruto da planta *Luffa cylindrica* amadurecido.
Fonte: Lui, 2015 (modificado).

A composição química do fruto seco é de 4,2% de proteína, 1,08% de lipídios, 1,04% de cinzas, 55,78% de fibra e 37,81% de carboidratos. A fibra varia de 50 – 60% de celulose, 25 – 30% de hemicelulose e 10 – 12% de lignina. Esta formulação pode variar de acordo com as condições climáticas, do solo e fatores metabólicos. Atualmente as principais utilidades atribuídas a este fruto são: limpeza geral, higiene corporal, aplicação em artesanato e filtros para piscinas, água e óleo. No setor biotecnológico a bucha vegetal tem se mostrado um material de suporte promissor para os pesquisadores. Os pioneiros de sua utilização foram Iqbal, M e Zafar (1993), que realizaram experimentos utilizando a bucha vegetal para a imobilização de células de algas, vegetais superiores, bactérias e fungos. Segundo Dias et al. (2014), as fibras naturais possuem alta diversidade e baixo custo, são atóxicas e não abrasivas, o que aumenta o empenho no uso desses suportes. Dentre as fibras utilizadas a de maior emprego é a bucha vegetal *Luffa cylindrica*, do gênero *Luffa*, também denominada *L.aegyptica*. Atualmente *L. cylindrica* é utilizada na indústria alimentícia, na fabricação de biodiesel e para uso medicinal (BARROSO *et al.*, 2014, OLADOJA, 2009, SAEED E IQBAL, 2013).

Segundo estudos feitos por K.E. Balet *et al.*, (2012), a morfologia da *L. cylindrica* forma uma rede de cordões fibrosos, com a estrutura micro esponjosa de micro célula, capaz de conduzir grande quantidade de volume através das fibras, além da capacidade de absorção desempenhando a função de micro reservatório por onde ocorre o fluxo de material ativo. Essas características, juntamente com a procura por novos materiais para matrizes de suporte para o crescimento celular, tornou a *Luffa* um material muito visado. Outra vantagem de sua utilização é o seu custo e disponibilidade. O estudo realizado por Dias (2014) comprova as vantagens descritas por K.E. Bal et al., 2012, uma vez que o emprego da *Luffa* com suporte se mostrou favorável ao crescimento de microrganismos, devido a sua morfologia e estrutura (vazada e formadora de poros), facilitando os fluxos celulares e componentes do meio. Além disso, OGBONNA et al., 1994 demonstrou que ela também pode ser utilizada como um veículo de imobilização biológica. Para a utilização da *Luffa* como suporte, onde o biocatalisador se encontra imobilizado,

estudos feitos por vários autores propõem diversos tratamentos térmicos e/ou químicos para que ocorram mudanças morfológicas, de forma a favorecer ainda mais a imobilização. A figura 4 exemplifica a mudança estrutural após um tratamento químico. Nesta figura temos o corte transversal das células fibrosas de *L. cylindrica* em dois momentos diferentes, antes do tratamento e após a lavagem térmica e imersão em hidróxido de sódio. No tratamento térmico a *Luffa* é submetido à fervura por 30 minutos e em seguida ela é lavada e mantida de molho em água destilada por 24 horas, por fim é deixada para secar a 70°C em estufa e autoclavada por 15 minutos a 121°C (SAEED, 2013).



Figura 4: Micrografia de um fio fibroso de *L. cylindrica*: Em a e a' é um corte transversal com canal central e células fibrosas ocas. Em b e b' após tratamento com ácido acético e quitosano.

Fonte: KE Balet al., 2012 (modificado).

Com base na inovação proposta de utilização da *Luffa* para crescimento celular, inseriu-se a cultura de células de hibridomas em suporte de vegetal *Luffa cylindrica* com a finalidade de aumentar a área de crescimento celular de hibridomas e consequentemente uma maior produção e liberação de anticorpos, uma vez que, quanto maior a área disponível por unidade de volume maior será a dispersão celular ao longo da cultura e consequentemente maior crescimento celular (AGRA, 2009).

4 METODOLOGIA

4.1 Célula utilizada

4.1.1 Célula de Hibridoma

Utilizou-se uma célula de hibridoma de rato, produtora de anticorpo anti IL-4, cedida pelo laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.1.2 Célula de Mieloma

Utilizou-se também a célula de mieloma SP2/1 cedida pelo LABICEM – Laboratório de Bioquímica e Imunologia Celular e Molecular do CAP-Campus Alto Paraopeba.

4.2 Manutenção da cultura

Com o objetivo de garantir a sobrevivência e a estocagem das células em estudo, as células foram submetidas a manutenções de curto prazo em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (SigmaAldrich©) - DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino estéril (LGC Biotecnologia). Para garantir essa manutenção e inibir o crescimento bacteriano, suplementou-se o meio DMEM com solução de antibióticos contendo Penicilina e Estreptomicina (SigmaAldrich©) , de acordo com a especificação do fabricante.

4.2.1 Meio de cultura DMEM

O meio de cultura DMEM de crescimento de células de mamífero é amplamente utilizado no cultivo de células de hibridomas e mielomas. O meio é rico em sais inorgânicos, aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas e fonte de energia como glicose.

Manutenção de curto prazo

Realizou-se a manutenção em curto prazo através de repiques consecutivos, onde a cada semana inoculou-se uma alíquota do cultivo anterior em uma nova cultura com

meio DMEM a 20% de SFB suplementado com antibiótico, seguido de incubação em estufa de CO_2 (PANASONIC) a 5% e temperatura de 37°C.

4.3 Preparo das culturas

4.3.1 Cultura de hibridomas

Incubaram-se as células de hibridoma em estufa de CO_2 a 5% e temperatura de 37°C, e observou-se em microscópio invertido, realizando-se repiques quando a cultura alcançava uma concentração celular adequada. Os repiques foram realizados transferindo-se 5 ml da cultura de células original e 10 ml de meio DMEM com 20% de soro fetal bovino e antibiótico. Complementou-se a garrafa “mãe” com 10 ml de meio DMEM com 20% de soro fetal bovino e antibiótico e então se reservou a mesma como estoque de células.

4.3.2 Cultura de mieloma

Retirou as células de mieloma fornecidas pelo LABICEM do nitrogênio e colocou-se o microtubo com as células em banho maria com a água em temperatura de aproximadamente 37°C, adicionou-se 1 ml de células a 12ml de meio DMEM com 20% de soro fetal bovino em dois tubos falcon. Em seguida levou os dois tubos balanceados à centrifuga por 10 minutos a 110 x g, e ao final do processo descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado celular com 8 ml de DMEM. Por fim, adicionaram-se antibiótico em ambas as garrafas e incubaram-se as garrafinhas em estufa de CO_2 a 5% e temperatura de 37°C.

4.4 Tratamento da *Luffa cylindrica*

Limpou-se a bucha, retiraram-se as sementes com o auxílio de uma pinça e cortou-se a mesma em discos planos circulares.

4.4.1 Tratamento para cultura de hibridomas

O tratamento foi feito segundo o protocolo sugerido por Saratele (2013) com modificações, onde ferveu-se a bucha por 45 minutos e lavou-se em seguida com

água destilada. Em seguida transferiu-se a bucha para um béquer, autoclavou-se por 40 minutos a 121°C, e manteve-se a bucha imersa em água estéril por 24 horas. Em seguida, levou-se à estufa (NOVA ÉTICA) para secar por 72 horas a 70°C. Armazenaram-se os discos em temperatura ambiente até serem utilizados

4.4.2 Tratamento para cultura de mieloma

Para a célula de mieloma o tratamento sofreu uma pequena alteração, mas seguindo o mesmo protocolo de Saratele (2013). Neste procedimento, ferveu-se a bucha por 45 minutos, mas esse processo ocorreu por três vezes e em cada etapa lavou-se com água destilada para retirar o excesso de impureza. Deixou-se a bucha no agitador por 12 a 16 horas para uma melhor remoção das impurezas. Após esta etapa colocaram-se os discos em um béquer menor contendo água esterilizada por 72 horas e a cada 24 horas trocou-se a água. Por fim, foi retirada a água e levou-se à estufa para secar por 72 horas a 70°C. Armazenaram-se os discos em temperatura ambiente até serem utilizados.

4.5 Montagem dos experimentos

4.5.1 Cultura de hibridomas

Ao atingir a concentração de células adequadas às quatro garrafinhas foram utilizadas para o seguinte experimento, como mostra o fluxograma na figura 5 (a).

Duas placas de petri foram utilizadas com adição dos discos de *Luffa*, sendo colocados 10 ml de meio DMEM - 10% SFB com antibiótico e 10 ml de meio com células, figura 5 (b) e as outras duas placas foram preparadas sem adição dos discos, com adição do mesmo volume de meio DMEM - 10% SFB com antibiótico e 10 ml de meio com células figura 5 (c).

Paralelamente duas garrafinhas com adição do suporte de bucha, sendo colocados 20 ml de meio DMEM 10% SFB e 20 ml de meio de cultura com antibiótico, figura 5 (d) e prepararam-se duas garrafinhas de vidro sem adição do suporte de bucha com

o mesmo volume de 20 ml de meio DMEM 10% SFB e 20 ml de meio de cultura com antibiótico ,figura 5 (e).

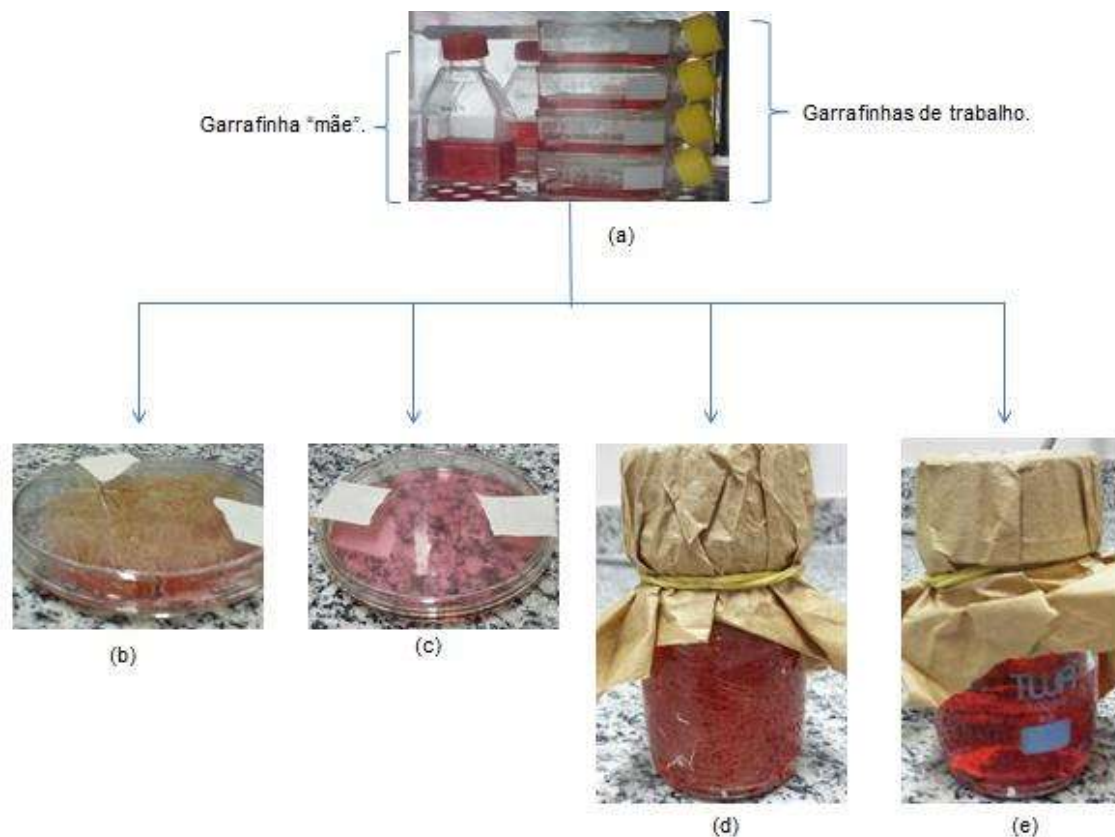


Figura 5: Fluxograma demonstrando as etapas de cultivo de hibridomas com e sem bucha. (a) Garrafinha "mãe" e garrafinhas de trabalho; (b) placa de petri com bucha; (c) placa petri sem bucha; (d) garrafinha de vidro com bucha; (e) garrafinha de vidro sem bucha.

Fonte: Autor

4.5.2 Cultura de mieloma

Após o tratamento da *Luffa cylindrica* cortou-se a mesma em discos menores com pesos aproximados de 0,0626 gramas, com diâmetro aproximado dos poços da placa de cultura de 24 poços, como mostra a figura 6 (b). Em seguida, embalou-se cada disco com papel alumínio (figura 6 (a)) e autoclavou-se por 30 minutos a 121°C. Armazenaram-se os discos em temperatura ambiente até serem utilizados.

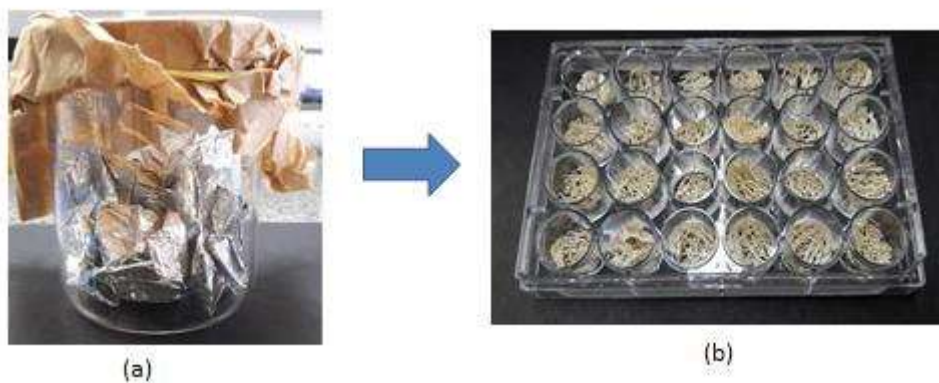


Figura 6: (a) Buchas de peso de aproximadamente 0,0626 gramas embaladas individualmente com papel alumínio; (b) Buchas inseridas na placa de 24 poços.

Fonte: Autor

4.5.2.1 Preparo de soluções

Preparou-se uma solução de fosfato salino – PBS concentrado 10 vezes utilizando-se 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de Na_2HPO_4 e 2,4 g de KH_2PO_4 para o volume final de 1 litro. Para o PBS 1x, diluiu-se 100 ml de PBS 10x em 900 ml de água destilada e acertou-se o pH para 7,4. Autoclavou-se a solução por 15 minutos a 121°C. Esperou-se esfriar para utilizá-lo.

Também se preparou uma solução de albumina 0,5%. Pesou-se 2 g de albumina bovina e dissolveu-se em 40 ml de água ultrapura. Em seguida, dentro do fluxo laminar devidamente limpo, filtrou-se a albumina com o auxílio de um filtro de 0,22 μm e de uma seringa de 20 ml.

Transferiu-se o conteúdo das garrafinhas contendo as culturas de células de mieloma para dois tubos Falcons de 45 ml. Realizou-se esta etapa dentro do fluxo laminar depois da assepsia com álcool 70% e ultravioleta por 15 minutos. Em seguida levou-se os dois tubos balanceados a centrifuga por 10 minutos a 400 x g, e ao final do processo descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado celular com 50 ml de DMEM.

4.5.2.2 Montagem da placa de 24 poços

Inseriram-se os discos na placa de 24 poços com o auxílio de uma pinça autoclavada. Em seguida, lavou-se a placa para preparar a *Luffa* para receber a cultura de mieloma, como mostra a figura 7. Na primeira fileira, como mostra a figura 7, inseriram-se 2 ml de PBS 1X em cada poço, na segunda e terceira fileira 2 ml de SFB puro, na quarta e quinta fileira 2 ml de albumina 0,5%, e na ultima fileira 1 ml de SFB e 1ml de albumina. Agitou-se suavemente a placa, incubou-se a mesma por 24h a 37 C e retirou-se todo conteúdo com o auxílio de uma pipeta. Depois se inseriu, em cada poço 2 ml de PBS 1x, agitou-se e retirou-se todo conteúdo. Repetiu-se esta etapa. Por ultimo inseriu-se em cada poço 2 ml da solução de PBS 1x com antibióticos. Agitou-se a placa e retirou-se todo conteúdo.

Ao final deste preparo, inseriu-se 2 ml em cada poço da ressuspensão de célula em meio DMEM suplementado com 20 % de soro fetal bovino e solução de antibioticos. A placa foi levada a estufa de CO_2 a 5% e temperatura de 37°C.

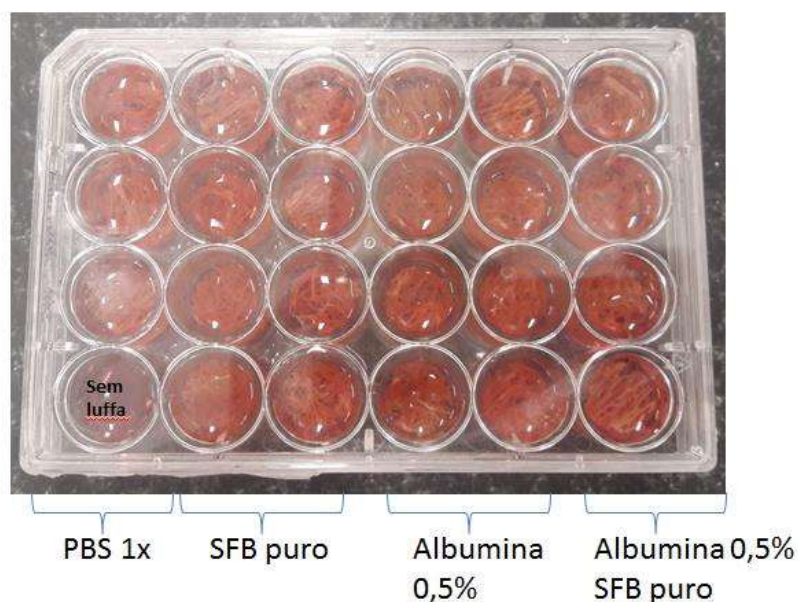


Figura 7: Esquema de lavagem da placa de 24 poços.
Fonte: Autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tratamento da Bucha

Fez-se o tratamento na *Luffa cylindrica* com o intuito de remover as substâncias tóxicas que estão presentes naturalmente na mesma. Sabe-se que a *Luffa* tratada e não tratada apresentam as mesmas condições físicas e as mesmas vantagens para a cultura, pois sua forma estrutural não é alterada. O tratamento da *Luffa* é realizado em função da mesma conter substâncias inibitórias ao crescimento celular e com atividade antimicrobiana, que são removidas durante o pré-tratamento. Experimentos iniciais realizados com as células de hibridoma e a *Luffa* não tratada indicaram a presença de compostos com atividade citotóxica sobre as células. A atividade antimicrobiana foi demonstrada por Caribé (2008) e Scalia (2015), que demonstraram que a *Luffa operculata*, da espécie da *Luffa cylindrica*, apresenta atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Após a primeira fervura observa-se a água amarelada, já na terceira fervura a água encontra-se translúcida, indicando a remoção ou degradação de alguns compostos.

5.2 Cultura de hibridoma

Foi feito o acompanhamento apenas das células nas placas petri com e sem *Luffa cylindrica* pelo microscópio invertido (ROBHE) e observou-se o crescimento de células de hibridomas ao longo da cultura, mas elas não estavam aderidas e sim em suspensão. O experimento teve que ser cancelado, pois ocorreram inúmeras quedas de energia elétrica no campus Alto Paraopeba nos meses de outubro e novembro, inviabilizando os experimentos. Assim as células não tiveram as condições necessárias para manter seu desenvolvimento e crescer, apresentando sinais de rompimento celular e consequente morte celular.

As culturas de células nas garrafas de vidro não foram analisadas devido às quedas de energia, inviabilizando as análises.

É importante ressaltar que as culturas de hibridomas são culturas de longa duração. Para atingir uma densidade adequada para produção de anticorpos, são necessários entre 7 a 15 dias de cultura ininterruptos. As quedas recorrentes de energia impossibilitaram as condições mínimas para manutenção dos experimentos, levando ainda à perda dos estoques de segurança e consequente perda da linhagem celular. Em função disso, passamos a utilizar as células SP2 nos experimentos subsequentes.

5.3 Cultura de mieloma

Analisou-se a placa de 24 poços e observou-se o crescimento da célula de mieloma com a *Luffa* tratada, mostrando a aplicabilidade e viabilidade dos experimentos. A figura 8 mostra a *Luffa cylindrica* em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino e solução de antibióticos e demonstra que de acordo com estudos feitos por K.E. Balet al., 2012, a morfologia da *L. cylindrica* forma uma rede de cordões fibrosos, com a estrutura micro esponjosa de micro célula, capaz de conduzir grande quantidade de volume através das fibras, além da capacidade de absorção desempenhando a função de micro reservatório por onde ocorre o fluxo de material ativo, como mostra a figura 8.

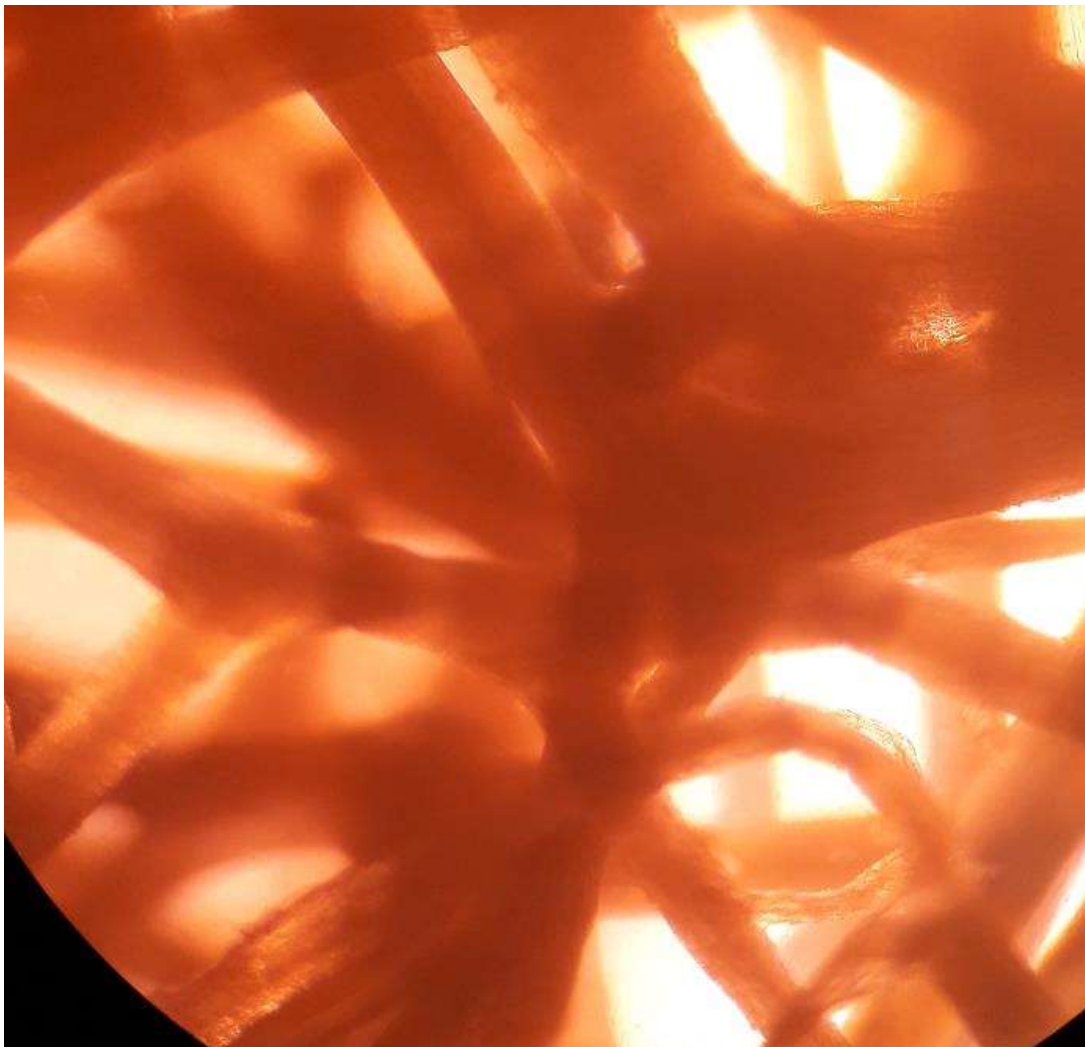


Figura 8: Rede de cordões fibrosos da *Luffa cylindrical* vista por microscópio invertido, 10 x.
Fonte: Autor

Na figura 9, observa-se o crescimento da célula de mieloma na ausência da *Luffa cylindrical* e na figura 10 as células na presença da *Luffa*. Observa-se que em ambas as culturas houve crescimento de células viáveis, demonstrando a viabilidade da cultura de mieloma utilizando a *Luffa* como suporte sólido de crescimento.

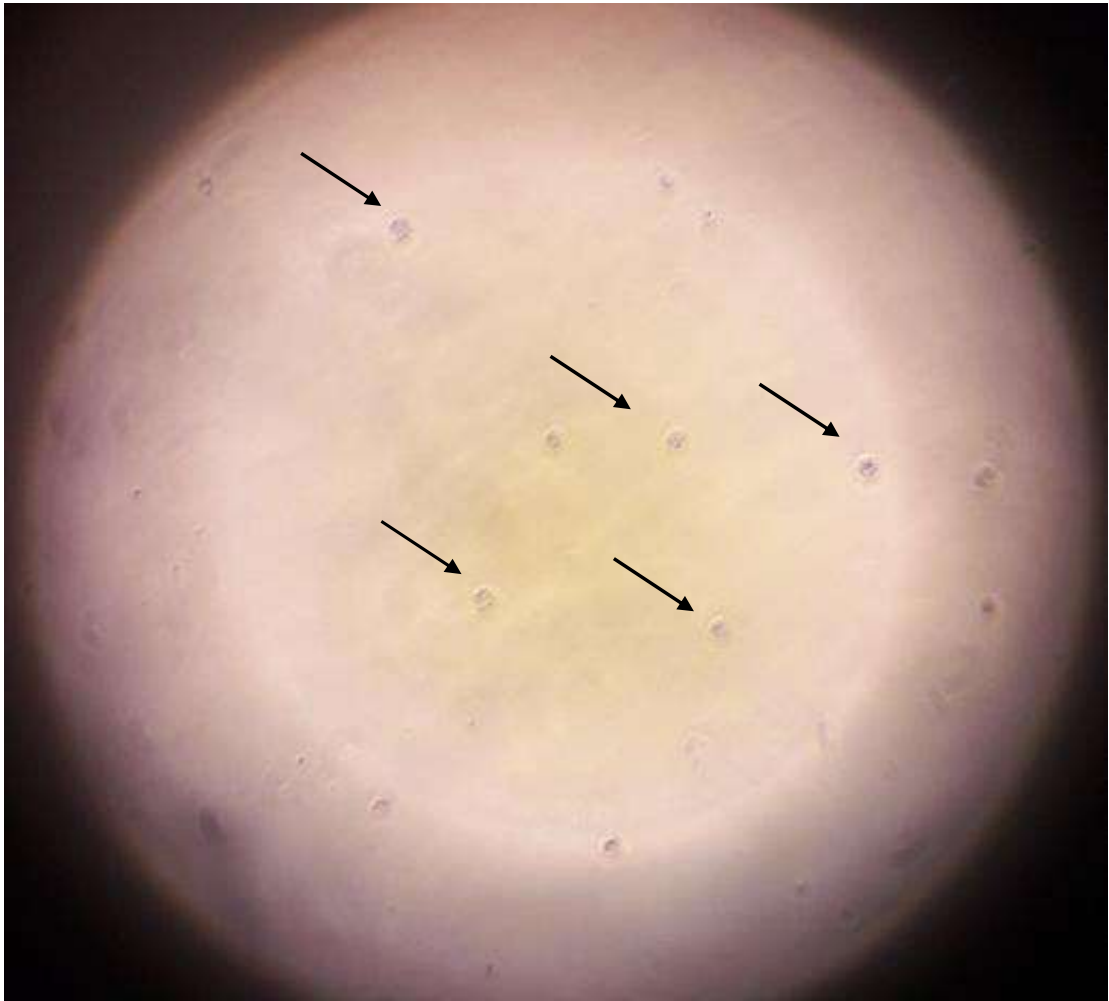


Figura 9: Crescimento de célula de mieloma na ausência de *Luffa cylindrica* vista de microscópio invertido, 10 x.
As setas indicam as células de mieloma em suspensão.
Fonte: Autor

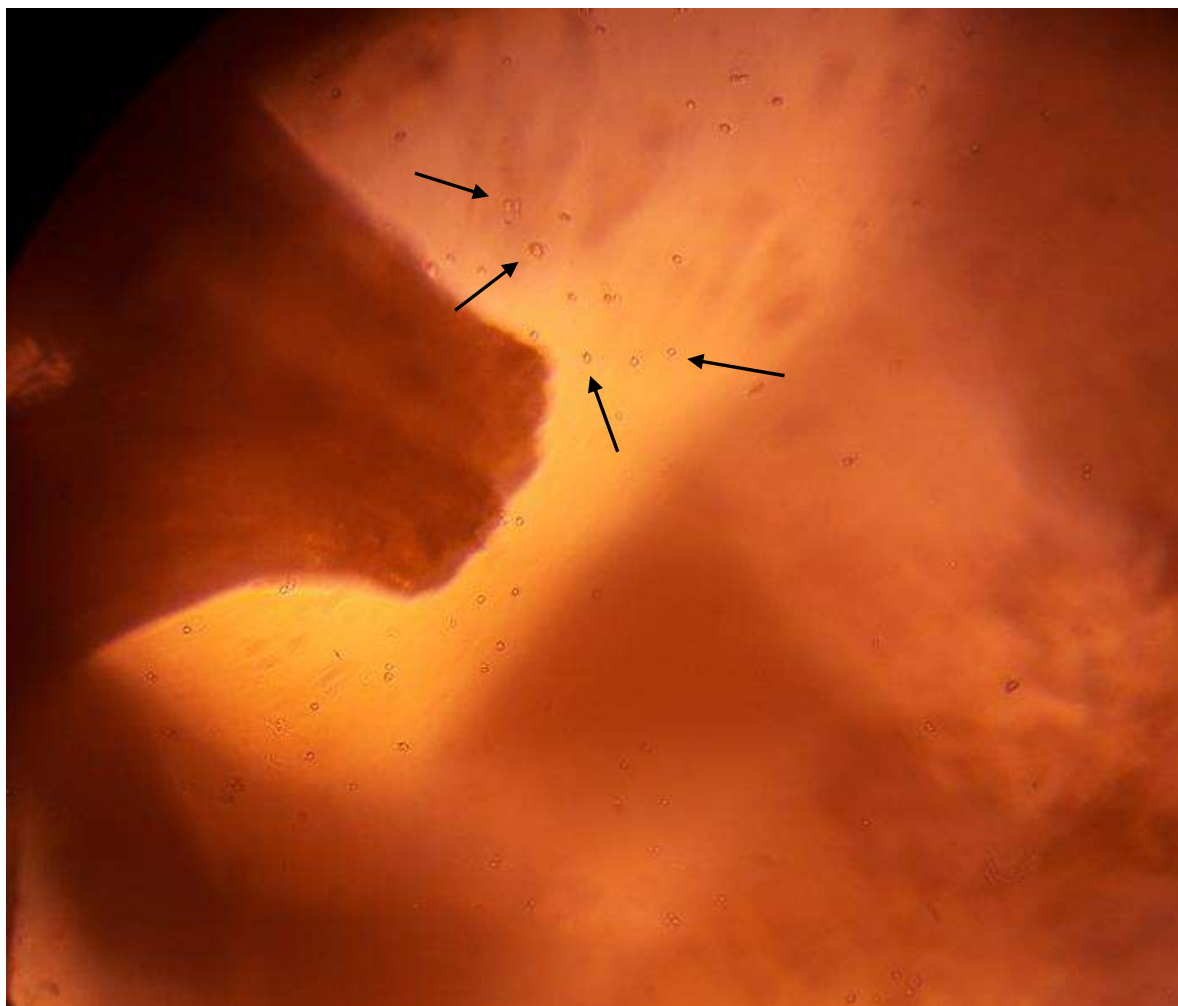


Figura 10: Crescimento de células de mieloma contendo a *Luffa cylindrica* como suporte, vista do microscópio invertido, 20 x. As setas indicam as células de mieloma em suspensão.
Fonte: Autor.

6 CONCLUSÃO

A vantagem da utilização da *Luffa cylindrica* como suporte para a cultura de células deve-se ao arranjo de suas fibras e sua elevada porosidade. O arranjo tridimensional proporcionado pela estrutura da *Luffa* colabora para o aumento de área para o crescimento das células, uma vez que o crescimento não se limita apenas à superfície que a cultura está contida, mas sim em todas as dimensões do arranjo do suporte da *Luffa cylindrica*.

A utilização da *Luffa cylindrica*, após o tratamento adequado, apresentou potencial para ser utilizada como suporte de crescimento para células de hibridomas e de mieloma.

Apesar de não obtermos resultados satisfatórios com as células de hibridomas devido a consecutivas quedas de energia elétrica, os experimentos terão continuidade utilizando as células de mieloma SP2/1 em diferentes condições, variando parâmetros como agitação e introdução forçada de ar/ CO₂ 5% no sistema. Esperamos com isso aumentar a troca de nutrientes e a densidade celular, aumentando assim o rendimento nas culturas de hibridomas.

.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A. K.; LICHTMAN, A. H.; SHIV P. **Imunologia Celular e Molecular. Anticorpos e Antígenos**. 8ª edição, Elsevier Editora Ltda, 2015.

AGRA, C.A. **Tratamento de águas residuais domésticas em reatores de biomassa dispersa e biomassa aderida**. Universidade Federal da Paraíba. Dissertação - Mestre em desenvolvimento e Meio Ambiente. Campina Grande, PB. 2009.

BAL, K. E. Morphology and antimicrobial properties of *Luffa cylindrica* fibers/chitosan biomaterial as micro-reservoirs for silver delivery. *Materials Letters*, 2012. v.79, p.238-241 Bruno A. N. **Biotecnologia I: Princípios e Métodos**. Artmed Editora 2014.

BARROSO, P. A.; et al. **Caracterização morfológica de plântulas de *Luffa cylindrica* L. germinadas *in vitro***. *Revista Agropecuária Técnica*, 2014. v.35, p. 89-93.

CARIBÉ, R. A. et al. **Abordagem Da Atividade Biologica Do Extrato Da *Luffa Operculata* Cogn (*Curcubitaceae*)**. p. 99, 2008.

CHEN, Q. et al. **A multiscale study on the structural and mechanical propertice of the luffa sponge from *Luffa cylindrica* plant**. *Journal of Biomechanics*, v. 47, n. 6, p. 1332 – 1339, 2014.

DIAS, N.A.; XAVIER, M.P.C.; MALAQUIAS, N.G.; SANTOS, E.P.; DA SILVA, M.L.C.P.; **Isolamento da celulose de bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) via diferentes tratamentos químicos para geração de material de reforço**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, SC. 2014.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana**. Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde. 2013.

IBRAHIM, M. A.; ALIYU A. B.; ABUSUFIYANY A.; BASHIR M.; SALLAU A. B. **Inhibition of *Naja nigricolis* (Reinhardt) venom protease activity by *Luffa egyptiaca* (Mill) and *Nicotiana rustica* (Linn) extracts**. *Indian Journal Experimental Biology*, 2011. v.49, p.552–554.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificty**. *Nature*, v. 256, p. 495-497, 1975.

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

LEGAZPI, L. ET AL. **Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: Substrate and agitation effects.** Biochemical Engineering Journal, v. 26,p. 122-130, 2005.

LIU Y-K, S. M.; TANAKA H; FURUSAKI S. **Characteristics of loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for plant cell immobilization.** Journal of Fermentation and Bioengineering. 1998. v.85, n.4, p.16–421.

MAINS, R.E.; CULLEN, E.I.;MAY,V.; EIPPER, B. A. (1987) **The role ofsecretory granules in peptidebiosynthesis.** Ann NY AcadSci., v.493, p.278-291.

MAZALI, I. O.; ALVES O. L. **Morphosynthesis: high fidelityinorganic replica ofthefibrous network ofloofasponge (*Luffa cylindrica*).** Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2005.v.77, p.25-31.ISSN 0001-3765.

MION, W. **Seleção de Mielomas e Hibridomasmurinos na produção de Anticorpos Monoclonais.**Tese de mestrado. Universidade Estadual Paulista - Julio de Mesquita Filho. Botucatuba, 2014.

MOLINARO, E.M., CAPUTO, L.F.G., AMENDOEIRA, M.R.R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.**Volume 2. Escola Politécnica de Saúde Joaquim, Venâncio. Rio de Janeiro. 2009. ISBN 978-85-98768-41-0

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica.** São Paulo: Rocca, 2007. 503 p. 253. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Manual da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

MURRAY P.,ROSENTHAL K. S.,PFALLE M. A. **Microbiologia médica.**7º edição, p. 29-41, 2014.

OGBONNA, J. C. et al. **Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a Carrier for Microbial CellImmobilization.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 78, n. 6, p. 437–442, 1994.

OLADOJA, N. A.; ABOLUWOYE, C. O.; AKINKUGBE, A. O. **Evaluation of loofah as a sorbent in the decolorization of basic dye contaminated aqueous system.** Industrial & Engineering Chemistry Research. 2009. v.48, p.2786–2794.

PAPOUTSAKIS, E. T.; (1991) **Fluid-mechanical damage of animal cells in boreactors.** Trends-Biotechnology. V.9, n.12, p.427-437.

PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. **Recombinant protein therapeutics – sucess rates, Market trends and values to 2010.** Nature Biotechnology, v. 22, n. 12, p. 1513 – 1519, 2004.

PEDRINI M. R. S. **Desenvolvimento e aplicações de um biorreator airlift com circulação externa.** Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Trindade, Florianópolis – SC. 1997.

PEREIRA JR., Nei. **Tecnologia de bioprocessos.** Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, p. 62. 2008.

REICHERT, J.M. et al. **Monoclonal antibody successes in the clinic.** *Nature Biotechnology*, v.23, n.9, p. 1073-1078, 2005.

SAEED, A.; IQBAL, M. **Loofa (Luffa cylindrica) sponge: Review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications.** *Biotechnology progress*, v. 29, n. 3, p. 573-600, 2013. ISSN 1520-6033. .

SCALIA, R. A. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana da Luffa operculata em Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae e Staphylococcus aureus.** *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, v. 1, p. 61, 2015.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial.** v.2, capítulo 6, p.93-122. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001

TANOBE, V. O. A. et al. **A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (Luffa cylindrica).** *Polymer Testing*, v. 24, n. 4, p. 474–482, 2005.

WALSH, G. **Biopharmaceutical benchmarks 2014.** *Nature Biotechnology*, v.32, p. 992-1000, 2014.

ZAMPIERI, A. et al. **Biotemplating of Luffa cylindrica sponges to self-supporting hierarchical zeolite macrostructures for bio-inspired structured catalytic reactors.** *Materials Science and Engineering C*, v. 26, n. 1, p. 130–135, 2006.