

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em
suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino.**

Rafael Tagé Biaggio

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em
suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientado: Rafael Tagé Biaggio

Orientadora: Profa. Dra. Kamilla Swiech

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Biaggio, Rafael Tagé

Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino. Ribeirão Preto, 2014.

117 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Swiech, Kamilla.

1. Linhagens celulares humanas. 2. Meios livres de soro. 3. Cultivo em suspensão.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafael Tagé Biaggio

Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Kamilla Swiech

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho as duas pessoas que me formaram e educaram, meus pais, Francisco e Rosa.

À minha família, que sempre me apoiou.

Aos meus amigos, que sempre me ajudaram e deram suporte.

À minha namorada Natália, por toda a dedicação oferecida durante esses anos.

Agradecimientos

Aos meus pais, Francisco e Rosa, pelo apoio, confiança, educação e carinho. Em especial, gostaria de agradecer minha mãe, minha primeira e eterna orientadora, em quem posso depositar minha confiar. Tenho muito a lhe agradecer.

À minha orientadora Kamilla, pela paciência, dedicação, ensinamentos e compreensão. Com a sua forma objetiva de resolver os problemas, você se tornou um exemplo pra mim e me inspira a ser cada dia melhor. Espero podermos continuar trabalhando no futuro.

À minha família, principalmente minhas avós Dona Rosinha e Dona Maria (*in memoriam*) pelo carinho e confiança.

À minha namorada Natália, pelo carinho e apoio durante esse percurso. Agradeço por me ajudar na organização e no planejamento, por me ouvir e dar conselhos.

Aos amigos de laboratório Amanda, Bel, Carol, Julia, Juliana, Gislane, Kalil, Lucas, Mário, Monize, Robson, pelo carinho, paciência e aprendizado. Agradeço aos momentos felizes que passamos juntos e as valiosas lições que contribuíram para o meu aperfeiçoamento.

Ao técnico do hemocentro Mário, pela paciência e por todos os ensinamentos.

À Sandra, a qual me ajudou em diversos momentos do mestrado, em relatórios e congressos. Sua ajuda foi fundamental e acrescentou muito ao meu trabalho. Sou muito grato.

Aos amigos do hemocentro Ana, Angelo, Aline, Everton, Lucas, Luiza, Lilian, Marcela, Naiara, Priscila, Raquel, Thais por todas as alegrias vividas, sugestões valiosas e histórias compartilhadas.

Aos meus amigos de faculdade Éder, Flávia, Juliana, Marcela, Matheus, Rafael e Vinícius, pelo apoio, compreensão e pela valiosa amizade.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Eleni e Rafael, por toda a ajuda e dedicação.

Aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por darem subsídios para a realização deste projeto e pela oportunidade de divulgação no exterior.

À todos que estiveram presentes nesta etapa e contribuíram com a realização deste projeto,

Muito Obrigado!

"Vencer a si próprio é a maior das vitórias."

Platão.

RESUMO

BIAGGIO, R. T. **Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino.** 2014. 117f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Linhagens celulares humanas têm atraído grande interesse devido a sua capacidade de glicosilar proteínas de maneira mais semelhante às proteínas nativas humanas, reduzindo o potencial de respostas imunológicas contra epítomos não humanos. No entanto, por se tratar de uma aplicação recente, essas células ainda não foram extensamente caracterizadas e cultivadas em condições reprodutíveis da escala industrial, ou seja, em suspensão e em meios de cultura livres de soro fetal bovino (SFB). Em função disso, o objetivo principal deste trabalho foi estabelecer culturas livres de SFB e em suspensão para as linhagens celulares humanas SK-Hep-1, HepG2 e HKB-11, que têm despertado grande interesse devido ao potencial de produção de proteínas recombinantes. Para isso, quatro formulações comerciais livres de SFB foram avaliadas. As células que apresentaram bons resultados na adaptação aos meios realizada em garrafas estáticas foram então adaptadas para crescimento em suspensão. Foi possível realizar a adaptação satisfatória da célula HKB-11 ao meio FreeStyle e da célula SK-Hep-1 ao meio SFMII bem como a criopreservação das mesmas também em condições livres de SFB. A caracterização cinética das células adaptadas mostrou que a célula HKB-11 apresentou concentração celular quatro vezes superior a da célula SK-Hep-1 ($8,6 \times 10^6$ e $1,9 \times 10^6$ células/mL, respectivamente) e apresentou crescimento celular durante 18 dias em cultura. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}) foi semelhante nas duas células ($0,0159 \text{ h}^{-1}$ para a HKB-11 e $0,0186 \text{ h}^{-1}$ para SK-Hep-1). A limitação do crescimento das células adaptadas não parece estar associada à exaustão de glicose e glutamina, tampouco à formação de lactato em concentrações inibitórias. Todavia, para ambos os casos, foi observada produção de amônia em concentrações consideradas inibitórias (2 - 5 mM). De maneira geral, foi possível estabelecer culturas celulares em condições compatíveis com o desenvolvimento de um bioprocessamento reprodutível, seguro e em concordância com as boas práticas de fabricação.

Palavras-chave: Células humanas, meios de cultura livres de soro fetal bovino, adaptação celular, SK-Hep-1, HepG2, HKB-11, cultura em suspensão, caracterização cinética, análise metabólica, criopreservação.

ABSTRACT

BIAGGIO, R. T. **Serum-free suspension adaptation of human cell lines.** 2014. 117f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Human cell lines have attracted great interest since they are capable of producing glycosylated proteins in a more similar way to native human proteins, reducing the potential for immune responses against non-human epitopes. However, these human cell lines have not been extensively characterized and cultured in large scale and in serum-free suspension conditions. As a result, the main objective of this work was to adapt three human cell lines: SK-Hep-1, HepG2 and HKB-11 to serum-free suspension cultures, since they are promising systems of recombinant protein expression. For this task, four commercial serum-free media were tested. Adapted cell lines in T-flasks were further adapted to suspension cultures. Results showed that both HKB-11 and SK-Hep-1 were adapted to serum-free suspension cultures in FreeStyle and SFMII, respectively and were cryopreserved in serum-free formulations. Kinetic characterization showed that HKB-11 cell concentration was four times higher than SK-Hep-1 cell ($8,6 \times 10^6$ and $1,9 \times 10^6$ cells/ml, respectively) and showed cell growth in culture over 18 days. The maximum specific growth rate (μ_{max}) was similar for both cell lines ($0,0159 \text{ h}^{-1}$ to HKB-11 and $0,0186 \text{ h}^{-1}$ to SK-Hep-1). Growth limitation of adapted human cell lines does not seem to be associated with depletion of glucose and glutamine, nor with the formation of lactate in inhibitory concentrations. However, in both cases, ammonia production achieved inhibitory concentrations (2 - 5 mM). In general, it was possible to establish human cell cultures that are compatible with reproducible and safe bioprocess conditions and in compliance with good manufacturing practices.

Keywords: Human cell lines, serum-free medium, cell adaptation, SK-Hep-1, HepG2, HKB-11, suspension culture, kinetic characterization, metabolic analysis, cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Comparação dos protocolos mais usados para adaptação de células para meios livres de soro fetal bovino (Adaptado de VAN DE VALK <i>et al.</i> , 2010).....	14
Figura 3.1 - Representação esquemática do procedimento de adaptação para meios de cultura livres de SFB em garrafa estática.....	21
Figura 4.1 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	25
Figura 4.2 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo das passagens em meio 75% livre de SFB FreeStyle.....	26
Figura 4.3 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 2).....	26
Figura 4.4 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo das passagens em meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas.....	28
Figura 4.5 - Morfologia da célula HKB-11 antes e após a adaptação ao meio livre de SFB FreeStyle. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio FreeStyle...	29
Figura 4.6 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	30
Figura 4.7 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo das passagens em meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas.....	30
Figura 4.8 - Morfologia da célula HKB-11 antes e após a adaptação ao meio livre de SFB CDM4. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio CDM4.....	31
Figura 4.9 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CD 293 em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	32
Figura 4.10 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB SFMII em garrafas estáticas (Adaptação 1)	33
Figura 4.11 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo das passagens em meio 25% livre de SFB SFMII.....	34

Figura 4.12 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	35
Figura 4.13 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 2).....	36
Figura 4.14 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	37
Figura 4.15 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo das passagens em meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas.....	37
Figura 4.16 - Morfologia da célula SK-Hep-1 antes e após a adaptação ao meio livre de SFB CDM4. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio CDM4.....	38
Figura 4.17 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CD 293 em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	39
Figura 4.18 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CD 293 em garrafas estáticas (Adaptação 2).....	40
Figura 4.19 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB SFMII em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	41
Figura 4.20 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo das passagens em meio livre de SFB SFMII em garrafas estáticas.....	41
Figura 4.21 - Morfologia da célula SK-Hep-1 antes e após a adaptação ao meio livre de SFB SFMII. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio SFMII.....	42
Figura 4.22 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HepG2 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	43
Figura 4.23 - Morfologia da célula HepG2 antes e após a adaptação para o meio FreeStyle 50% livre de SFB. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio FreeStyle 50% livre.....	44
Figura 4.24 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HepG2 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	45

Figura 4.25 - Morfologia da célula HepG2 antes e após a adaptação para o meio CDM4 50% livre de SFB. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio CDM4 50% livre de SFB.....	45
Figura 4.26 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HepG2 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CD 293 em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	46
Figura 4.27 - Morfologia da célula HepG2 antes e após a adaptação para o meio CD 293 50% livre de SFB. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio CD293 50% livre de SFB.....	47
Figura 4.28 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HepG2 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB SFMII em garrafas estáticas (Adaptação 1).....	48
Figura 4.29 - Morfologia da célula HepG2 antes e após a adaptação para o meio SFMII 50% livre de SFB. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio SFMII 50% livre de SFB.....	48
Figura 4.30 - Crescimento e viabilidade da célula HKB-11 cultivada em meio FreeStyle em frasco <i>spinner</i> durante várias passagens em suspensão.....	50
Figura 4.31 - Comparação do crescimento e da viabilidade da célula HKB-11 cultivada em meio FreeStyle em frasco <i>spinner</i> e <i>erlenmeyer</i>	50
Figura 4.32 - Crescimento e viabilidade da célula HKB-11 cultivada em meio CDM4 em frasco <i>spinner</i> durante várias passagens em suspensão.....	51
Figura 4.33 - Comparação do crescimento e da viabilidade da célula HKB-11 cultivada em meio CDM4 em frasco <i>spinner</i> e <i>erlenmeyer</i>	52
Figura 4.34 - Crescimento e viabilidade da célula SK-Hep-1 cultivada em meio CDM4 em frasco <i>spinner</i> durante várias passagens em suspensão.....	53
Figura 4.35 - Comparação do crescimento e da viabilidade da célula SK-Hep-1 cultivada em meio CDM4 em frasco <i>spinner</i> e <i>erlenmeyer</i>	54
Figura 4.36 - Crescimento e viabilidade da célula SK-Hep-1 cultivada em meio SFMII em frasco <i>spinner</i> durante várias passagens em suspensão.....	55
Figura 4.37 - Comparação do crescimento e da viabilidade da célula SK-Hep-1 cultivada em meio SFMII em frasco <i>spinner</i> e <i>erlenmeyer</i>	56
Figura 4.38 - Crescimento e viabilidade celular (A); perfil da concentração de glicose, lactato (B); glutamina, glutamato e amônia (C) durante o cultivo da célula HKB-11 em meio FreeStyle em frasco <i>erlenmeyer</i> (n=3).....	57

Figura 4.39 – Morfologia da célula HKB-11 quando cultivada em suspensão em frascos <i>erlenmeyer</i> no meio de cultura FreeStyle.....	59
Figura 4.40 - Crescimento e viabilidade celular (A); perfil da concentração de glicose, lactato (B); glutamina, glutamato e amônia (C) durante o cultivo da célula SK-Hep-1 em meio SFMII em frasco <i>erlenmeyer</i> (n=3).....	60
Figura 4.41 - Morfologia da célula SK-Hep-1 quando cultivada em suspensão em frascos <i>erlenmeyer</i> no meio de cultura SFMII.....	62
Figura 4.42 - Taxa de sobrevivência e viabilidade da célula HKB-11 em meio FreeStyle na quinta passagem após descongelamento: A) 15 dias; B) 30 dias; C) 60 dias em -194°C.....	64
Figura 4.43 - Taxa de sobrevivência e viabilidade da célula SK-Hep-1 em meio SFMII na quinta passagem após descongelamento: A) 15 dias; B) 30 dias; C) 60 dias em -194°C.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Comparação das principais características dos sistemas de expressão (Adaptado de GENWAYBIOTECH).....	03
Tabela 5.1. Tempos de duplicação estimados antes e após a 1ª adaptação para os meios de cultura livres de SFB realizada em garrafas estáticas.....	69
Tabela 5.2. Tempos de duplicação estimados antes e após as passagens sucessivas nos meios de cultura livres de SFB suplementados realizadas em garrafas estáticas.....	71
Tabela 5.3. Comparação dos parâmetros cinéticos de crescimento, μ_{\max} , X_{\max} e t_D , das células HKB-11 e SK-Hep-1 cultivadas em suspensão em frascos <i>erlenmeyer</i> nos meios de cultura livres de SFB.....	74
Tabela 5.4. Parâmetros cinéticos de crescimento, μ_{\max} , X_{\max} e t_D , das células HKB-11 e SK-Hep-1 adaptadas para cultivo em suspensão e meio de cultura livre de SFB.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -Gal	Epítopo Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc
μ	Velocidade específica de crescimento
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Arg	Arginina
ATCC	American Type Culture Collection
BALB/c	Linhagem murina albina rotineiramente utilizada em laboratórios
BHK	Baby Hamster Kidney cells
CAP	CEVEC's Amniocyte Production cells
CD 293	CD 293-AGT
CDM4	CDM4CHO
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
Cis	Cisteína
CMV	Citomegalovirus
Co	Cobalto
CO ₂	Dióxido de carbono
COS	Células CV-1 em Origem carreando o gene do SV40
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DHFR	Dihidrofolato redutase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
EBNA1	Epstein Barr Virus Nuclear Antigen - 1
ECGF	Endothelial Cell Growth Factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
egr1	Early Growth Response 1
EUA	Estados Unidos da América
F	Flúor
Fase <i>lag</i>	Fase de adaptação celular

FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FS	FreeStyle 293 Expression Medium
FVIII	Fator VIII da coagulação
gas6	Growth Arrest Specific 6
Gli	Glicina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
HEK	Human Embryonic Kidney cells
HeLa	Adenocarcinoma de cervix retirado da paciente Henrietta Lacks
HepG2	Human Hepatocellular carcinoma cells
His	Histidina
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HKB	Hybrid of Kidney and B cells
HT-1080	Célula derivada de fibrosarcoma humano
I	Iodo
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
K	Potássio
Leu	Leucina
Lis	Lisina
MCF-7	Michigan Cancer Foundation breast cancer cell line 7
Met	Metionina
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
Na	Sódio
Neu5Gc	Ácido N-glicolilneuramínico

Ni	Níquel
NS0	Non-Ig Secreting myeloma Cells
PER.C6	Human Embryonic Retinoblast Cells
Phe	Phenylalanine
Pro	Prolina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
Se	Selênio
Ser	Serina
SFB	Soro Fetal Bovino
SFMII	293 SFMII
SK-Hep-1	Célula humana derivada de adenocarcinoma de fígado
Sn	Estanho
Sp2/0-Ag14	Fusão entre células derivadas do baço de ratos BALB/c e do mieloma P3X63Ag8 murino
t _D	Tempo de Duplicação
TGF	Transforming Growth Factor
Thr	Threonine
tPA	Tissue Plasminogen Activator
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosine
UE	União Européia
USP	Universidade de São Paulo
UTP	Uridina Trifosfato
V	Vanádio
Val	Valina
Vero	Célula derivada de rim de macaco verde africano (Verda Reno)
X	Concentração celular
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biofármacos.....	1
1.2 Sistemas de expressão.....	2
1.2.1 Células humanas e suas vantagens.....	5
1.3 Cultivos em meios livres de soro fetal bovino e em suspensão.....	10
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Linhagens e meios de cultura.....	19
3.2 Condições de cultivo.....	19
3.3 Procedimentos de adaptação para meio de cultura livre de SFB e para crescimento em suspensão.....	20
3.4 Criopreservação das células.....	21
3.5 Métodos analíticos.....	22
3.5.1 Análise da concentração e viabilidade celular	22
3.5.2 Análise de glicose, glutamina e ácido láctico.....	22
3.5.3 Análise de amônia	22
3.6 Análise dos resultados.....	23
4. RESULTADOS	25
4.1 Adaptação aos meios livres de SFB em garrafas estáticas.....	25
4.1.1 Célula HKB-11.....	25
4.1.2 Célula SK-Hep-1.....	34
4.1.3 Célula HepG2.....	42
4.2 Adaptações para crescimento em suspensão.....	49
4.2.1 Célula HKB-11	49
4.2.2 Célula SK-Hep-1.....	52
4.3 Caracterização cinética e metabólica das células adaptadas.....	56
4.3.1 Célula HKB-11.....	56
4.3.2 Célula SK-Hep-1.....	59
4.4 Estabelecimento de um banco de células adaptadas criopreservadas	

em condições livres de SFB.....	62
4.4.1 Célula HKB-11.....	63
4.4.2 Célula SK-Hep-1.....	64
5. DISCUSSÃO	68
5.1 Adaptação aos meios livres de SFB em garrafas estáticas	68
5.2 Adaptação para crescimento em suspensão.....	73
5.3 Caracterização cinética e metabólica das células adaptadas.....	75
5.4 Estabelecimento de um banco de células adaptadas criopreservadas em condições livres de SFB.....	79
6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biofármacos

A indústria farmacêutica encontrou um ramo promissor na área de biotecnologia com o advento da engenharia genética na década de 70. Trata-se dos biofármacos, classe de medicamentos compostos por proteínas recombinantes, anticorpos, peptídeos e substâncias derivadas de ácidos nucleicos, usadas para fins terapêuticos ou de diagnóstico *in vivo* produzidas através de métodos que não sejam baseados na extração direta de uma fonte biológica nativa (WALSH, 2002). Basicamente, os biofármacos atuam de forma a compensar a deficiência ou falta de uma enzima importante para o funcionamento do organismo (BERLEC e STRUKELJ, 2013). Em 1982, a empresa Ely Lilly conseguiu a aprovação do primeiro biofármaco pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento do diabetes: a insulina humana produzida em *Escherichia Coli*. Em 1986, a Genentech conseguiu a aprovação do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) para tratamento de doenças embolíticas, tornando-se esta a primeira proteína terapêutica obtida a partir de células de mamíferos (CHU e ROBINSON, 2001; GRILLBERGER *et al.*, 2009). Atualmente, existem mais de 425 produtos biofarmacêuticos aprovados nos Estados Unidos e União Européia, sendo que 140 são proteínas recombinantes. Destas, 40 são consideradas *blockbuster*, ou seja, suas receitas são superiores a \$1 bilhão/ano, e outras 18 apresentam vendas entre \$500 milhões-\$1bilhão (RADER, 2013b). Só em 2012 foram aprovados 18 novos produtos biofarmacêuticos e existem cerca de 500 novos produtos que estão em fase pré-clínica e clínica, visando o combate de diversas doenças, como vários tipos de câncer, doenças reumáticas e doenças negligenciadas (DUROCHER e BUTLER, 2009; RADER, 2013b). Esta nova classe de medicamento apresentou uma expansão de mercado de \$8 bilhões em 1992 para \$149 bilhões em 2010 e é esperado aumentar \$239 bilhões até 2015 (VISIONGAIN, 2012). Anualmente, este crescimento varia entre 10 a 20%, valores superiores aos obtidos pela indústria farmacêutica de maneira geral (ZHU, 2012). Em 2012, a indústria biofarmacêutica faturou US\$165 bilhões, sendo \$110 bilhões relativos apenas a anticorpos e outras proteínas recombinantes com taxa de crescimento anual de 15% (RADER, 2013a). Estima-se que hoje o mercado biofarmacêutico seja responsável por mais de 40% de todo o investimento em pesquisa e

desenvolvimento da indústria farmacêutica, valor cotado em mais de \$80 bilhões (RADER, 2013b).

Um dos fatores que levam ao crescimento de 15% ao ano deste setor é a queda do número de patentes de biofármacos líderes de venda da primeira geração, como eritropoietina, α -interferon, hormônio de crescimento humano entre outros, permitindo a fabricação de biosimilares, nos quais o desenho de bioprocesso é extremamente importante para manter a competitividade do produto. Estima-se que até 2016, sejam perdidos \$33,2 bilhões na queda das patentes (BUTLER, 2005; WALSH, 2010a).

Por isso, a velocidade de desenvolvimento é muito importante no mercado biofarmacêutico. Segundo Aunins, citado por GIRARD e colaboradores (2002), a cada ano de atraso no lançamento do produto no mercado, são adicionados 10 a 100 milhões de dólares no processo de desenvolvimento e validação. Desta forma, a escolha apropriada do sistema de expressão e o modo de cultivo são essenciais para garantir a rapidez no desenvolvimento e a qualidade do produto com elevada produtividade.

1.2 Sistemas de expressão

Biofármacos ou proteínas recombinantes terapêuticas podem ser produzidos por sistemas microbianos, leveduras, células de inseto, de mamíferos (incluindo células humanas), células vegetais e por animais transgênicos (ZHU, 2012). *Escherichia coli*, leveduras e células de mamíferos representam juntos 89% de todas as aprovações. As principais características destes sistemas encontram-se apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Comparação das principais características dos sistemas de expressão (Adaptado de GENWAYBIOTECH).

Características	Bactérias	Leveduras	Células de inseto	Células de mamíferos
Crescimento celular	Rápido (30 min)	Rápido (90 min)	Lento (18-24 h)	Lento (24h)
Complexidade e custo do meio	Baixo	Baixo	Alto	Alto
Expressão extracelular	Secreção para o periplasma	Secreção para o meio	Secreção para o meio	Secreção para o meio
Níveis de expressão	Alto	Baixo - Alto	Baixo - Alto	Baixo - Moderado
Rendimento (mg/L de cultura)	50-500	10-200	10-200	0.1-100
Enovelamento de proteínas	Re-enovelamento usualmente necessário	Re-enovelamento pode ser necessário	Adequado	Adequado
N-Glicosilação	Ausente	Alto teor de manose	Simple, sem adição de ácido siálico	Complexa
O-Glicosilação	Ausente	Presente	Presente	Presente
Taxa de sucesso na produção (solúvel ou funcional)	40-60%	50-70%	50-70%	80-95%
Custo do processo	Baixo	Baixo	Moderado	Alto

Sistemas microbianos, especialmente a *Escherichia Coli*, e leveduras não demandam muito investimento para estabelecer uma nova linha de produção, possuem ciclos rápidos, os processos são facilmente controláveis e apresentam alta produtividade quando comparado às células de mamíferos. No entanto, apresentam a limitação de não serem capazes de produzir proteínas glicosiladas com adequado perfil para garantir a atividade biológica e ausência de reações imunogênicas. Sistemas de expressão como células de insetos, fungos filamentosos e plantas são usados predominantemente para a produção de vacinas. Entretanto, algumas glicoproteínas produzidas nestes sistemas de expressão encontram-se em fase clínica (WALSH, 2010a,b; SWIECH *et al.*, 2012; ZHU, 2012).

Por mais de 25 anos, as células de mamíferos têm sido as mais utilizadas pela indústria, sendo responsáveis por 43% das proteínas aprovadas (BERLEC e STRUKELJ, 2013). Dentre as diversas células de mamíferos disponíveis, como as células de mieloma tipo linfoblástico murino (NS0 e Sp2/0-Ag14), células embrionárias de rim humano (HEK-293), células de retina humana imortalizadas

(PER.C6), fibrosarcoma humano (HT-1080), células derivadas de mieloma de camundongo (NS0) e células de rim de hamster neonato (BHK-21), destacam-se as células de ovário de hamster chinês (CHO), devido a sua extensa caracterização e a habilidade de realizar glicosilação semelhante à humana. Por este motivo, há uma maior aceitação pelas agências regulatórias para aprovações de biofármacos desenvolvidos nesta célula (DUROCHER e BUTLER, 2009; WALSH, 2010a; SWIECH *et al.*, 2012; ALTAMIRANO *et al.*, 2013; BERLEC e STRUKELJ, 2013).

A glicosilação é uma das mais importantes modificações pós-traducionais realizadas pela célula, estando relacionada com o enovelamento da estrutura proteica, reconhecimento de ligantes, sinalização celular, atividade biológica, solubilidade, estabilidade, tempo de meia-vida e capacidade de produzir resposta imunogênica (DUROCHER e BUTLER, 2009; WALSH, 2010b ; ALTAMIRANO *et al.*, 2013; BERLEC e STRUKELJ, 2013; PIKANÇO-CASTRO *et al.*, 2013). Está associada a 40% de todos os produtos biofarmacêuticos aprovados, uma vez que a maioria dessas proteínas apresenta uma ou mais modificações que influenciam nas suas propriedades bioquímicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas (WALSH, 2010a). Outras modificações pós-traducionais realizadas pelas células são processamento proteolítico, formação de pontes dissulfeto, γ -carboxilação, β -hidroxilação, O-sulfatação e amidação (DUROCHER e BUTLER, 2009; BERLEC e STRUKELJ, 2013). Como citado anteriormente, mais de 500 proteínas estão em fase pré-clínica e clínica e 70% destas proteínas são glicosiladas. Deste modo, um sistema de expressão eficiente é requerido para adequada produção destas proteínas glicosiladas.

Apesar da capacidade de gerar um produto com propriedades terapêuticas aceitáveis, a plataforma de expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos ainda possui algumas limitações. Enquanto que outros sistemas de expressão como, por exemplo, leveduras e bactérias, permitem a produção da proteína-alvo em grandes quantidades em meios de cultura de baixo custo, células de mamíferos necessitam de meios de cultura complexos e de alto custo para a manutenção de seu crescimento e consequente expressão da proteína (VAN DER VALK *et al.*, 2010; WALSH, 2010a; BERLEC e STRUKELJ, 2013). Além disso, limitações como baixa velocidade específica de crescimento e densidade celular, e elevado consumo de fontes de carbono e energia (usualmente glicose e glutamina) gerando altas concentrações de subprodutos tóxicos (geralmente lactato e amônio),

acarreta na limitação do tempo da cultura e pode interferir na qualidade da proteína de interesse (SCHRÖDER, 2008; SUNLEY e BUTLER, 2010; DIETMAIR *et al.* 2011; ALTAMIRANO *et al.*, 2013). Como a concentração do produto final está vinculada primariamente a produtividade específica da célula, células com alto rendimento permitem a redução do volume de biorreator, reduzindo os custos de manufatura (MORETTI *et al.*, 2010).

Portanto, para se ter um processo de produção viável economicamente, a manipulação genética da célula deve resultar em uma expressão eficiente da proteína de interesse; o meio de cultura selecionado deve ser capaz de suportar o crescimento da célula e a produção da proteína em altos níveis com o menor custo possível e, finalmente, as etapas de *upstream* e *downstream* devem ser desenvolvidas de maneira a se obter altos rendimentos do produto, também com custo reduzido (MELLADO e CASTILHO, 2008; VAN DER VALK *et al.*, 2010; ZHU, 2012).

1.2.1 Células humanas e suas vantagens

As células humanas são detentoras de uma maquinaria de expressão que produz glicoproteínas recombinantes homólogas as nativas, uma vez que as células murinas, como a BHK e CHO, são deficientes em algumas enzimas presentes em humanos, como a α 2-6 sialiltransferase, α 1-3/4 fucosiltransferase e N-acetilglucosamina transferase. Além de não possuir algumas enzimas humanas, as células murinas produzem dois epítomos altamente imunogênicos para humanos e que podem reduzir o tempo de meia-vida do biofármaco: o Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc (α -Gal) e o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (PADLER-KARAVANI e VARKI, 2011; GHADERI *et al.*, 2012; SWIECH *et al.*, 2012). O estudo de Padler-Karavani e colaboradores (2008) mostraram que pacientes utilizando proteínas de origem murina possuíam anticorpos IgM, IgG e IgA circulantes contra os epítomos α -Gal e Neu5G. Segundo Durocher e Butler (2009), cerca de 1 a 2% dos anticorpos humanos são direcionados contra os epítomos α -1,3-galactose, normalmente produzidos por células não primatas como a CHO, podendo causar hipersensibilidade. No entanto, ao contrário do epítomo α -Gal, o ácido Neu5Gc pode ser metabolizado e incorporado nos glicoconjugados das células humanas, apesar da presença de anticorpos policlonais anti-Neu5G circulantes. Isso também pode

ocorrer na cultura *in vitro* de células humanas que são cultivadas utilizando meios suplementados com derivados animais, como o soro fetal bovino. Ghaderi e colaboradores (2012) mostram em uma tabela contendo os principais biofármacos no mercado e a probabilidade de contaminação com o epítipo imunogênico Neu5Gc em suas moléculas. Entre os biofármacos listados, podemos destacar os produtos comerciais Herceptin®, Humira®, Refacto® produzidos em células CHO, Helixate®, Kogenate®, NovoSeven® produzidos em células BHK, Remicade®, Erbitux®, Zenapax® produzidos em células Sp2/0. Portanto, o ácido Neu5Gc é o primeiro exemplo de um xeno-autoantígeno e deve ser evitado para melhorar a qualidade do produto (PADLER-KARAVANI e VARKI, 2011, GHADERI *et al.*, 2012).

Deste modo, buscando plataformas alternativas para produção de proteínas recombinantes, as células humanas têm ganhado destaque pela produção de proteínas com correto perfil glicolítico e sem a presença de resíduos imunogênicos, auxiliando na terapia de pacientes crônicos. Abaixo encontram-se descritas as principais linhagens de células humanas que vem sendo estudadas para tal finalidade.

A célula HEK-293, uma linhagem derivada de células embrionárias humanas de rim, foi desenvolvida a 37 anos atrás (GRAHAM *et al.*, 1977), mas apenas nos últimos anos tem sido extensamente usada. Esta linhagem celular é provavelmente a mais utilizada para pesquisas relacionadas à expressão de proteínas recombinantes (SUN *et al.*, 2006; ADAM *et al.*, 2008; BACKLIWAL *et al.*, 2008; LOIGNON *et al.*, 2008; WAJIH *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2011; SWIECH *et al.*, 2011; DUMONT *et al.*, 2012; FISCHER *et al.*, 2012), apesar da única proteína licenciada para uso terapêutico (Xigris, proteína C ativada, aprovada em 2001) ter sido retirada do mercado em 2011 devido a falta de efetividade (ELI LILLY, 2011; SWIECH *et al.*, 2012). Células HEK-293 também são amplamente utilizadas para a produção de vetores virais (adenovírus, retrovírus, lentivírus e vírus adenoassociado) (LEE *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2009; PETIOT *et al.*, 2011). Muitos vetores produzidos usando esta linhagem estão atualmente em fase II e III de ensaios clínicos (HENRY *et al.*, 2011). Uma das razões para a sua larga aplicação é o fato destas células crescerem facilmente em suspensão e em meios livres de soro disponíveis comercialmente. Apesar das vantagens, essas células formam grandes agregados em biorreatores, dificultando o processo de escalonamento (LIU *et al.*, 2006; MEI *et al.*, 2006; DUROCHER e BUTLER, 2009; ZHU, 2012).

A linhagem HT-1080 é uma linhagem humana derivada de fibrosarcoma com um fenótipo do tipo epitelial que tem sido usada pela empresa Shire para produzir 4 proteínas terapêuticas comerciais: Dynepo (epoetina delta), Elapraxe (iduronato-2-sulfatase), Replagal (α -galactosidase A) e VPRIV (glucocerebrosidase) (SWIECH *et al.*, 2012). A empresa fabricante utiliza a tecnologia de ativação gênica, introduzindo um promotor *upstream* ao gene de interesse (MORAN, 2010). Apesar de sua utilização comercial, não foram encontrados na literatura informações a respeito das suas características de crescimento e metabólicas (SWIECH *et al.*, 2012).

A linhagem humana PER.C6 (Crucell Holland BV e DSM Biologics) é uma das mais promissoras linhagens dentre as várias alternativas às células CHO e provavelmente se tornará a maior plataforma para a produção de anticorpos monoclonais. Está sendo extensivamente usada para a produção de vacinas, anticorpos monoclonais e enzimas (PAU *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2003; BERDICHEVSKY *et al.*, 2008; TCHOUDAKOVA *et al.*, 2009; KRUIF *et al.*, 2010; ROSS *et al.*, 2012; SANDERS *et al.*, 2013). Produtividades acima de 15 g/L já foram relatadas (COCO-MARTIN e HARMSEN, 2008). Muitas companhias já licenciaram a PER.C6 para produção em larga escala e para a produção interna de candidatos terapêuticos (LANGER, 2009). As células foram desenvolvidas imortalizando células embrionárias de retina humana com o gene E1 do adenovírus. Crescem prontamente em suspensão ou aderidas, em meios livres de soro e componentes animais. Esta linhagem mostrou oferecer vantagens significativas como: não necessitar amplificação gênica e marcadores de seleção, como o sistema diidrofolato redutase (DHFR); clones estáveis altamente produtores podem ser obtidos dentro de alguns meses; baixo número de cópias é suficiente para manter uma expressão eficiente e produção estável (FALLAUX *et al.*, 1998; YALLOP *et al.*, 2005; COCO-MARTIN e HARMSEN, 2008). Seu desenvolvimento foi extensamente documentado e está de acordo com a regulação dos EUA e UE (JONES *et al.*, 2003). Apesar das vantagens citadas, esta linhagem não se encontra disponível para pesquisas científicas.

A linhagem CAP foi desenvolvida pela CEVEC e é composta por células derivadas de fluido amniótico humano transformada para as funções EA1, E1B, pIX e adaptadas para crescimento em suspensão em diversos sistemas de cultivo (frascos de cultura, biorreator wave) visando o escalonamento (SCHIEDNER *et al.*,

2000; SCHIEDNER *et al.*, 2008; SWIECH *et al.*, 2012). Podem ser facilmente transfectadas com agentes comerciais e expressam estavelmente altas quantidades de proteínas recombinantes (ESSERS *et al.*, 2011; SWIECH *et al.*, 2012). Vários estudos demonstram seu potencial de produzir proteínas recombinantes e vacinas virais (SCHIEDNER *et al.*, 2008; ESSERS *et al.*, 2011; FISCHER *et al.*, 2012; GENZEL *et al.*, 2013). Além disso, um banco de células adaptadas para suspensão foi produzido de acordo com a farmacopeia europeia tornando estas células disponíveis comercialmente (SWIECH *et al.*, 2012). Esta célula também não está disponível para pesquisa, apenas para uso comercial.

A linhagem HKB-11 (ATCC, CRL-12568™) foi desenvolvida pela fusão das células 293S e a célula 2B8 (derivada do linfoma de Burkitt's) com polietilenoglicol, sendo patenteada pela Bayer (CHO *et al.*, 2002). Esta célula possui tanto características da HEK-293 (fácil transfecção e expressão de grandes quantidades de proteína) como propriedades da célula B, como eficiente secreção (CHO *et al.*, 2002). A HKB-11 foi desenvolvida para resolver o problema de agregados da 293S cultivadas em suspensão em meio livre de SFB. Portanto, essas células crescem bem em meios livres de soro e em suspensão, possuem elevadas eficiências de transfecção e secretam grandes quantidades de proteínas recombinantes com perfil de glicosilação humana (CHO *et al.*, 2002; MEI *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos exemplificam sua elevada capacidade de produção (MEI *et al.*, 2010; FISCHER *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2013). Algumas glicoproteínas, como o fator VIII da coagulação (FVIII), são difíceis de expressar devido ao seu tamanho e complexidade, tanto que a magnitude de expressão do fator VIII é de 2 a 3 vezes menor do que outras proteínas recombinantes produzidas por células de mamíferos. Em comparação com outras linhagens, a HKB-11 mostrou um aumento nos níveis de FVIII de 8 vezes em comparação com HEK-293 e 30 vezes em relação a BHK-21 (MEI *et al.*, 2006). Em outro estudo, as células HKB-11 apresentaram maior eficiência de transfecção e expressão (aproximadamente duas vezes) de interleucina e anticorpos que as células 293S (ZHU, 2012). No seu uso para expressar a muteína da interleucina IL-2SA, Cho e colaboradores (2001) alcançaram produtividades de 470 mg/L, indicando seu potencial de escalonamento. Outras proteínas como IgG, receptor de quinases, TGF β , IL-4, ICAM-1 também foram expressas com sucesso (CHO *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2002; FISCHER *et al.*, 2012). Apesar do potencial, ainda não foram relatados produtos comerciais relacionados a esta célula.

A linhagem celular SK-Hep-1 foi estabelecida em 1971 e sua morfologia foi descrita primeiramente por Fogh e Trempe em 1975. É uma linhagem celular humana imortal, derivada do fluído ascítico de paciente com adenocarcinoma de fígado. Apesar da localização do tumor, não apresenta características de uma célula hepática como proteínas específicas desse tipo celular (albumina, α -fibrinogênio ou γ -fibrinogênio) (TURNER e TURNER, 1980), mas trata-se de uma célula de origem endotelial. Em 1980, pesquisadores identificaram α 1-antitripsina e o complemento (C3) *in vitro* no meio de cultura das células SK-Hep-1 (TURNER e TURNER, 1980). Três anos após, foi identificada a secreção de ativador de plasminogênio no sobrenadante do meio de cultivo (BARLOW *et al.*, 1983). Em 1984, pesquisadores descreveram a síntese de fibronectina pelas células SK-Hep-1 (GLASGOW e COLMAN, 1984). Em 1998, Herlitschka e colaboradores demonstraram que a linhagem SK-Hep-1 também é uma excelente produtora de fator VIII, sem a necessidade de amplificação gênica e com níveis de expressão superiores a de células CHO. Picanço e colaboradores (2007) realizaram a expressão de fator VIII em linhagens celulares hepáticas e não hepáticas utilizando vetores lentivirais com diferentes promotores e concluíram que os melhores níveis de expressão foram obtidos com o promotor CMV na linhagem celular SK-Hep-1. No entanto, por se tratar de uma aplicação recente, essa linhagem ainda não foi apropriadamente caracterizada do ponto de vista de sua utilização na produção de proteínas terapêuticas através do cultivo em condições representativas a da escala industrial.

A linhagem celular HepG2 (ATCC, HB-8065™) é uma linhagem celular humana imortal, obtida do carcinoma hepatocelular, com morfologia epitelial. É aderente em garrafa estacionária. Estudo demonstrou que a célula HepG2 secreta as seguintes proteínas: α -fetoproteína, albumina, α -2-macroglobulina, α -1-antitripsina, transferrina, plasminogênio, complemento C4, fibrinogênio entre outros. (KNOWLES e ADEN, 1983). Essa célula despertou interesse, principalmente pela expressão dos fatores de coagulação. A célula HepG2, por exemplo, produz naturalmente pequenas quantidades de fator VIII (HERLITSCHKA *et al.*, 1998). Em 2008, pesquisadores analisaram a produção de fator VIII em células HepG2 comparando-as com células CHO e perceberam que a expressão foi 10 vezes superior na HepG2 (CAMPOS-DA-PAZ *et al.*, 2008).

1.3 Cultivos em meios livres de soro fetal bovino e em suspensão

O cultivo de células de mamíferos requer condições mais rigorosas que as células de microrganismos, como meio de cultura especializado, suprimento correto de oxigênio e CO₂, baixas densidades celulares de inóculo, cuidados com estresse mecânico e infecção por vírus e micoplasma. Tradicionalmente, essas células são cultivadas em meios de cultura suplementados com derivados humanos ou animais de forma a aumentar a viabilidade e produtividade. Algumas proteínas presentes no soro também são utilizadas como excipientes e estabilizadores na formulação final do medicamento. No entanto, o uso de derivados do plasma humano, como por exemplo os concentrados de fator VIII, trouxe a tona problemas referentes ao uso de componentes humanos devido a transmissão de vírus como a hepatite B na década de 70, hepatite C e HIV na década de 80. Posteriormente, a encefalopatia espongiforme bovina e a febre aftosa revelaram que o uso de componentes de origem animal como o soro fetal bovino (SFB), preferido por apresentar menores concentrações de imunoglobulinas e elevadas proporções de fatores de crescimento, poderia também causar sérios riscos aos pacientes que usassem produtos manufaturados com tal componente. Mais recentemente, a hepatite A, parvovírus humano B19 e a doença de Creutzfeld-Jakob trouxeram preocupações com relação à possibilidade de transmissão. Além disso, novos patógenos derivados do sangue podem surgir e não devem ser negligenciados. A partir desses achados, a comunidade científica começou a procurar alternativas visando o desenvolvimento de bioprocessos livres de derivados animais. Além da possibilidade de transmissão de agentes infecciosos (príons, vírus, bactérias, fungos e micoplasma), podem ser citadas outras desvantagens relacionadas ao uso de soro fetal bovino em qualquer etapa de manufatura: aumento do custo de produção devido ao meio de cultura com alto valor agregado e de elevada complexidade, dificultando a purificação da proteína de interesse (alto teor de proteínas heterólogas); variabilidade entre lotes e fornecedores de soro; aumento da imunogenicidade devido a presença de epítomos não humanos (α -Gal e Neu5Gc); além do aspecto ético relacionado a obtenção do soro fetal bovino. Pensando nisso, as agências regulatórias orientam que os processos e a formulação de proteínas recombinantes sejam livres de componentes animais (VAN DER VALK *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2008; DUROCHER e BUTLER, 2009; GRILLBERGER, *et al.*, 2009; VAN DER VALK *et al.*, 2010;

PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2013). Hoje, diversas proteínas recombinantes são produzidas por processos ausentes de soro (CHO *et al.*, 2001, SUN *et al.*, 2006; ADAM *et al.*, 2008; LOIGNON *et al.*, 2008; MEI *et al.*, 2010; KRUIF *et al.*, 2010; FISCHER *et al.*, 2012; ROSS *et al.*, 2012; SANDERS *et al.*, 2013; SEO *et al.*, 2013).

Os bioprocessos para produção de proteínas recombinantes em células de mamíferos têm priorizado a utilização de células em suspensão cultivadas em meios de cultura livres de soro fetal bovino (SFB). A maioria das linhagens de células de mamíferos são células dependentes de ancoramento, no entanto, com a utilização de procedimentos específicos e meios de cultura adequados, estas linhagens estão sendo adaptadas para o crescimento em suspensão e tem demonstrado susceptibilidade ao aumento de escala (WURM, 2004; DUROCHER e BUTLER, 2009; ZHU, 2012).

Uma das principais vantagens da propagação da cultura em suspensão é a facilidade em relação ao escalonamento. Células que crescem aderidas a um substrato necessitam de um aumento na área superficial desse substrato para que continuem crescendo. Já no caso das culturas em suspensão, pode-se produzir e coletar grandes quantidades de células sem ser necessário um aumento na área superficial. Esta característica possibilita o cultivo dessas células em biorreatores e o escalonamento do processo com relativa facilidade (WURM, 2004; FRESHNEY, 2005; CHICO *et al.*, 2008).

O uso do SFB como suplemento do meio de cultura pode trazer sérias desvantagens, conforme citado anteriormente. No entanto, a retirada do soro não é tão simples, uma vez que este rico suplemento fornece vários nutrientes necessários a sobrevivência das células como fatores de crescimento, hormônios, aminoácidos, lipídeos, minerais, vitaminas, elementos traço, entre outros agindo tanto no crescimento celular (fatores de crescimento, hormônios e proteases), quanto na proteção biológica (antitoxina, antioxidante, antiprotease, controle de pH) e mecânica (albumina) (BRUNNER *et al.*, 2010; VAN DER VALK *et al.*, 2010). O desenvolvimento de formulações livres de soro geralmente é difícil e requer a adaptação individual de cada linhagem celular e processo (MORAES *et al.*, 2008; GRILLBERGER, *et al.*, 2009; VAN DER VALK *et al.*, 2010). A composição do meio de cultura tem papel determinante no crescimento celular, produtividade e qualidade do produto, uma vez que deve fornecer as condições fisiológicas adequadas para o cultivo celular (ZHU, 2012). O desafio é encontrar substitutos para todos os fatores

de crescimento presentes no soro e adaptar cada linhagem para o meio livre de soro. Apenas 10-20% das tentativas de adaptação são bem sucedidas (PAZOS *et al.*, 2004).

Os meios de cultura livres de SFB podem ser divididos em quatro categorias químicas: i) Meios livres de soro, que não requerem a suplementação de soro, mas podem conter frações de proteínas (extratos animais e vegetais); ii) Meios livres de proteínas, que não contêm proteínas ou frações de alto peso molecular, mas podem conter frações de peptídeos (hidrolisados de proteínas); iii) Meios livres de componentes animais, que não contêm nenhum tipo de derivados de animais, mas não precisam ser quimicamente definidos (extratos de plantas, hidrolisados de fungos e bactérias); iv) Meios quimicamente definidos, que não contêm proteínas, hidrolisados ou qualquer outro aditivo sem composição definida (VAN DER VALK *et al.*, 2010).

Para o desenvolvimento de uma nova formulação, o procedimento tradicional envolve a adição de componentes individuais à uma formulação basal e o monitoramento do comportamento das células nessa formulação. Portanto, o primeiro passo para a formulação de um meio livre de soro é a escolha do meio basal apropriado e os suplementos a serem usados. O meio basal deve prover sais, elementos traço, carboidratos, vitaminas e aminoácidos. Alguns exemplos de meios basais amplamente utilizados são *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's Nutrient mixture F-12* (DMEM/F-12), *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), entre outros (HERNANDEZ e PIERA, 2010). Na maioria das vezes, o meio basal deve conter um suplemento essencial chamado ITS (insulina, transferrina e selênio). Insulina é um hormônio essencial para a cultura celular. Transferrina é a proteína responsável por internalizar o íon ferro nas células. Já o selênio é um elemento traço fundamental em selenoproteínas e evita o estresse oxidativo nas células (VAN DER VALK *et al.*, 2010).

Além do ITS, os suplementos mais utilizados são: i) hormônios: regulam várias funções como proliferação celular e apoptose (insulina, glicocorticóides, triiodotironina); ii) fatores de crescimento: aumentam a proliferação celular e estimulam funções específicas (EGF, ECGF, IGF); iii) carboidratos: substrato para a respiração celular (glucose, frutose, galactose); iv) glutamina: precursor essencial para síntese de proteínas e ribonucleotídeos. Também funciona como combustível celular no caso de divisão ou ineficiência no catabolismo da glicose; v) aminoácidos:

são 13 aminoácidos essenciais (Arg, Cis, Gln, His, Ile, Leu, Lis, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr, e Val) e estão presentes nas concentrações de 0.5–4 mM no meio basal DMEM, por exemplo. Os 7 aminoácidos não essenciais (Ala, Asn, Asp, Glu, Gli, Pro, e Ser) são fornecidos pelo meio Ham's F-12; vi) elementos traço: importantes para funcionamento de enzimas, proteção contra danos oxidativos, dentre outras funções. Meio basal Ham's F-12 é rico em elementos traço (Fe, Se, Zn, Cu, Co, Cr, I, F, Mn, Mo, V, Ni, Sn); vii) lipídeos: reserva de energia, constituintes das membranas celulares, e atuam no transporte e sinalização celular. Ácidos graxos essenciais e etanolamina são recomendados para compor a formulação do meio de cultura; viii) vitaminas: existem 7 compostos que são essenciais para o crescimento e proliferação celular (colina, ácido fólico, nicotinamida, pantotenato, piridoxal, riboflavina, e tiamina). São fornecidas pelos meios basais. Outros compostos como ácido retinóico, α -tocoferol e ascorbato também podem ser usados; ix) agente contra estresse mecânico: qualquer estresse mecânico, proveniente da agitação mecânica, por exemplo, pode ocasionar efeitos negativos para as células e portanto, suplementos que protegem as mesmas deste estresse são frequentemente necessários, como por exemplo, Pluronic® F68; x) inibidores de proteases: finalizam a tripsinização e bloqueiam a ação das peptidases lisossomais, protegendo a célula (α_1 -antitripsina); xi) hidrolisados de proteínas: fornecem aminoácidos e pequenos peptídeos. Não são quimicamente definidos e não são essenciais, pois estão presentes no meio basal; xii) proteínas: funcionam como carreadores, dentre outras funções. Nas primeiras culturas, a albumina era fornecida pelo SFB, mas hoje já existe albumina recombinante não proveniente de fontes animais (BRUNNER *et al.*, 2010; VAN DER VALK *et al.*, 2010).

Atualmente, já existem meios livres de soro comerciais para diversas linhagens celulares, principalmente as que são frequentemente empregadas na indústria, como CHO, BHK, células Vero e hibridomas. Para células humanas, uma grande variedade de produtos comerciais foram encontrados apenas para as células HEK-293 (www.invitrogen.com). No entanto, as informações relacionadas às formulações destes meios são limitadas e alguns dos suplementos utilizados não são classificados como quimicamente definidos. Portanto, em alguns casos, para se atender as demandas das agências regulatórias, faz necessário o desenvolvimento de meios livres de soro quimicamente definidos para cada linhagem celular (GRILLBERGER *et al.*, 2009).

Algumas destas formulações podem ser encontradas em um banco de dados criado especificamente para formulações livres de soro (BRUNNER *et al.*, 2010). No entanto, ainda não foi possível desenhar uma única formulação livre de soro que funcione para todas as linhagens celulares. Na verdade, até diferentes clones da mesma linhagem necessitam adaptação especial (BUTLER, 2005; VAN DER VALK *et al.*, 2010).

Há diversas maneiras de se adaptar células para o crescimento em meios livres de SFB. Tipicamente, a cultura é submetida a um processo gradual de diminuição do soro até as condições livres de SFB serem atingidas. Preferencialmente, as células devem, neste processo, estar na fase de crescimento exponencial e possuírem viabilidades acima de 90%. Encontram-se apresentados na Figura 1.1, diversos protocolos para realizar a adaptação para meios livres de SFB (VAN DE VALK *et al.*, 2010).

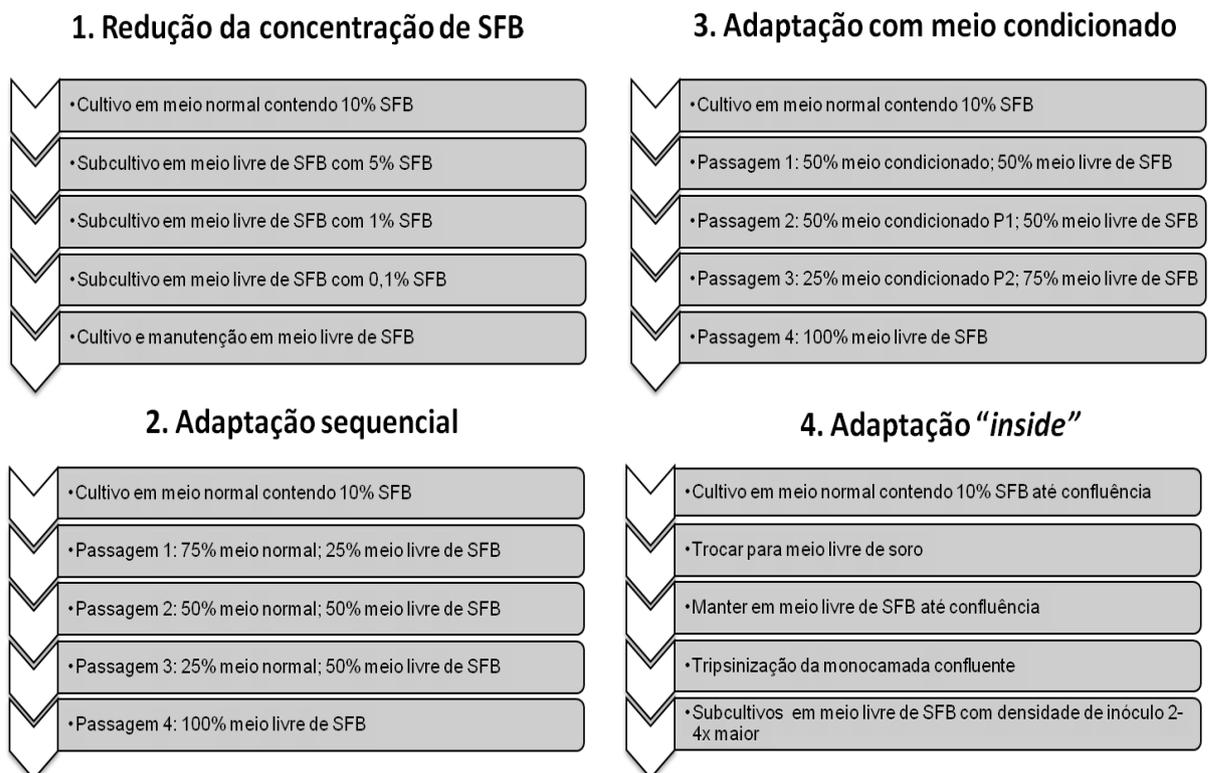


Figura 1.1 – Comparação dos protocolos mais usados para adaptação de células para meios livres de soro fetal bovino (Adaptado de VAN DE VALK *et al.*, 2010).

Apesar do recente destaque das células humanas para produção de proteínas recombinantes, o cultivo destas células em meios livres de soro e em suspensão, condições ideais para a escala comercial, ainda não foi consolidado, como no caso

das células murinas. Dentre as células humanas, apenas a HEK-293 e a PER.C6 tem sido frequentemente cultivadas desta maneira. Portanto, o estabelecimento de culturas em suspensão e meios livres de SFB para células humanas promissoras como a HKB-11 e as hepáticas HepG2 e SK-Hep-1 são de extrema importância para uma futura aplicação em escala comercial.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste projeto foi estabelecer culturas livres de SFB e em suspensão para as linhagens celulares humanas HKB-11, SK-Hep-1 e HepG2.

2.2 Objetivos específicos

1) Seleção de meios de cultura livres de SFB dentre as formulações já existentes para células de mamíferos em garrafas estáticas.

2) Adaptação das linhagens celulares para crescimento em suspensão nos meios previamente definidos.

4) Caracterização da cinética de crescimento e do metabolismo celular das linhagens adaptadas.

5) Estabelecimento de banco de células adaptadas criopreservadas em condições livres de SFB.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens e meios de cultura

As linhagens SK-Hep-1, HepG2 e HKB-11 (HTB-52™, HB-8065™ e CRL-12568™, respectivamente) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), transportadas e mantidas congeladas à -194°C. Quando descongeladas, um banco mestre e um banco de trabalho foram produzidos, este último utilizado para realizar os experimentos. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Cultura Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto, FMRP-USP. Quatro formulações comerciais quimicamente definidas e livres de derivados animais e humanos foram avaliadas no processo de adaptação: FreeStyle™ 293 Expression Medium (Invitrogen), CD 293 AGT™ (Invitrogen), 293 SFMII (Invitrogen) e CDM4CHO (HyClone). Estas formulações foram suplementadas com 1% do antibiótico Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Invitrogen). Os meios CD 293 e 293 SFMII foram também suplementados com 1% de Glutamax® (Invitrogen). O pH foi corrigido para 7,4. Ao final do procedimento de adaptação em garrafas estáticas, foi também adicionado às formulações: ITS – Insulin-Transferrin-Selenium 100x (Invitrogen), Cell Boost 5 (HyClone) e Pluronic® F-68 (Invitrogen).

3.2 Condições de cultivo

Cultivo em frasco T: Uma vez que as células utilizadas são originalmente dependentes de ancoramento e portanto crescem aderidas, garrafas de poliestireno de 25 e 75 cm² com superfície fisicamente tratada (Greiner Bio-One), foram utilizadas para o cultivo das células, com volumes de trabalho de 5 e 10 mL de meio de cultura, respectivamente. As garrafas foram mantidas em um ambiente de 5% CO₂ a 37°C.

Cultivo em frascos *Spinner* e *Erlenmeyer*: A adaptação para crescimento em suspensão foi realizada inicialmente em frascos *spinner* de 100 mL (Wheaton) contendo 20 mL de meio de cultura com uma agitação de 80 rpm em um ambiente de 5% CO₂ a 37 °C. Posteriormente, foi avaliada a utilização de frascos *erlenmeyer* de 125 mL (Corning), com volume de trabalho de 20 mL, sob agitação orbital. As células adaptadas aos meios livres de SFB originárias das garrafas de cultura foram

tripsinizadas com solução de dissociação TrypLE™ Select (1X) (Invitrogen) e então transferidas para os frascos *spinner* ou *erlenmeyer*.

3.3 Procedimentos de adaptação para meio de cultura livre de SFB e para crescimento em suspensão

Partindo de um inóculo de 1×10^6 células em 5 mL de meio de cultura padrão DMEM (Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino (HyClone), 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Merck) e 2,4 g/L de tampão HEPES (Sigma-Aldrich), as células foram adaptadas de modo sequencial aos meios livres de SFB em garrafas estáticas através da diminuição gradativa de meio de cultura contendo SFB. A concentração de SFB foi reduzida de 25% a cada passagem, devido a adição de 25% das formulações comerciais livres de SFB na solução final. As células foram mantidas por 2 - 3 passagens em cada condição, sendo realizada a etapa seguinte de adaptação apenas quando a viabilidade celular fosse superior a 90% (Figura 3.1).

Quando baixos valores de viabilidade e elevados tempos de duplicação celular (t_D) foram obtidos, passagens intermediárias foram realizadas, como por exemplo 60%, 87,5% e 95% de meio livre de SFB, afim de se obter uma adaptação mais gradual. A cada passagem, as células aderidas foram tripsinizadas com solução de tripsina-EDTA 0,5% 10x (Invitrogen) por 5 minutos, centrifugadas à $280 \times g$ à $20^\circ C$ e ressuspendidas em meio de cultura contendo SFB. Quando adaptadas aos meios 100% livres de soro, as células foram tripsinizadas com solução de dissociação TrypLE™ Select (1X) (Invitrogen) e transferidas para os frascos *spinner* para adaptação em suspensão. O inóculo inicial para os cultivos foi de 5×10^5 células/mL. As células foram mantidas em frascos *spinner* por um período de 30 - 60 dias e então transferidas para cultivos sob agitação orbital em frascos *erlenmeyer*.

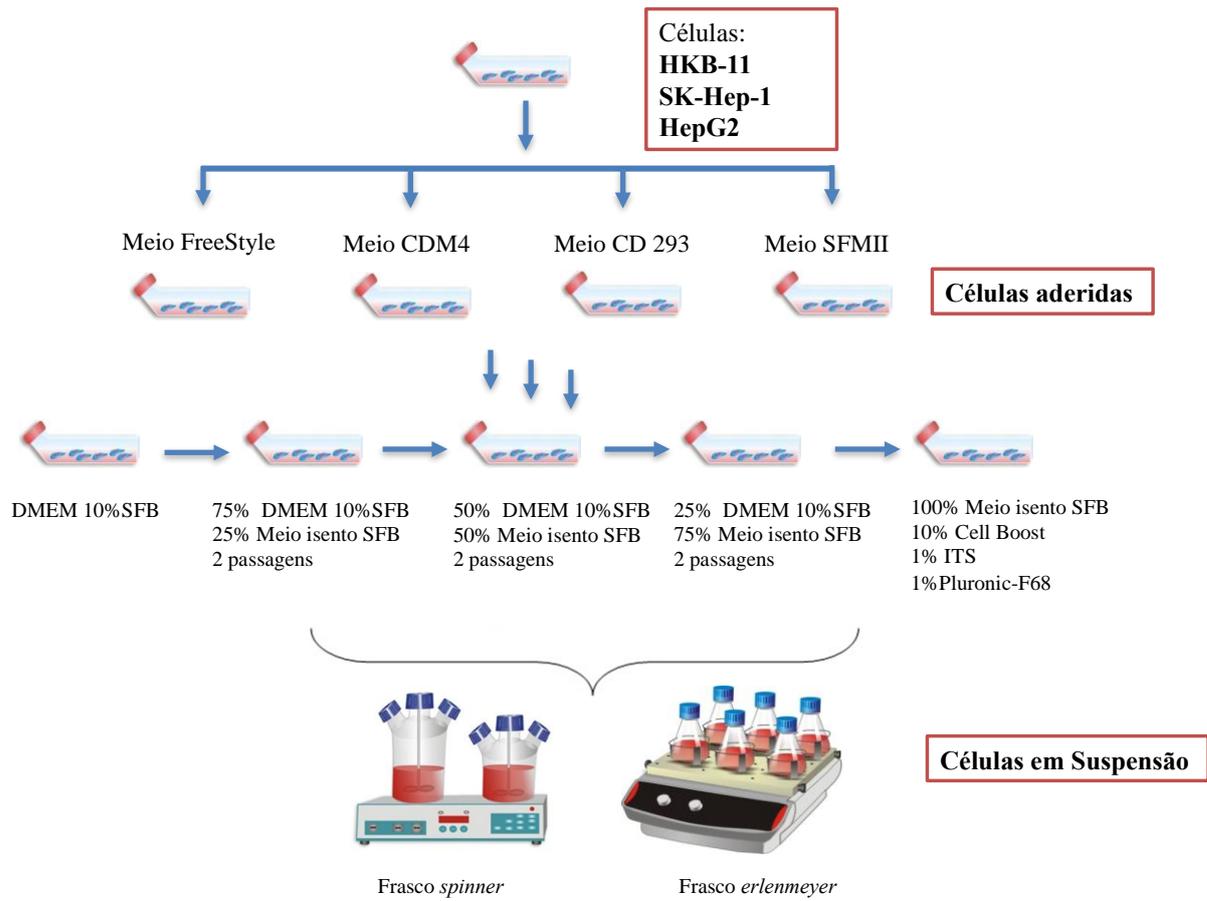


Figura 3.1 - Representação esquemática do procedimento de adaptação para meios de cultura livres de SFB em garrafa estática.

3.4 Criopreservação das células

As linhagens cultivadas em meios de cultura contendo SFB foram congeladas em solução composta por 90% SFB e 10% DMSO (Sigma-Aldrich) (condição padrão). Para serem congeladas, as células foram tripsinizadas, quantificadas e centrifugadas à 280xg, à 20°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de solução de congelamento e transferido para um criotubo (Greiner Bio-One).

Como o objetivo principal deste trabalho foi estabelecer condições de cultivo livres de SFB, este teve que ser removido de todo o bioprocesso, incluindo no estabelecimento do criobanco de células. Portanto, foram testados as seguintes condições de criopreservação: (1) condição padrão 90% SFB + 10% DMSO e diversas formulações livres de SFB; (2) 45% de meio fresco + 45% de meio condicionado + 10% DMSO; (3) Synth-a-Freeze (Invitrogen); (4) HyCryo (HyClone); (5) ProFreeze-CDM (Lonza); (6) Cell Freezing Medium-DMSO Serum free (Sigma-

Aldrich). Como o intuito foi avaliar o potencial de criopreservação dos meios e a taxa de sobrevivência das células, estas foram mantidas por 15, 30 e 60 dias à -194°C. A concentração utilizada por criotubo foi $1,5 \times 10^6$ células/mL. Após ressuspender as células em meio de congelamento e transferi-las para criotubos, estes foram mantidos à 4°C por 10 minutos para permitir a penetração do crioprotetor DMSO na célula e posteriormente transferidos para o dispositivo de criopreservação Mr. Frosty™ (Thermo Scientific) que foi armazenado à -80°C por 24 horas. Este dispositivo regula a velocidade de congelamento a uma taxa de -1°C/minuto. Passado 24 horas, as células foram armazenadas à -194°C.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 *Análise da concentração e viabilidade celular*

Para a análise de viabilidade e concentração de células foi utilizado o método de exclusão com o corante azul de tripan em hemacitômetro (FRESHNEY, 2005). Eventualmente, a viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo (BD FACS Calibur) utilizando o corante iodeto de propídeo (BD Biosciences) para comprovação da viabilidade que estava sendo determinada com azul de tripan.

3.5.2 *Análise de glicose, glutamina e ácido láctico*

A determinação da concentração de glicose, glutamina e ácido láctico presente nos sobrenadantes dos cultivos foi realizada enzimaticamente no analisador bioquímico YSI 2700 (Yellow Springs Instruments).

3.5.3 *Análise de amônia*

As análises de amônia foram feitas nas amostras do sobrenadante do meio de cultivo em eletrodo íon seletivo (Orion, Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. O medidor da Thermo Scientific (EUA), modelo ORION 710A foi utilizado para obter as medidas de concentração.

3.6 Análise dos resultados

A adaptação das células aos meios de cultivo livres de SFB foi acompanhada pela viabilidade celular e pelo tempo de duplicação celular (t_D), definida como o tempo necessário para duplicar o número de células presentes na cultura. O t_D foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$t_D = t \times \log 2 / [\log(N / N_0)] \quad [1]$$

onde t é o tempo de cultivo, N é o número de células final e N_0 é o número de células inicial.

A caracterização cinética das células adaptadas foi realizada levando em consideração a concentração celular máxima (X_{max}) e a velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}). Para a determinação de μ_{max} , foi utilizada a seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad [2]$$

onde: μ é a velocidade específica de crescimento (h^{-1}); X , a concentração celular (células/mL) e t , o tempo de cultivo (h).

Na fase exponencial de crescimento da célula podemos considerar que:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = cte = \mu_{max} \quad [3]$$

Integrando esta equação da concentração inicial de células X_0 a uma concentração X num intervalo de tempo t , temos que,

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{max} \cdot t \quad [4]$$

Nesta expressão, o valor de μ_{max} é o coeficiente angular do gráfico de $\ln X$ em função do tempo. Esta análise foi feita utilizando o programa Origin[®] (OriginLab Corporation).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Adaptação aos meios livres de SFB em garrafas estáticas

4.1.1 Célula HKB-11

- **Meio FreeStyle**

Inicialmente, nosso protocolo de adaptação contava com 3 concentrações intermediárias antes de remover completamente o soro (25%, 50% e 75% de meio livre de SFB). Na 1ª adaptação, a célula HKB-11 apresentou, em 100% de meio livre de SFB, t_D de 60,4 h e 86,6% de viabilidade, praticamente o dobro do valor obtido concentração anterior de 75% (32 h) e na condição padrão (Meio DMEM 10% SFB) (34,8 h), indicando que a retirada completa do soro fetal bovino afetou o crescimento celular (Figura 4.1).

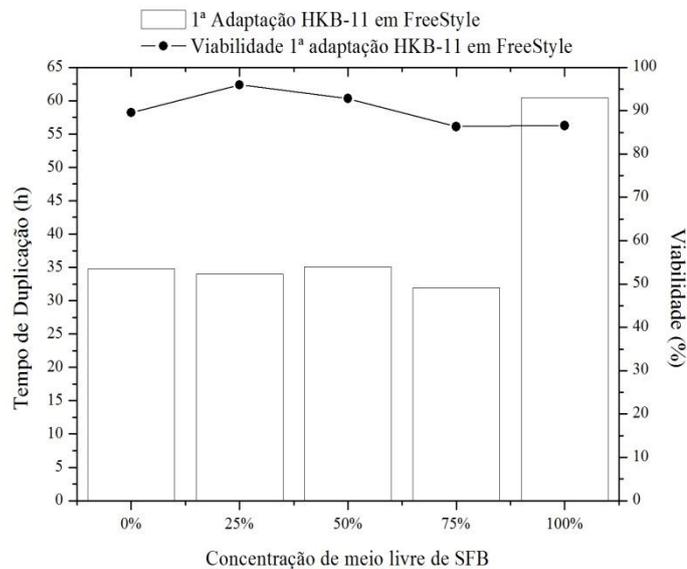


Figura 4.1 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 1).

Na passagem de 100% em meio FreeStyle, as células foram criopreservadas. Após o descongelamento, estas células apresentaram baixa viabilidade e não houve crescimento celular, sendo necessária a readaptação a partir da concentração de 75% de meio livre de SFB, previamente congelada. Como nessa nova adaptação as células apresentaram baixo crescimento, uma vez que na primeira passagem não houve crescimento e na segunda passagem o tempo de duplicação celular atingiu

137,5 h (Figura 4.2), uma adaptação mais gradativa foi realizada, acrescentando concentrações intermediárias de 87,5% e 95% de meio livre de soro. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 4.3.

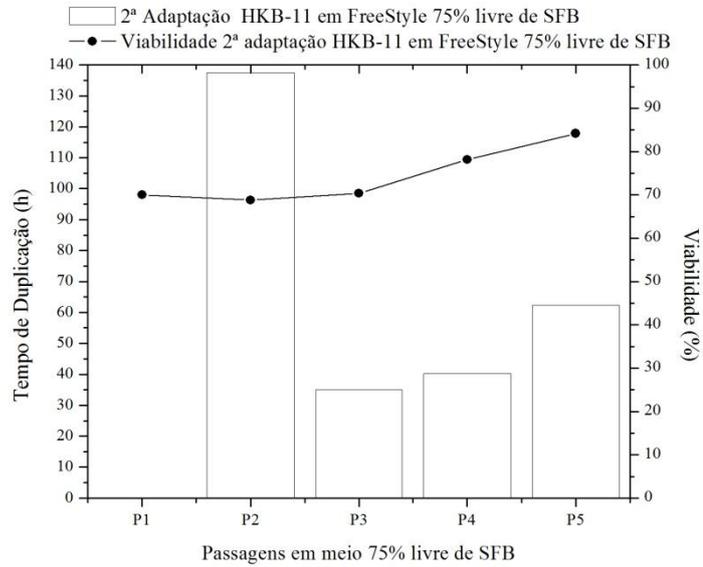


Figura 4.2 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo das passagens em meio 75% livre de SFB FreeStyle.

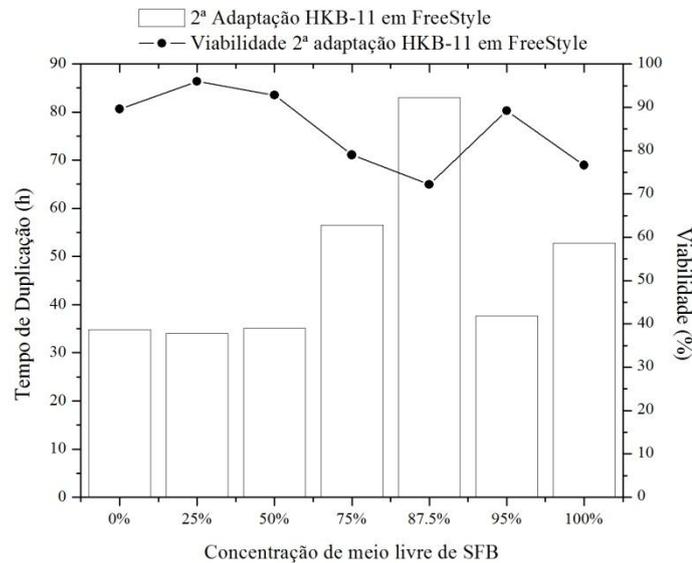


Figura 4.3 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 2).

Pela Figura 4.3, podemos observar que as células cultivadas em Freestyle mantiveram o t_D semelhante ao do cultivo controle DMEM 10%SFB até a

concentração de 50% de meio livre de SFB (34,8 h no controle; 34 h em 25% e 35,1 h em 50% de meio livre de SFB). Essa semelhança se repetiu na viabilidade celular, que se manteve em torno de 90,0% na mesma faixa de concentração (89,6% no controle; 96,0% em 25% e 92,8% em 50% de meio livre de SFB). Ou seja, inicialmente a célula HKB-11 apresentou boa resposta à remoção do soro fetal bovino. A partir da concentração 75% de meio livre de soro, o tempo de duplicação celular foi de 56,5 h, o que representa um aumento de aproximadamente 61% em relação ao tempo da concentração anterior, acompanhada de uma queda de 17% na viabilidade (de 92,8% para 79,0%). A passagem para a concentração de 87,5% de meio livre de SFB foi a mais crítica, uma vez que as células HKB-11 sofreram um aumento de 138% no t_D se comparado com o controle (83 h e 34,8 h, respectivamente). A viabilidade diminuiu 19% se comparada com o controle (72,2% e 89,6%, respectivamente). No entanto, na concentração de 95% de meio livre de soro, as células apresentaram t_D de 37,6 h, ou seja, próximo ao controle (34,8 h), e viabilidade em valores próximos a 90,0%, indicando uma possível adaptação. Na passagem seguinte, onde ocorreu a total retirada do soro, o valor do tempo de duplicação celular foi de 52,8 h, ou seja, 40% maior em relação a 95%, e a viabilidade foi de 76,6%, 15% menor em relação a passagem anterior, reforçando novamente a importância do soro na manutenção celular. Apesar do aumento do t_D e redução da viabilidade, estes foram considerados satisfatórios ($t_D = 52,8$ h e viabilidade = 76,6%), para dar prosseguimento as subseqüentes passagens em meio FreeStyle.

Com o intuito de melhorar o crescimento celular observado na passagem de 100% ($t_D = 52,8$ h), o meio foi suplementado com 10% de Cell Boost 5 (HyClone), 1% Insulin-Transferrin-Selenium 100x (Invitrogen) e 1% de Pluronic® F-68 (Invitrogen).

Os resultados obtidos nesta etapa podem ser observados na Figura 4.4. Após a primeira passagem em meio livre de SFB, onde a célula apresentou baixo crescimento ($t_D = 82,4$ h e viabilidade = 51,2%), o tempo de duplicação ficou na faixa de 44,3 h – 60,5 h e a viabilidade entre 75,8% e 95,9%. Apesar de na quinta passagem a célula não ter apresentado t_D semelhante ao obtido no controle (57,6 h e 34,8 h, respectivamente), foi dado prosseguimento à adaptação para crescimento em suspensão.

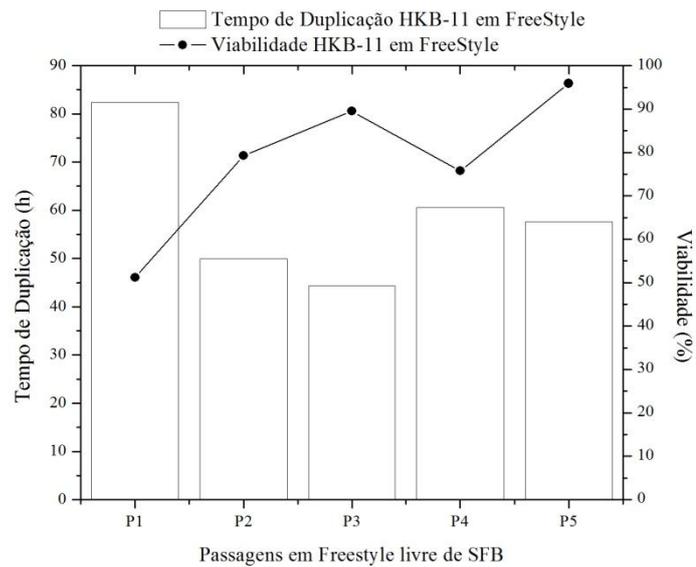


Figura 4.4 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo das passagens em meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas.

Com relação à morfologia da HKB-11 durante a adaptação, observamos pela Figura 4.5 que em meio DMEM 10% SFB (controle), as células crescem muito bem aderidas à garrafa estática, com formato um pouco mais alongado que as células adaptadas ao meio FreeStyle livre de soro. Assim como as células adaptadas, as células em meio controle também crescem de forma agrupada. Em meio FreeStyle, as células apresentaram formato arredondado com crescimento em suspensão e formando agregados celulares de tamanho variado.

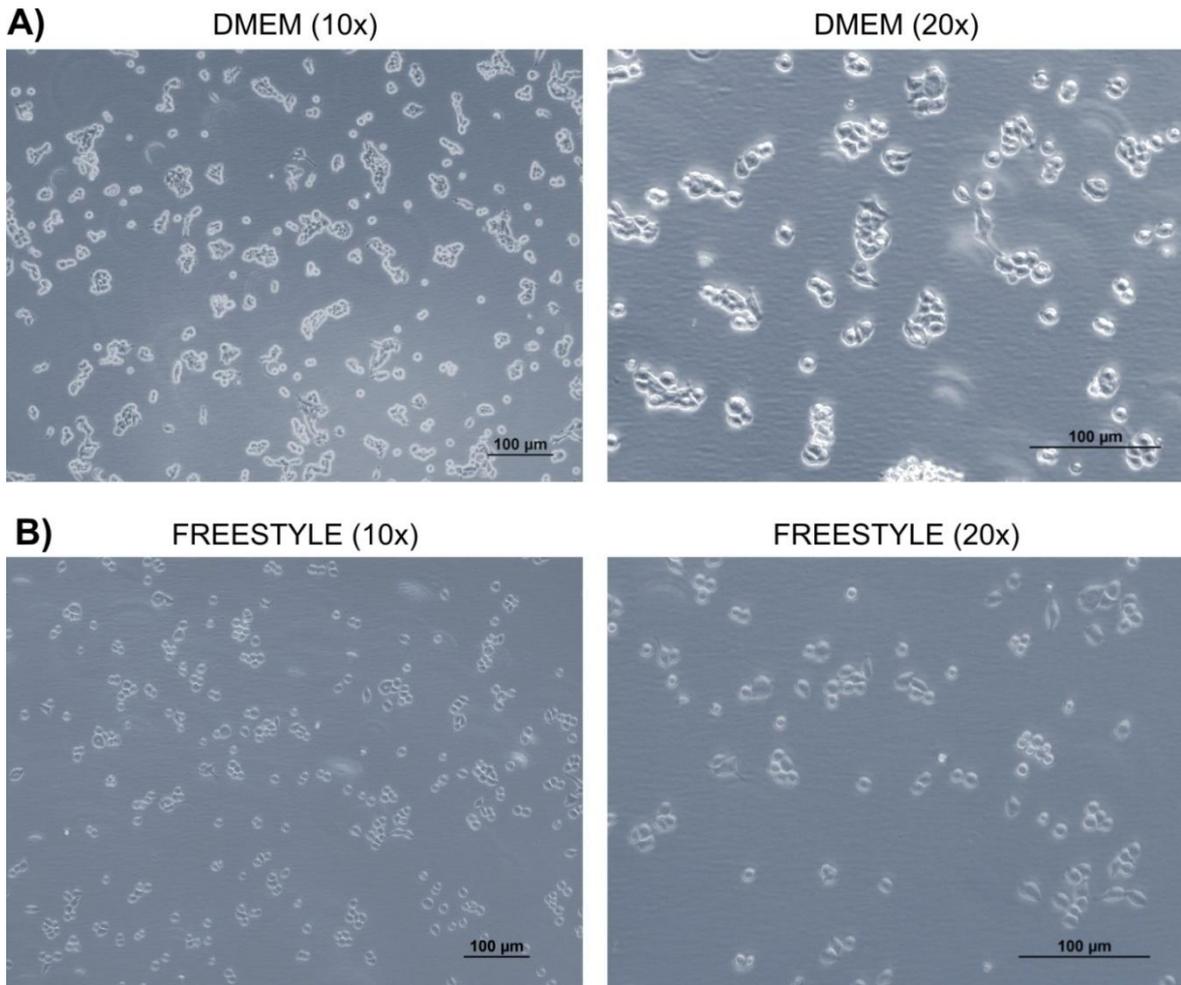


Figura 4.5 - Morfologia da célula HKB-11 antes e após a adaptação ao meio livre de SFB FreeStyle. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio FreeStyle.

- **Meio CDM4**

A célula HKB-11 necessitou de três passagens intermediárias até obter uma cultura livre de SFB em meio CDM4 na 1ª adaptação. Pela Figura 4.6, observamos que a célula HKB-11 em meio CDM4 sofreu com a retirada do soro já na primeira passagem da adaptação, com aumento de 49% no valor do tempo de duplicação celular e redução de 15% no valor da viabilidade em relação ao controle (52 h e 75,8% e 34,8 h e 89,6%, respectivamente). No entanto, na concentração de 50% de meio livre de soro, as células apresentaram t_D semelhante ao do controle (33,3 h e 34,8 h, respectivamente), apesar do menor valor de viabilidade (64,4%). Na concentração de 75%, o tempo de duplicação celular foi de 38,2 h, enquanto que a viabilidade aumentou (74,3%), mostrando que a célula estava suportando as condições até então empregadas. Já em meio CDM4 livre de soro, o t_D aumentou para 62,4 h, enquanto a viabilidade chegou a 70,4%.

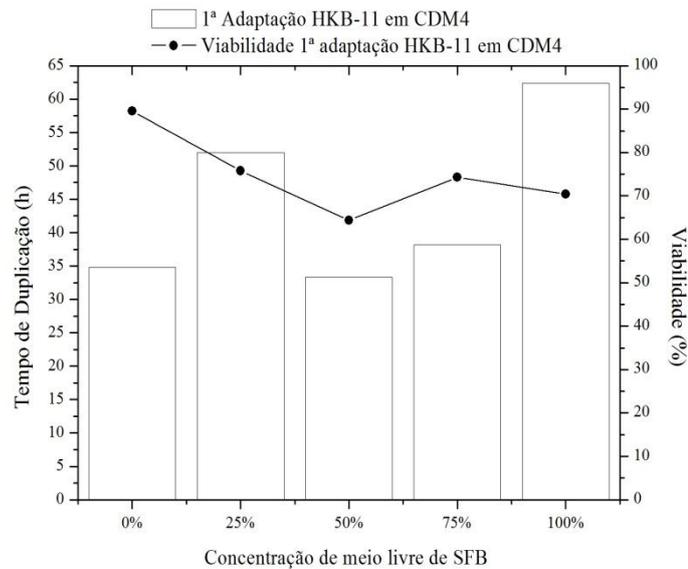


Figura 4.6 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas (Adaptação 1).

Uma vez adaptadas para CDM4 livre de soro, as células foram submetidas a passagens sucessivas em meio suplementado com 10% de Cell Boost 5, 1% ITS-G 100x e 1% de Pluronic® F-68 para avaliar a reprodutibilidade da adaptação.

Conforme mostrado na Figura 4.7, o valor do t_D ficou na faixa de 42,9 h – 95,4 h e a viabilidade, na faixa de 78,9% - 92,9%. A maioria das passagens resultaram em um t_D em torno de 45 h e viabilidade acima de 80%. Na quinta passagem em meio CDM4, a célula apresentou t_D de 48,1 h e 89,8% de viabilidade.

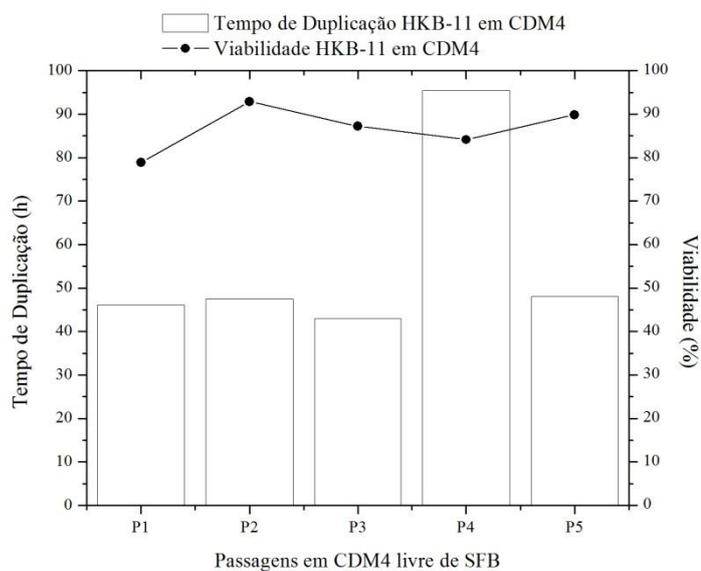


Figura 4.7 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo das passagens em meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas.

Com relação à morfologia da HKB-11, observamos pela Figura 4.8 que a célula adaptada em meio CDM4 apresentou morfologia semelhante à observada no meio FreeStyle, com crescimento em suspensão na forma de agregados.

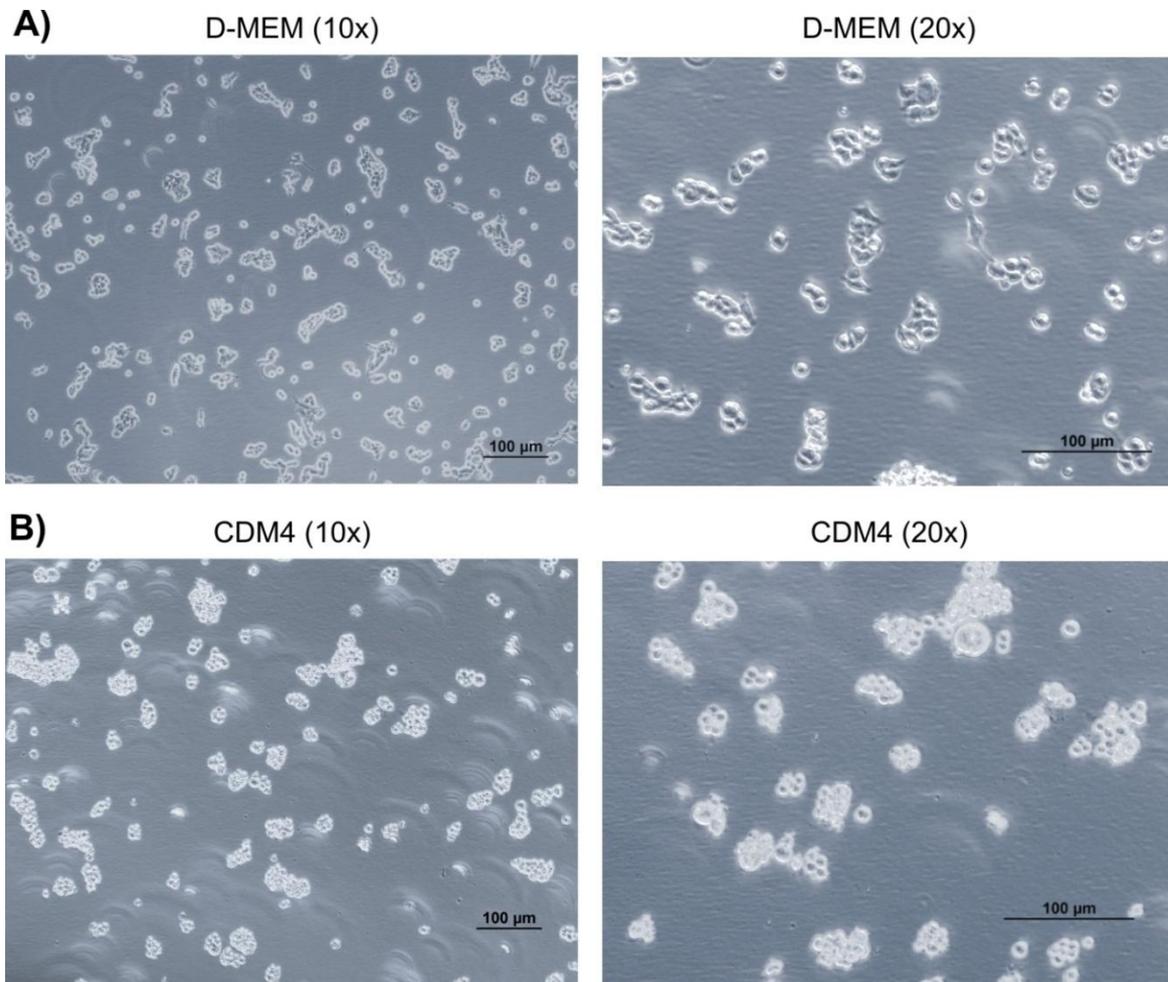


Figura 4.8 - Morfologia da célula HKB-11 antes e após a adaptação ao meio livre de SFB CDM4. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio CDM4.

- **Meio CD 293**

Na 1ª adaptação para o meio CD 293 observamos que as células HKB-11 apresentaram valores de tempo de duplicação celular entre 34,8 h e 66,3 h, com viabilidade entre 68,2% e 93,5% (Figura 4.9). Os melhores resultados da adaptação foram obtidos em 75% de meio sem soro, com valor de t_D e viabilidade de 41,2 h e 93,5%, respectivamente. No entanto, este valor não foi mantido em CD 293 livre de soro, sendo que o t_D sofreu aumento de 61% em relação a concentração de 75% de meio livre de soro (66,3 h e 41,2 h, respectivamente) e redução de 8% em relação a viabilidade (85,6% e 93,5, respectivamente). Na passagem subsequente, houve contaminação da cultura em CD 293 100% livre de soro e como não haviam sido

congeladas, a passagem 75% de meio livre de soro foi descongelada. Após o descongelamento, não houve crescimento celular e a viabilidade caiu 72% entre a primeira e última passagem (97,8% e 27,3%), ou seja, as células não se adaptaram bem as novas condições de cultivo e por isso sua adaptação para meio livre de soro não foi realizada.

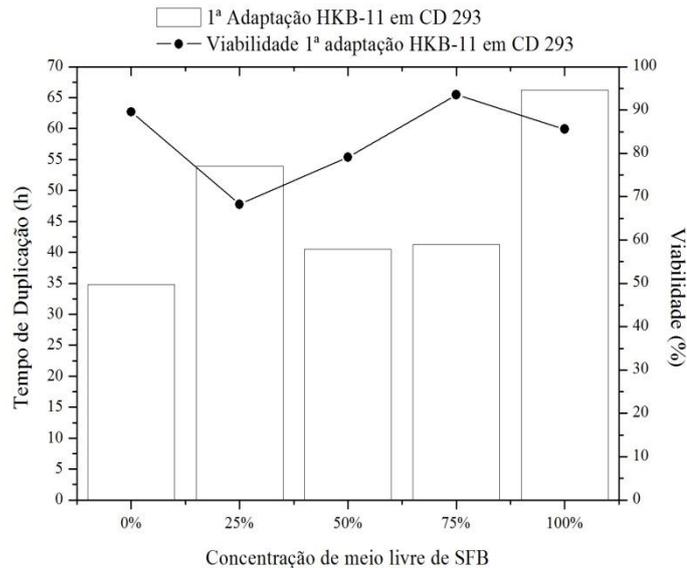


Figura 4.9 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CD 293 em garrafas estáticas (Adaptação 1).

- **Meio SFMII**

Durante a 1ª adaptação, as células HKB-11 em 25% de meio SFMII mostraram um tempo de duplicação celular aproximadamente 3 vezes superior ao controle (112,8 h e 34,8 h, respectivamente) (Figura 4.10). Na concentração de 50% de meio livre de soro, as células apresentaram um tempo de duplicação celular mais baixo (46,5 h) com 76,2% de viabilidade. Em 75%, este padrão de t_D se manteve (56 h) com 86,3% de viabilidade. Já na passagem SFMII livre de SFB, a célula HKB-11 atingiu t_D de 104,5 h, valor 87% maior que a passagem anterior e 76,1% de viabilidade.

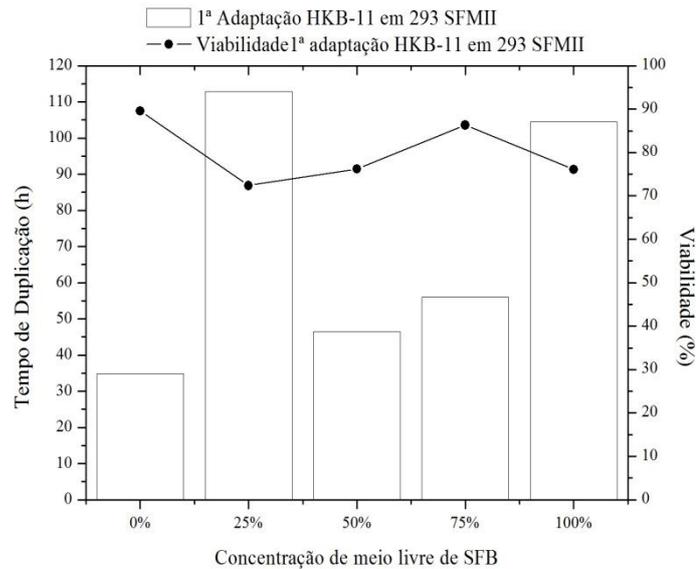


Figura 4.10 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB SFMII em garrafas estáticas (Adaptação 1).

Apesar da possível adaptação da HKB-11 em SFMII livre de soro, houve contaminação da cultura na passagem seguinte, sem que houvesse tempo para criopreservar a célula. Por isso, foram descongelados criotubos referentes à passagem 75% de meio livre de SFB para a realização de uma nova adaptação. No entanto, baixas concentrações celulares foram alcançadas no descongelamento, não sendo possível realizar outra adaptação a partir de 75% de meio livre de soro. Deste modo, uma nova adaptação foi realizada partindo de DMEM 10% SFB.

Pela Figura 4.11, podemos observar que a maioria das passagens em meio 25% livre de SFB da 2ª adaptação possuem viabilidades menores que 70% e t_D acima de 50 h, sendo que picos de 183,5 h (P1), 322,8 h (P4) e 716,6 h (P7) foram encontrados e na última passagem não foi observado crescimento celular. Estes resultados demonstram a dificuldade da célula HKB-11 em se adaptar ao meio SFMII na ausência de soro fetal bovino, de forma que este meio não foi utilizado para adaptação para crescimento em suspensão.

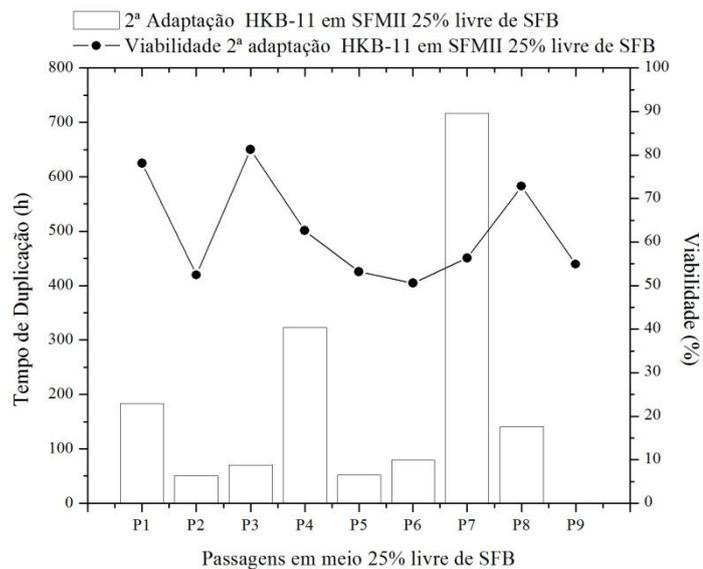


Figura 4.11 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HKB-11 ao longo das passagens em meio 25% livre de SFB SFMII.

4.1.2 Célula SK-Hep-1

- **Meio FreeStyle**

Durante a adaptação da SK-Hep-1, observamos que a célula apresentou t_D na faixa de 38,1 h a 48,5 h e viabilidade entre 78,6% e 93,6% ao longo do cultivo (Figura 4.12). Houve uma boa adaptação inicial da célula (passagem 25%) uma vez que seus valores de t_D e viabilidade foram melhores que o controle (38,1 h e 93,6% e 44,2 h e 87,5%, respectivamente). Esta característica de adaptação se manteve até 75% de meio livre de SFB, concentração na qual a célula apresentou ligeira dificuldade em se adaptar ao meio FreeStyle, pelo aumento de 17% no t_D em relação a passagem de 50% (48,5 e 41,5 h, respectivamente). Apesar da célula se adaptar ao meio SFMII livre de soro ($t_D = 46,1$ h e 78,6% de viabilidade), não houve crescimento nas passagens subsequentes em meio livre de soro e as células adaptadas e criopreservadas não sobreviveram ao congelamento, sendo necessário o descongelamento na passagem de 75% de meio livre de soro para uma segunda tentativa de adaptação.

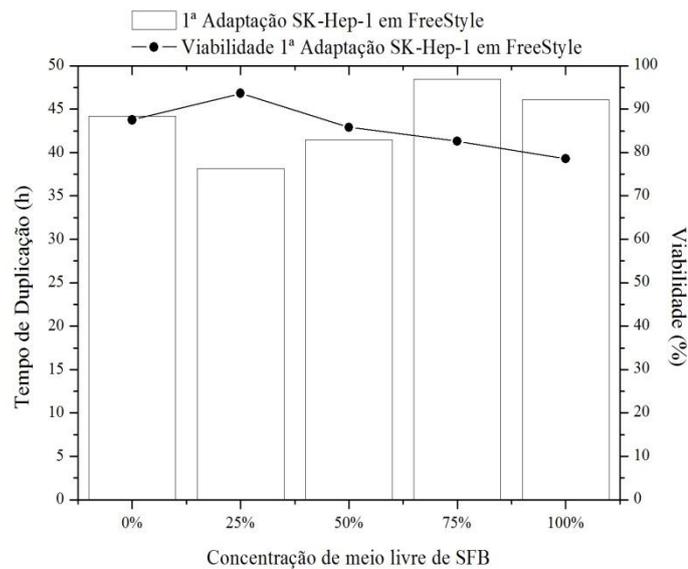


Figura 4.12 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 1).

A 2ª adaptação foi realizada descongelando a passagem de 75% de meio livre de soro. No entanto, as células não apresentaram viabilidade superior a 50% no descongelamento. Células criopreservadas na passagem de 50% de meio livre de soro foram descongeladas e as passagens podem ser acompanhadas pela Figura 4.13. Após o descongelamento, o tempo de duplicação foi alto (276,4 h), uma vez que a célula precisou se adaptar as condições de cultivo. Já nas passagens 75% e 87,5% podemos observar uma queda no t_D e na viabilidade em ambas as passagens (94 h, 82,9% e 71,4 h, 75%, respectivamente), indicando a retomada do crescimento. Porém, na passagem 87,5% as células contaminaram, e novamente células em 50% de meio livre de soro foram descongeladas. Como a viabilidade destas células descongeladas foi baixa, 31,6% na média, a adaptação não foi realizada, uma vez que a célula SK-Hep-1 estava apresentando dificuldade em se adaptar ao meio livre de soro assim como em se recuperar do processo de descongelamento.

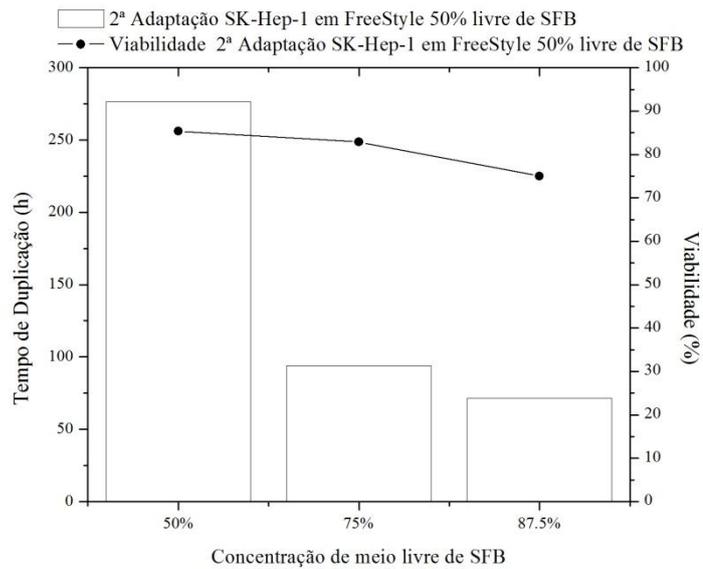


Figura 4.13 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 2).

- **Meio CDM4**

Durante a adaptação da célula SK-Hep-1 em meio CDM4, o valor de t_D variou entre 42,4 h e 132,1 h e a viabilidade entre 42,7% e 88,1%, conforme mostrado na Figura 4.14. Apesar da boa adaptação inicial em 25% (42,4 h e 88,1%), alcançando valores semelhantes ao controle (44,2 h e 87,5%), a célula apresentou um gradativo aumento no tempo de duplicação celular, conforme o SFB estava sendo eliminado da cultura. Em CDM4 100% livre de soro, o t_D foi de 132,1 h e 42,7% de viabilidade, valor 107% superior e 45% inferior em relação ao t_D e viabilidade da passagem de 75% de meio livre de soro (63,8 h e 77,8%, respectivamente).

Uma vez atingido 100% de meio livre de soro, as células SK-Hep-1 foram submetidas a passagens sucessivas em meio CDM4 suplementado, assim como foi realizado com a célula HKB-11. Conforme observado na Figura 4.15, o t_D ficou entre 36,9 h e 152,6 h e a viabilidade na faixa de 21,2% e 93,7%. As duas primeiras passagens tiveram valores acima de 110 h e viabilidade abaixo de 70%. A partir de P3 estes valores foram otimizados, atingindo na 5ª passagem 36,9 h e 86,7% de viabilidade, indicando uma possível adaptação ao meio CDM4. Após verificarmos o crescimento e viabilidade satisfatórios da célula SK-Hep-1 em meio CDM4 livre de soro prosseguimos com a adaptação para crescimento em suspensão em frascos *spinner*.

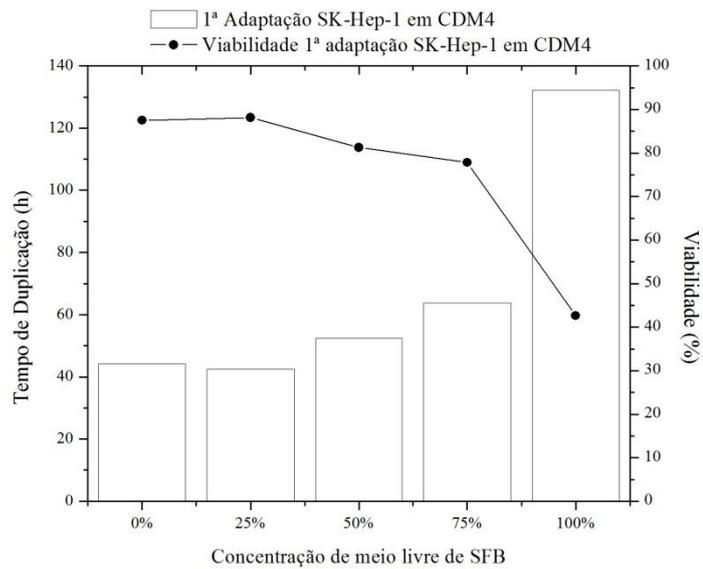


Figura 4.14 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas (Adaptação 1).

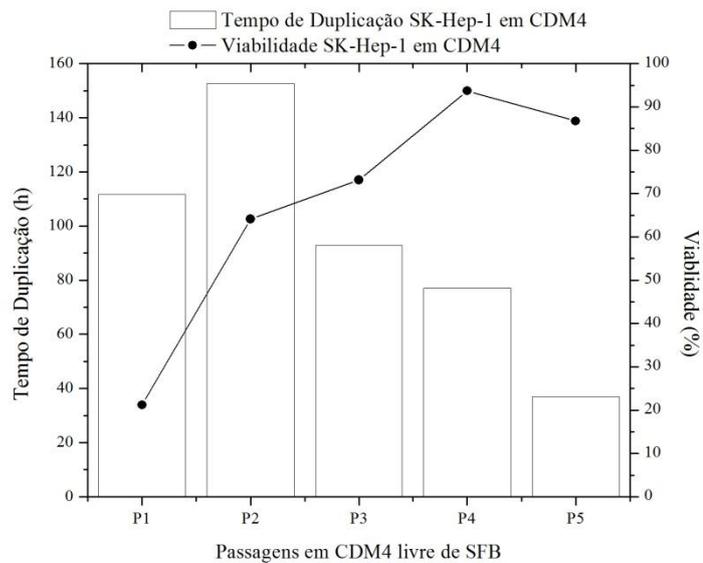


Figura 4.15 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo das passagens em meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas.

Com relação à morfologia da SK-Hep-1, vemos que a célula cresce muito bem aderida à garrafa estática quando cultivada em DMEM 10% SFB (Figura 4.16A) e são predominantemente maiores e mais alongadas quando comparadas com as células HKB-11 No meio livre de SFB CDM4 (Figura 4.16B), as células adaptadas crescem predominantemente em suspensão e com grande quantidade de grumos, resultado semelhante ao encontrado com a célula HKB-11 adaptada em CDM4.

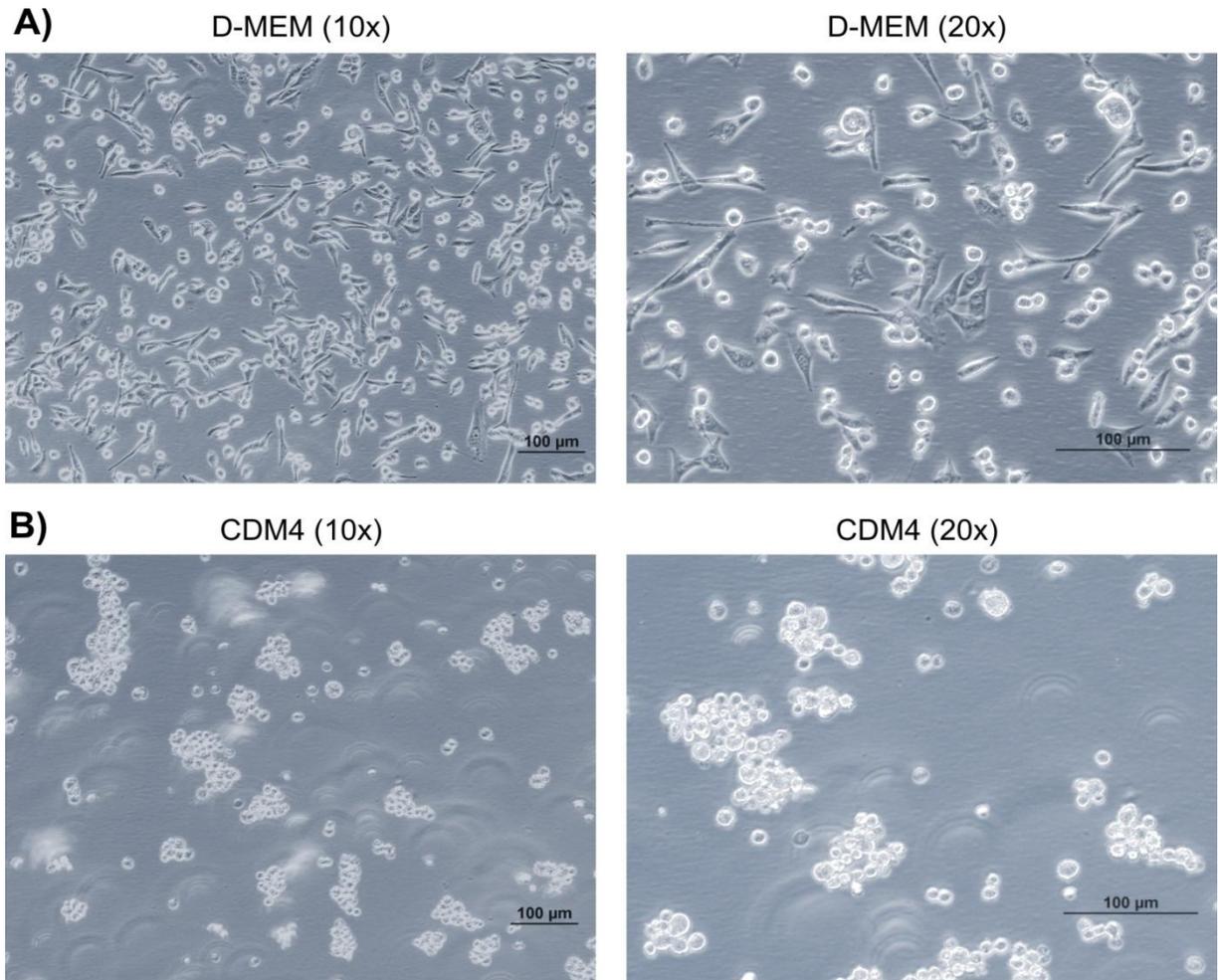


Figura 4.16 - Morfologia da célula SK-Hep-1 antes e após a adaptação ao meio livre de SFB CDM4. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio CDM4.

- **Meio CD293**

De acordo com a Figura 4.17, pode-se observar que a SK-Hep-1 apresentou um aumento de 69% no tempo de duplicação na primeira passagem da adaptação, com t_D de 74,6 h e 90,1% de viabilidade em comparação a 44,2 h e 87,5% apresentados no controle. Durante as outras passagens, o tempo de duplicação se manteve em torno de 55 h e 80% de viabilidade. No entanto, na passagem 100% de meio CD 293 livre de soro, houve uma queda de 73% na viabilidade das células em relação a passagem de 75% de meio livre de soro (22,8% e 84,8%, respectivamente), indicando que a célula não conseguiu se adaptar ao meio CD 293 livre de SFB.

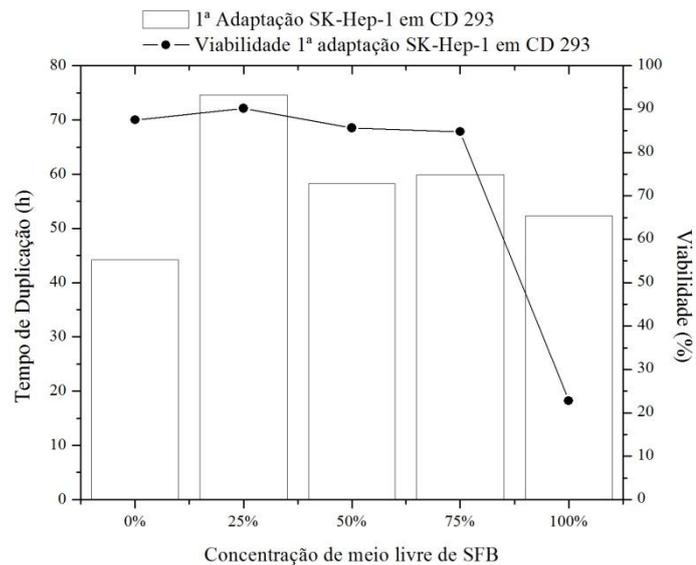


Figura 4.17 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CD 293 em garrafas estáticas (Adaptação 1).

Para avaliar se a célula conseguia se adaptar, foram descongeladas células na passagem 75% de meio livre de soro, porém estas células não sobreviveram ao descongelamento. Como o tempo de duplicação e viabilidade da célula SK-Hep-1 durante a primeira adaptação foi relativamente constante, uma nova tentativa de adaptação foi realizada.

Como podemos observar pela Figura 4.18, o tempo de duplicação celular mais que duplicou já na primeira passagem e quintuplicou em 60% de meio livre de soro em relação ao controle (245 h e 44,2 h, respectivamente), indicando que a célula SK-Hep-1 tem dificuldade em se adaptar ao meio CD 293 livre de soro. Em função destes resultados, o meio CD 293 não foi utilizado para adaptação em suspensão.

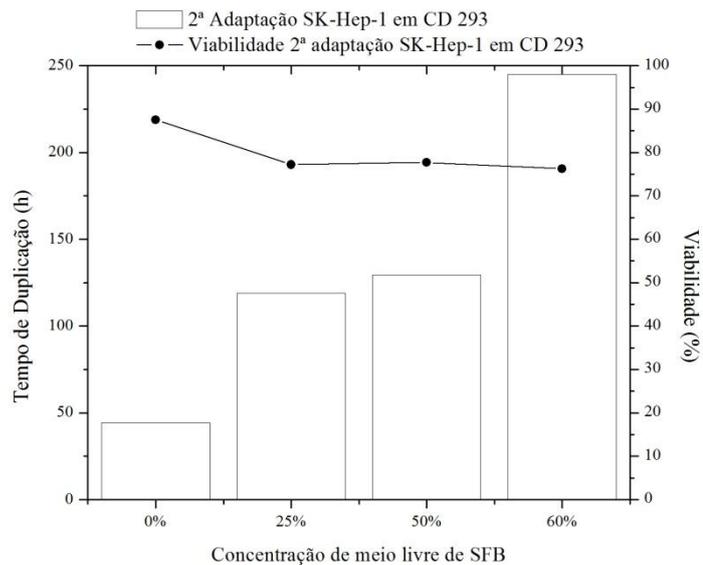


Figura 4.18 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CD 293 em garrafas estáticas (Adaptação 2).

- **Meio SFMII**

Durante a adaptação ao meio 293 SFMII livre de SFB, a célula SK-Hep-1 apresentou t_D entre 53,4 h e 96,7 h e viabilidade entre 57% e 85,3% (Figura 4.19). Na primeira passagem, o tempo de duplicação aumentou 52% e a viabilidade reduziu 17% em relação ao controle (67,1 h e 44,2 h, e 72,4% e 87,5%, respectivamente). Nas subseqüentes passagens, o t_D diminuiu, atingindo 53,4 h em 75% de meio livre de soro, apesar da redução de 33% na viabilidade em comparação com a passagem de 50% de meio livre de soro (85,3 h e 57%, respectivamente). Em 100% de SFMII livre de soro, o tempo de duplicação aumentou 81% em relação à passagem anterior (96,7 h e 53,4 h, respectivamente).

Nas passagens sucessivas, o meio SFMII livre de soro foi suplementado, assim como realizado com o meio CDM4. Pela Figura 4.20, podemos observar que a célula SK-Hep-1 apresentou elevados tempos de duplicação celular, acima de 100 h na média, atingindo máximo de 455 h (P3). A viabilidade não foi constante, oscilando entre 36% e 81%. No entanto, devido à adaptação na primeira tentativa e a sobrevivência da célula ao meio 100% SFMII, demos continuidade a adaptação para crescimento em suspensão em frascos *spinner*.

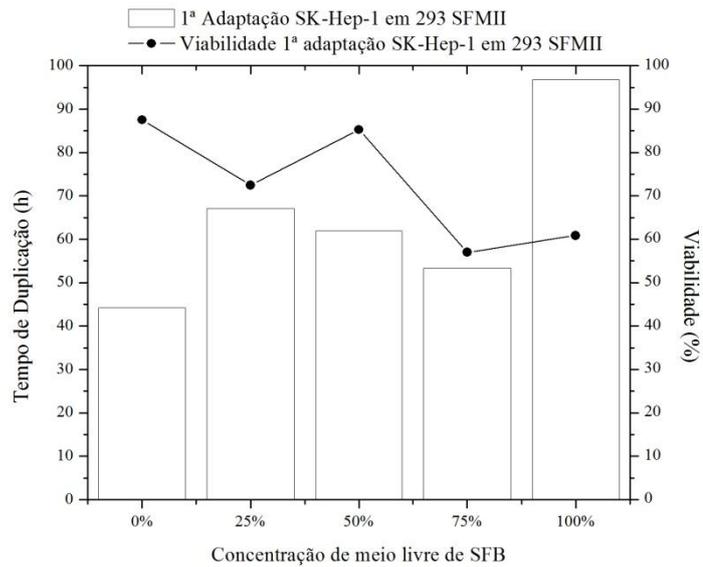


Figura 4.19- Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB SFMII em garrafas estáticas (Adaptação 1).

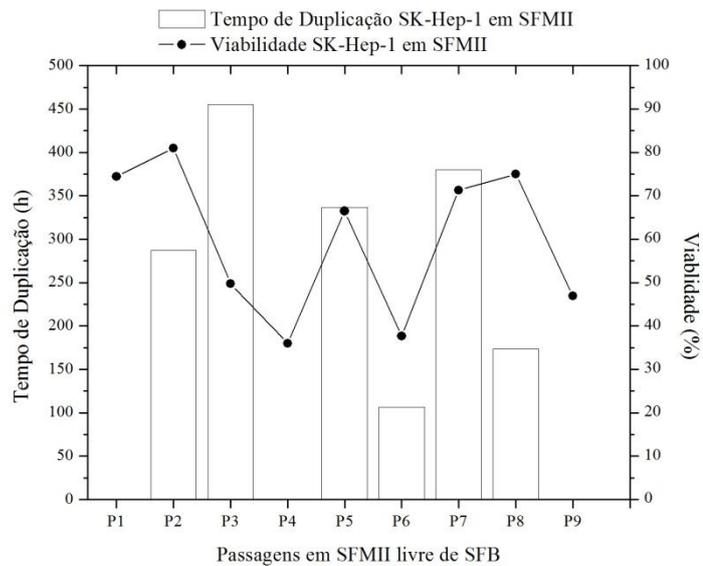


Figura 4.20 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula SK-Hep-1 ao longo das passagens em meio livre de SFB SFMII em garrafas estáticas.

A morfologia da célula adaptada em meio SFMII apresentou características similares ao cultivo da SK-Hep-1 em CDM4 pela forma arredondada, crescimento em suspensão e em grumos (Figura 4.21).

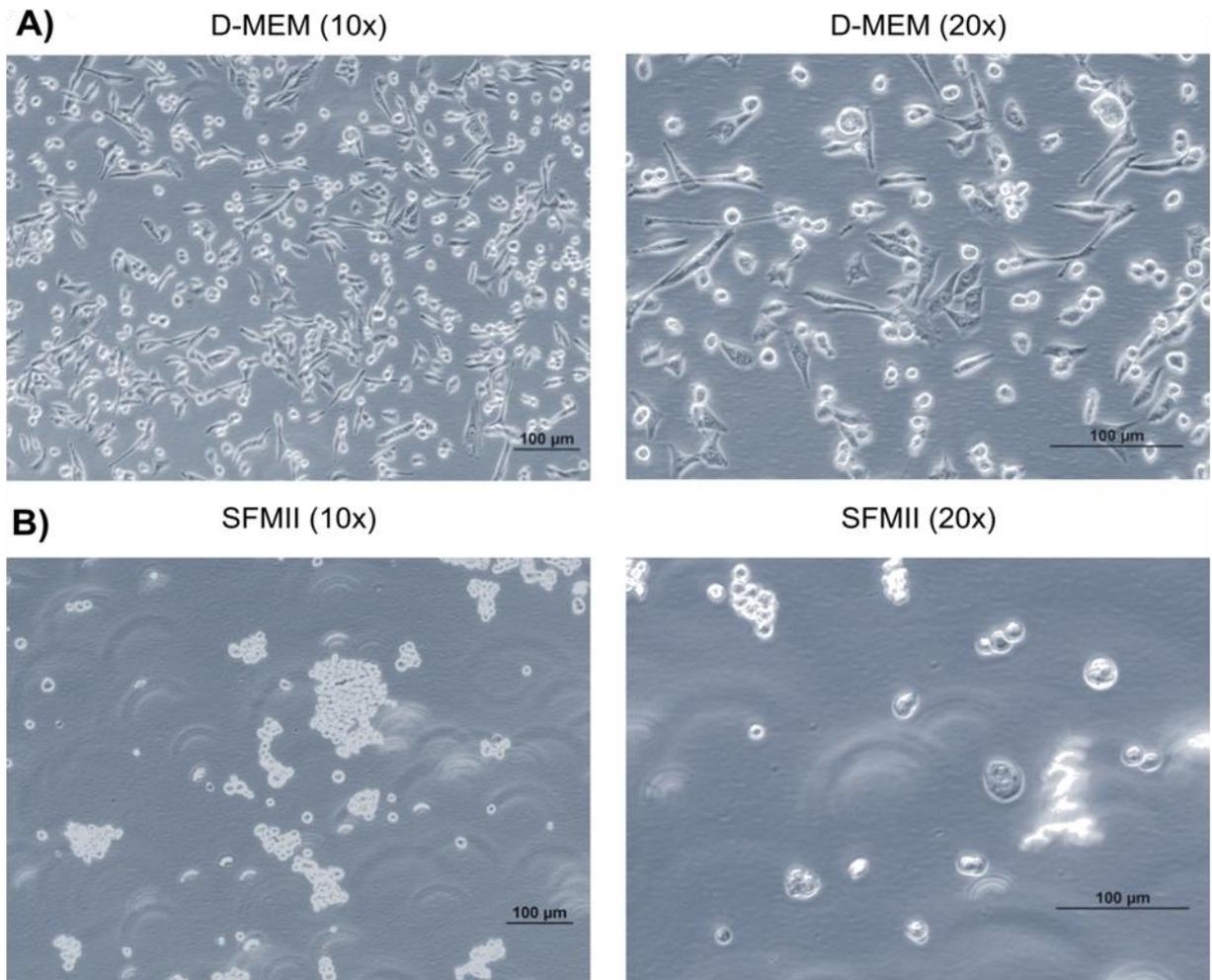


Figura 4.21 - Morfologia da célula SK-Hep-1 antes e após a adaptação ao meio livre de SFB SFMII. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio SFMII.

4.1.3 Célula HepG2

- **Meio FreeStyle**

Durante a adaptação da célula HepG2, o t_D manteve-se entre 68,8 h e 111,1 h e a viabilidade entre 41,6% e 87,8% (Figura 4.22). Mesmo em meio DMEM 10% SFB, a célula apresentou elevado tempo de duplicação (88,1 h), praticamente o dobro se comparado com os controles da HKB-11 e SK-Hep-1 (34,8 h e 44,2 h, respectivamente). Como em 50% de meio livre de SFB houve elevação de 55% no tempo de duplicação em relação a passagem anterior (111,1 h e 71,6 h, respectivamente) e em 75% de meio livre de SFB a viabilidade celular diminuiu 28% em relação a passagem de 50% de meio livre de SFB (59,2% e 82%, respectivamente), uma passagem intermediária (87,5%) foi acrescentada. Mesmo assim, a célula HepG2 apresentou uma queda de 54% na viabilidade em relação ao

controle em 87,5% de FreeStyle livre de soro (90% e 41,6%, respectivamente). As passagens posteriores em 87,5% não apresentaram crescimento celular de modo que este meio não foi utilizado para adaptação para suspensão da célula HepG2.

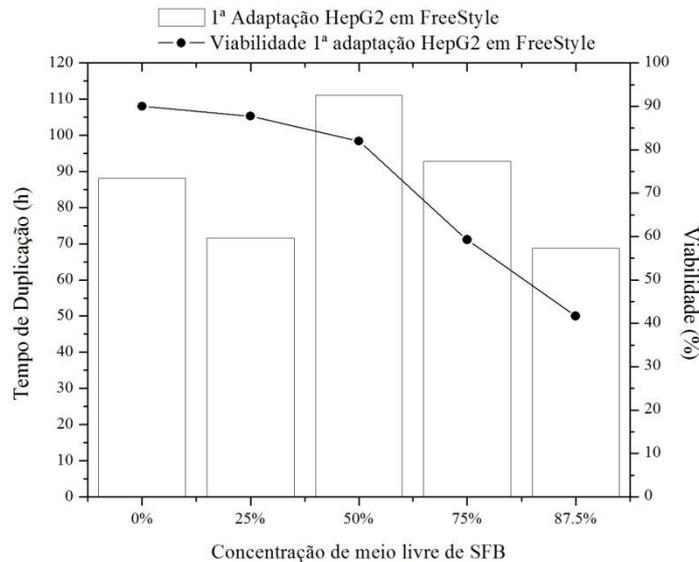


Figura 4.22- Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HepG2 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB FreeStyle em garrafas estáticas (Adaptação 1).

Em relação a morfologia, a célula HepG2 quando cultivada em meio DMEM 10% SFB cresce aderente e sob a forma de aglomerados, os quais dificultam a tripsinização e as contagens (4.23A). Esta característica se manteve para as adaptações em meios livres de SFB. Como podemos observar pela Figura 4.23B, as células cultivadas em meio FreeStyle 50% livre de soro fetal bovino se mantiveram agrupadas e parcialmente aderidas, com algumas poucas células em suspensão.

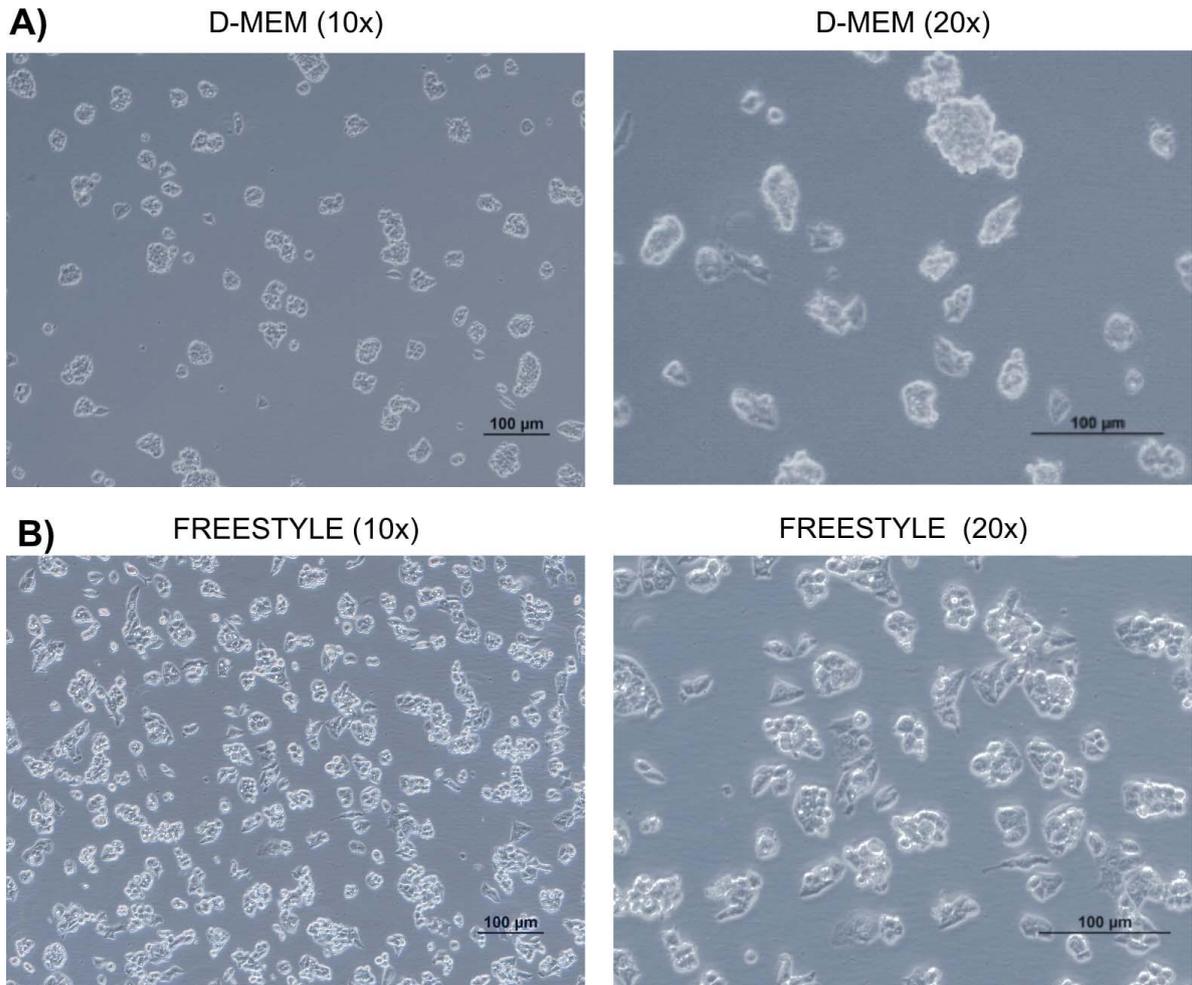


Figura 4.23 - Morfologia da célula HepG2 antes e após a adaptação para o meio FreeStyle 50% livre de SFB. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio FreeStyle 50% livre de SFB.

- **Meio CDM4**

Analisando a Figura 4.24, foi observado que durante as quatro primeiras passagens, a célula HepG2 apresentou t_D um pouco menor que o controle (71,2 h, 77,6 h, 78,8 h, 78,9 h e 88,1 h, respectivamente), assim como foi menor a viabilidade (87,7%, 80,5%, 50,7%, 47,8% e 90%, respectivamente). Em 100% de CDM4 livre de SFB, o tempo de duplicação aumentou 268% em relação a passagem anterior (78,9 h e 290,3 h, respectivamente), e a viabilidade foi de 71,6%, indicando que a célula teve dificuldade em se adaptar ao meio CDM4. Devido ao alto valor de t_D e ao fato das células em CDM4 100% livre de soro criopreservadas não terem sobrevivido, este meio não foi utilizado para continuar com o processo de adaptação para suspensão.

A morfologia da célula HepG2 em meio CDM4 50% livre de soro foi semelhante as células cultivadas em meio FreeStyle 50%, crescendo agrupadas e aderidas (Figura 25B).

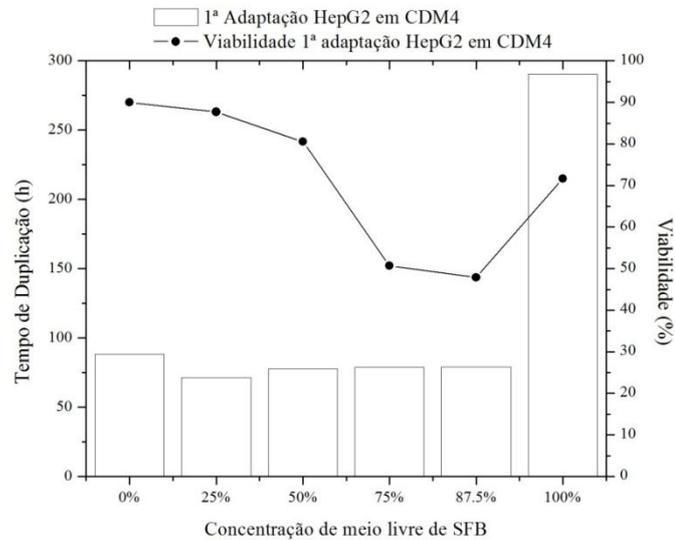


Figura 4.24 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HepG2 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CDM4 em garrafas estáticas (Adaptação 1).

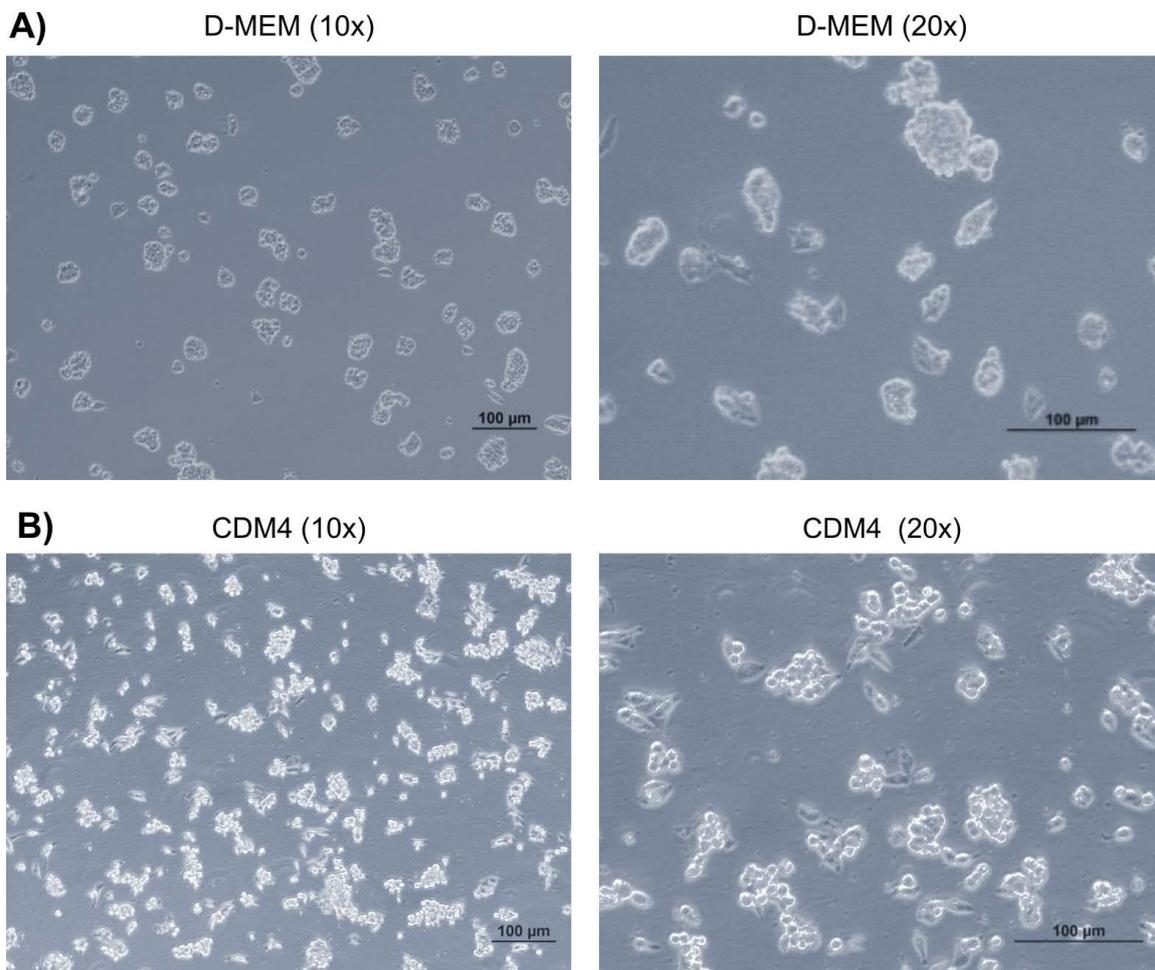


Figura 4.25 - Morfologia da célula HepG2 antes e após a adaptação para o meio CDM4 50% livre de SFB. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio CDM4 50% livre de SFB.

- **Meio CD293**

A adaptação da célula HepG2 em meio CD 293 também não foi satisfatória em função dos baixos valores de viabilidade (Figura 4.26). A passagem para 50% de meio livre de soro foi crítica para o processo de adaptação, uma vez que a viabilidade nesta concentração decaiu 74% em relação a passagem de 25% de meio livre de soro (18% e 69,9%, respectivamente), acompanhada de aumento de 14% no t_D (122,4 h e 107,1 h, respectivamente) em relação a mesma passagem. Na passagem de 75% de CD 293 livre de soro, o t_D foi de 162,5 h e a viabilidade de 6,4%, valor irrisório para dar prosseguimento com a adaptação para 100% de meio livre de soro fetal bovino.

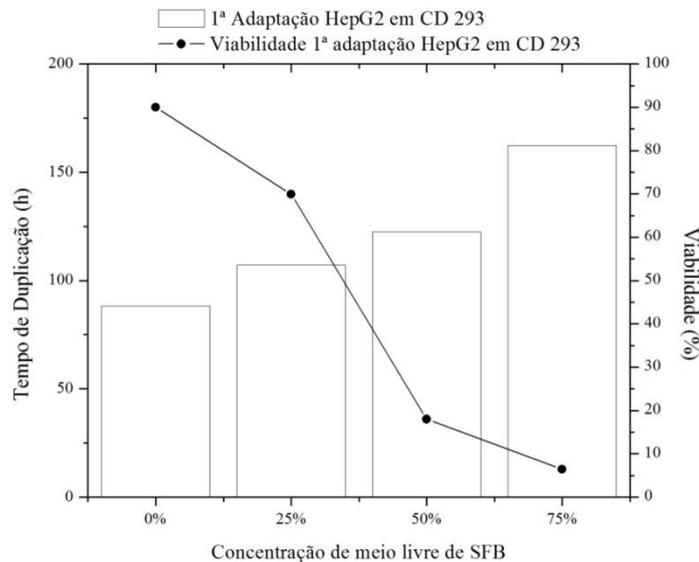


Figura 4.26 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HepG2 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB CD 293 em garrafas estáticas (Adaptação 1).

A maioria das células HepG2 em 50% de CD 293 livre de SFB cresceram em suspensão e apresentaram morfologia mais arredondada em relação aos meios FreeStyle e CDM4 50% livres de soro (Figura 4.27B).

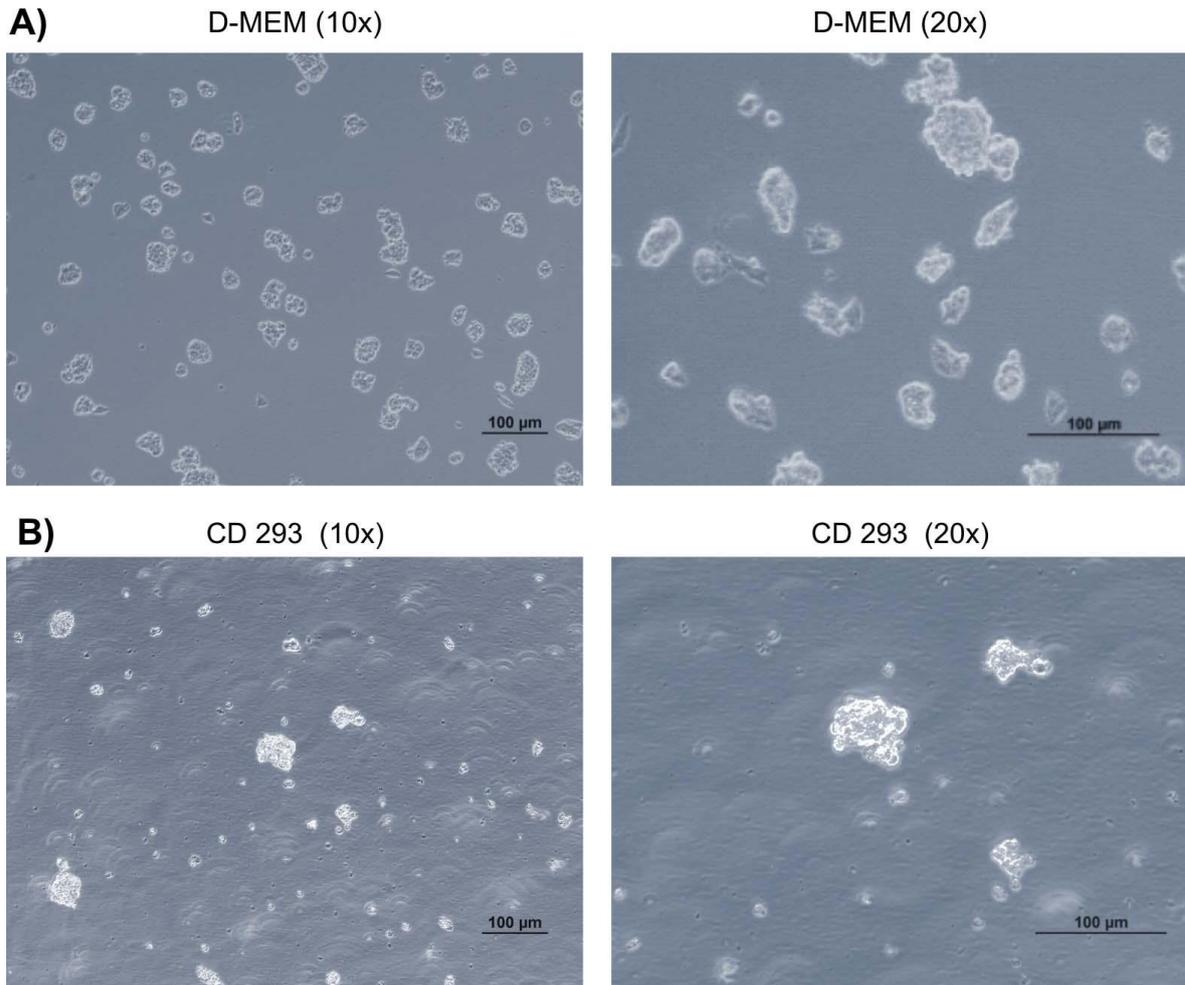


Figura 4.27 - Morfologia da célula HepG2 antes e após a adaptação para o meio CD 293 50% livre de SFB. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio CD293 50% livre de SFB.

- **Meio SFMII**

A célula HepG2 cultivada em meio SFMII, assim como nos demais meios, apresentou altos valores de t_D e baixos valores de viabilidade (Figura 4.28). Na primeira passagem da adaptação, a viabilidade celular sofreu uma queda de 55% em relação ao controle (40,6% e 90%, respectivamente) com aumento de 23% no t_D (108,8 h e 88,1 h, respectivamente). Em 50% de SFMII livre de SFB, a viabilidade foi de 17,4%, valor 81% menor que o controle (90%) e o t_D foi de 94,7 h. Nas duas passagens subsequentes, o valor de viabilidade se manteve abaixo de 30% (29,4% em 75%, e 22,1% em 87,5% de meio livre de SFB) e o tempo de duplicação celular chegou a 223,1 h em 75% de meio livre de soro. Na passagem 100% SFMII não houve duplicação celular, sendo que a viabilidade se manteve em 30%.

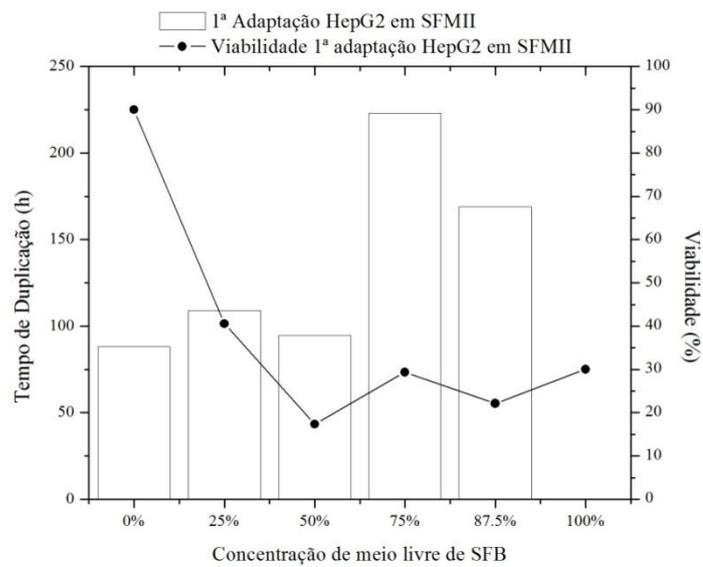


Figura 4.28 - Tempo de duplicação (t_D) e viabilidade da célula HepG2 ao longo da adaptação para o meio livre de SFB SFMII em garrafas estáticas (Adaptação 1).

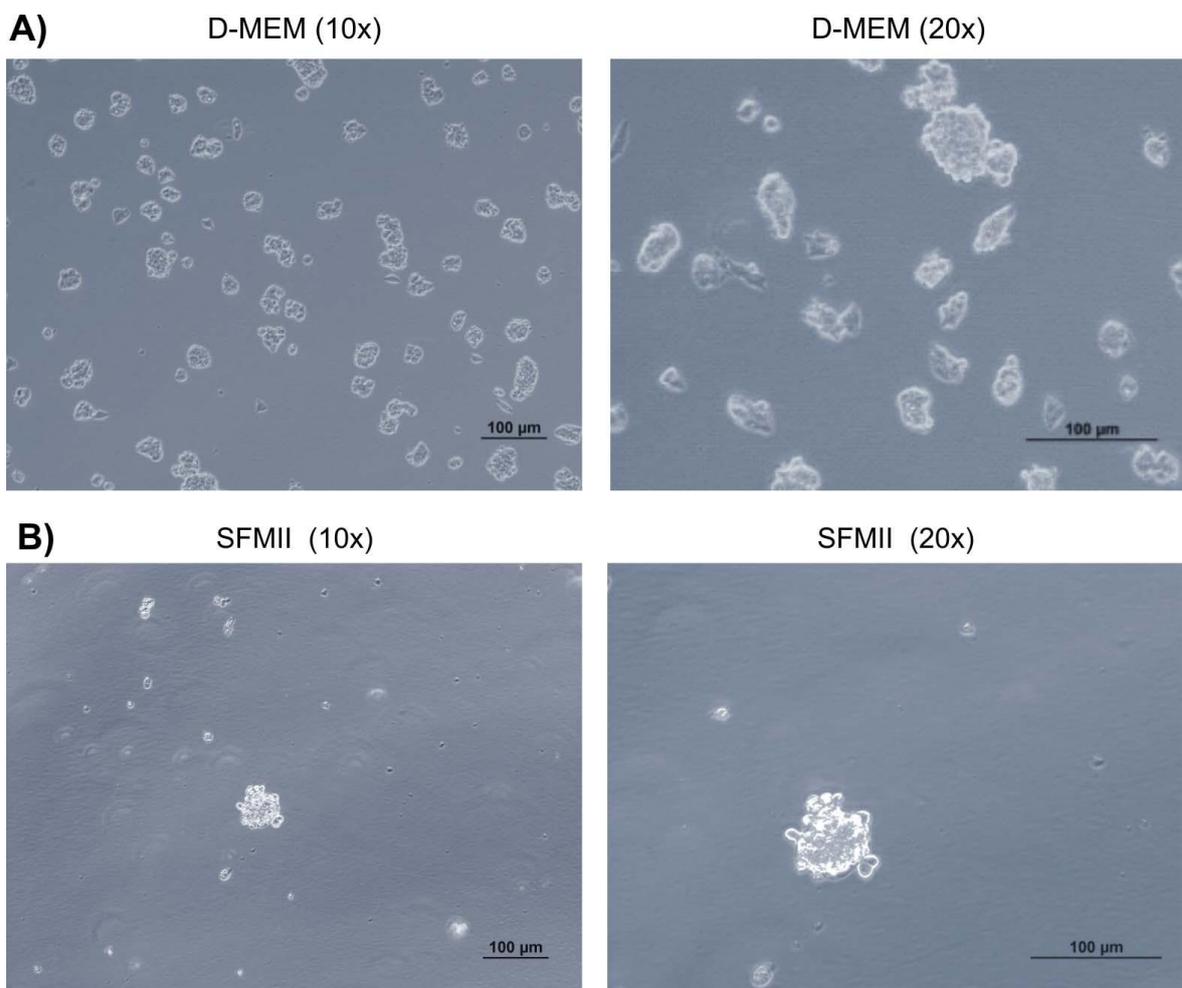


Figura 4.29 - Morfologia da célula HepG2 antes e após a adaptação para o meio SFMII 50% livre de SFB. A) Meio DMEM 10% SFB; B) Meio SFMII 50% livre de SFB.

A célula HepG2 cultivada em 50% de SFMII livre de SFB cresceram de forma semelhante ao cultivo em CD 293, arredondadas, em suspensão e com baixo número de células (Figura 4.29B).

4.2 Adaptações para crescimento em suspensão

Os meios de cultura que apresentaram resultados satisfatórios durante a etapa de adaptação em garrafas estáticas foram utilizados na adaptação para crescimento em suspensão realizada inicialmente em frascos *spinner* e posteriormente em frasco *erlenmeyer* sob agitação orbital. Como não foi possível adaptar a célula HepG2 para os meios livres de SFB, a adaptação para crescimento em suspensão foi realizada apenas para as células HKB-11 e SK-Hep-1.

4.2.1 Célula HKB-11

- **Meio FreeStyle**

Pela Figura 4.30, as células HKB-11 cultivadas em meio FreeStyle em frascos *spinner* não apresentaram crescimento durante os 34 dias de cultivo. Houve decréscimo da concentração e da viabilidade durante as passagens, sendo que a concentração celular só ultrapassou a concentração inicial de inóculo (5×10^5 células/mL) nas três primeiras passagens, atingindo valor máximo de $7,6 \times 10^5$ células/mL na primeira passagem com 96,4% de viabilidade. Após a 3ª passagem, não houve significativo crescimento celular.

Para avaliar se o problema de adaptação era referente ao meio ou ao sistema de cultivo em suspensão, resolvemos testar o sistema orbital, utilizando frascos *erlenmeyers* e comparar os resultados entre os dois sistemas. A Figura 4.31 mostra os resultados obtidos nesta comparação. Novamente, a célula HKB-11 quando cultivada em frasco *spinner* não apresentou resultados satisfatórios, uma vez que não ocorreu o crescimento celular e, conjuntamente, a viabilidade da célula decresceu durante os 7 primeiros dias de cultivo, corroborando com o resultado anterior. Em sistema orbital, a célula HKB-11 apresentou contínuo crescimento ao longo dos dias, com velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max}) de $0,0185\text{h}^{-1}$, concentração celular máxima (X_{\max}) de $3,42 \times 10^6$ células/mL e 86,5% de

viabilidade no 8º dia. Além disso, a concentração celular permaneceu em torno de 3×10^6 células/mL até o 13º dia, onde o cultivo foi encerrado.

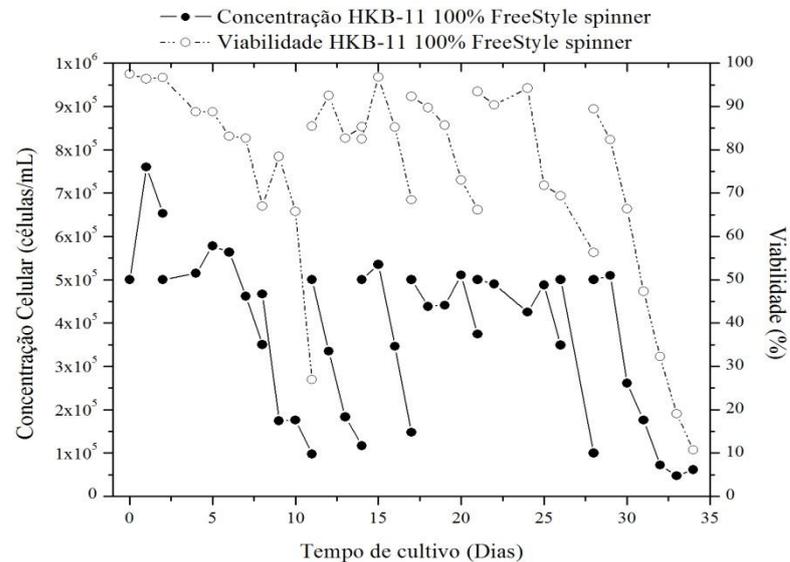


Figura 4.30 - Crescimento e viabilidade da célula HKB-11 cultivada em meio FreeStyle em frasco *spinner* durante várias passagens em suspensão.

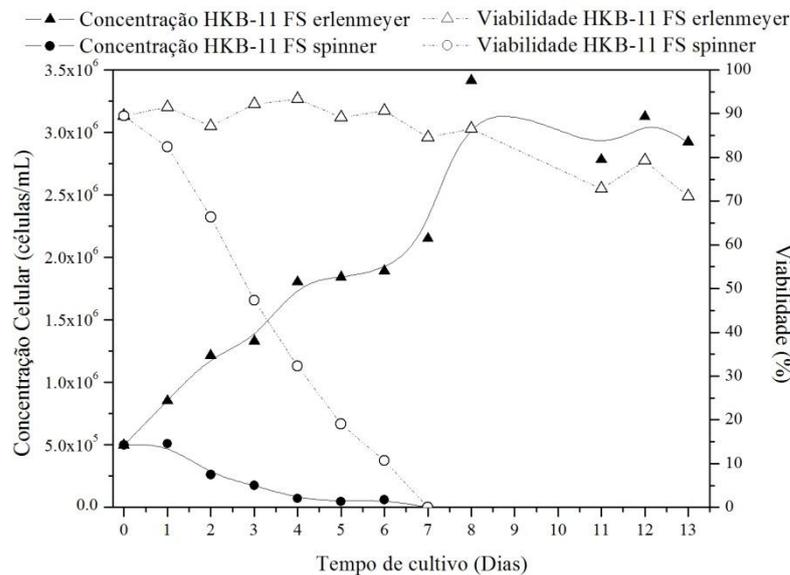


Figura 4.31 - Comparação do crescimento e da viabilidade da célula HKB-11 cultivada em meio FreeStyle em frasco *spinner* e *erlenmeyer*.

Após adaptação para crescimento em suspensão, a célula HKB-11 cultivada em meio FreeStyle foi criopreservada para avaliação da estabilidade da adaptação após sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento. Frente aos resultados satisfatórios neste meio de cultura, foi dado continuidade ao trabalho com a

caracterização cinética e metabólica da célula. Esta etapa foi realizada em frascos *erlenmeyer* sob agitação orbital em triplicata.

- **Meio CDM4**

A primeira adaptação para suspensão em meio CDM4 foi realizada em frasco *spinner*, assim como realizado para o meio FreeStyle. A Figura 4.32 mostra esta adaptação na qual a célula HKB-11 apresentou bom desempenho, com passagens sucessivas apresentando perfil semelhante de crescimento. O valor de μ_{\max} nessas 13 passagens (48 dias) variou entre $0,0090 - 0,0281h^{-1}$, com concentração celular máxima de $3,92 \times 10^6$ células/mL (6ª passagem). De um modo geral, a viabilidade se manteve acima de 80% por 41 dias, variando de 66,7% (9ª passagem) a 93,7% (3ª passagem). No entanto, a partir da 13ª passagem, podemos observar a fase de declínio celular, indicada tanto pelo baixo valor da concentração como de viabilidade.

Conforme realizado com o meio FreeStyle, cultivamos a célula HKB-11 em meio CDM4 tanto em frasco *spinner* como *erlenmeyer*, para comparar os resultados entre os sistemas.

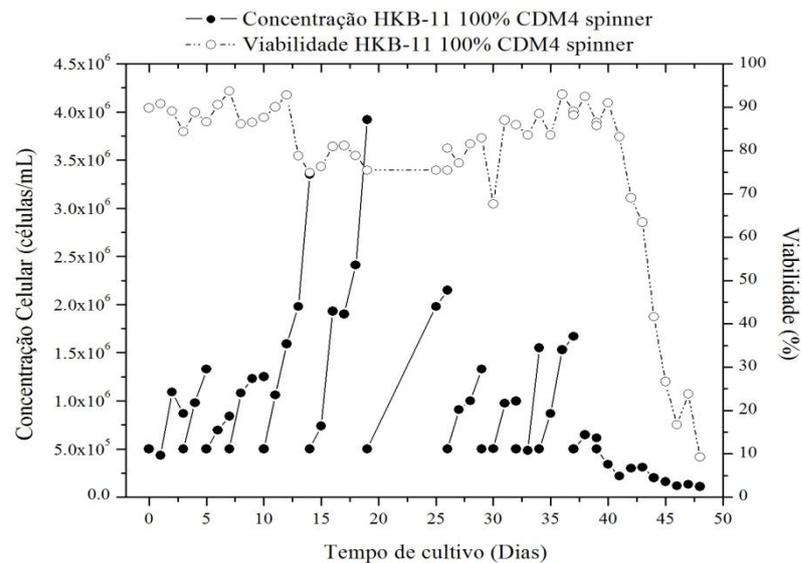


Figura 4.32- Crescimento e viabilidade da célula HKB-11 cultivada em meio CDM4 em frasco *spinner* durante várias passagens em suspensão.

Comparando ambos os sistemas, observamos que houve uma grande variação de crescimento (Figura 4.33), assim como observado para o meio FreeStyle (Figura 4.31). Em frasco *spinner* não se nota significativo crescimento ao longo de 9

dias de cultivo, além do contínuo decréscimo da viabilidade em função do tempo. Por sua vez, o cultivo em *erlenmeyer* se mostrou muito promissor, atingindo no 7º dia de cultivo concentração celular máxima de $8,01 \times 10^6$ células/mL, 90,6% de viabilidade e valor de μ_{\max} de $0,0278 \text{h}^{-1}$. Logo após, ocorreu o declínio do crescimento (8º dia), que pode ser observado tanto pela queda na concentração celular como pela progressiva diminuição da viabilidade.

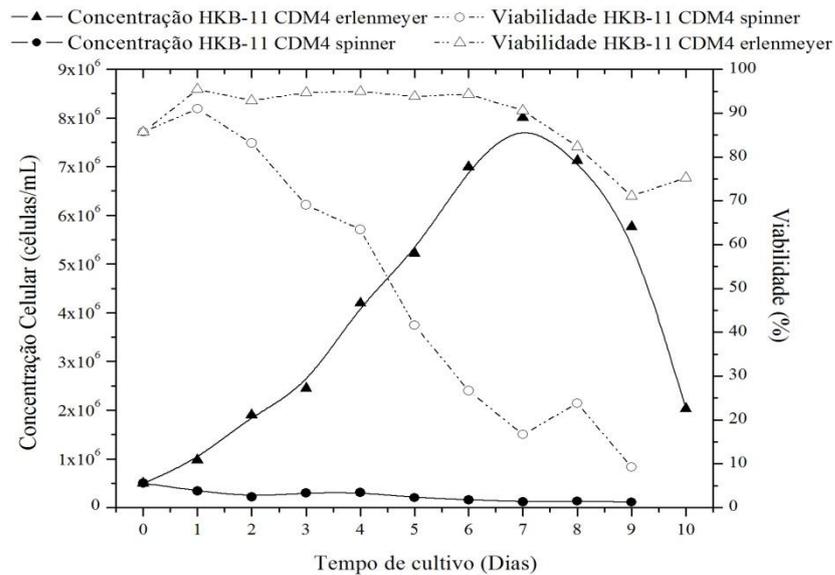


Figura 4.33 - Comparação do crescimento e da viabilidade da célula HKB-11 cultivada em meio CDM4 em frasco *spinner* e *erlenmeyer*.

Apesar de ter apresentado bom crescimento durante a adaptação para suspensão, a célula cultivada em meio CDM4 não suportou a etapa de congelamento e descongelamento. Todos os criotubos congelados não apresentaram crescimento pós-descongelamento. Em função disso, não foi realizada a etapa de caracterização cinética e metabólica neste meio.

4.2.2 Célula SK-Hep-1

- **Meio CDM4**

A Figura 4.34 mostra que a célula SK-Hep-1 em meio CDM4 apresentou bons resultados até a 7ª passagem, uma vez que posteriormente houve baixo crescimento celular e não se observou padrão neste crescimento. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max}) variou nesses 57 dias de cultivo entre $0,0062 - 0,0169 \text{h}^{-1}$,

com concentração celular máxima de $3,14 \times 10^6$ células/mL e viabilidade entre 31,5% e 95,1%. Esses valores de μ_{\max} e X_{\max} ocorreram na 6ª passagem, com uma viabilidade de 76,5%.

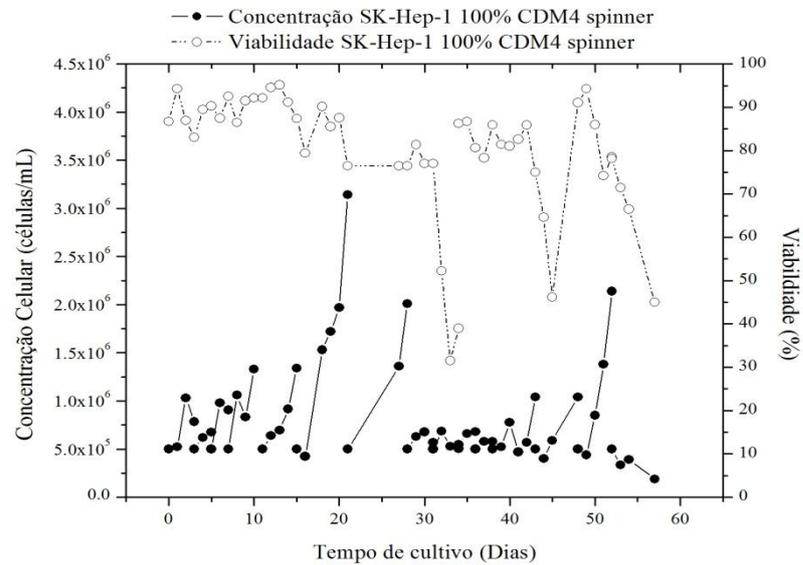


Figura 4.34 - Crescimento e viabilidade da célula SK-Hep-1 cultivada em meio CDM4 em frasco *spinner* durante várias passagens em suspensão.

A comparação do crescimento em frascos *spinner* e *erlenmeyer* também foi realizada. Podemos observar pela Figura 4.35, que houve uma grande variação entre os cultivos. Em frasco *spinner* não ocorreu significativo crescimento ao longo de 240 h (10 dias), com valores de concentração celular abaixo da concentração de inóculo (5×10^5 células/mL). A viabilidade do cultivo em *spinner* também não foi satisfatória, com declínio progressivo a partir do tempo 0 h, terminando em 29,7% em 240 h. No cultivo em frasco *erlenmeyer*, a célula SK-Hep-1 apresentou crescimento exponencial a partir de 24 h de cultivo, atingindo μ_{\max} de $0,0101 \text{ h}^{-1}$, X_{\max} de $1,37 \times 10^6$ células/mL e 96,5% de viabilidade em 168 h (7º dia). Após este tempo, houve declínio da concentração celular até o tempo de 240 h.

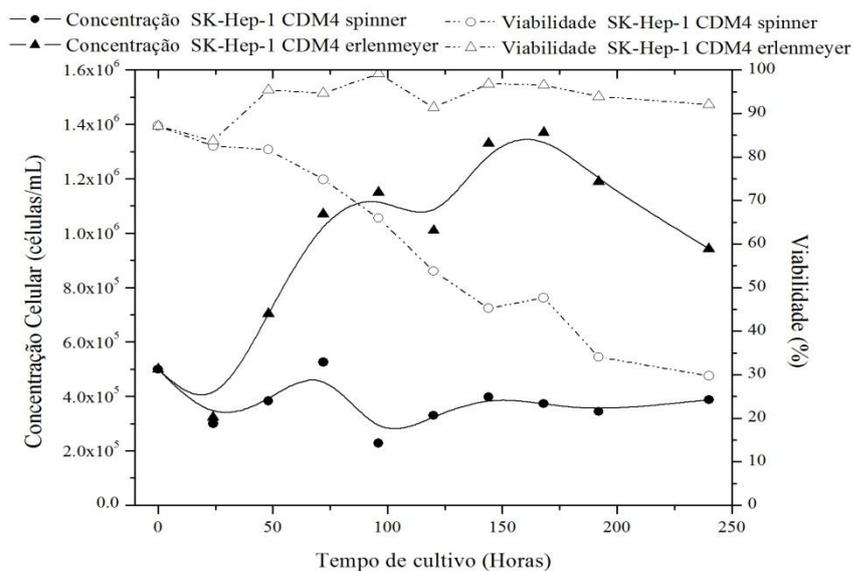


Figura 4.35 - Comparação do crescimento e da viabilidade da célula SK-Hep-1 cultivada em meio CDM4 em frasco *spinner* e *erlenmeyer*.

Apesar do resultado promissor da célula SK-Hep-1 cultivada em meio CDM4 em suspensão, problemas na criopreservação desta célula, assim como ocorrido com a célula HKB-11, inviabilizaram a continuidade do trabalho neste meio.

- **Meio SFMII**

De acordo com a Figura 4.36, podemos observar que o cultivo da SK-Hep-1 em SFMII em frasco *spinner* não obedece a um padrão e, além disso, a maioria dos valores de concentração celular está abaixo do inóculo inicial ($3,04 \times 10^5$ células/mL). Durante os 38 dias de cultivo e por 13 passagens, os valores de concentração celular variaram de $2,2 \times 10^5$ células/mL até $8,1 \times 10^5$ células/mL e a viabilidade variou entre 36,4% e 90,4%.

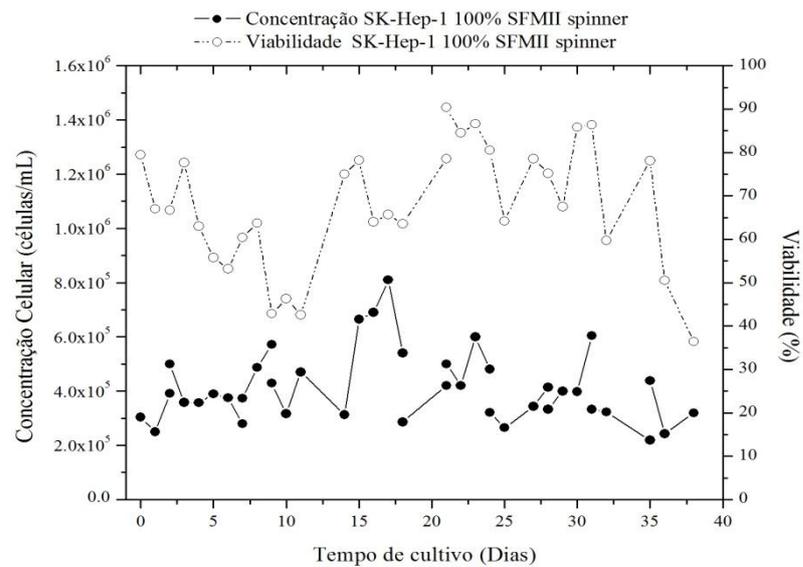


Figura 4.36 - Crescimento e viabilidade da célula SK-Hep-1 cultivada em meio SFMII em frasco *spinner* durante várias passagens em suspensão.

Para avaliar se o problema de adaptação era referente ao meio ou ao sistema de cultivo, uma batelada comparando os sistemas foi realizada. Pela Figura 4.37, observamos este foi o único caso até então em que houve crescimento em frasco *spinner*, apresentando concentração celular entre $5,51 \times 10^5$ – $2,24 \times 10^6$ células/mL, sendo o último valor referente ao X_{\max} (216 h). Após este tempo, se observou declínio celular. A viabilidade manteve-se em torno de 90%, variando entre 87,8 – 95,9%. O μ_{\max} foi de $0,0165 \text{ h}^{-1}$. Em relação ao cultivo em frasco *erlenmeyer*, podemos observar que a concentração celular manteve-se entre $5,21 \times 10^5$ - $2,13 \times 10^6$ células/mL, sendo este último valor o X_{\max} , que ocorreu em 120 h, momento após o qual verificamos declínio celular. De modo geral, o cultivo apresentou viabilidades acima de 95%, variando entre 87,9 - 98,1%. A velocidade específica de crescimento máxima foi de $0,0225 \text{ h}^{-1}$. Em função do superior desempenho observado quando as demais células adaptadas foram cultivadas em frasco *erlenmeyer*, optou-se por continuar com a etapa de caracterização cinética e metabólica da célula SK-Hep-1 em meio SFMII também neste sistema.

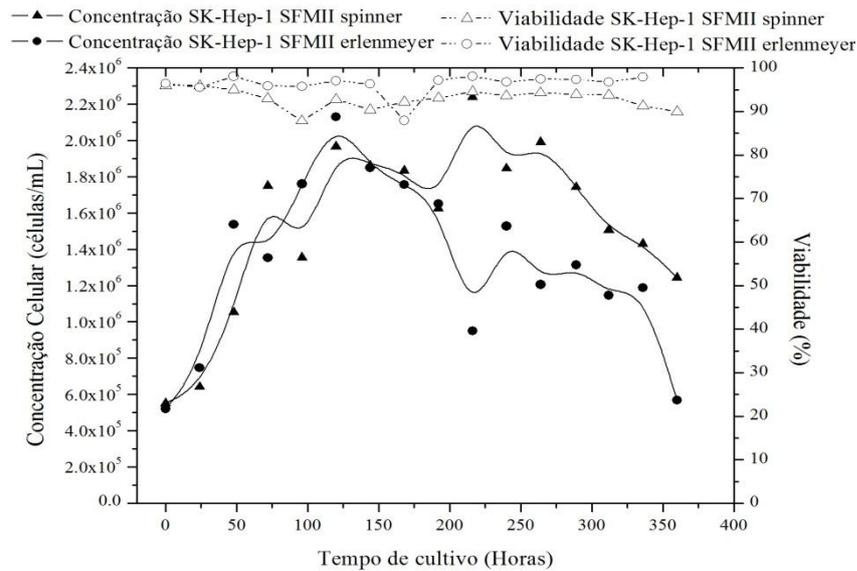


Figura 4.37 - Comparação do crescimento e da viabilidade da célula SK-Hep-1 cultivada em meio SFMII em frasco *spinner* e *erlenmeyer*.

4.3 Caracterização cinética e metabólica das células adaptadas

Nesta etapa do trabalho foram utilizadas apenas as células adaptadas para crescimento em suspensão que apresentaram bons resultados após o congelamento e descongelamento. Para a célula HKB-11 foi selecionado o meio FreeStyle e para a célula SK-Hep-1 o meio SFMII.

4.3.1 Célula HKB-11

Pela Figura 4.38A, podemos observar que a célula HKB-11 apresentou crescimento celular até 432 h (18^o dia), tempo no qual o valor de concentração celular foi máxima de $8,6 \times 10^6$ células/mL com 76,8% de viabilidade, ou seja, obtivemos um cultivo com concentração de $6,6 \times 10^6$ células viáveis/mL. A velocidade específica de crescimento máxima foi de $0,0159 \text{ h}^{-1}$. Após 432 h, a concentração celular decaiu, acompanhada da viabilidade. A viabilidade apesar de se manter acima de 80% na maior parte do cultivo não foi constante, apresentando valor máximo de 91,7% (0 h) e mínimo de 62,2% (504 h).

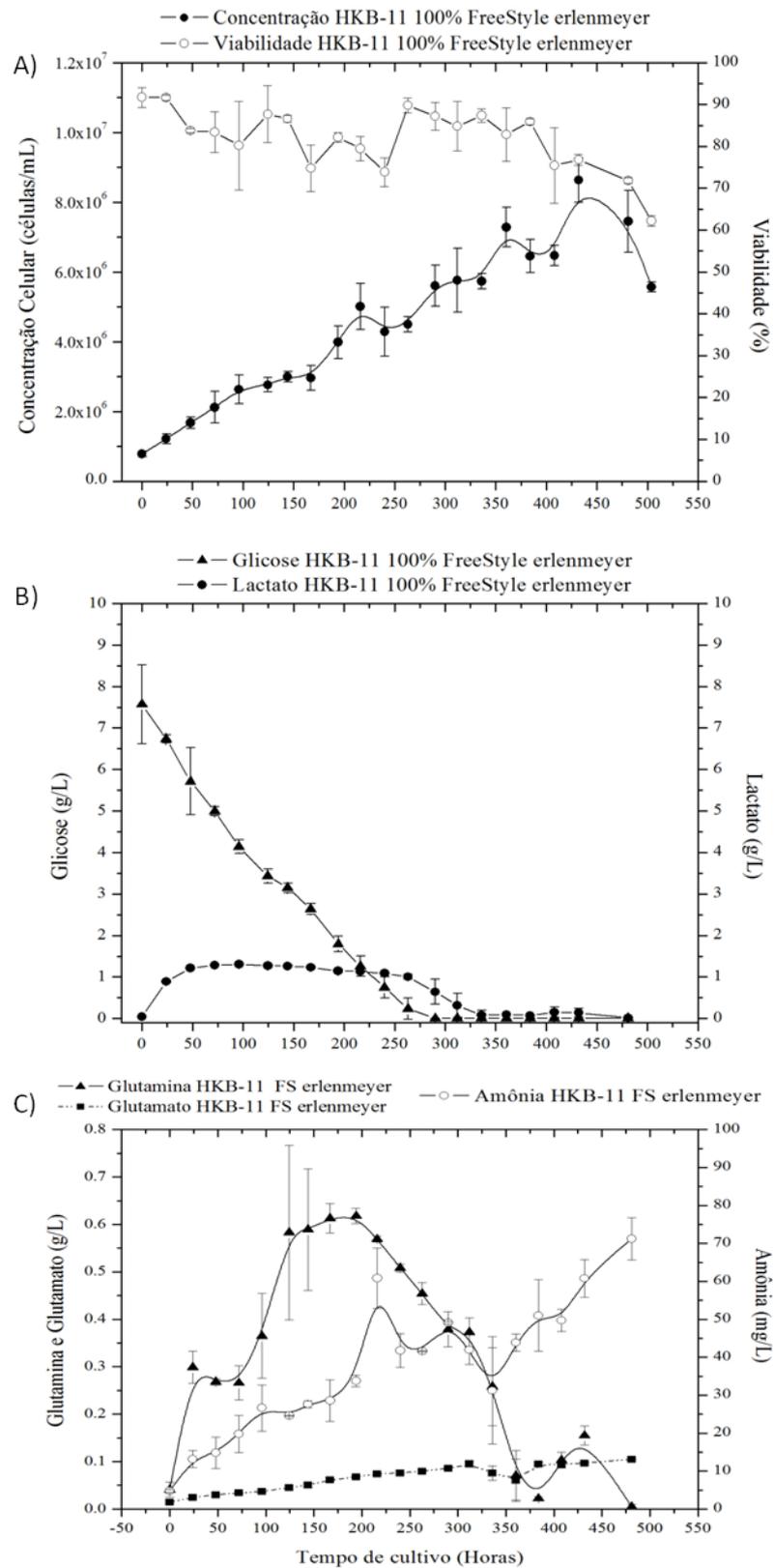


Figura 4.38 - Crescimento e viabilidade celular (A); perfil da concentração de glicose, lactato (B); glutamina, glutamato e amônia (C) durante o cultivo da célula HKB-11 em meio FreeStyle em frasco erlenmeyer (n=3).

Em relação ao metabolismo celular, podemos observar pela Figura 4.38B, que a concentração de glicose no meio começou a diminuir e a de lactato aumentar a partir do tempo 0 h. A concentração inicial de 7,6 g/L de glicose progressivamente decai até exaustão em 290 h (12º dia). A concentração de lactato aumentou nos dois primeiros dias e se manteve aproximadamente constante entre 48 h e 264 h em 1,2 - 1,3 g/L (13,5 -14,6 mM). Após este período, foi consumido até exaustão em 336 h (14º dia).

Pela Figura 4.38C, podemos observar que houve um aumento da concentração de glutamina até 194 h, havendo então declínio da concentração de 0,618 g/L até alcançar 0,005 g/L em 481 h (20º dia) ou seja, foram necessários 12 dias para esgotar a concentração de glutamina. A concentração de glutamato cresceu a partir do tempo 0h (0,014 g/L), até atingir um máximo de 0,105 g/L em 481 h (20º dia). Com relação a amônia, houve um crescente aumento na concentração inicial de 4,78 mg/L durante todo o cultivo. Também houve um pico de 60,83 mg/L de amônia (3,57 mM) em 216 h, 24 h após o pico máximo de glutamina na solução. A concentração máxima atingida pela amônia foi de 71,20 mg/L (4,18 mM).

Encontra-se apresentada na Figura 4.39, a morfologia da célula HKB-11 adaptada para crescimento em suspensão. Do tempo inicial até o momento no qual a concentração celular foi máxima (432 h), houve um grande crescimento celular, com as células crescendo de forma independente em sua maioria, mas também nota-se a formação de pequenos aglomerados.

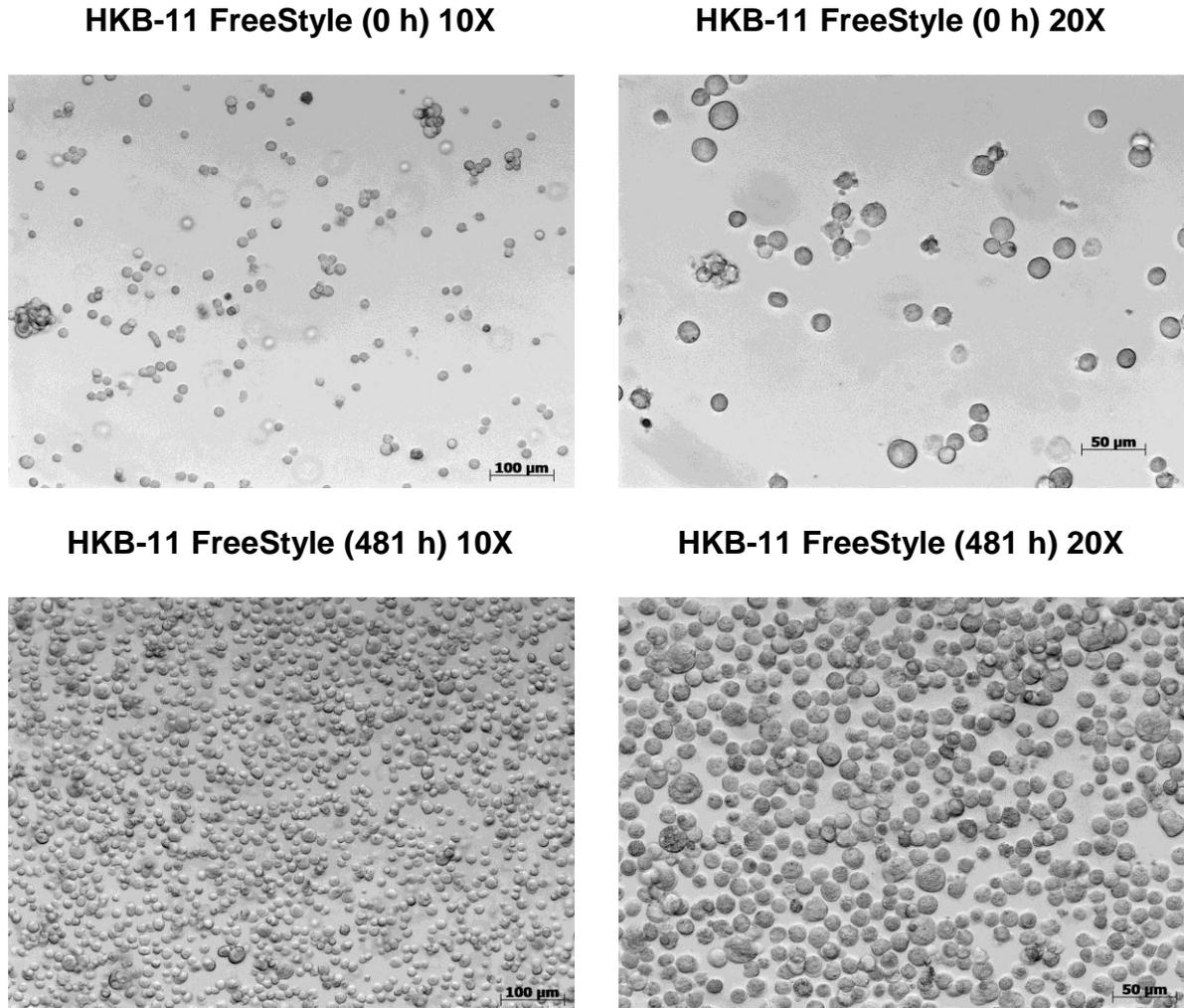


Figura 4.39 – Morfologia da célula HKB-11 quando cultivada em suspensão em frascos *erlenmeyer* no meio de cultura FreeStyle.

4.3.2 Célula *SK-Hep-1*

De acordo com a Figura 4.40A, o crescimento celular foi exponencial por três dias, entrando na fase estacionária em 96 h (4^o dia). Durante os 13 dias de cultivo, a viabilidade celular ficou acima de 90%, variando entre 94,3 – 97,6%. A concentração celular atingiu seu valor máximo, $1,93 \times 10^6$ células/mL, no tempo de 192 h e o valor de μ_{\max} foi de $0,0186 \text{ h}^{-1}$. Após 192 h, a concentração celular começou a diminuir até o fim do cultivo.

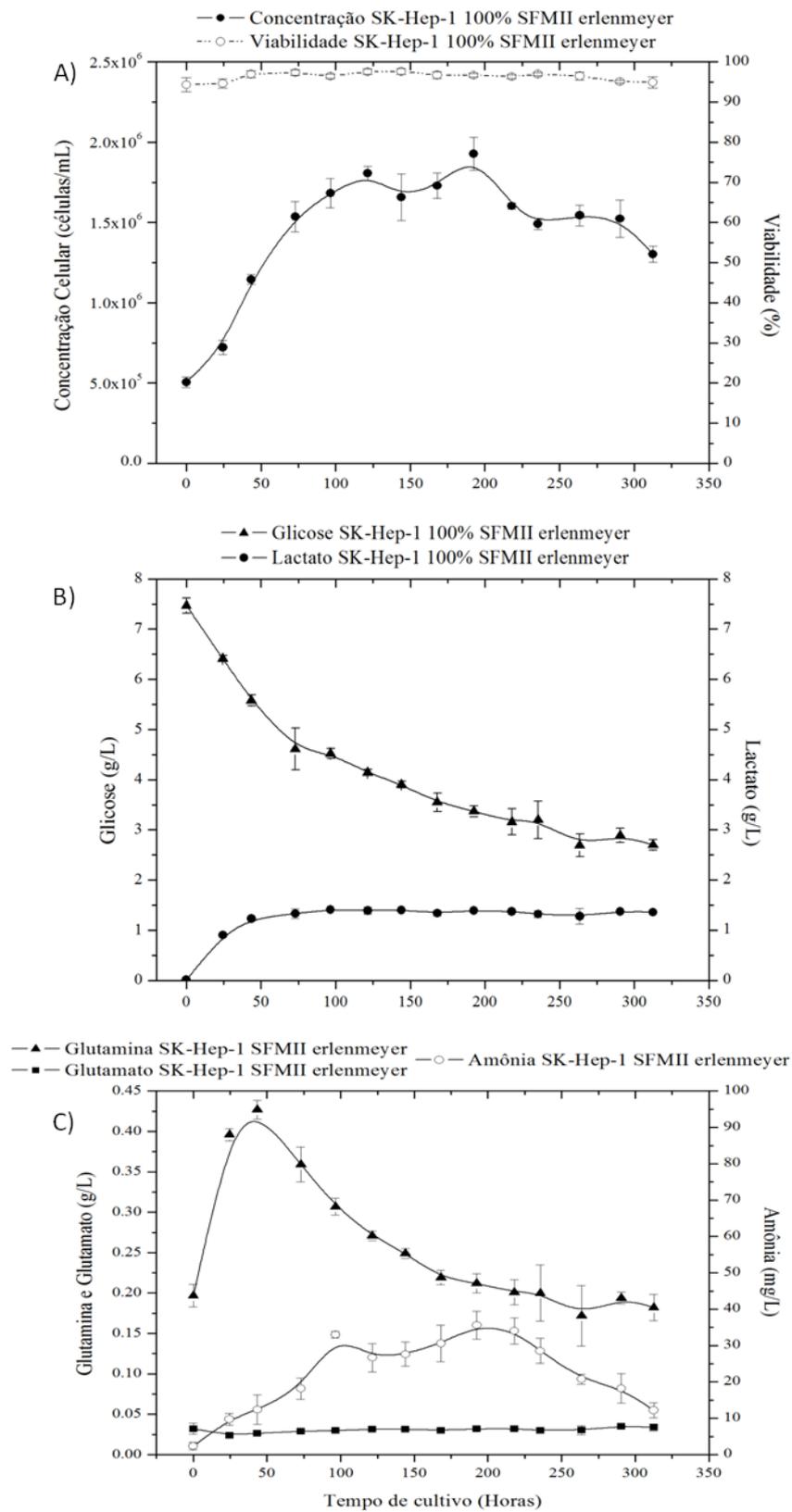


Figura 4.40 - Crescimento e viabilidade celular (A); perfil da concentração de glicose, lactato (B); glutamina, glutamato e amônia (C) durante o cultivo da célula SK-Hep-1 em meio SFMII em frasco *erlenmeyer* (n=3).

Este perfil de crescimento se reflete no consumo de glicose, que foi mais intenso nos três primeiros dias de cultivo. A concentração inicial foi de 7,5 g/L e chegou a 2,7 g/L em 312h (13^o dia), onde o cultivo foi encerrado. Como esperado, houve formação de lactato decorrente do metabolismo da glicose, atingindo em 96h o valor máximo de 1,4 g/L (15,7 mM), permanecendo praticamente constante durante o restante do cultivo (Figura 4.40B). A glutamina aumentou a sua concentração inicial de 0,197 g/L até atingir o valor máximo de 0,427 g/L em aproximadamente 43 horas de cultivo. Após 43h, a glutamina foi consumida, alcançando o valor de 0,182 g/L no último dia de cultivo (13^o dia), redução de 57% do valor inicial. A concentração de glutamato manteve-se praticamente constante durante os 13 dias de cultivo em torno de 0,03 g/L (Figura 4.40C), atingindo máximo de 0,034 g/L em 312h. Podemos observar que a concentração de amônia no sobrenadante aumenta a partir do tempo 0 h. Esse crescimento ocorre até 192h (8^o dia), onde atinge seu valor máximo de 35,59 mg/L (2,09 mM). Após 192h, a concentração de amônia começa a decair até 12,21 mg/L (0,72 mM) em 312h, onde o cultivo foi encerrado.

Encontra-se apresentada na Figura 4.41, a morfologia da célula SK-Hep-1 adaptada para crescimento em suspensão. Podemos observar que, do momento do inóculo até a concentração celular máxima (192 h), houve grande crescimento celular, mas ao contrário da célula HKB-11, quase não se observa a formação de agregados, sendo que as células crescem de forma unitária.

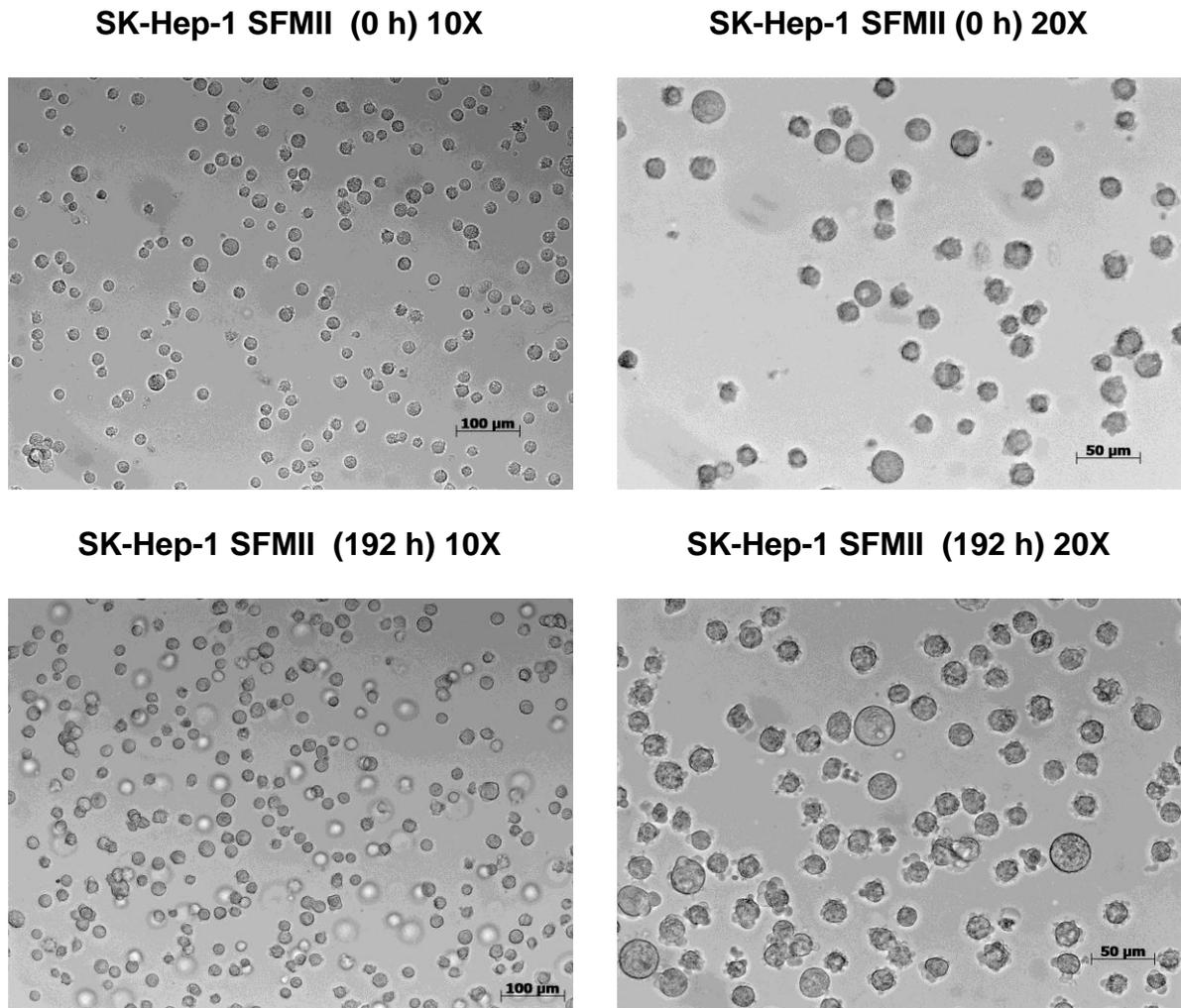


Figura 4.41– Morfologia da célula SK-Hep-1 quando cultivada em suspensão em frascos *erlenmeyer* no meio de cultura SFMII.

4.4 Estabelecimento de um banco de células adaptadas criopreservadas em condições livres de SFB

Durante a adaptação celular verificamos a necessidade de modificar o meio de congelamento padrão (90% SFB + 10% DMSO), uma vez que ambas as células HKB-11 e SK-Hep-1 apresentaram baixa viabilidade no descongelamento, sendo que vários lotes foram perdidos, principalmente para os cultivos em meio CDM4. Além disso, para se obter um produto biofarmacêutico seguro e de qualidade, é necessário remover completamente o soro fetal bovino de todo o bioprocesso, ou seja, do descongelamento até a formulação final. Deste modo, quatro meios de congelamento livres de SFB comerciais (Synth-a-Freeze (Invitrogen); HyCryo (HyClone); ProFreeze-CDM (Lonza); Cell Freezing Medium-DMSO Serum free

(Sigma)) e a condição 45% de meio fresco + 45% de meio condicionado + 10% DMSO foram testados e comparados com a condição de congelamento padrão (90% SFB + 10% DMSO). Foram avaliados 3 tempos de congelamento (15, 30 e 60 dias) e foram preparados dois lotes diferentes para cada condição. Esta etapa do trabalho foi realizada para a célula HKB-11 adaptada ao meio FreeStyle e para a célula SK-Hep-1 adaptada ao meio SFMII.

4.4.1 Célula HKB-11

A Figura apresentada abaixo (Figura 4.42) é relativa as taxas de sobrevivência no momento do descongelamento e as viabilidades na 5^a passagem do cultivo para os diferentes tempos de congelamento. A taxa de sobrevivência é a razão entre a viabilidade na qual as células foram congeladas e a viabilidade apresentada após descongelamento.

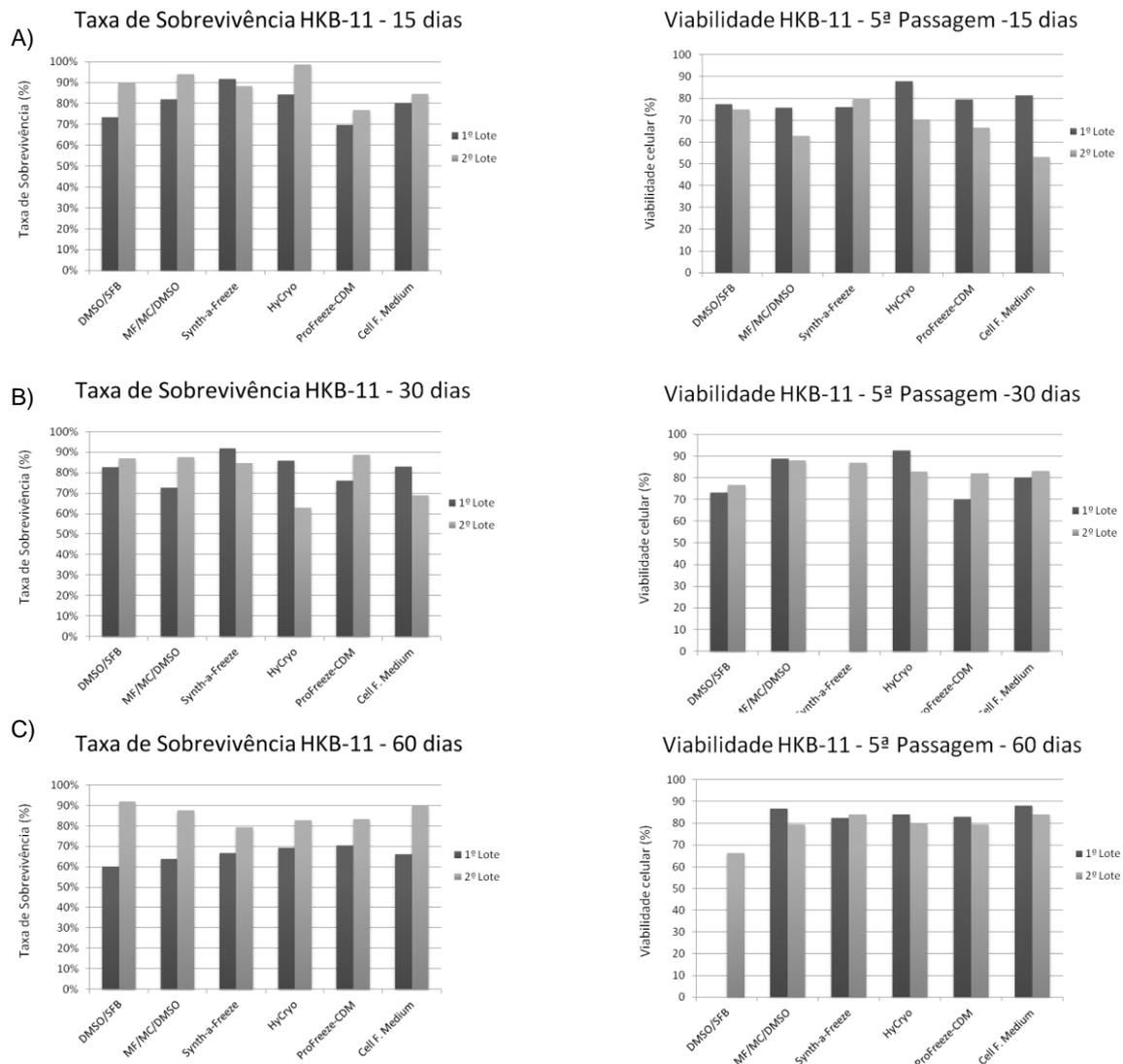


Figura 4.42- Taxa de sobrevivência e viabilidade da célula HKB-11 em meio FreeStyle na quinta passagem após descongelamento: A) 15 dias; B) 30 dias; C) 60 dias em -194°C.

4.4.2 Célula SK-Hep-1

Observando a Figura 4.43, podemos observar que os resultados do descongelamento do 1º lote foram insatisfatórios, uma vez que nos três tempos de congelamento testados, as taxas de sobrevivência da SK-Hep-1 foram menores que 50%. No 2º lote, por sua vez, houve pela menos 1 meio promissor cuja taxa de sobrevivência celular foi superior à 80% em todos os tempos: o meio HyCryo (Hyclone).

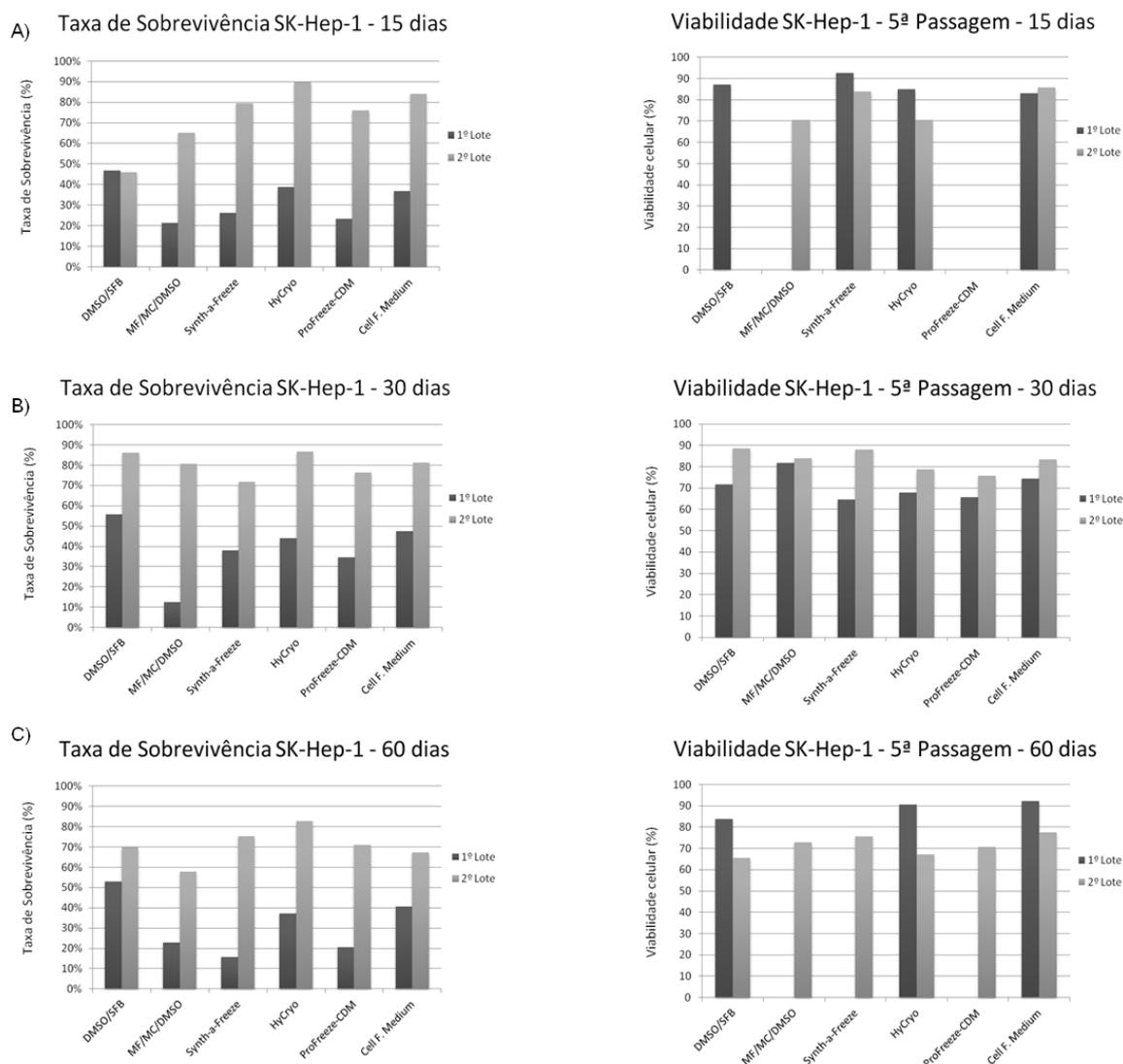


Figura 4.43- Taxa de sobrevivência e viabilidade da célula SK-Hep-1 em meio SFMII na quinta passagem após descongelamento: A) 15 dias; B) 30 dias; C) 60 dias em -194°C.

Com relação à viabilidade na quinta passagem pós descongelamento, podemos observar que os melhores resultados, para ambos os lotes e diferentes tempos, foram obtidos com os meios HyCryo (Hyclone) e Cell Freezing Medium-DMSO Serum free (Sigma).

De modo geral, as soluções de criopreservação HyCryo e Cell Freezing Medium-DMSO Serum free foram as que se demonstraram mais promissoras para criopreservar a célula SK-Hep-1 em meio SFMII livre de soro, com taxas de sobrevivência pós descongelamento e viabilidades na 5ª passagem na média de 63,2% e 59,6% e de 76,7% e 82,8%, respectivamente. Portanto, serão utilizadas

para posteriores estudos e para estabelecimento de um criobanco de células SK-Hep-1 adaptadas para suspensão e condições livres de SFB.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1 Adaptação aos meios livres de SFB em garrafas estáticas

A adaptação para os meios livres de soro foi realizada através da diminuição gradativa da concentração de SFB presente no meio. Esta redução gradual aumenta a chance de uma adaptação satisfatória para condições livres de soro (KIM *et al.*, 1999).

De uma forma geral, os resultados das adaptações aos meios livres de SFB nas três linhagens celulares testadas, HKB-11, SK-Hep-1 e HepG2 mostraram o aumento do tempo de duplicação (t_D) ao longo das passagens devido a progressiva retirada de soro. Os valores de t_D das passagens foram maiores que os respectivos valores de t_D dos controles de cada célula (meio DMEM suplementado com 10% SFB). A passagem com retirada completa de soro (100% meio livre de SFB) foi a mais crítica, com elevado tempo de duplicação e baixa viabilidade celular. A Tabela 5.1 apresenta os valores do t_D estimados antes e após a adaptação. Para a célula HKB-11, houve aumento no valor de t_D de 74, 79, 91 e 200% nos cultivos em meios FreeStyle, CDM4, CD 293 e SFMII, respectivamente, em comparação ao controle. Na célula SK-Hep-1, houve aumento de 199, 119, 4 e 18% no valor de t_D nos cultivo em CDM4, SFMII, FreeStyle e CD 293, respectivamente, em relação ao controle. A célula HepG2 apresentou crescimento apenas no meio CDM4 livre de SFB, com aumento de 229% no valor de t_D em comparação com o controle. Além disso, mesmo em DMEM suplementado com 10% de SFB, a célula HepG2 apresentou altos valores de t_D , além de crescimento na forma de grandes e compactos aglomerados. Estas características fazem com que a célula não seja interessante do ponto de vista de uma futura aplicação industrial. Em função disso, o trabalho foi continuado apenas com as linhagens HKB-11 e SK-Hep-1.

Tabela 5.1. Tempos de duplicação estimados antes e após a 1ª adaptação para os meios de cultura livres de SFB realizada em garrafas estáticas.

Meios de cultura	Tempo de Duplicação (h)		
	HKB-11	SK-Hep-1	HepG2
DMEM+10% SFB	34,8	44,2	88,1
FreeStyle	60,4	46,1	n.d.
CDM4	62,4	132,1	290,3
CD 293	66,3	52,3	n.d.
SFM II	104,5	96,7	n.d.

n.d. – valores não determinados devido a não adaptação da célula.

O soro fetal bovino é um suplemento rico em carboidratos, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, hormônios, fatores de crescimento, proteínas, dentre outros fatores que auxiliam a manutenção, sobrevivência e duplicação celular. Esse complexo e rico suplemento torna os meios de cultura universais, uma vez que o SFB é capaz de nutrir todas as necessidades das células. As suas principais funções no meio de cultura são: 1) prover fatores hormonais que estimulam o crescimento e a proliferação das células; 2) fornecer proteínas que carregam hormônios (transcortina), minerais e elementos traço (transferrina) e lipídeos (lipoproteínas); 3) prover fatores de adesão e espalhamento; 4) fornecer fatores de estabilização e detoxificação, necessários para manter o pH e inibir proteases de forma direta (α -antitripsina ou α 2-macroglobulina) ou indireta (agindo como um ligante inespecífico) (BRUNNER *et al.*, 2010). Sem este suplemento, as células dependem da formulação dos meios de cultura, que deverão conter os requisitos mínimos para a sobrevivência de cada linhagem e nem sempre somente o meio basal é capaz de suprir todas as necessidades da célula (VAN DER VALK *et al.*, 2010). Vale ressaltar que, além dos meios terem que fornecer os nutrientes para a célula, cada linhagem tem necessidades diferentes, de modo que seu metabolismo deve ser considerado. Por isso, os resultados não foram semelhantes para todas as células e o aumento no tempo de duplicação celular reflete a falta de alguns componentes no meio que antes eram supridos pelo soro fetal bovino.

Apesar de algumas linhagens celulares poderem ser mantidas em meios de cultura basais, a maioria das células necessita de suplementos adicionais para sobreviver ou proliferar de maneira satisfatória (HUTCHINGS e SATO *et al.*, 1977; GSTRAUNTHALER, 2003; BRUNNER *et al.*, 2010; VAN DER VALK *et al.*, 2010),

principalmente nas formulações livres de SFB. No caso das células HKB-11 e SK-Hep-1 adaptadas aos meios livres de soro, essa necessidade foi verificada pelo aumento significativo do tempo de duplicação celular em comparação aos valores obtidos nos cultivos em meio suplementado com SFB. Na tentativa de melhorar este crescimento, os meios de cultivo livres de SFB foram suplementados com 10% de Cell Boost 5 (Hyclone), 1% de Pluronic® F68 (Invitrogen) e 1% de ITS, Insulina-Transferrina-Selênio (Invitrogen). Cell Boost 5 é um suplemento quimicamente definido livre de componentes animais, que provê lipídeos, aminoácidos, vitaminas, elementos traço, colesterol e fatores de crescimento. A Insulina-Transferrina-Selênio promove captação de glucose e aminoácidos, lipogênese, transporte de íon ferro, reduz radicais de oxigênio e provê cofator para a glutathione peroxidase e outras proteínas, além de atuar como antioxidante. Pluronic® F-68 é um surfactante não iônico capaz de proteger as células das forças de cisalhamento em culturas em suspensão, evitando o estresse e morte celular. Essa suplementação foi formulada visando suprir os nutrientes presentes no SFB, descritos na literatura (PRICE e GREGORY, 1982; GSTRAUNTHALER, 2003; BRUNNER *et al.*, 2010).

O cultivo das células inicialmente adaptadas foi realizado nos meios suplementados por pelo menos 5 passagens, e as respectivas médias de t_D podem ser observadas na Tabela 5.2. A célula HKB-11 cultivada em FreeStyle apresentou tempo de duplicação 70% superior ao t_D no DMEM suplementado com 10% de SFB, ao passo que o cultivo em CDM4 mostrou t_D 61% superior ao controle. Já para a célula SK-Hep-1, o cultivo em CDM4 representou um tempo de duplicação 113% maior que o controle, enquanto que o cultivo em SFMII apresentou um t_D 556% superior em relação ao controle. Esses valores demonstram que, apesar da suplementação dos meios livres de soro, o tempo de duplicação não foi o mesmo com relação ao controle, uma vez que o SFB é um complexo e rico nutriente celular. Apesar disso, vemos que a célula HKB-11 foi a que apresentou valores de t_D mais próximos ao tempo de duplicação do controle, o que indica que esta célula se adaptou melhor aos meios livre de soro. O cultivo em CDM4 foi o mais promissor para ambas as células, com t_D de 56 h e 94,2 h para a célula HKB-11 e SK-Hep-1, respectivamente.

Nas sucessivas passagens em meio livre de SFB, foi observado que a célula HKB-11 não suportou a retirada de SFB nas formulações CD 293 e SFMII, enquanto que a célula SK-Hep-1 não se adaptou aos meios FreeStyle e CD 293, indicando

que provavelmente estes meios não contêm os requisitos nutricionais específicos exigidos para estas células.

Tabela 5.2. Tempos de duplicação estimados antes e após as passagens sucessivas nos meios de cultura livres de SFB suplementados realizadas em garrafas estáticas.

Meios de cultura	Tempo de Duplicação (h)	
	HKB-11	SK-Hep-1
DMEM+10% SFB	34,8	44,2
FreeStyle	59	n.d.
CDM4	56	94,2
CD 293	n.d.	n.d.
SFM II	n.d.	289,8

n.d. – valores não determinados devido a não adaptação da célula.

Apesar de estarem descritos na literatura diversos protocolos para adaptação de células a condições livres de SFB (SINACORE *et al.*, 2000; SCHRODER *et al.*, 2004, VAN DER VALK *et al.*, 2010), nem todas as linhagens celulares conseguem ser adaptadas utilizando os métodos convencionais, geralmente baseados na progressiva retirada de soro (JALURIA *et al.*, 2008). Mesmo as células adaptadas demandam tempo e esforços consideráveis para concluir o processo de adaptação (passagens livres de soro). Além disso, durante a adaptação podem ocorrer diversas alterações como redução de viabilidade, mudanças na morfologia, aberrações fisiológicas e mudanças no metabolismo (VAN DER VALK *et al.*, 2004).

No estudo de Jaluria e colaboradores (2008), os autores observaram essas alterações durante a adaptação das células HEK-293 para concentrações decrescentes de SFB. Em meio contendo 2% de SFB, as células haviam se tornado mais esféricas e compactas, além de desaderirem da superfície e se agregarem com outras células. Além disso, as células que foram cultivadas com baixas concentrações de SFB permaneceram por um período prolongado na fase lag, exibindo menor viabilidade e velocidade específica de crescimento. Na tentativa de melhorar os resultados da adaptação, os autores, após analisar diferenças na expressão gênica das células durante a adaptação, modificaram a célula HEK-293 com os genes *egr1* (*early growth response 1*) e *gas6* (*growth arrest specific 6*) e

verificaram que o aumento da expressão destes genes, aumenta de maneira moderada a habilidade da célula em se adaptar a condições livres de SFB.

Hernández e Fischer (2007) realizaram a adaptação de diversas linhagens celulares de mamíferos (mieloma do BALB/c, NS0, hibridoma, Vero, COS-1, COS-7, BHK e HEK-293) para meios de cultura livres de SFB e quimicamente definidos, através da redução gradativa da concentração de SFB, o mesmo procedimento utilizado no presente trabalho. De maneira geral, foi possível adaptar todas as linhagens celulares. No entanto, essas células apresentaram uma redução na taxa de crescimento celular após a adaptação. Por exemplo, o tempo de duplicação da célula COS-7 passou de 40 horas no meio contendo 10% SFB para aproximadamente 55 horas após 11 passagens. Já para a célula VERO foi observado um aumento de 2,5 vezes no valor de t_D após a adaptação.

Dentre as células humanas, a HEK-293 já foi adaptada e vem sendo amplamente cultivada em meios livres de SFB e em suspensão (ADAM *et al.*, 2008, BACKLIWAL *et al.*, 2008; ; LOIGNON *et al.*, 2008, SONG *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2006; SWIECH *et al.*, 2011). O mesmo não foi observado para as células utilizadas neste trabalho. Não foram encontrados trabalhos relatando a adaptação para tais condições para as células SK-Hep-1 e HepG2. Para a célula HKB-11, encontram-se descritos na literatura estudos mostrando o cultivo destas células já adaptadas para a produção de proteínas recombinantes (CHO *et al.*, 2002, MEI *et al.*, 2006, FISCHER *et al.*, 2012, TANG *et al.*, 2013), no entanto, não foram encontrados relatos das adaptações.

Vale ressaltar a importância da adaptação de células antes da modificação genética para produção de determinada proteína recombinante, como está sendo proposto neste trabalho. Belin e Rousselle (2006), adaptaram a célula HEK293-EBNA transformada com o fragmento rLG4/5 da laminina 5 ao meio livre de soro Pro293s-CDM (Cambrex). Apesar de obterem sucesso na adaptação em meio livre de soro, não houve a produção da proteína de interesse (fragmento rLG4/5).

Em relação à morfologia da HKB-11 e SK-Hep-1 durante a adaptação, observamos que em meio DMEM 10% SFB (controle), ambas as células crescem muito bem aderidas à garrafa estática, apresentando formato mais alongado do que as células adaptadas aos meios livres de SFB, sendo a SK-Hep-1 predominantemente maior e mais alongada quando comparada com a célula HKB-11. Em meios livres de soro (FreeStyle e CDM4 para HKB-11 e CDM4 e SFMII para

SK-Hep-1), as células apresentaram formato arredondado com crescimento em suspensão e agregados celulares de tamanho variado. A fusão que originou a célula HKB-11 inicialmente foi realizada para melhorar a tendência de formar grandes agregados pela 293S, um dos tipos celulares que deu origem à HKB-11 (CHO *et al.*, 2002). Este estudo cita que a maioria dos clones estão prontos para adaptação para suspensão em culturas livres de soro sem formar grandes agregados. No entanto, o autor revela que a HKB-11 formou pequenos agregados (de 10 a 20 células), que foram muito menores que os formados pela 293S (de 20 para mais de 100 células). Essa tendência de formar pequenos agregados ainda se manteve na linhagem HKB-11 cultivada em FreeStyle e CDM4. A formação de grumos é uma medida de autoproteção celular que ocorre naturalmente no processo de adaptação, conforme observado por diferentes autores (HU e AUNINS, 1997; HALDANKAR *et al.*, 1999).

É desejável o cultivo de células individualizadas, uma vez que os agregados celulares podem ser um problema e reduzir a viabilidade da cultura, devido a maior tensão de cisalhamento e pela dificuldade na transferência de massa para as células que estão no interior, limitando os nutrientes (SUN *et al.*, 2008).

5.2 Adaptação para crescimento em suspensão

A adaptação para crescimento em suspensão foi realizada apenas nas células que apresentaram resultados satisfatórios na etapa de adaptação aos meios livres de SFB em garrafas estáticas: célula HKB-11 adaptada aos meios FreeStyle e CDM4 e SK-Hep-1 adaptada aos meios SFMII e CDM4.

A adaptação da célula HKB-11 para crescimento em suspensão em meio FreeStyle realizada inicialmente em frascos *spinner* não foi satisfatória, uma vez que não houve crescimento celular e as células apresentaram diminuição da viabilidade ao longo das passagens (34 dias). Já para a adaptação em meio CDM4, as células HKB-11 apresentaram bons resultados de crescimento até a 13^a passagem (39 dias de cultivo). Passado este período, observou-se apenas o declínio do crescimento celular e da viabilidade. O mesmo comportamento foi observado para a célula SK-Hep-1, onde o cultivo em SFMII não obteve resultados satisfatórios em *spinner* e em CDM4 houve crescimento celular somente até a 7^a passagem, ou seja, a célula não se adaptou ao crescimento em suspensão em frascos *spinner* nos meios testados.

Em função deste comportamento, as células foram também cultivadas em frascos *erlenmeyer* sob agitação orbital e a comparação com o crescimento em frasco *spinner* foi realizada. Novamente foi observada ausência de crescimento celular em frasco *spinner* na maioria dos cultivos em ambas as células. Já as células cultivadas em suspensão sob agitação orbital apresentaram bons resultados para os meios testados, conforme pode ser observado na Tabela 5.3. Isto pode estar associado a uma elevada tensão de cisalhamento no frasco *spinner* em função da velocidade de rotação utilizada (80 rpm) ou a uma transferência de oxigênio ineficiente.

Muller e colaboradores (2005) demonstraram que células HEK-293 EBNA e CHO-DG44 adaptadas para cultivos em suspensão e meios livres de SFB, possuem crescimento superior quando cultivadas sob agitação orbital em comparação ao cultivo em frascos *spinner*.

Tabela 5.3. Comparação dos parâmetros cinéticos de crescimento, μ_{\max} , X_{\max} e t_D , das células HKB-11 e SK-Hep-1 cultivadas em suspensão em frascos *erlenmeyer* nos meios de cultura livres de SFB.

Meios de cultura	Células					
	HKB-11			SK-Hep-1		
	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (células/mL)	t_D (horas)	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (células/mL)	t_D (horas)
FreeStyle	0,0185	3,42x10 ⁶	37,5	n.d.	n.d.	n.d.
CDM4	0,0278	8,01x10 ⁶	24,9	0,0101	1,37 x10 ⁶	68,6
SFM II	n.d.	n.d.	n.d.	0,0225	2,13x10 ⁶	30,8

n.d. – valores não determinados devido a não adaptação da célula.

De maneira geral, podemos observar que para a célula HKB-11 cultivada em frascos *erlenmeyer*, os melhores resultados foram obtidos utilizando o meio CDM4 e para a célula SK-Hep-1, o meio SFMII. Os tempos de duplicação dos cultivos em suspensão diminuíram significativamente em relação aos t_D estimados durante as passagens sucessivas nos meios livres de SFB em garrafas estáticas (Tabela 5.2), apresentando em alguns casos t_D menores que os estimados nas condições controle

(suplementado com SFB). Isto se deve a maior adaptação da célula à nova condição de cultivo em função das sucessivas passagens em meio livre se soro.

Após a adaptação para crescimento em suspensão, as células foram criopreservadas (90% SFB, 10% DMSO) para verificar a estabilidade da adaptação. Não foi observado crescimento celular pós-descongelamento, tanto para a célula HKB-11 quanto para a SK-Hep-1 cultivada em meio CDM4. Em função disso, foi dado continuidade ao trabalho, com a caracterização cinética e metabólica das células adaptadas, apenas para a célula HKB-11 cultivada em FreeStyle e SK-Hep-1 em SFMII.

5.3 Caracterização cinética e metabólica das células adaptadas

Para uma melhor caracterização cinética das células adaptadas, foram realizados cultivos em triplicata em frascos *erlenmeyer*. Os principais parâmetros cinéticos de crescimento das células adaptadas para suspensão encontram-se resumidos na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Parâmetros cinéticos de crescimento, μ_{\max} , X_{\max} e t_D , das células HKB-11 e SK-Hep-1 adaptadas para cultivo em suspensão e meio de cultura livre de SFB.

Célula	Meio de Cultura	μ_{\max} (h^{-1})	t_D (horas)	X_{\max} (células/mL)	Tempo X_{\max} (dias)
HKB-11	FreeStyle	0,0159	43,6	$8,6 \times 10^6$	18
SK-Hep-1	SFMII	0,0186	37,3	$1,9 \times 10^6$	8

O perfil de crescimento da célula HKB-11 adaptada apresentado na Figura 4.38 e os parâmetros cinéticos indicam que esta célula possui um período de crescimento extenso e atinge altas concentrações celulares, característica interessante para uma eventual aplicação industrial. As células apresentaram um valor de X_{\max} de $8,6 \times 10^6$ células/mL (432 h) e μ_{\max} de $0,0159 h^{-1}$. Surpreendentemente, a concentração celular e a viabilidade começaram a decair significativamente apenas após 432 horas de cultivo.

Os valores de concentração celular alcançados no cultivo da célula HKB-11 são altos quando comparados aos valores comumente obtidos no cultivo de outras células humanas como a HEK-293 e a PER.C6 em condições livres de SFB.

Concentrações celulares máximas na faixa de $2\text{-}3 \times 10^6$ células/mL para a célula HEK293 (SUN *et al.*, 2006; LOIGNON *et al.*, 2008) e 3×10^6 células/mL para a célula PER.C6 (MARANGA *et al.*, 2005; BERDICHEVSKY *et al.*, 2008) tem sido reportadas para cultivos em batelada. Loignon e colaboradores (2008) realizaram o cultivo da célula HEK293-6E, HEK-293 que expressa constitutivamente a proteína EBNA1 do vírus Epstein Barr, para produção da proteína IFN α 2b. Essa célula foi adaptada para suspensão e para o meio livre de soro F17 (Invitrogen) suplementado com 0,5% de peptona. Durante 9 dias de cultivo em batelada alimentada, foi obtido X_{\max} de aproximadamente 3×10^6 células/mL (inóculo de $2,5 \times 10^5$ células/mL) no 7º dia, tempo de duplicação de 46,9 h e μ_{\max} de $0,0148 \text{ h}^{-1}$.

O crescimento da célula HKB-11 também é superior se comparado a célula de mamífero (célula murina) mais utilizada nos processos industriais, a CHO-K1. Usualmente esta linhagem adaptada para crescimento em suspensão e meio livre de SFB, consegue atingir concentrações de $1\text{-}2 \times 10^6$ células/mL em frascos *spinner*, com um tempo de duplicação de aproximadamente 24-30 horas (HALDANKAR *et al.*, 1999; SINACORE *et al.*, 2000).

A cinética de crescimento da célula SK-Hep-1, foi similar a comumente observada para as células animais em cultura. Houve crescimento exponencial até o terceiro dia, com uma velocidade específica de crescimento de $0,0186 \text{ h}^{-1}$. O cultivo atingiu concentração celular máxima de $1,93 \times 10^6$ células/mL em 192 horas de cultivo. Estes valores são semelhantes aos reportados no cultivo de células humanas em suspensão e meios livres de SFB, conforme citado anteriormente. A célula apresentou viabilidades superiores a 95% durante todo o cultivo.

Em função da aplicação recente das células HKB-11 e SK-Hep-1 para a produção de proteínas recombinantes, ainda não foram encontrados trabalhos na literatura reportando as características de crescimento destas células tanto em cultivos empregando SFB quanto em cultivos livres desta suplementação.

Além da velocidade específica de crescimento, viabilidade e concentração celular, o metabolismo é outro fator importante que deve ser observado durante o cultivo, uma vez que a disponibilidade de nutrientes interfere na regulação e crescimento celular (ALTAMIRANO *et al.*, 2008). Além disso, a caracterização do metabolismo e fisiologia celular permite uma melhor definição dos requerimentos necessários para o crescimento da célula, de modo que o meio de cultura e as

condições de cultivo possam ser desenvolvidos para suportar o processo de produção (MORETTI *et al.*, 2010).

Tanto para a célula HKB-11 quanto para a SK-Hep-1, em função do crescimento celular, a concentração de glicose no meio começou a diminuir, decorrente do consumo de fonte de carbono para produção de energia pela célula. Houve exaustão de glicose (12^o dia de cultivo) apenas no cultivo da célula HKB-11, decorrente do alto crescimento apresentado. Apesar disso, esta exaustão não parece estar associada à limitação do crescimento celular.

Outro efeito do metabolismo que reflete o crescimento celular e deve ser acompanhado é a concentração de glutamina. A glutamina é um aminoácido não essencial que é degradado para a formação de glutamato e amônia. Com o decorrer do metabolismo, a concentração de glutamina decai, uma vez que este aminoácido é utilizado nas reações do ciclo do ácido tricarboxílico, transformando-se em glutamato pela perda de amônia do seu esqueleto carbônico. Em sua forma desaminada, o glutamato pode estar envolvido no ciclo do ácido tricarboxílico, na gliconeogênese, síntese proteica, entre outros. Amônia será utilizada para a formação de purinas, pirimidinas e aminoaçúcares (ALTAMIRANO *et al.*, 2008; ALTAMIRANO *et al.*, 2013).

Foi observado nos primeiros dias de cultivo em ambas as células, o aumento da concentração de glutamina, indicando uma possível produção deste aminoácido pela célula. Isto não ocorre pois a glutamina é consumida e utilizada em diversas rotas do metabolismo celular, inclusive como fonte de energia, apesar do consumo preferencial ser fontes de carbono (glicose).

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram suplementados com GlutaMAX™ (Invitrogen), o que explica o comportamento atípico do aumento da concentração de glutamina. O GlutaMAX™ é um dipeptídeo formado por L-alanina-L-glutamina, complexo que promove maior estabilidade em meio aquoso e não se degrada espontaneamente, como ocorre com a L-glutamina. É degradado lentamente por aminopeptidases que são liberadas pela célula, formando os aminoácidos L-alanina e L-glutamina no meio de cultura. Essa situação se assemelha a uma operação em batelada alimentada, uma vez que a glutamina é continuamente liberada para o meio de cultura, mas é mantida a baixas concentrações (LIFETECHNOLOGIES, 2014). Por esta razão, podemos observar o crescimento da concentração de glutamina no meio, não por estar sendo sintetizada

pela célula, mas sim pela clivagem de GlutaMAX™ no meio. Novamente foi observada exaustão da glutamina apenas para a célula HKB-11, sendo que esta exaustão aconteceu no final do cultivo.

Um dos maiores problemas da cultura *in vitro* é a formação de lactato e amônia decorrente do metabolismo celular. Quando excedem determinada concentração, possuem efeitos tóxicos e inibitórios para as células. O lactato formado pela degradação de glicose e conversão de piruvato pela enzima lactato desidrogenase, pode reduzir o pH do meio ou aumentar a osmolaridade deste. De modo geral, concentrações menores que 20 mM (1,78 g/L) não afetam a célula, ao passo que de 20-40 mM (1,78 - 3,56 g/L) atrapalham a produtividade e acima deste valor, inibem o crescimento celular. Já a amônia tem um efeito mais potente que o lactato, uma vez que a concentração inibitória deste subproduto é em torno de 2 a 5 mM (34,06 – 85,15 mg/L). Apesar do seu mecanismo não estar completamente esclarecido, a elevação de sua concentração diminui a concentração de UTP e com isso inibe o crescimento. Aparentemente compete também com cátions (K^+) pelo transporte para o interior celular através dos transportadores Na^+/K^+ -ATPase e Na^+K^+2Cl -cotransportadora. O subproduto amônia pode afetar a glicosilação de proteínas, uma vez que interfere na ramificação da cadeia de glicanas e diminui a concentração de ácido (ALTAMIRANO *et al.*, 2008; ALTAMIRANO *et al.*, 2013).

Foi observada produção do metabólito secundário lactato apenas nos 3 primeiros dias de cultivo para ambas as células. Passado este período, a concentração permaneceu constante na faixa de 1,2-1,3 g/L para a célula HKB-11 e 1,4 g/L para a célula SK-Hep-1, valores considerados não inibitórios. Para a célula HKB-11, a partir da exaustão da glicose (290 h) houve também o consumo de lactato. Como a fonte de carbono principal havia se exaurido, a interconversão de lactato para piruvato foi realizada, de forma a fornecer uma fonte de energia para a célula. O piruvato pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico, transformando-se em energia.

No cultivo da célula HKB-11, concentrações de amônia consideradas inibitórias para células de mamíferos, a partir de 34,06 mg/L (2 mM), foram observadas após 200 horas de cultivo, sendo que os valores aumentaram até atingir 71,20 mg/L (4,18 mM) no final do cultivo. Apesar disso, a célula apresentou crescimento celular até 432 horas de cultivo. Para a SK-Hep-1, a concentração máxima de amônia, 35,56 mg/L (2,09 mM) coincidiu com o início do declínio celular

em 192 h. Além disso, o crescimento celular pode ser inibido quando a concentração de amônia atingiu cerca de 30mM (1,8 mM), uma vez que a célula entrou na fase estacionária em 96 horas.

5.4 Estabelecimento de um banco de células adaptadas criopreservadas em condições livres de SFB

De modo geral, podemos notar que não houve um padrão de melhor meio de congelamento para a HKB-11, uma vez que dependendo do dia de descongelamento ou da duplicata, um meio apresentou melhor resultado que outro. Porém, os meios Synth-a-Freeze e HyCryo foram os que apresentaram melhores resultados para o descongelamento e viabilidade na quinta passagem: 83,7% e 82,7% para Synth-a-Freeze, 84,4% e 82,9% para HyCryo, na média, respectivamente. A condição de criopreservação 45% M.F / 45% M.C. / 10% DMSO também apresentou bons resultados com taxa de sobrevivência de 81,2% e 80,2% de viabilidade na quinta passagem. Por isso, estes três meios podem ser utilizados para o estabelecimento de banco de células HKB-11 criopreservadas em condições livres de SFB.

Em relação a célula SK-Hep-1, os meios Hycryo e Cell Freezing Medium-DMSO Serum free foram os que demonstraram ser mais promissores para criopreservar a célula em meio SFMII livre de soro, com taxas de sobrevivência pós descongelamento e viabilidades na 5ª passagem na média de 63,2% e 59,6% e de 76,7% e 82,8%, respectivamente. Portanto, podem ser utilizados para o estabelecimento de banco de células SK-Hep-1 criopreservadas em condições livres de SFB.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Foi possível adaptar duas das três linhagens celulares humanas inicialmente propostas para meios livres de soro fetal bovino e para crescimento em suspensão. A célula HKB-11 foi adaptada para o meio FreeStyle e a célula SK-Hep-1 para o meio SFMII. Essa adaptação se mostrou estável durante várias passagens em cultura e após diversos ciclos de congelamento e descongelamento. Não foi possível adaptar a célula Hep-G2 para tais condições.

A caracterização cinética das células adaptadas mostrou que a célula HKB-11 apresentou densidade celular quatro vezes superior ao da célula SK-Hep-1 ($8,6 \times 10^6$ e $1,9 \times 10^6$ células/mL, respectivamente) e superior inclusive ao dados da literatura. Além disso, a célula HKB-11 apresentou crescimento durante 18 dias em cultura, característica interessante para uma futura aplicação industrial. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}) foi semelhante nas duas células ($0,0159 \text{ h}^{-1}$ para a HKB-11 e $0,0186 \text{ h}^{-1}$ para SK-Hep-1).

A limitação do crescimento celular não parece estar associada à exaustão de glicose e glutamina, tampouco a formação de lactato em concentrações inibitórias. Todavia, para ambos os cultivos, foi observada produção de amônia em concentrações consideradas inibitórias (2 - 5mM).

Além da adaptação, também foi possível criopreservar as células, de maneira satisfatória, em meios livres de soro fetal bovino, condição importante para o desenvolvimento de um bioprocesso reprodutível, seguro e em concordância com as boas práticas de fabricação.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, E.; SARRAZIN, S.; LANDOLFI, C.; MOTTE, V.; LORTAT-JACOB, H.; LASSALLE, P.; DELEHEDDE, M. Efficient long-term and high-yielded production of a recombinant proteoglycan in eukaryotic HEK293 cells using a membrane-based bioreactor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 369, p. 297-302, 2008.

ALTAMIRANO, C.; GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas *In Vitro*. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 4, p. 81-104.

ALTAMIRANO, C.; BERRIOS, J.; VERGARA, M.; BECERRA, S. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16 n. 3, p. 1-14, 2013.

BACKLIWAL, G.; HILDINGER, M.; HASIJA, V.; WURM, F. M. High-Density Transfection With HEK-293 Cells Allows Doubling of Transient Titers and Removes Need for A Priori DNA Complex Formation With PEI. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 721-727, 2008.

BAI, J.; CEDERBAUM, A. I. Cycloheximide Protects HepG2 Cells from Serum Withdrawal-Induced Apoptosis by Decreasing p53 and Phosphorylated p53 Levels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 3, 2006.

BARLOW, G. H.; FIRESTONE, S. L.; ROBBINS K. C. Identification of the plasminogen activator (S) produced by the transformed liver cell line, SK-HEP-1. **Thrombosis Research**, v. 32; p. 29-34, 1983.

BELIN, V.; ROUSSELLE, P. Production of a recombinantly expressed laminin fragment by HEK293-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis-based bioreactor. **Protein Expression and Purification**, v. 48, p. 43–48, 2006.

BERDICHEVSKY, M.; GENTILE, M.; HUGHES, B.; MEIS, P.; PELTIER, J.; BLUMENTALS, I.; AUNINÜS, J.; ALTARAS, N. E. Establishment of Higher Passage PER.C6 Cells for Adenovirus Manufacture. **Biotechnol. Prog.**, v. 24, p. 158–165, 2008.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 40, p. 257–274, 2013.

BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Serum-free Cell Culture: The Serum –free Media Interactive Online Database. **Altex**, v. 27, n.1, p.53-62, 2010.

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

CAMPOS-DA-PAZ, M.; COSTA, C.S.;QUILICI, L. S.; SIMÕES, I. C.; KYAW, C. M.; MARANHÃO, A. Q.; BRIGIDO, M. M. Production of recombinant Human Factor VIII in different cell lines and the effect of human XBP1 co-expression. **Molecular Biotechnology**, v.39, p. 155-158, 2008.

CHICO, E; RODRÍGUEZ, G; FIGUEREDO, A. Biorreatores para células animais. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1ª Edição. São Paulo: **Roca**, 2008. Cap. 9, p. 216-254.

CHO, M. S.; YEE, H.; BROWN, C.; JEANG., K.; CHAN, S. An oriP expression vector containing the HIV-1 Tat/TAR transactivation axis produces high levels of protein expression in mammalian cells. **Cytotechnology**, v. 37, p. 23–30, 2001.

CHO, M. S.; YEE, H.; CHAN, S. Establishment of a Human Somatic Hybrid Cell Line for Recombinant Protein Production. **J Biomed Sci**; v. 9, p. 631-638, 2002.

CHU, L.; ROBINSON D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 180-187, 2001.

COCO-MARTIN, J. M.; HARMSSEN. M. M. A Review of Therapeutic Protein Expression By Mammalian Cells. **BioProcess International**, cap. 4, p. 28-33, 2008.

DIETMAIR, S. NIELSEN, L. K.; TIMMINS, N. E. Engineering a mammalian super producer. **J Chem Technol Biotechnol.**, v. 86, p. 905–914, 2011.

DRAGANOV, M.; MURDJEVA, M. A. ; KAMBEROV, E. Development of a new serum-free cell culture system, McCoy–Plovdiv. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 36: p. 284–286, 2000.

DUMONT, J. A.; LIU, T.; LOW, S. C; *et al.* Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. **Blood**, v. 119, n. 13, p. 3024-3030, 2012.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20; p. 700–707, 2009.

ELI LILLY, 2011. Disponível em:

<<http://newsroom.lilly.com/releasedetail.cfm?releaseid=617602>>. Acesso em: 04 nov. 2013.

ESSERS, R.; KEWES, H.; SCHIEDNER, G. Improving volumetric productivity of a stable human CAP cell line by bioprocess optimization. **BMC Proceedings**, v. 5(Suplem. 8), p. 1-3, 2011.

FALLAUX, F. J .; BOUT, A.; VAN DER VELDE, I.; *et al.* New Helper Cells and Matched Early Region 1-Deleted Adenovirus Vectors Prevent Generation of Replication-Competent Adenoviruses. **HUMAN GENE THERAPY**, v. 9, p. 1909-1917, 1998.

FISCHER, S.; CHARARA, N.; GERBER, A.; WÖLFEL, J.; SCHIEDNER, G.; VOEDISCH, B.; GEISSE, S. Transient Recombinant Protein Expression in a Human Amniocyte Cell Line: The CAP-T[®] Cell System. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 2250-2261, 2012.

FOGH, J.; TREMPER, G. Human tumor cells in vitro. New York: **Plenum Press**; 1975.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. **Wiley-Liss**, New York, 2005.

GENZEL, Y.; BEHRENDT, I.; RÖDIG, J.; *et al.* CAP, a new human suspension cell line for influenza virus production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 111–122, 2013.

GENWAYBIOTECH. **Protein Expression**. Genwaybio. Disponível em: <http://legacy.genwaybio.com/gw_file.php?fid=6033>. Acesso em: 23 Fev. 2014

GHADERI, D.; ZHANG, M.; HURTADO-ZIOLA, N.; VARKI, A. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human

sialylation, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 28, p. 147-176, 2012.

GIRARD, P.; DEROUAZI, M.; BAUMGARTNER, G.; BOURGEOIS, M.; JORDAN, M.; JACKO, B.; WURM, F. M. 100-liter transient transfection. **Cytotechnology**, v. 38, p. 15–21, 2002.

GLASGOW, J. E.; COLMAN, R. W. Fibronectin Synthesized by a Human Hepatoma Cell Line. **Cancer Research**, v. 44, p. 3022-3028, 1984.

GRAHAM, F. L.; SMILEY J.; RUSSELL, W.; NAIRN, C. R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J. Gen. Virol**, v. 36, p. 59-67, 1977.

GRILLBERGER, L.; KREIL, T. R.; NASR, S.; REITER, M. Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. **Biotechnology Journal**, v.4, p.186-201, 2009.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture. **ALTEX**, v. 20, n. 4, p. 275-281, 2003.

HALDANKAR, R.; KOPCHICK, J. J.; RIDGWAY, D. Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 336-346 , 1999.

HENRY, O.; JOLICOEUR, M.; KAMEN A. Unraveling the metabolism of HEK-293 cells using lactate isotopomer analysis. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 34, p. 263–273, 2011.

HERLITSCHKA, S. E.; SCHLOKAT, U.; FALKNER, F. G., DORNE, F. High expression of a B-domain deleted factor VIII gene in a human hepatic cell line. **Journal of Biotechnology**, v.61, p. 165-173, 1998.

HERNÁNDEZ, Y. G.; FISCHER, R. W. Serum-free Culturing of Mammalian Cells – Adaptation to and Cryopreservation in Fully Defined Media. **ALTEX**, v. 24, n. 2, 2007.

HERNANDEZ, J. C.; PIERA, C. M. Ares Trading S.A. **Serum-free cell culture medium for mammalian cells**. US 7,709,229 B2, 04 Mai. 2010.

HU, W. S.; AUNINS, J. G. Large-scale mammalian cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 148-153, 1997.

HUTCHINGS, S. E.; SATO, G. H. Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 2, p. 901-904, 1978.

JALURIA, P.; KONSTANTOPOULOS, K.; BETENBAUGH, M.; SHILOACH, J. *Egr1* and *Gas6* Facilitate the Adaptation of HEK-293 Cells to Serum-Free Media by Conferring Enhanced Viability and Higher Growth Rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 1443-1452, 2008.

JONES, D.; KROOS, N.; ANEMA, R.; et al. High-Level Expression of Recombinant IgG in the Human Cell Line PER.C6. **Biotechnol. Prog.**, n. 19, p. 163-168, 2003.

KANG, S.; SONG, J.; KANG, H.; et al. Insulin can block apoptosis by decreasing oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase- and extracellular signal-regulated protein kinase-dependent signaling pathways in HepG2 cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 148, p. 147-155, 2003.

KIM, E. J.; KIM, N. S.; LEE, G. M. Development of a serum-free medium for dihydrofolate reductase-deficient Chinese hamster ovary cells (DG44) using a statistical design: beneficial effect of weaning of cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, v. 35, p. 178-182, 1999.

KIM, K.; KIM, M. S.; MOON, J. H.; et al. Enhancement of Recombinant Antibody Production in HEK 293E Cells by WPRE. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 633-638, 2009.

KRUIF, J.; KRAMER, A.; NIJHUIS, R.; ZANDE, V.; BLANKEN, R.; CLEMENTS, C.; VISSER, T.; KEEHNEN, R.; HARTOG, M.; THROSBY, M.; LOGTENBERG, T. Generation of Stable Cell Clones Expressing Mixtures of Human Antibodies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, p. 741-750, 2010.

LANGER, E. On the Horizon: New Expression Systems to Become Common Industry Platforms. The economics and increased simplicity of new platforms make them better alternatives to the currently dominant *E. coli*, yeast, and CHO systems. **BioPharm International**, n. 1, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.biopharminternational.com/biopharm/Business/On-the-Horizon-New-Expression-Systems-to-Become-Co/ArticleStandard/Article/detail/601408>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

LEE, Y. Y.; YAP, M. G. S.; HU, W.; WONG, K. T. K. Low-Glutamine Fed-Batch Cultures of 293-HEK Serum-Free Suspension Cells for Adenovirus Production, **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 501–509, 2003.

LIFETECHNOLOGIES. **GlutaMAX™ vs. Glutamine.** Disponível em: <<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/media-supplements/glutamax-media/glutamax-vs-glutamine.html>>. Acesso em: 02 Fev. 2014.

LIU, X. M.; LIU, H.; WU, B. C.; *et al.* Suspended aggregates as an immobilization mode for high-density perfusion culture of HEK 293 cells in a stirred tank bioreactor. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 72, p. 1144–1151, 2006.

LOIGNON, M.; PERRET, S.; KELLY, J.; BOULAIS, D.; CASS, B.; BISSON, L.; AFKHAMIZARREH, F.; DUROCHER, Y. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 1-16, 2008.

MARANGA, L.; AUNINS, J. G.; ZHOU, W. Characterization of Changes in PER.C6™ Cellular Metabolism During Growth and Propagation of a Replication-Deficient Adenovirus Vector. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 5, 2005.

MEI, B.; CHEN, Y.; CHEN, J.; PAN, C. Q.; MURPHY, J. E. Expression of human coagulation factor VIII in a Human Hybrid Cell line, HKB-11. **Molecular Biotechnology**, v.34, p.165-178, 2006.

MEI, B.; PAN, C.; JIANG, H.; TJANDRA, H.; *et al.* Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment. **BLOOD**, v. 116, n. 2, 2010.

MELLADO, M. C. M.; CASTILHO, L. R. Proteínas recombinantes terapêuticas. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica.** 1ª Edição. São Paulo: **Roca**, 2008. Cap. 16, p. 384-402.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de cultura para células animais. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica.** 1ª Edição. São Paulo: **Roca**, 2008. Cap. 5, p. 105-121.

MORAN, N. Shire's replacement enzymes validate gene activation. **Nat. Biotechnol.**, v. 28, p. 1139–1140, 2010.

MORETTI, P.; BEHR, L.; WALTER, J. G.; *et al.* Characterization and improvement of cell line performance *via* flow cytometry and cell sorting. **Eng. Life Sci.**, v. 10, n. 2, p. 130–138, 2010.

MULLER, N.; GIRARD, P.; HACKER, D. L.; JORDAN, M.; WURM, F. M. Orbital Shaker Technology for the Cultivation of Mammalian Cells in Suspension. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 4, 2005.

PADLER-KARAVANI, V.; Yu, H.; Cao, H.; *et al.* Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: Potential implications for disease. **Glycobiology**, v. 18, n. 10 p. 818–830, 2008.

PADLER-KARAVANI, V.; VARKI, A. Potential Impact of the Non-Human Sialic Acid *N*-Glycolylneuraminic Acid on Transplant Rejection Risk. **Xenotransplantation**, v. 18, n. 1, p. 1–5, 2011.

PAU, M. G.; OPHORST, C.; KOLDIJK, M. H.; SCHOUTEN, G.; MEHTALI, M.; UYTDEHAAG; F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 2716–2721, 2001.

PAZOS, P.; BOVERI, M.; GENNARI, A.; CASADO, J.; FERNANDEZ, F.; PRIETO, P. Culturing Cells Without Serum: Lessons Learnt Using Molecules of Plant Origin. **ALTEX**, v. 21, p. 67-72, 2004.

PETIOT, E.; JACOB, D.; LANTHIER, S.; LOHR, V.; ANSORGE, S.; KAMEN, A. A. Metabolic and Kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK293 cell culture. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 84, p. 1-12, 2011.

PICANÇO-CASTRO, V.; HEINZ, S.; BOTT, D.; BEHRMANN, M.; COVAS, D.T.; SEIFRIED, E.; TONN, T. Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. **Cytotherapy**, v. 9, n. 8, p.785-794 , 2007.

PICANÇO-CASTRO, V.; BIAGGIO, R. T.; COVAS, D. T.; SWIECH, K. Production of Recombinant Therapeutic Proteins in Human Cells: Current Achievements and Future Perspectives. **Protein & Peptide Letters**, v. 20, p. 1373-1381, 2013.

PRICE, P. J.; GREGORY, E. A. Relationship between *in vitro* growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. **IN VITRO**, v. 18, n. 6, 1982.

RADER, R. A. FDA Biopharmaceutical Product Approvals and Trends in 2012. **BioProcess International**, v. 11, n. 3, p. 18-27, 2013a.

RADER, R. A. An Analysis of the US Biosimilars Development Pipeline and Likely Market Evolution. **BioProcess International**, v. 11, n. 6, p. 16-23, 2013b.

ROSS, D.; BROWN, T.; HARPER, R.; PAMARTHI, M.; NIXON, J.; BROMIRSKI, J.; LI, C. M.; GHALI, R.; XIE, H.; MEDVEDEFF, G.; LI, H.; SCUDERI, P.; ARORA, V.; HUNT, J.; BARNETT, T. Production and characterization of a novel human recombinant alpha-1-antitrypsin in PER.C6 cells. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 262-273, 2012.

SANDERS, B. P.; EDO-MATAS, D.; CUSTERS, J. H. H. V.; KOLDIJK, M. H.; KLAREN, V.; TURK, M.; LUITJENS, A.; BAKKER, W. A. M.; UYTDEHAAG, F.; GOUDSMIT, J.; LEWIS, J. A.; SCHUITEMAKER, H. PER.C6[®] cells as a serum-free suspension cell platform for the production of high titer poliovirus: A potential low cost of goods option for world supply of inactivated poliovirus vaccine. **Vaccine**, v. 31, p. 850- 856, 2013.

SCHAMBERGER, C J.; GERNER, C.; CERNI, C. Caspase-9 plays a marginal role in serum starvation-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 302, p. 115 – 128, 2005.

SCHIEDNER, G.; HERTEL, S.; KOCHANEK, S. Efficient Transformation of Primary Human Amniocytes by E1 Functions of Ad5: Generation of New Cell Lines for Adenoviral Vector Production. **Human Gene Therapy**, v. 11, p. 2105– 2116, 2000.

SCHIEDNER, G.; HERTEL, S.; BIALEK, C.; KEWES, H.; WASCHÜTZ G.; VOLPERS, C. Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for antibiotic selection. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 1-11, 2008.

SCHRÖDER, M.; MATISCHAK, K.; FRIEDL, P. Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. **Journal of Biotechnology**, v. 108, p. 279–292, 2004.

SCHRÖDER, M. Engineering eukaryotic protein factories. **Biotechnol. Lett.**, v. 30, p. 187–196, 2008.

SEO, J. S.; KIM, Y. J.; CHO, J. M.; BAEK, E.; LEE, G. M. Effect of culture pH on recombinant antibody production by a new human cell line, F2N78, grown in suspension at 33.0 °C and 37.0 °C. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 5283–5291, 2013.

SINACORE, M. S.; DRAPEAU, D.; ADAMSON, S. R. Adaptation of Mammalian Cells to Growth in Serum-Free Media. **Molecular Biotechnology**, v. 15, p. 249-257, 2000.

SONG, M.; RAPHAELLI, K.; JONES, M. L.; *et al.* Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening. **J Chem Technol Biotechnol.**, v. 1, n. 86, p. 935–994, 2011.

SUN, X.; GOH, P. E.; WONG, K. T. K.; MORI, T.; YAP, M. G. S. Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, p. 843–848, 2006.

SUN, X.; HIA, H. C.; GOH, P. E.; YAP, M. G. S. High-Density Transient Gene Expression in Suspension-Adapted 293 EBNA1 Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 1, 2008.

SUNLEY, K.; BUTLER, M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. **Biotechnology Advances.**, v. 28, p. 385–394, 2010.

SWIECH, K.; KAMEN, A.; ANSORGE, S.; DUROCHER, Y.; PICANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; ABREU NETO, M. S.; COVAS, D. T. Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII. **BMC Biotechnology**, v. 11, n.114, p. 1-10, 2011.

SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expression and Purification**, v. 84, p. 147–153, 2012.

TANG, L.; LEONG, L.; SIM, D.; *et al.* von Willebrand factor contributes to longer half-life of PEGylated factor VIII *in vivo*. **Haemophilia**, v. 19, p. 539–545, 2013.

TCHOUDAKOVA, A.; HENSEL, F.; MURILLO, A.; ENG, B.; FOLEY, M.; SMITH, L.; SCHOENEN, F.; HILDEBRAND, A.; KELTER, A.-R.; ILAG, L. L.; VOLLMERS, H. P.; BRANDLEIN, S.; MCININCH, J.; CHON, J.; LEE, G.; CACCIUTTOLO, M. High level expression of functional human IgMs in human PER.C6[®] cells. **mAbs**, v. 1, 163-171, 2009

KNOWLES, B. B.; ADEN, D. P. The Wistar Institute of Anatomy and Biology. **Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses thereof.** US 4,393,133, 12 Jul. 1983.

TURNER, B. M.; TURNER, V. S. Secretion of alpha-antitrypsin by an established human hepatoma cell line and by human/mouse hybrids. **Somatic Cell Genetics**, v. 6, p. 1-14; 1980.

VALDÉS, R. ; IBARRA, N.; GONZÁLEZ, M.; *et al.* CB.Hep-1 hybridoma growth and antibody production using protein-free medium in a hollow fiber bioreactor, **Cytotechnology**, v. 35, p. 145–154, 2001.

VAN DER VALK, J.; MELLOR, D.; BRANDS, R.; *et al.*The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 1–12, 2004.

VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; *et al.* Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. **Toxicology in Vitro**, n.24, p. 1053-1063, 2010.

VISIONGAIN. Biosimilars and Follow-On Biologics: Global Market Outlook 2010-2022, p. 213, 2012.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1158–1170, 2012.

WAJIH, N.; OWEN, J.; WALLIN, R. Enhanced Functional Recombinant Factor VII Production by HEK 293 Cells Stably Transfected with VKORC1 where the Gamma-Carboxylase Inhibitor Calumenin is Stably Suppressed by shRNA Transfection. **Thromb Res.**, v. 122, p. 405-410, 2008.

WALSH, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p.135–138, 2002.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 917-924, 2010a

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17/18, 2010b.

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

YALLOP, C.; CROWLEY, J.; COTE, J.; HEGMANS-BROUWER, K.; LAGERWERF, F.; GAGNE, R.; MARTIN, J.C.; OOSTERHUIS, N.; OPSTELTEN, D.J.; BOUT, A. PER.C6[®] Cells for the Manufacture of Biopharmaceutical Proteins, in: J. Knablein (Ed.), *Modern Biopharmaceuticals: Design, Development and Optimization*, **Wiley-VCH**, Weinheim, p. 779–807, 2008.

