

TECNOLOGIAS DE CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS

Analice Ricarte Lima

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP Cubatão), Cubatão, SP, Brasil

Dr. Manuel Filgueira Barral

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP Cubatão), Cubatão, SP, Brasil

Resumo: A expressão de genes em células animais possibilita a produção de proteínas em larga escala com características adequadas para aplicações estruturais, funcionais e imunológicas. Essas proteínas destinadas ao uso em saúde são conhecidas como biofármacos e possuem grande relevância no desenvolvimento de terapias modernas. Nos últimos anos, especialmente após a pandemia da COVID-19, o mercado e o desenvolvimento desses produtos foram significativamente ampliados, impulsionando novas pesquisas e avanços tecnológicos na área biotecnológica. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre as tecnologias relacionadas à produção de biofármacos a partir de células animais. Com essa revisão, buscou-se atualizar e discutir os principais sistemas de expressão celular, técnicas de manipulação genética e métodos de cultivo utilizados na produção dos biofármacos.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais. Biorreatores. Linhagens geneticamente modificadas. Glicosilação. Microcarregadores.

Abstract: The expression of genes in animal cells enables the large-scale production of proteins with characteristics suitable for structural, functional, and immunological applications. Proteins intended for use in healthcare are known as biopharmaceuticals and play a major role in the development of modern therapies. In recent years, especially after the COVID-19 pandemic, the market and development of these products have expanded significantly, driving new research and technological advances in the field of biotechnology. In this context, the objective of this study was to conduct a literature review on technologies related to the production of biopharmaceuticals from animal cells. Through this review, the aim was to update

and discuss the main cellular expression systems, genetic manipulation techniques, and cultivation methods used in the production of biopharmaceuticals.

Keywords: Antibody production. Animal cell bioreactor. Genetically engineered strains. Glycosylation. Microcarriers.

INTRODUÇÃO

A cultura de células é uma área fundamental da biotecnologia que teve início com os estudos de Ross Granville Harrison (1870–1959) (Moro *et al.*, 2024). Em 1907, o biólogo demonstrou que era possível cultivar células nervosas fora de um organismo vivo, estabelecendo as bases para o desenvolvimento das técnicas modernas de cultura celular. Desde então, essa tecnologia tem sido amplamente estudada e aprimorada, especialmente no que se refere às células animais, tornando-se essencial para diversas aplicações científicas e biotecnológicas.

Observou-se que a expressão de genes heterólogos — genes não presentes naturalmente em um organismo e introduzidos por manipulação genética nessas células — possibilita a produção de proteínas recombinantes em larga escala e com características adequadas para estudos estruturais e funcionais, além de aplicações imunológicas e terapêuticas. Entre esses produtos destacam-se anticorpos recombinantes, terapias baseadas em ácidos nucleicos e células geneticamente modificadas, geralmente denominados biofármacos.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar pesquisas publicadas nos últimos dez anos relacionadas a métodos, equipamentos, tipos de linhagens celulares e novas tecnologias aplicadas à biotecnologia. A partir desse levantamento, buscou-se compreender o progresso recente da área e identificar possíveis tendências e perspectivas para o desenvolvimento futuro.

LINHAGENS DE EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão de proteínas heterólogas- proteínas não presentes naturalmente em um organismo e cuja expressão ocorre por manipulação genética com a introdução de gene de outra espécie- em micro-organismos e células animais, é um ponto fundamental no atual desenvolvimento da biotecnologia. Essa expressão permite a produção de proteínas bioativas a partir de meios relativamente baratos ao

invés de utilizar extrações custosas, com uso intensivo de mão de obra, e que resultam em produtos de qualidade variável. A seleção de um sistema de expressão recombinante ótimo é fundamental para definir um processo de produção de proteínas eficaz e viável. Um sistema de expressão ótimo depende, portanto, da sua produtividade, da bioatividade da proteína obtida, do uso previsto para a proteína e das suas características físico-químicas, juntamente com o custo, conveniência e segurança do próprio sistema de expressão.

As células hospedeiras utilizadas para a expressão de genes heterólogos tanto podem ser procarióticas ou eucarióticas, sendo que ambas têm vantagens e desvantagens inerentes. Grandes proteínas são geralmente expressas em células eucarióticas, enquanto as menores são expressas em células procarióticas o que caracteriza os dois principais sistemas de expressão.

O sistema de expressão eucariótico mais comum utiliza as células de ovário de hamster chinês, comumente chamadas de células CHO (*Chinese Hamster Ovary*). Dentre as vantagens dessa linhagem, tem-se a capacidade de produzir anticorpos em altas concentrações (3 g/L a 8 g/L) em grande escala e de sobreviver a meios definidos. Outros sistemas utilizando células de mamíferos adotados são células de mieloma de camundongo NS0 (7 produtos), rim de hamster bebê (BHK), rim embrionário humano (HEK293) – frequentemente usadas para expressão transiente e produção de vírus associados a adenovírus (AAVs) devido à sua alta eficiência de transfecção e rápido crescimento, células de mieloma de camundongo SP2/0 e células retinianas embrionárias humanas imortalizadas PER C6 (Horie *et al.*, 2022; Ho *et al.*, 2021).

Em relação a sistemas de expressão de não-mamíferas, os sistemas de *E. coli* continuam em predominância no mercado, sendo usados para vários produtos, demonstrando que, apesar da sua incapacidade de produzir proteínas com glicosilação ou de realizar qualquer processo pós-traducional próprio ao uso humano, eles ainda têm um papel essencial no mercado. Outro microrganismo relevante é a bactéria *Pseudomonas fluorescens*.

Além desses sistemas de não-mamíferos citados, também se tem um número menor de produtos utilizando para expressão de proteínas heterólogas em leveduras, como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula*

polymorpha. As leveduras apresentam vantagens como a capacidade de modificações pós-traducionais, por sua natureza eucariótica, que inclui o dobramento correto de proteínas e a adição de glicanos, embora estes sejam predominantemente do tipo de alto teor de manose e, assim, diferentes do padrão humano. Além disso, derivados de levedura, como hidrolisados, têm sido amplamente utilizados não só para melhorar a proliferação celular ou como suplemento para a transição de culturas para meios livres de soro, mas também para aperfeiçoar o perfil de glicosilação de proteínas recombinantes, como em células CHO (Horie *et al.*, 2022; Ho *et al.*, 2021).

A expressão genética estável de proteínas heterólogas também é possível em células embrionárias de dípteros como a linhagem *Drosophila melanogaster* *Schneider* 2 (S2) que vêm sendo utilizadas para a produção de proteínas recombinantes como anticorpos, enzimas, inibidores tumorais, fatores de crescimento e antígenos virais. (Pilatti *et al.*, 2020).

TECNOLOGIAS DE ENGENHARIA GENÉTICA EM CÉLULAS ANIMAIS

A engenharia genética modifica sequências de DNA em genomas celulares utilizando tecnologias de biologia molecular. Existem muitos tipos de modificações genéticas possíveis de serem feitas no genoma e incluem a capacidade de atingir locais específicos e realizar alterações como incluem *knockouts* (deleções de sequências de DNA), *knockins* (inserções de sequências de DNA) e substituições (substituição de sequências de DNA por sequências exógenas). As deleções são utilizadas para remover elementos regulatórios que nocauteiam a expressão gênica, ativam a expressão gênica ou alteram a estrutura/função de proteínas por meio da alteração de sequências codificadoras.

A engenharia genética é utilizada principalmente para a expressão de proteínas heterólogas em células hospedeiras com expressão estável, afetando minimamente as propriedades dessas células hospedeiras (Lanigan; Kopera; Saunders, 2020).

A combinação de tecnologias de engenharia genética com a tecnologia de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) possibilita a reprogramação de células adultas (somáticas) em laboratório para um estado pluripotente. Esse processo permite o estudo e a correção de erros genéticos, além de ampliar as

possibilidades da medicina regenerativa, visando à substituição de tecidos perdidos ou danificados por doenças degenerativas ou lesões (Ofenbauer; Tursun, 2019). Nesse contexto, a modificação genômica de células animais apresenta grande potencial tanto para a produção industrial de proteínas quanto para diversas aplicações médicas.

A tecnologia para modificações genéticas com maior repercussão nos últimos anos foi o da edição genômica por repetição palindrômica curta regularmente interespaçada em *cluster*, técnica abreviada como CRISPR que, aliada aos avanços em computação e recursos de geração de imagens, deu início a uma nova era na edição genômica (Tiwari, 2020; Wang; Doudna, 2023).

As bases da tecnologia CRISPR-Cas9 foram estabelecidas quando pesquisadores observaram pela primeira vez sequências repetitivas peculiares no DNA bacteriano no final da década de 1980. Essas sequências, mais tarde denominadas CRISPR, eram inicialmente um mistério. No início dos anos 2000, percebeu-se terem essas sequências um papel na imunidade bacteriana e juntamente com a descoberta das proteínas CAS, especialmente a Cas9 – uma endonuclease que causa uma quebra na fita dupla do DNA e que é capaz de modificar o genoma –, foram fundamentais para a compreensão de como as bactérias usavam o CRISPR para cortar o DNA.

Desde o advento do sistema CRISPR-Cas, o direcionamento genético mediado por endonucleases tornou-se o método mais amplamente aplicado em engenharia genética, substituindo o uso de outras nucleases. A tecnologia CRISPR-Cas9 tem sido aplicada para editar genomas de vários organismos, incluindo aves, para os quais a recombinação genética era anteriormente difícil. Para aprimorar ainda mais a tecnologia de edição genética usando CRISPR-Cas, é necessário facilitar a eficiência da recombinação genética de *knockin* e supressão de alvos não identificados (Horie *et al.*, 2022).

Para utilizar o sistema CRISPR-Cas9 em aplicações industriais e médicas, é necessário administrá-lo e traduzi-lo para células-alvo com alta eficiência. Essa tecnologia tende a avançar cada vez mais por meio de vários estudos, que permitirão a edição genômica e a regulação transcricional mais precisas e eficientes.

GLICOSILAÇÃO E COMPATIBILIDADE HUMANA

Os biofármacos são majoritariamente glicoproteínas, ou seja, proteínas que contêm oligossacarídeos ligados covalentemente e são encontradas em toda a natureza, tendo uma grande gama de funções. A porção carboidrato ligada à proteína é também denominada *glico* e, antes da ligação a um amino ácido, a molécula de açúcar é chamada de grupo glicosil (Butler, 2008).

A adição de glicosil a uma cadeia peptídica, proteica ou lipídica, é chamada de glicosilação. Mais da metade das proteínas do corpo humano são glicosiladas. Em células eucarióticas, a glicosilação ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi.

A glicosilação de proteínas é um processo pós-traducional fundamental para a regulação da estrutura e função das proteínas no organismo, desempenhando um importante papel na estabilidade, na localização celular, nas interações proteína-proteína e no reconhecimento celular. Ela é essencial para o funcionamento adequado das proteínas no organismo, pois influencia o enovelamento, a estabilidade, a solubilidade e o tráfego intracelular de uma proteína. A glicosilação ocorre em moléculas responsáveis por adesão celular, vitais para a progressão do câncer, metástase tumoral e evasão imunológica (Butler, 2008; He; Zhou; Wang, 2024; Läubli, Borsig, 2019).

Embora o impacto e papel dos glicanos — porção carboidrato ligada à proteína também chamados de polissacarídeo — nos glicoconjugados da superfície celular e nas proteínas ligadas a glicanos (GBPs) terem sido difíceis de definir, as características dos polissacarídeos provavelmente contribuem para seu papel central e dinâmico em muitos processos imunológicos, ou seja, sua capacidade de neutralização e eliminação dos micro-organismos patógenos e das suas toxinas microbianas ou derivadas dos venenos (Hale *et al.*, 2024).

A composição dos glicanos é determinada pela ação de enzimas como glicosiltransferases e glicosidases, além da disponibilidade de nucleotídeos de açúcares na célula. Esses fatores podem variar em resposta a estímulos ambientais, modulando a modificação e o alongamento das cadeias de glicanos e, conseqüentemente, influenciando a função das proteínas e a sensibilidade celular das proteínas ligadas a glicanos (Hale *et al.*, 2024). A composição dos glicanos

em proteínas recombinantes também depende do sistema hospedeiro utilizado para sua produção. Sistemas bacterianos, por exemplo, não produzem glicoproteínas naturalmente, enquanto leveduras, plantas e insetos podem gerar glicanos imunogênicos. Já sistemas baseados em células de mamíferos são capazes de produzir glicanos complexos semelhantes aos humanos, sendo por isso amplamente utilizados na produção de glicoproteínas bioterapêuticas (Gupta ; Shukla, 2018).

Gupta e Shukla (2018) destacam os dois processos de glicosilação; o primeiro onde um oligossacarídeo liga-se ao aminoácido asparagina de uma cadeia polipeptídica, consistindo a N-glicosilação, e o segundo onde um glicano liga-se à serina ou à treonina, consistindo a O-glicosilação. Têm sido utilizadas técnicas de engenharia genética, como o *knockout*, para silenciar um gene alvo de interesse e que permite o aumento da atividade biológica. Segundo os autores, o uso de ferramentas modernas de edição genômica e um melhor controle e compreensão dos processos de cultura celular possibilitarão o desenvolvimento de hospedeiros de produção de uma próxima geração aprimorada de proteínas que podem levar ao desenvolvimento de proteínas terapêuticas de baixo custo e acessíveis com potência superior e com doses e frequências mais baixas.

Até o momento, várias estratégias foram implementadas para superar os desafios de qualidade do produto. A melhor abordagem para controlar a glicosilação tem sido monitorar a qualidade do produto desde a triagem do clone, sua seleção e as etapas subsequentes de otimização do processo. Segundo Ma *et al.* (2020), essas técnicas de engenharia genética de proteínas e enzimas industriais ainda estão em seus primórdios e o grau de sua aceitação na comunidade científica não é alto.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são, estruturalmente, glicoproteínas potencializadoras de anticorpos naturais ou capazes, por mimetização, de suplementar o sistema imunológico do corpo e, assim, realizar um ataque a micro-organismos ou células tumorais (Mekala *et al.*, 2024).

Os mAbs são grandes moléculas proteicas heterodiméricas com peso molecular de aproximadamente 150 kDa e formam duas cadeias leves idênticas

envolvidas na ligação ao material estranho ou antígeno (os braços Fab – Fragmento de ligação ao antígeno) e uma terceira unidade (Fc – Fragmento cristalino – envolvida na ligação de moléculas geralmente relacionadas à eliminação do antígeno), formando uma estrutura em forma de Y. A unidade Fc é formada por duas cadeias pesadas idênticas unidas por ligações dissulfeto (Castelli; McGonigle; Hornby, 2019).

Existem cinco classes de anticorpos ou imunoglobulinas, denominadas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE que se diferenciam em suas regiões Fc e, ao se ligarem ao antígeno, tendem a desencadear diferentes funções efetoras. Cada classe é dividida em diferentes subtipos; por exemplo, a IgG é dividida em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que diferem ligeiramente originando potenciais de ação imune distintas. Devido à sua meia-vida circulante e à relativa facilidade de produção, todos os mAbs terapêuticos atualmente utilizados clinicamente são IgG1 (Ryman; Meibohm, 2017; Tanaka, 2024).

O seu desenvolvimento foi possível após a introdução da técnica do hibridoma, técnica de fusão de células de linfócitos e mieloma gerando clones imortais a partir de células B que puderam ser rastreados com base na afinidade de ligação de seu produto, permitindo a seleção de mAbs específicos e de alta afinidade (Castelli; McGonigle; Hornby, 2019). Segundo a Merck (2025), os anticorpos monoclonais produzidos a partir da tecnologia de hibridoma são utilizados nas seguintes aplicações: análises bioquímicas; utilização em imunoterapia e purificação de proteínas.

MEIOS DE CULTIVO CELULAR

Os meios de cultura são componentes determinantes ao cultivo de células. Eles são caracterizados como ambientes que fornecem nutrientes essenciais (fontes de energia como glicose e frutose, aminoácidos, sais inorgânicos, vitaminas, lipídios, fatores de crescimento e hormônios). Não existe um meio "universal" e a escolha é específica para cada tipo celular. Sendo assim, o desenvolvimento de produtos depende diretamente da qualidade e eficácia dos meios (Nema; Khare, 2012).

Existem duas categorias: os meios naturais e os meios sintéticos. Os naturais são compostos por fluidos biológicos naturais, como plasma, soro, extrato de tecidos, entre outros. Por não terem sua composição definida, a variação entre lotes

é observável – reduzindo sua reprodutibilidade –, junto ao risco de contaminação e acarretamento de substâncias citotóxicas que podem inibir ou afetar funções básicas da célula. Em compensação, apresentam proliferação e sobrevivência celular aprimoradas. Já os sintéticos são constituídos por um meio básico suplementado, podendo utilizar os fluidos anteriormente citados (como os soros) ou substâncias quimicamente definidas. No primeiro caso, ocorrem as mesmas dificuldades enfrentadas pelos meios naturais, além de um alto custo de produção. No segundo, apesar da padronização por lote e da contaminação reduzida, existe grande dificuldade para projetar o meio ideal para cada tipo celular, o que faz com que não se tenha variedades suficientes para todos os tipos celulares (Yao; Asayama, 2017).

Os meios sintéticos podem ser classificados em diferentes tipos: contendo soro e livres de soro. Os meios contendo soro utilizam esse fluido como principal fonte de nutrição. O soro é um líquido claro e amarelado obtido após a remoção de fibrinogênio e de células do sangue (Verma; Verma; Singh, 2020). Apesar das limitações já mencionadas, esse tipo de meio costuma ser mais facilmente desenvolvido e eficaz em diversos tipos celulares, devido à presença de substâncias biologicamente ativas essenciais para a sobrevivência celular. O tipo de soro mais utilizado é o FBS (soro fetal bovino). Vale ressaltar que sua qualidade está diretamente ligada à sua origem e à sua rastreabilidade, sendo necessário evitar regiões de encefalopatia espongiforme bovina, patologia proteica mais conhecida como “doença da vaca louca” (Schnitzler *et al.*, 2015).

Os meios livres de soro possuem composição definida, o que favorece maior reprodutibilidade e facilita a validação dos processos de cultivo. Entretanto, seu desenvolvimento é uma tarefa difícil, existindo apenas algumas formulações para tipos celulares específicos. Além disso, esse tipo de meio necessita de uma constante observação do pH e temperatura, e reagentes extremamente puros e assépticos (Verma; Verma; Singh, 2020).

O uso de hidrolisados nos meios de cultura surge como uma alternativa na formulação de meios livres de soro. Os hidrolisados são obtidos a partir da hidrólise enzimática ou química de materiais proteicos de origem vegetal, animal ou microbiana. Eles contêm uma mistura complexa de peptídeos, aminoácidos livres, carboidratos, lipídios, minerais, vitaminas e até mesmo fatores bioativos (Ho *et al.*,

2021). Esses componentes proporcionam não apenas nutrição, mas também efeitos funcionais, como proteção contra estresse oxidativo, estímulo à proliferação celular, melhora no perfil de glicosilação de proteínas recombinantes e aumento na produtividade de anticorpos monoclonais (Ho *et al.*, 2021). Uma das limitações do uso de hidrolisados é sua natureza indefinida, o que acarreta variações entre lotes e possíveis contaminantes ou subprodutos prejudiciais. Para contornar isso, técnicas modernas de cromatografia e espectrometria de massas vêm sendo empregadas para identificar peptídeos ativos e, futuramente, permitir a substituição dos hidrolisados por misturas definidas e sintéticas (Ho *et al.*, 2021).

Por fim, os tipos “livre de proteínas”, “livre de xenobióticos” e “quimicamente definidos” são os subgrupos dos meios sem soro. Os dois primeiros podem ser caracterizados como meios que podem conter componentes indefinidos, mas sem proteínas, enquanto o terceiro é um meio sem origem animal onde todos os componentes são definidos. (Ho *et al.*, 2021).

TIPOS DE CULTIVOS UTILIZADOS

Para realizar a cultura de células animais, são necessárias algumas etapas específicas. Inicialmente, obtém-se a cultura primária, que é extraída de fragmentos de tecidos por desintegração mecânica e/ou química ou por digestão enzimática (Verma; Verma; Singh, 2020). Essas culturas primárias são heterogêneas e demandam um meio complexo para seu crescimento, assim como citado na seção anterior. Dessa forma, as culturas celulares podem ser classificadas em dois tipos, de acordo com seu comportamento no meio: aderentes ou em suspensão.

- **Células aderentes:** necessitam de uma superfície sólida, estável, não tóxica e biologicamente inerte para se fixarem, utilizando proteínas de adesão que funcionam como uma “ponte” entre a célula e a superfície. Nesse processo de subcultura que se utilizam enzimas para desprender as células, permitindo sua transferência para um novo recipiente.
- **Células em suspensão:** crescem e se mantêm em meios líquidos. Um exemplo típico são as células sanguíneas, que vivem naturalmente no plasma (Verma, Verma; Singh, 2020).

Após essa etapa, a cultura é submetida à passagem, um processo de subcultura celular no qual se produz um grande número de células a partir das já

existentes, originando uma linhagem celular homogênea. Depois da subcultura, as células podem ser propagadas, caracterizadas e armazenadas para uso futuro, sendo caracterizadas como linhagens (Verma, Verma e Singh, 2020). Tais linhagens também são divididas em dois tipos, caracterizados pelo seu tempo de vida útil, podendo ser finitas ou infinitas. O primeiro caso é dado por células dependentes de ancoragem (aderentes), com uma baixa taxa de crescimento e limitações de densidade. Já o segundo caso é caracterizado por células que podem ter seu desenvolvimento em suspensão ou monocamada, sendo essas células cancerígenas ou linhagens transformadas in vitro (Verma; Verma; Singh, 2020).

SISTEMAS DE CULTIVO CELULAR

Os sistemas de cultivo celular constituem ambientes artificiais projetados para manter e propagar células, tecidos ou órgãos in vitro. Eles atuam como mantenedores de condições específicas de fatores de crescimento, pH, temperatura, concentração de gases (CO_2 e O_2), osmolalidade e, sobretudo, esterilidade (Verma; Verma; Singh, 2020). Cada parâmetro é vital para a sobrevivência e multiplicação celular, motivo pelo qual seu monitoramento deve ser constante. A escolha do sistema de cultivo depende diretamente da linhagem celular utilizada, da escala de produção e do objetivo pretendido.

Como discutido anteriormente, as células podem ser classificadas em aderentes (dependentes de ancoragem) ou suspensas (independentes de ancoragem), o que dá origem a dois sistemas principais de cultura: o 2D e o 3D.

Para o cultivo de células de mamíferos, o método de cultura bidimensional (2D) é amplamente utilizado em laboratório. Utiliza-se superfícies de cultura plásticas revestidas com proteínas ou moléculas de adesão para auxiliar a fixação celular.

Nesse caso, as células são fixadas à superfície de cultura e formam uma monocamada de espessura de uma célula, facilitando a troca do meio e observando a morfologia celular individual para controle de qualidade. Quando a superfície de cultura estiver totalmente coberta (confluente), as células devem ser destacadas e semeadas uniformemente em baixa densidade em um novo recipiente, à medida que as células mudam suas características ao se tornarem confluentes. (Horie et al., 2022). Como o rendimento celular final de culturas 2D depende da área de cultura, diversos equipamentos, como frascos rolantes e frascos multiestágios, estão

disponíveis, projetados para aumentar eficientemente a área de cultura. No entanto, é difícil obter de 10^9 células/mL a 10^{10} células/mL (o número de células necessário em aplicações médicas).

Entre suas principais vantagens está a simplicidade do manuseio, já que a expansão celular pode ser realizada em superfícies planas, o que torna o processo acessível e eficiente, especialmente quando grandes quantidades de células não são necessárias. Além disso, a cultura em 2D permite fácil observação e controle de qualidade e adequação para células dependentes de ancoragem (Nema; Khare, 2012).

Apesar dessas vantagens, as culturas em monocamada apresentam limitações significativas. A principal delas é a baixa representatividade dessas células em relação ao ambiente tridimensional das células dos organismos vivos, o que pode gerar resultados parciais ou enganosos. Além disso, por dependerem de superfícies planas para crescer, o número de células é limitado pela área disponível do recipiente. Quando toda a superfície é ocupada, ocorre a confluência da cultura, estágio em que o crescimento celular é interrompido devido ao contato célula-célula, levando à chamada fase estacionária ou platô de crescimento.

Tais limitações estimularam o desenvolvimento dos sistemas 3D, nos quais células em suspensão não dependem de superfícies de adesão, apresentando maior capacidade de expansão e uma emulação da realidade biológica. Dessa forma, os sistemas 3D conseguem superar deficiências observadas no cultivo em 2D e ampliam as possibilidades de aplicação em pesquisa e biotecnologia (Horie *et al.*, 2022).

Além disso, já existem alternativas que permitem a sobrevivência de células dependentes de ancoragem em sistemas de suspensão, unindo as vantagens de ambos os métodos. Isso é feito por meio do uso de microcarregadores, que consistem em microesferas revestidas com matriz extracelular — um substrato que simula o ambiente natural da célula. As células aderem a essas esferas, que permanecem suspensas no líquido, combinando a capacidade de adesão do 2D com a expansão volumétrica típica do 3D. Contudo, quando há excesso de microcarregadores, eles tendem a colidir com frequência, o que pode prejudicar a viabilidade celular (Horie *et al.*, 2022).

BIORREATORES PARA CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS

Os biorreatores são equipamentos padrão para prover um ambiente favorável e ideal às células para que alcancem seu auge de performance e para que os produtos tenham qualidade ao serem replicados. Portanto, sua principal função é promover qualidade quando as formulações são escalonadas. Além disso, garantem o controle dos processos biológicos, sendo essa uma ferramenta essencial para a indústria. Por razão da larga escala requerida, os biorreatores de células animais vêm se popularizando, entretanto, enfrentam o desafio de não terem uma alta produtividade para células com uma complexidade elevada e que necessitam de cuidados especiais (Horie *et al.*, 2022).

A indústria tem migrado de culturas planares para biorreatores de tanque agitado (stirred-tank bioreactors), que permitem a cultura em suspensão com o uso de microcarregadores. Segundo Schnitzler (2015), esses biorreatores estão disponíveis em diferentes tipos e escalas, sendo eles:

- **Os sistemas de mini-reatores** que apresentam volumes de trabalho que variam entre 3 e 250 mL e são adequados para o desenvolvimento de processos em pequena escala, com monitoramento e controle de gases e de linha; alguns deles são projetados para utilização de microcarregadores magnéticos.
- **Os reatores de bancada agitados**, entre 1 e 5 litros, são utilizados para o desenvolvimento e expansão inicial dos processos. Em escala intermediária, os reatores agitados em escala piloto possuem volumes de 50 a 300 litros e são empregados na fabricação em nível piloto e clínico, com a vantagem de serem escaláveis a partir de versões menores.
- **Os reatores de produção**, por sua vez, variam entre 500 e 2000 litros e são adequados para a fabricação em escala clínica e industrial.

Reator tanque agitado (STR)

Os reatores tipo de tanque agitado continuamente (STR) são equipamentos essenciais usados em engenharia química, biotecnologia e processos de produção industrial. Nele, as reações químicas ou bioquímicas ocorrem com mistura do meio, garantindo temperatura, concentração e taxas de reação uniformes em todo o volume de reação.

São tanques agitados convencionais em aço inoxidável e têm um grande potencial de ampliação de escala, o que é crucial para atender à crescente demanda por vacinas, por exemplo (Gallo-Ramirez *et al.*, 2015). Certas linhagens celulares têm requisitos especiais em relação ao seu ambiente de cultivo sendo importantes no projeto do biorreator um alto coeficiente de transferência de massa de gás (volumétrico), baixo consumo de energia volumétrico, baixa tensão de cisalhamento, baixa suscetibilidade à bioincrustação, capacidade de cultivar células aderentes e propriedades de mistura adequadas.

Biorreatores descartáveis (*disposable bioreactors*)

Biorreatores descartáveis têm sido cada vez mais incorporados em instalações biotecnológicas, impulsionados pelas necessidades do mercado e, em particular, pelos desenvolvedores e fabricantes de medicamentos, vacinas e outros produtos biológicos. Suas vantagens de uso contribuíram para novos desenvolvimentos e resultaram na disponibilidade de uma variedade de tipos de biorreatores descartáveis, que diferem em potência de entrada, design, instrumentação e escala do recipiente de cultivo (Stanbury; Whitaker ; Hall, 2017). A principal vantagem é não necessitar instalações e procedimentos de limpeza e esterilização, que representam uma proporção substancial dos custos de capital e operacionais da fermentação convencional.

Existem muitos tipos de recipientes disponíveis, que diferem em design, escala, instrumentação e requisitos de energia, sendo os biorreatores descartáveis mais comuns disponíveis comercialmente os de agitação por ondas/balanço (onde o movimento de balanço promove a mistura e a transferência de oxigênio, os de agitação orbital e os de agitação mecânica (Wang; Doudna, 2023).

Biorreatores com microcarregadores

Os microcarregadores são geralmente cultivados em biorreatores de tanque agitado, mas outros biorreatores, como biorreatores de microgravidade de parede rotativa, biorreatores Wave e biorreatores de leito fluidizado também podem ser utilizados (Chen *et al.*, 2020).

As razões para o uso de microcarregadores (Chen *et al.*, 2020) incluem o aumento de escala de produção: permitir altas densidades celulares; estabelecer

condições de cultivo otimizadas por melhor controle de parâmetros críticos do processo; facilidade de amostragem e monitoramento e redução de manipulação manual.

Liu *et al.* (2018) demonstraram um aumento do rendimento da produção de vacinas de 7 a 14 vezes com processo em biorreator com microcarregadores. Dessa forma, os microcarregadores são uma solução tecnológica essencial quando métodos de cultura tradicionais não conseguem fornecer a área de superfície ou o volume de produção necessários para aplicações biotecnológicas em escala industrial ou clínica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tecnologia do cultivo de células animais constitui eixo central da biotecnologia atual. Dado o avanço em áreas como engenharia genética, modelagem estrutural da dinâmica do processo e a automação de biorreatores, há uma tendência de avançar no aumento da eficiência, escalabilidade e sustentabilidade ética em sistemas produtivos. Contudo, o potencial total das células animais originais ainda pode ser explorado de forma mais ampla e será necessário um esforço contínuo de pesquisa para aumentar a aplicabilidade e reduzir os custos operacionais.

A engenharia genética, tanto na forma do sistema CRISPR, quanto suas tecnologias associadas, ainda irá exercer influência significativa dentro dos próximos dez anos. A continuação do refinamento das ferramentas CRISPR no futuro e sua interação com outras tecnologias devem viabilizar um controle ainda mais preciso da expressão gênica ou a introdução de mudanças na estrutura das proteínas. Os efeitos dessas inovações vão além das aplicações biomédicas e se estendem ao campo da agricultura e biotecnologia industrial, possibilitando aplicações profiláticas e terapêuticas em doenças e contribuindo para a criação de animais geneticamente otimizados e plantas resistentes (Wang; Doudna, 2023).

Os anticorpos monoclonais (mAbs) e seus derivados continuarão a estar entre os grandes protagonistas do mercado biofarmacêutico. O foco do desenvolvimento futuro deve ser em moléculas com maior especificidade, menor

imunogenicidade e propriedades farmacocinéticas mais amenas, assim como em métodos que permitam menores custos produtivos a partir de métodos de cultivo de células e purificação mais eficientes (Kothari *et al.*, 2024).

Em síntese, as perspectivas para a área apontam um cenário de convergência tecnológica, em que o cultivo de células animais será cada vez mais conectado à bioinformática, à inteligência artificial e à engenharia de precisão. Esse movimento tende a alterar não apenas a eficiência dos processos industriais, mas também a relação entre biotecnologia e medicina, promovendo a produção de terapias personalizadas e acessíveis, traduzindo os avanços científicos em benefícios concretos para a sociedade e a sustentabilidade global.

REFERÊNCIAS

BUTLER, M. Post-translational modifications of recombinant proteins. In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; EL-MABROUK, M. (org.). **Animal Cell Technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. London: Taylor & Francis, 2008. p. 129–146.

CASTELLI, M. S.; MCGONIGLE, P.; HORNBY, P. J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 7, n. 6, art. e00535, p. 1–18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prp2.535>. Acesso em: 11 ago. 2025.

CHEN, X.-Y. *et al.* Recent advances in the use of microcarriers for cell cultures and their ex vivo and in vivo applications. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02738-7>. Acesso em: 9 jun. 2025.

GALLO–RAMÍREZ, L. E. *et al.* Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 9, p. 1181–1195, 2015. Disponível em: [/doi.org/10.1586/14760584.2015.1067144](https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1067144). Acesso em: 5 mai. 2025.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 24, p.

10457–10468, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9430-6>. Acesso em: 12 mai. 2025.

HALE, R. C. *et al.* The role of glycosylation in clinical allergy and immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 153, n. 1, p. 55–66, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.09.003>. Acesso em: 12 mai. 2025.

HE, M.; ZHOU, X.; WANG X. Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, art. 194, p. 1–25, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01886-1>. Acesso em: 15 jun. 2025.

HO, Y. *et al.* Applications and analysis of hydrolysates in animal cell culture. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, art. 93, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00443-w>. Acesso em: 15 jun. 2025

HORIE, M. *et al.* Recent advances in animal cell technologies for industrial and medical applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 133, n. 6, p. 509–514, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.03.005>. Acesso em: 15 jun. 2025.

KOTHARI, M. *et al.* A comprehensive review of monoclonal antibodies in modern medicine: tracing the evolution of a revolutionary therapeutic approach. **Cureus**, v. 16, n. 6, art. e61983, p. 1–9, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.7759/cureus.61983>. Acesso em: 14 jul. 2025.

LANIGAN, T. M.; KOPERA, H. C.; SAUNDERS, T. L. Principles of genetic engineering. **Genes**, v. 11, n. 3, art. 291, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes11030291>. Acesso em: 18 set. 2025.

LÄUBLI, H.; BORSIG, L. Altered cell adhesion and glycosylation promote cancer immune suppression and metastasis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, art. 2120, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02120>. Acesso em: 15 jun. 2025.

LIU, C.-C. *et al.* Enhancing enterovirus A71 vaccine production yield by microcarrier perfusion bioreactor culture. **Vaccine**, v. 36, n. 22, p. 3134–3139, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.042>. Acesso em: 21 set. 2025.

MA, B. *et al.* Protein Glycoengineering: An Approach for Improving Protein Properties. *Front. Chem.* 8:622. 2020. Disponível em: <http://10.3389/fchem.2020.00622>. Acesso em jun 2025.

MEKALA, J. R. *et al.* Emerging trends and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Gene*, [s. l.], v. 925, art. 148607, p. 1–14, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148607>. Acesso em: 16 ago. 2025.

MERCK. **Hybridoma fusion partners cell lines**. [S. l.]: Merck, [2025]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/hybridoma-fusion>. Acesso em: 25 jul. 2025

MORO, L. G. *et al.* A Brief History of Cell Culture: From Harrison to Organs-on-a-Chip. **Cells**, v. 13, n. 24, art. 2068, p. 1–28, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells13242068>. Acesso em: 1 jul. 2025.

NEMA, R.; KHARE, S. An animal cell culture: Advance technology for modern research. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 219–226, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/abb.2012.33030>. Acesso em: 16 jun. 2025

OFENBAUER, A.; TURSUN, B. Strategies for in vivo reprogramming. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 61, p. 9–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.06.002>. Acesso em: 14 ago. 2025.

PILATTI, L. *et al.* Purificação da glicoproteína do vírus da raiva produzida em células S2 de *Drosophila melanogaster*: um método de imunoafinidade eficiente. **Biotechnology Progress**, v. 36, n. 6, art. e3046, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.3046>. Acesso em: 16 mai. 2025

RYMAN, J. T.; MEIBOHM, B. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 576–588, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/psp4.12224>. Acesso em: 16 jun. 2025.

SCHNITZLER, A. C. *et al.* Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: current technologies and challenges. **Biochemical Engineering Journal**, v. 108, p. 3–13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.08.014> . Acesso em: 15 set. 2025.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Design of a fermenter. In: STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 3. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2017. cap. 7, p. 487–580. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-036131-4.50012-2>. Acesso em: 16 jul. 2025.

TANAKA, N. **Anticorpos**. Todo Estudo, 2024. Disponível em: <https://www.todoestudo.com.br/biologia/anticorpos>. Acesso em: 30 jul. 2025.

TIWARI, P. The CRISPR revolution: a new era in genome editing. **International Journal of Advanced Biochemistry Research**, v. 8, n. 1, p. 505–509, 2024. DOI: <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i1Sg.383>. Acesso em: 12 nov. 2025

VERMA, A.; VERMA, M.; SINGH, A. Animal tissue culture principles and applications. In: VERMA, A. S.; SINGH, A. (org.). **Animal Biotechnology**: models in discovery and translation. 2. ed. London: Academic Press, 2020. cap. 14, p. 251–272. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>. Acesso em: 30 jun. 2025.

WANG, J. Y.; DOUDNA, J. A. CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning. **Science**, v. 379, n. 6629, art. add8643, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.add8643>. Acesso em: 10 nov. 2025.