



**UnB**

**Instituto de Química**

**Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESCALONAMENTO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA rhPDGF-BB EM  
CÉLULAS HEK293T: ADAPTAÇÃO E CRESCIMENTO CELULAR**

**ROSANA SANTOS CAVALCANTE**

**Orientador (a): Dr<sup>a</sup>. TALITA SOUZA CARMO**

**Brasília, Maio 2019**

**ROSANA SANTOS CAVALCANTE**

**ESCALONAMENTO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA rhPDGF-BB EM  
CÉLULAS HEK293T: ADAPTAÇÃO E CRESCIMENTO CELULAR**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de Brasília como  
requisito para obtenção do título de Mestra  
em Tecnologias Química e Biológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Talita Souza Carmo

Brasília DF  
2019

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Rosana Santos Cavalcante**, matrícula nº **17/0097561**, intitulada ***“Escalonamento de produção da proteína rhPDGF-BB em células HEK293T: adaptação e crescimento celular”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 30 de maio de 2019.

Prof.<sup>a</sup> Dra. Talita Souza Carmo  
Presidente de Banca

Prof.<sup>a</sup> Dra. Grace Ferreira Ghesti  
Membro Titular

Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliane Ferreira Noronha  
Membro Titular IB/UnB

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva  
Membro Suplente

Em 30 de maio de 2019.

Dedico esse trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, **Ernesto e Helena**, ao meu irmão, **Samuel** e a meu namorado, **Idio Filho**, pelo carinho, confiança e sempre estarem ao meu lado.

## **AGRADECIMENTOS**

*À minha família, meus pais e meu irmão pelo apoio, carinho, amor incondicional, por confiarem e acreditarem em mim nos momentos mais difíceis, essa vitória também é de vocês. Ao meu namorado, Idio Filho, por todo o apoio e carinho em todos os momentos difíceis e pela ajuda prestada sempre que precisei... e sem dúvidas por acreditar que eu chegaria até aqui quando nem eu mesma acreditei! Por estar ao meu lado sempre, desde o início da idealização do mestrado, você foi minha fonte de inspiração para tornar esse sonho real.*

*À minha orientadora Talita, pela oportunidade, pelo conhecimentos e discussões, pelos puxões de orelha, que me contribuíram para crescimento profissional e pessoal.*

*À minha colega de laboratório, Caterina, que juntas desenvolvemos esse projeto que com certeza tem potencial para crescer ainda mais e meu colega Milton pelas dicas e auxílios durante a elaboração deste trabalho.*

*Ao grupo de pesquisa Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) incorporado à Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo (USP) que contribuiu com o desenvolvimento desse projeto nos cedendo as células utilizadas nesta pesquisa.*

*À UnB, ao Instituto de Biologia e ao PPGTQB, pelo espaço e pela grandiosa experiência adquirida.*

*E a todos os meus amigos que me apoiaram, auxiliaram e torceram por mim, contribuindo direta e indiretamente no meu desenvolvimento pessoal e profissional.*

*“O rio atinge seus obstáculos porque aprendeu a contornar problemas”*

*Lao-Tsé*

*“Além do conteúdo do agora, além das coisas que passam, além do próprio fluxo, dirija sua atenção para o próprio amor, para o ser, para a essência. Assim você se torna, se descobre sendo o próprio amor, o próprio ser, a própria essência.”*

*Agnimitra*

## RESUMO

O PDGF-BB é a forma homodimérica do fator derivado de plaquetas, é uma proteína responsável pela cascata de coagulação sanguínea, com alto poder mitogênico e angiogênico. Esta proteína pode ser utilizada em terapias de crescimento capilar e reparo de tecidos, devido sua capacidade de atrair, recrutar e proliferar diferentes tipos celulares necessários para o processo de remodelação da matriz proteica. Dentre as possíveis aplicações está o tratamento de neuropatia diabética, uma complicação do diabetes, que consiste na formação de feridas ou úlceras nas regiões periféricas – pés - do paciente e que podem gerar amputações não traumáticas. O tratamento com os fármacos disponíveis no mercado contendo PDGF-BB possuem altos custos, que impossibilita sua disponibilidade aos pacientes e até mesmo sua redistribuição pelo SUS. Neste trabalho, o intuito foi avaliar e acompanhar o crescimento celular de HEK293T superprodutoras de rhPDGF-BB adaptando-as ao crescimento em suspensão aderido à superfícies em microcarreadores em dois aumentos de escala: sistema *FibraStage* e frasco tipo *spinner* de 100mL visando o escalonamento da produção da proteína. A avaliação do perfil metabólico dos meios condicionados foi realizado por colorimetria e HPLC. Obteve-se um perfil não linear durante as horas de cultivo em ambos aumentos de escala. Os resultados mostraram que o perfil metabólico das células no *FibraStage* variou conforme a concentração de glicose no meio e regulou a produção de lactato e glutamina durante a batelada. Para o ensaio em *spinner* após 5 dias de adaptação celular ao sistema e fase *lag* de 10 dias, as células atingiram a fase exponencial. Os testes realizados com os microcarreadores mostraram que a medida que as horas de cultivo aumentaram, a integridade física dos carreadores foi comprometida, porém não impediu a proliferação das células em sua superfície. Assim, os resultados mostraram-se promissores para a utilização em um novo aumento de escala e volume de trabalho compatível com biorreator tipo *Wave*.

**PALAVRAS-CHAVE:** PDGF-BB; Reparo de tecidos; HEK 293T; Aumento de escala;

## ABSTRACT

PDGF-BB is the homodimeric form of the factor derived from platelets, it is a protein responsible for the cascade of blood coagulation, with high mitogenic and angiogenic power. This protein can be used in capillary growth and tissue repair therapies because of its ability to attract, recruit and proliferate different cell types necessary for the process of remodeling the protein matrix. Among the possible applications is the treatment of diabetic neuropathy, a complication of diabetes, which consists of the formation of wounds or ulcers in the peripheral regions - feet - of the patient and that can generate non-traumatic amputations. Treatment with the commercially available drugs containing PDGF-BB has high costs, which makes it impossible for the patients to be available and even for their redistribution through SUS. In this work, the aim was to evaluate and monitor the cell growth of rhPDGF-BB overproducing HEK293Ts adapting them to the growth in suspension adhered to the surfaces in microcarriers in two increases of scale: FibraStage system and spinner bottle aiming at the scale-up of protein production. The evaluation of the metabolic profile of conditioned media was performed by colorimetry and HPLC. A non-linear profile was obtained during the culture hours at both scale increases. The results showed that the metabolic profile of the cells in the FibraStage varied according to the concentration of glucose in the medium and regulated the production of lactate and glutamine during the batch. For the spinner assay after 5 days of cell adaptation to the system and 10 day lag phase, the cells reached the exponential phase. Tests performed with the microcarriers showed that as the growing hours increased, the physical integrity of the carriers was compromised, but did not prevent proliferation of the cells on their surface. Thus, the results were promising for use in a new increase in scale and work volume compatible with Wave type bioreactor.

**KEYWORDS:** PDGF-BB; Tissue repair; HEK293T; Increase of scale;



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Etapas para de planejamento e produção de biofármaco. Adaptado de GIBSON. <sup>43</sup> .....	6
<b>Figura 2.</b> Modelo de estrutura do PDGF-BB. Subunidades formadoras da molécula: amarela e laranja, dispostas de forma antiparalela. Adaptado de KUAL, Jun et al. <sup>62</sup> .....	9
<b>Figura 3.</b> Cascata de coagulação sanguínea na presença de PDGF-BB. Adaptado de PERIAYAH, M.H. et al. <sup>65</sup> EVROVA, O. et al. ....	9
<b>Figura 4.</b> Microscopia eletrônica de varredura das células HEK293T. Adaptado de CHANG, H.Y. et al. <sup>98</sup> e SOKOLOVA, V. et al. <sup>99</sup> .....	14
<b>Figura 5.</b> Representação do bioreator de tanque agitado (STR). Adaptado de KUUYSTERMANS e AL-RUBEAL. <sup>104</sup> .....	15
<b>Figura 6.</b> Estrutura e componentes do biorreator WAVE. Fonte: (CARVALHO, S.Lucas et al.,2017) 119 .....	17
<b>Figura 7.</b> Linha de produção de rhPDGF-BB realizada pelo NUCEL. ....	23
<b>Figura 8.</b> Estrutura FibraStage ligado a plataforma (P) e ao controlador (C). A) Ilustração do movimento de descida (D) do meio; B) Ilustração do movimento de subida (U) do meio. Adaptado: <a href="http://www.knbs.co.kr/pdf/fibrastagebrochure.pdf">http://www.knbs.co.kr/pdf/fibrastagebrochure.pdf</a> .....	25
<b>Figura 9.</b> Concentração de glicose e lactato residual durante a fase de crescimento nas garrafas T75 analisadas por fotometria. Número de subcultivos: 48 h. Lactato (azul) e Glicose (preto). Fator de divisão eixo y $10^{-3}$ . ....	28
<b>Figura 10.</b> Concentração residual de glicose, lactato e glutamina na fase de crescimento das garrafas T75 por HPLC. Glicose (preto), Lactato (azul) e Glutamina (vermelho). Fator de divisão eixo y $10^{-2}$ . ....	29
<b>Figura 11.</b> Concentração residual de glicose e lactato no 1º ensaio FibraStage por fotometria. Lactato (azul) e Glicose (preto). Fator de divisão eixo y $10^{-4}$ . A) Perfil metabólico de todos os cultivos B) Os seis primeiros pontos de cultivo. ....	30
<b>Figura 12.</b> Concentração residual de glicose, lactato e glutamina no 1º ensaio FibraStage por HPLC. Glicose (preto), Lactato (azul) e Glutamina (vermelho). Fator de divisão eixo y $10^{-2}$ . ....	31
<b>Figura 13.</b> Concentração residual de glicose, lactato e glutamina no 2º ensaio FibraStage por HPLC. Glicose (preto), Lactato (azul) e Glutamina (vermelho). Fator de divisão eixo y $10^{-2}$ . ....	33
<b>Figura 14.</b> Comparativo do perfil metabólico do meio condicionado no ensaios FibraStage I (glicose I, lactato I e glutamina I) e FibraStage II (glicose II, lactato II e glutamina II) analisados por HPLC. Glicose (preto), Lactato (azul) e Glutamina (vermelho). ....	35
<b>Figura 15.</b> Fases da adesão celular de HEK293T superprodutoras de rhPDGF-BB em Cytodex 3 [3 mg/mL] em frasco <i>spinner</i> e volume de trabalho 100mL sob agitação magnética de 60 rpm. A) 5 dias B) 7 dias C) 12 dias D) 16 dias E) 19 dias F) 26 dias. ....	39
<b>Figura 16.</b> Concentração de glicose residual medida por fotometria, no experimento com Cytodex 3 [3 mg/mL] em frasco <i>spinner</i> . Perfil das células viáveis medidas pela linearização das concentrações de células viáveis calculadas pela diferença das células totais. ....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição do meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).....	24
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**SUS** – Sistema Único de Saúde;

**TGF- $\beta$**  - Fator de Transformação Beta;

**PDGF** - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas;

**FGF** - Fator de Crescimento Derivado dos Fibroblastos;

**EGF** - Fator de Crescimento Epidérmico;

**ND** - Neuropatia Diabética;

**NDP** - Neuropatia Diabética Periférica;

**MSCs** – Células-Tronco Mesenquimais;

**HEK** - Célula de Rim Embrionário Humano;

**CHO** - Célula de Ovário de *Hamster* Chinês;

**BHK** - Célula de Rim de *Hamster* Bebê;

**SP2/0** - Célula de Mieloma Murino;

**PER.C6** - Célula Derivada da Retina Humana;

**STR** - Biorreator de Tanque Agitado;

**mAb** - Anticorpo Monoclonal;

**OD** - Oxigênio Dissolvido;

**rFVII** - Fator de Coagulação Recombinante VII;

**SUBs** - Biorreator de Uso Único;

**SEAP** - Fosfatase Alcalina Placentária Humana;

**NUCEL** - Núcleo de Terapia Celular e Molecular;

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle's Medium;

**SFB** - Soro Fetal Bovino;

**PBS** - Tampão Fosfato Salina;

**HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

**TCA** - Ácidos Tricarboxílicos;

**LDH** - Lactato Desidrogenase;

**NAD** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo;

**MSC** - Células Estromais Mesenquimais;

**VE** - Vesículas Extracelulares;

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Diabetes Mellitus e neuropatia diabética.....	3
2.1.1 Produção de biofármacos para tratamentos de doenças crônicas.....	5
2.2 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).....	7
2.2.1 PDGF-BB e sua aplicação.....	8
2.3 Sistemas de expressão de r-proteínas.....	11
2.3.1 Expressão de r-proteínas em células de mamíferos.....	12
2.4 Modos de produção de r-proteínas.....	14
2.5 Escalonamento de produção.....	19
2.5.1 Condições e características de cultivo de células de mamífero.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivos Específicos.....	22
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Obtenção dos clones superprodutores rhPDGF-BB.....	22
4.2 Elaboração de meio de cultura.....	23
4.3 Adaptação e cultivo celular aderente em frascos.....	24
4.4 Adaptação e cultivo celular em suspensão em Fibra Stage.....	25
4.5 Adaptação e cultivo celular a microcarreadores em <i>spinner</i> .....	26
4.6 Remoção das células aderidas ao microcarreador.....	26
4.6 Concentração de células e viabilidade celular.....	26
4.7 Análises de metabólitos residuais do meio de cultivo.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
5.1 Ensaio de adaptação celular em frascos e Fibra Stage.....	27
5.2 Ensaio de adaptação celular em fracos <i>spinner</i> e adesão em Cytodex 3.....	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43

## 1.INTRODUÇÃO

A produção de proteínas recombinantes em células de mamíferos, como sistemas de expressão, vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas nos últimos 20 anos, mostrando-se eficientes devido à elevada aplicação médica dos produtos, como foco principal a produção de biofármaco diversificando o mercado de vendas.<sup>1,2</sup>

Para a demanda em escala industrial o modo de produção dessas proteínas foi descrito por técnicas de aprimoramento de cultivo celular – manutenção das células viáveis - e a mobilidade no volume de trabalho – escalonamento da produção para proteína final – os quais despertaram interesse para indústria biofarmacêutica ainda que escassa sob a produção acadêmica.<sup>3,4</sup>

Nas duas últimas décadas, o desenvolvimento de produtos recombinantes tem sido relevante para a Saúde Pública, em especial o Sistema Único de Saúde (SUS), seja na utilização como agentes de defesa celular ou em tratamentos com terapia gênica de doenças crônicas como hemofilias e outros<sup>5</sup>. Atualmente, o diabetes *mellitus* é responsável pela morbidade de 140,2 mil habitantes no país (dados referentes a 2018) e tem proporcionado um vasto campo de pesquisa, sendo favorecida pela inovação tecnológica e após um século de progresso médico, os pacientes convivem melhor com a doença do que nunca antes. Com a lei Federal nº11.347 (27 de setembro de 2006) que determina monitoramento e fornecimento gratuito de fármacos para o tratamento do diabetes pelo SUS, os medicamentos utilizados passaram a ter uma abordagem preventiva mais eficaz pela melhora dos fármacos desenvolvidos, no entanto, o tratamento tradicional não foi capaz de reduzir a prevalência de efeitos colaterais da doença, como: nefropatias, retinopatias e neuropatias.<sup>5</sup>

A neuropatia diabética é considerada o efeito colateral menos compreendido no mundo, sua prevalência é de aproximadamente 30% em pacientes diabéticos hospitalizados e 20-30% em pacientes diabéticos de base comunitária.<sup>6</sup> Suas complicações geram desde úlceras nos pés, gangrena e até mesmo amputações não traumáticas.<sup>7,8</sup>

Diante da variedade de complicações e manifestações clínicas associadas às neuropatias diabéticas, no intuito de auxiliar o processo de cicatrização das feridas e úlceras formadas foram testadas terapias celulares e expressão de proteínas para reparos de tecidos. Esse processo envolve quatro fases biológicas sobrepostas - coagulação, inflamação, proliferação celular e remodelação<sup>9</sup> – que acontecem de forma linear nas feridas agudas e nas feridas

crônicas – neuropatias - a progressão das fases encontram-se em diferentes etapas ao mesmo tempo e não ocorre em sincronia.<sup>9</sup>

Em virtude desta assincronia, fatores de transformação beta (TGF- $\beta$ ), de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), de crescimento epidérmico (EGF) e de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>10</sup> foram identificados e utilizados para acelerar a velocidade do processo de cicatrização durante a fase de proliferação celular em estudos experimentais com humanos e roedores normais e no auxílio da remodelação celular em teste envolvendo problemas de coagulação sanguíneas.<sup>11-14</sup> Embora o uso terapêutico com fator de crescimento resulte em uma melhora na cicatrização, é importante ressaltar que o uso exige um importante equilíbrio entre a dose da proteína e sua real ação regulatória durante a cascata de recuperação dos tecidos.<sup>15,16</sup>

Os biofármacos disponíveis na indústria farmacêutica para contornar os efeitos da neuropatia são: uso tópico do fármaco Regranex®, produzidos por *Saccharomyces cerevisiae*, composto por 100 $\mu$ g de becaplermin (PDGF-BB) por grama de gel custando cerca de US\$ 1.103,00 cada; e tecidos equivalentes à pele como o Apligraf® (Organogenesis) fornecido como um disco circular de aproximadamente 75 mm de diâmetro e 0,75 mm de espessura, como substituto vivo da pele em duas camadas, fabricado por células derivadas do tecido prepúcio masculino neonatal com queratinócitos e fibroblastos com colágeno tipo I bovino custando cerca de US\$ 1,670.00 folha/aplicação.<sup>17,18</sup>

Em média, são necessárias sete aplicações por um período inicial de tratamento durando cerca de um mês e cinco dias. Dependendo do grau de complicação da ferida o tratamento poderá necessitar de mais aplicações para a completa cicatrização aumentando o uso das folhas, assim, o tratamento disponível com os biofármacos do mercado envolvem altos custos tornando-se dispendioso para o SUS.

Dessa forma, para viabilizar o tratamento com o biofármaco contendo PDGF e na tentativa de contornar os problemas econômicos de compra e redistribuição desses medicamentos, foi proposto um processo de produção dessa proteína em células de mamífero, e aplicando técnicas de escalonamento para aumento do volume de trabalho. A produção final de proteína purificada e ativa necessária para elaboração do biofármaco poderá atingir maiores volumes e proporcionar um reequilíbrio no custo-benefício do processo de produção. Esse aumento de produção final contribuirá para elaboração de uma nova rota de produção e uma redução de custos de processos, viabilizando o acesso aos tratamentos com foco na regeneração celular de feridas nas regiões, periféricas auxiliando os pacientes diabéticos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Diabetes Mellitus e neuropatia diabética

O diabetes *mellitus*, é uma condição crônica que ocorre quando há níveis elevados de glicose no sangue, hiperglicemia, por falta, insuficiência ou ineficácia na produção e utilização do hormônio insulina. Atualmente afeta 851 milhões de pessoas em todo o mundo e 12,5 milhões de adultos no Brasil. Os problemas encontrados devido à hiperglicemia não controlada englobam diversos danos celulares, tais como: doença cardiovascular, nefropatia, retinopatia, cegueira e neuropatia, sendo este último um sintoma colateral diagnosticado com prevalência de 10-18%.<sup>19</sup>

Destacando-se essa prevalência e as enfermidades geradas por esse sintoma colateral, a neuropatia diabética (ND) é caracterizada pela redução da vascularização em nervos periféricos e deficiência de angiogênese e fatores neurotróficos.<sup>20-22</sup> Como compõem um grupo heterogêneo de manifestações clínicas, as complicações geradas pela neuropatia diabética periférica (NDP) variam de acordo com estado sensorial das fibras envolvidas, já que os sintomas da NDP podem ser dolorosos, com agravamentos de fortes dores musculares e desagradáveis sensações de queimação e formigamento à noite, ou silenciosos, como dormência e/ou perda da sensibilidade devido ao envolvimento de fibras nervosas sensório-motoras distais, sendo este o mais comum deles.<sup>23</sup>

Estes sintomas silenciosos da NDP podem agravar o estado clínico do paciente já que a perda da sensibilidade, o desequilíbrio da pressão arterial e a deformidade na região periférica – os pés, por exemplo - podem transformar calos em feridas cada vez mais complicadas, até mesmo em um histórico de ulceração ou amputação. Em muitos países, a amputação não-traumática de membros inferiores são precedidas de úlceras, chegando a mais de 85%.<sup>24-26</sup> Estima-se que 24,4% do total de gastos com saúde entre a população diabética mundial esteja relacionado a complicações nos pés.<sup>27</sup> No Brasil, os custos médicos totais do tratamento de complicações nos pés de pacientes diabéticos foram estimados em US\$ 27,7 milhões para internação e US\$ 333,5 milhões para atendimento ambulatorial, resultando em um ônus econômico total de US\$ 361 milhões em 2014.<sup>28</sup>

A escolha e o uso do melhor tratamento para contornar essa enfermidade como também o controle glicêmico implica uso de fármacos, que em sua maioria possuem altos custos de comercialização. Outro fator negativo no tratamento do diabetes são as classes de medicamentos usadas, já que grande parte dos fármacos disponíveis para controle glicêmico



causam eventos adversos, que abrangem desde infecções geniturinárias à intolerância gastrointestinal grave, agravando-se em neuropatia autonômica diabética.<sup>29</sup>

O mecanismo dessa patogênese é excepcionalmente complexo devido ao envolvimento simultâneo de diversas vias de sinalização durante a coagulação sanguínea. No entanto, grande parte do tratamento envolve uso de fármacos baseados na estabilização glicêmica, como: Benfotiamine, Epalrestat, ranirestat, ácido  $\alpha$ -lipóico,<sup>30-32</sup> que a longo prazo tornam-se pouco viáveis.<sup>33-35</sup> O uso de analgésicos opiáceos como Tramadol também são encontrados para contornar sintomas de dor, porém a exposição a longo prazo também não é recomendado.<sup>36</sup>

Como não existe um tratamento definitivo para prevenir a incidência de neuropatia diabética, tratamentos pontuais como terapias celular e acompanhamento voltadas para patogênese que envolvam a desaceleração sintomática da enfermidade, a prevenção de suas complicações têm sido os principais métodos usados para reduzir e monitorar os índices da neuropatia.<sup>30</sup>

Estudos contendo duas isoformas do fator de crescimento de hepatócitos humanos (HGF) administradas por injeções intramusculares em pacientes com neuropatia diabética dolorosa obtiveram respostas para melhora nos movimentos das regiões afetadas pela doença e diminuição ou alívio das dores nas regiões afetadas, fibras nervosas intraepidérmicas. Os pacientes testados obtiveram uma redução de 50% na dor em comparação com 17,6% dos pacientes do grupo placebo, e dois dias de tratamento foram suficientes para proporcionar alívio sintomático com melhora na qualidade de vida por três meses.<sup>37</sup>

Foi testado também o transplante local de células-tronco mesenquimais (MSCs) em ratos diabéticos afetados pela neuropatia com intuito de aumentar a angiogênese e avaliar a regeneração neural nos nervos ciáticos. Observou-se que após quatro semanas, a injeção de MSCs nos músculos dos membros posteriores afetados obteve a restauração da velocidade de condução nervosa e resposta muscular na região e a expressão de múltiplos fatores envolvidos na angiogênese nervosa melhorou o estado clínico da neuropatia diabética nas demais regiões musculares dos ratos.<sup>20</sup>

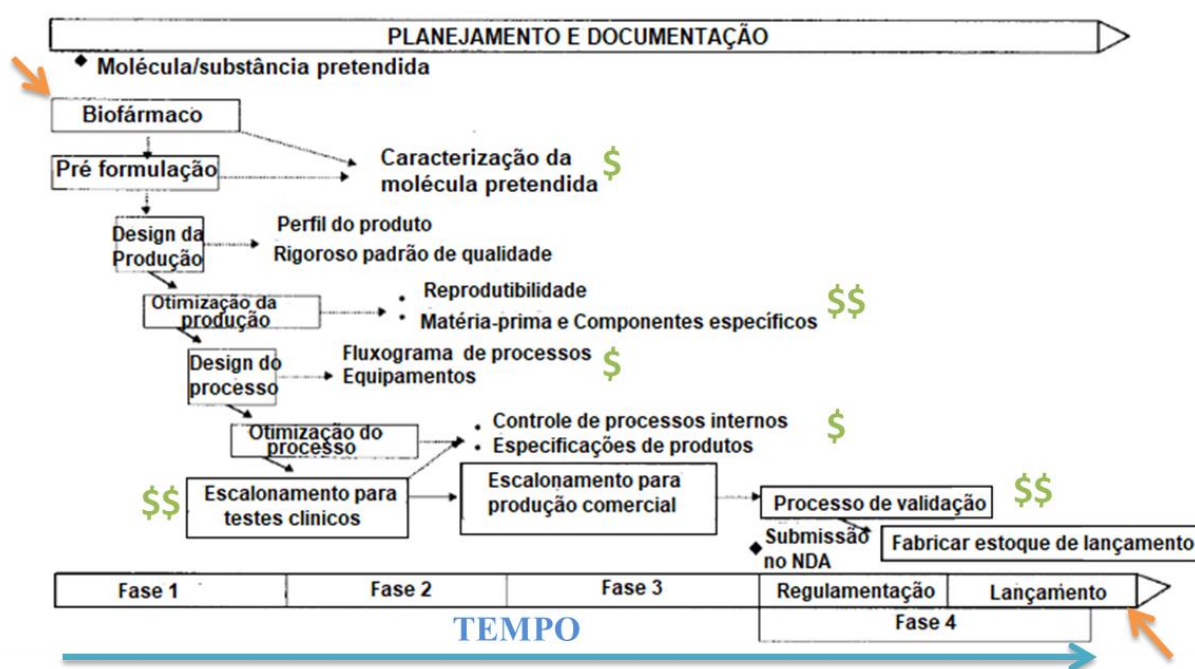
Outro sucesso recente em terapias celulares aliadas à bioengenharia foi a utilização de peles testadas em úlceras neuropáticas do pé diabético. Em um ensaio de 12 semanas, uma pele de camada dupla composta de fibroblastos vivos e queratinócitos a partir do prepúcio neonatal geraram 56% de cicatrização nas feridas em comparação com o grupo controle que alcançou apenas 38%. Foram observadas também diminuição na incidência de osteomielite e

amputação, devido à cicatrização mais rápida. Outro estudo sob as mesmas condições observaram a incidência de cicatrização de 30% em relação aos 18% do grupo controle.<sup>38,39</sup>

O fato é que, a proporção da população diabética com fatores de risco para ulceração do pé atinge entre 40% e 70% dos pacientes, o que indica a necessidade de um processo de triagem prestados à esse público para identificar os indivíduos de alto risco e com isso buscar estratégias terapêuticas para controlar a formação dessas úlceras e feridas da NDP. Dessa forma, o processo de triagem deve ser cada vez mais integrativo e efetivo aumentando a qualidade de vida do paciente, já que o risco de úlcera no pé é de cerca de 25%<sup>25,40</sup> e sua maior complicação, as amputações não traumáticas, representam dois terços de todas as amputações não traumáticas realizadas no setor hospitalar.<sup>24</sup> Outro fator que corrobora essa triagem são as redução de custos médicos pago pelos sistemas de saúde pública devido ao pré-diagnóstico e às medidas preventivas corretas.<sup>23</sup>

### **2.1.1 Produção de biofármacos para tratamentos de doenças crônicas**

A elaboração e o desenvolvimento dos fármacos convencionais até a comercialização final do produto envolve processos complexos e dispendiosos podendo durar 15 anos, com custos excedentes a US\$ 2 bilhões,<sup>41</sup> quando compara-se esses custos de produção com os produtos biofarmacêuticos temos que o custo total de pesquisa e desenvolvimento de novos biofármaco alcançam US\$ 1.395 milhões e US\$ 2.558 milhões, respectivamente. Essa diferença de aproximadamente US\$ 1,9 bilhões representa, além da diminuição de gastos, a reinvenção das rotas tecnológicas existentes durante as etapas de produção de novos biofármaco (Figura 1).<sup>42</sup>



**Figura 1.** Etapas para o planejamento e produção de biofármaco. Adaptado de GIBSON.<sup>43</sup>

Para a elaboração e lançamento de um novo biofármaco no mercado são necessários planejamento de várias etapas de produção e documentação como visto na Figura 1. Como o tempo médio gasto para a comercialização de um novo biofármaco no mercado chega a dez anos intervalo que vai desde a eleição da substância pretendida para lançamento no mercado até etapas de: otimização do *design* de produção - caracterização e reprodutibilidade no padrão de qualidade; etapas de otimização dos processos de produção e etapas de escalonamento para ensaios clínicos e produção em volume de trabalho industrial que levam em média de seis a sete anos até o processo de validação final. Assim o sucesso final requer recursos financeiros imersos em cada etapa do processo e necessita de gerenciamento em cada fase do projeto final.<sup>44</sup>

O grande diferencial dos produtos biofarmacêuticos é a alta versatilidade de sua resposta bioativa em hospedeiros vivos e biológicos envolvendo biotecnologia e bioprocessos.<sup>45</sup> Ao passo que a compreensão dos sistemas de expressão de biofármacos aumenta, a participação no mercado também cresce, oferecendo velocidade e qualidade de produção para indústria farmacêutica, além de contemplar cada vez mais tratamentos e possibilitar diversas aplicações como agentes de defesa celular.<sup>46</sup>

Dentre todas as aplicações, a classe que mais se destaca dentre os produtos biofarmacêuticos são as proteínas terapêuticas, com funções de defesa celular como imunoreguladores em casos de adultos com hepatite C crônica<sup>47</sup> e papéis fisiológicos no corpo humano, incluindo catalisadores e receptores, canais de membrana e carreadores de macromoléculas em diferentes tratamentos clínicos, como a entrega dirigida de amoxicilina em casos persistente de *Chlamydia trachomatis*.<sup>48</sup> Algumas terapias com proteínas terapêuticas recombinantes de alta especificidade possibilitam também substituição ou remoção de proteína defeituosa em casos de distúrbios endócrinos ou deficiências hormonais, como a insulina em pacientes diabéticos e em casos de hemostase e trombose como o uso de fator de coagulação XVIII e XIX para hemofílicos A e B, respectivamente.<sup>47</sup>

Então, o reparo e manutenção das defesas celulares e das funções fisiológicas do corpo se tornam cada vez mais importantes para doenças classificadas como crônicas, as quais o indivíduo necessita de acompanhamento médico para o tratamento da doença. O reflexo desse cenário desde 2014 é o crescimento de 32% na produção de biofármacos a partir de proteínas terapêuticas recombinantes, produzidos e aprovados no mercado utilizando-se células de mamíferos como sistemas de expressão,<sup>49</sup> com uma demanda projetada para alcançar o dobro em dias atuais,<sup>50</sup> movimentando vendas globais excedentes a US\$ 450 bilhões até 2019.<sup>46,50</sup>

## **2.2 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)**

Conhecido pelo grande potencial mitogênico e angiogênico, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) tem sido estudado ao longo dos anos.<sup>12,14,51,52</sup> Dada a capacidade de estimular células de origem mesenquimal por meio de grânulos alfa de plaquetas ativadas durante a coagulação sanguínea, o PDGF torna-se crucial nos processos de cicatrização e reparo tecidual, incluindo fibroblastos da derme, células da glia e também no reparo ósseo e dental.<sup>12,14,51-53</sup> Outro grande potencial encontrado durante as fases do processo de cicatrização é sua capacidade de atração de diferentes tipos de celulares como: fibroblastos, monócitos, neutrófilos e células de músculo liso, os quais possibilitam a construção de novos vasos sanguíneos, recrutamento e proliferação das células necessárias para o processo, síntese de outros fatores de crescimento, e finalmente, a síntese e remodelamento da matriz protéica.<sup>12,14</sup>

Existem quatro alelos de PDGF sendo eles: PDGFA, PDGFB, PDGFC e PDGFD, os quais correspondem aos cromossomos 7, 22, 4 e 11, em seres humanos, e nos cromossomos 5,

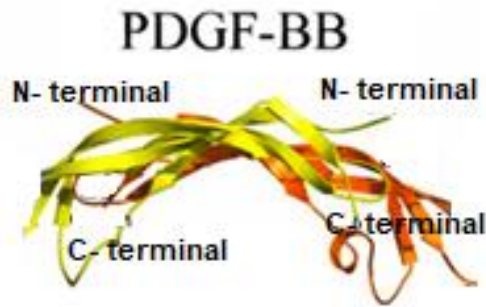
15, 3 e 9 em camundongos, respectivamente.<sup>54</sup> Os grupos formados incluem pelo menos cinco membros estruturalmente relacionados, PDGF-AA, -BB, -AB, -CC e -DD<sup>8</sup>, que podem formar ambos homodímeros e heterodímeros.<sup>55</sup> As cadeias de PDGF são unidas em dímeros através de pontes dissulfeto na qual se ligam aos receptores de tirosina quinase codificados por dois genes, PDGFR- $\alpha$  e  $\beta$ - e o PDGF-BB é a única isoforma capaz de se ligar a ambos receptores PDGFR- $\alpha$  e  $\beta$ .<sup>56,57</sup>

Estudos com o receptor PDGFR-  $\beta$  em tratamentos de carcinoma de células renais (CCR), tumor altamente vascularizado, permitiu o prognóstico do tumor por meio de marcadores celulares endoteliais e perivasculares na presença de PDGFR-  $\beta$  correlacionando a expressão PDGFR-  $\beta$  perivascular com a densidade do vaso sanguíneo e a modulação do prognóstico de acordo com as variações intrínsecas da doença.<sup>58</sup>

### **2.2.1 PDGF-BB e sua aplicação**

Uma das isoformas homodímeras, o PDGF-BB, biologicamente ativo intracelularmente<sup>12</sup> tem sua síntese regulada finamente de forma independente no nível transcricional e postranscricional, sendo frequentemente aumentada em resposta a estímulos externos, como exposição à baixa concentração de oxigênio, à trombina ou ao estímulo com vários fatores de crescimento e citocinas.<sup>59</sup> Em condições fisiológicas, o PDGF-BB é secretado principalmente pelas células de Kupffer e uma vez que um tecido tenha sido danificado, várias células diplóides podem sintetizar e secreta-lo auxiliando na proliferação de tecidos conjuntivos.<sup>60</sup>

O PDGF-BB possui 241 aminoácidos, cujo DNA genômico contém cerca de 14 kDa e o DNA codificante cerca de 3,5 kb é altamente expresso na placenta e no coração.<sup>61</sup> Seu domínio é caracterizado por um padrão de resíduos de cisteínas altamente conservado, incluindo o chamado motivo *cystine knots* e as duas subunidades formadoras da sua estrutura estão dispostas de maneira antiparalela (Figura 2).

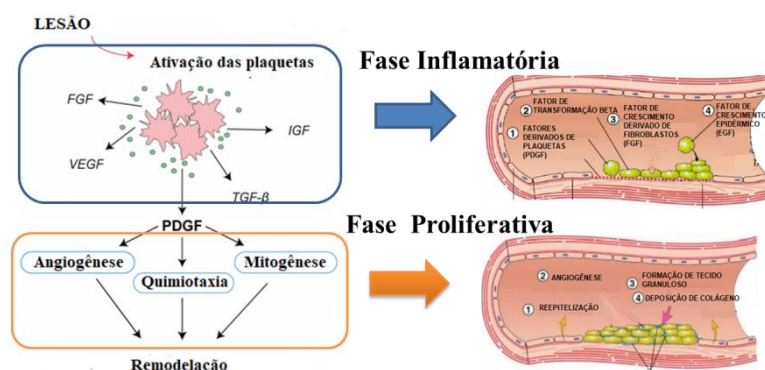


**Figura 2.** Modelo de estrutura do PDGF-BB. Subunidades formadoras da molécula: amarela e laranja, dispostas de forma antiparalela. Adaptado de KUAL, Jun et al.<sup>62</sup>

Como visto na Figura 2, a alta complexidade de dobramentos da proteína e seus diversos prolongamentos dados pelo grande tamanho, consistem em um dobramento estreito semelhante a um nó, na qual um dos dissulfetos interligados atravessa o círculo formado pelos outros dois nós e pelas sequências intervenientes. Do nó de cistina ao centro, dois grandes laços estabilizados por interações de receptor- $\beta$  estendem-se em uma direção opostas - laços em arranjo antiparalelo da molécula - e um laço mais curto aponta na direção oposta.<sup>63</sup>

A biossíntese e o processamento proteolítico no terminal -COOH da isoforma PDGF-BB implica a otimização e estudos em sistemas de expressão que serão capazes de realizar todas as transformações transcricionais e pós transcricional necessárias e preservar todas as respostas bioativas importantes de forma eficaz para a posterior utilização em terapias celular.<sup>64</sup>

Sua utilização em terapias celular com foco na reparação dos tecidos durante a cascata de coagulação destaca-se durante a fase a inflamatória e proliferativa durante o processo de cicatrização (Figura 3).



**Figura 3.** Cascata de coagulação sanguínea na presença de PDGF-BB. Adaptado de PERIAYAH, M.H. et al.<sup>65</sup> EVROVA, O. et al.

Após o surgimento da lesão ou da necessidade do processo de coagulação sanguínea substâncias vaso construtoras são acionadas para o início do processo de reconstrução e

remodelação da matriz tecidual (Figura 3). A grande atuação inicia-se na fase inflamatória quando sua presença das demais plaquetas ativadas o PDGF-BB encaminha e recruta neutrófilos e monócitos no início da cicatrização e promoção da síntese de colágeno e proteoglicanos importantes para reorganização da matriz extracelular. Já na fase proliferativa, devida a capacidade de angiogênese e mitogênese desse fato de crescimento, a proliferação e ativação dos fibroblastos no tecido vizinho são estimulados a migrarem para o local da injúria – quimiotaxia – e então há remodelação nos fibroblastos promovendo a cicatrização completa.<sup>66</sup>

A utilização rhPDGF-BB em terapias de crescimento capilar e reparo de tecidos, expressos no epitélio folicular foi estudada na forma de injeções intraoperatórias<sup>67</sup>, as quais potencializaram o crescimento das células da papila dérmica através da indução de proteínas que estimulam a síntese de estromelina acelerando o crescimento folicular. Ao final do tratamento utilizando-se injeções intra-operatórias, os pacientes apresentaram melhora clínica no número médio de folículo capilar, com um aumento médio de 33,6 cm cabelos na área alvo, e um aumento médio na densidade total do cabelo de 45,9 cabelos por cm<sup>2</sup> em comparação com os valores basais. A avaliação microscópica mostrou o aumento de 0,05 mm na espessura da epiderme e do número de folículos pilosos e o aumento discreto de pequenos vasos sanguíneos ao redor dos folículos pilosos na pele tratada em comparação com os valores basais.<sup>67</sup>

Devido às suas capacidades como a regulação da função imunitária, da proliferação e diferenciação de vários tipos celulares, tais como: epitélio, osso e tecidos moles, os fatores de crescimento e a sua aplicação nas superfícies dentárias radiculares com o objetivo de induzir a repopulação celular, têm sido investigados com maior detalhe.<sup>68</sup> A fim de promover a regeneração periodontal, estudos em cães raça Beagle demonstraram que rhPDGF-BB afeta positivamente o processo de regeneração em enxertos na matriz óssea nas mandíbulas caninas, a medida que os defeitos foram expostos as concentrações de PDGF-BB, notou-se aumento na proliferação na rede vascular e conseqüentemente uma redução no tempo de regeneração na matriz óssea lamelar. A aplicação local de PDGF na superfície radicular facilita a cicatrização tecidual, acelerando a cadeia de eventos que levam à formação de novo enxerto da matriz óssea.<sup>69-71</sup>

Avaliando ainda a eficácia do rhPDGF-BB combinado a  $\beta$ -fosfato tricálcico no tratamento de periodontite, após 6 meses de uso, o grupo testado mostrou uma redução de 0,035 mm na profundidade da margem gengival e um ganho no nível de enxerto na matriz

óssea de 0,65 mm e 0,40 mm no 3º e 6º mês. O preenchimento ósseo linear foi melhorado em 35% no grupo teste comparado ao grupo controle com redução 0,036mm de retração gengival.<sup>72</sup>

Com relação ao uso de rhPDGF-BB em tratamentos de feridas diabéticas em ratos aplicados topicamente por meio de membranas nanofibrosas com concentrações distintas de rhPDGF-BB, estudos comprovaram o melhor desempenho na cicatrização das feridas com relação ao grupo placebo devido ao aumento 0,51mm de metaloproteinase de matriz por 21 dias para o grupo com rhPDGF-BB e 0,25mm para o grupo placebo. As análises histológicas também comprovaram melhor recuperação da pele após 14 dias de uso da nanofibra+ rhPDGF-BB.<sup>73</sup>

A eficiência na cicatrização de úlceras diabéticas em humanos foi estudada<sup>74,75</sup> utilizando-se rhPDGF-BB em uso tópico. Estudos relataram o aumento de 15% na incidência de fechamento de feridas em 20 semanas de tratamento e 50% de cicatrização das feridas de pacientes diabéticos. Os critérios de eficácia do tratamento incluíram a porcentagem de pacientes que atingiram a cicatrização completa, alcançando 57,5% dos pacientes, dentro do período de tratamento de 20 semanas, com tempo médio para alcançar a cicatrização completa de 63 dias e a taxa de recorrência da úlcera de 21% durante o período de seis meses após a cicatrização e a adesão ao tratamento. Esses resultados confirmam a eficácia e segurança do gel tópico comercializado para o tratamento de úlceras diabéticas de membros inferiores.<sup>76</sup>

### **2.3 Sistemas de expressão de r-proteínas**

Assim como a expressão de PDGF-BB requer um sistema de expressão eficiente, a produção de proteínas terapêuticas recombinantes em sua totalidade também foi explorada em vários sistemas de expressão, sendo eles: *Escherichia coli*, *Komagataella phaffii*, *S.cerevisae*, cultura de células de insetos, *Spodoptera frugiperda* ou *Trichoplusia ni*, mediadas por baculovírus, *Autographa californica*, e células de mamíferos CHO e HEK293.<sup>6</sup>

Os resultados encontrados durante a expressão de proteínas nos diversos sistemas variou conforme a capacidade e maquinaria existentes para os processos proteolíticos transcricionais e pós-transcricionais de cada organismo, nas quais se observou a expressão de proteínas, geralmente de alta complexidade. Assim, foi selecionado o melhor sistema a ser usado, já que o desenvolvimento de novas plataformas de produção de proteínas tem como objetivo melhorar a funcionalidade dos medicamentos produzidos através do alcance de dobramentos



das proteínas bem sucedidas e as modificações pós-traducionais mantendo a fidelidade no processo.<sup>77</sup>

Os sistemas bacterianos foram os mais rentáveis e predominantes desde a década de 1980<sup>78</sup>, devido à alta taxa de duplicação, baixo custo de manipulação e certa simplicidade de produção, porém apresentaram proteínas com pouca solubilidade ou falta de modificação pós-tradução adequada devido à baixa capacidade proteolítica desse organismo.<sup>79,80</sup> A implementação da produção em sistemas como leveduras, ofertou uma alternativa aos hospedeiros procarióticos e melhoria na capacidade de modificação pós-tradução das proteínas.<sup>81</sup>

Para os sistemas de baculovírus e de insetos, sistema inicialmente bem-sucedido para produção de vacinas,<sup>78</sup> a capacidade de síntese, dobramento, modificação e processamento das proteínas produzidas obtiveram cadeias de glicosilação compostas com resíduos de fucose ligados ao núcleo N-glicanos com função alergênica, impossibilitando e reduzindo as aplicações farmacêuticas desse sistema expressão.<sup>82,83</sup>

Então, a compreensão cada vez maior da fisiologia e das necessidades celulares e dos fatores envolvidos na expressão gênica heteróloga e as capacidades de modificações proteolíticas, fortaleceram o uso de diferentes sistemas de expressão, sendo eles procarióticos e eucarióticos, como células de animais.<sup>84,85</sup>

De fato, as proteínas terapêuticas produzidas em linhagens celulares mais comuns como bactérias, leveduras e mamíferos, encontram-se em constante evolução, competindo para melhorar suas propriedades, destacar-se como plataformas a serem escolhidas para produção de biofármaco de qualidade, tornando-as capazes de concorrer com a produção de enzimas para indústrias químicas redefinindo protocolos e estratégias de produção.<sup>46</sup>

### **2.3.1 Expressão de r-proteínas em células de mamíferos**

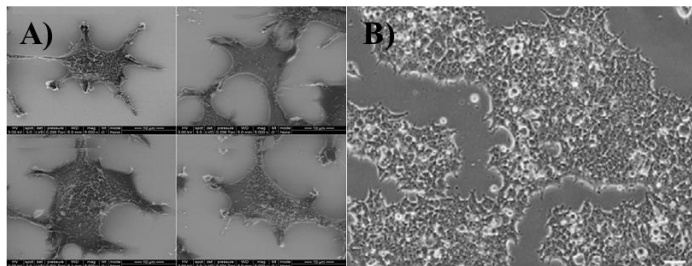
A expressão de r-proteínas terapêuticas em célula de mamífero está associada à capacidade de adicionar glicanos nas proteínas sintetizadas com diferentes estruturas anexadas em um único esqueleto peptídico e sequência de aminoácido conhecida, tornando-se o hospedeiro ideal para o processo de proteínas bioativas e com perfil de dobramento seguro e desejável na elaboração de proteínas terapêuticas recombinantes com destinação final de biofármacos.<sup>86,87</sup> Para produção de r-proteína, células de rim embrionário humano (HEK) 293 e células de ovário de *hamster* chinês (CHO) são comumente utilizadas, e em alguns casos

também expressas em células de rim de *hamster* bebê (BHK), em linhagens de mieloma murino (SP2/0) e NS0, dependente do colesterol e a linhagem PER.C6, derivada da retina humana.<sup>88,89</sup>

O *workhorse* da produção de proteínas de mamíferos especialmente em escala industrial é o uso de células CHO, isolada por Theodore Puck no final da década de 50,<sup>90</sup> inicialmente selecionadas para estudos citogenéticos, devido ao seu baixo número de cromossomos ( $2n = 22$ ) e cultura celular confiável atingindo alta densidade celular. A receita global anual em 2012 de produtos de células CHO chegou a mais de US \$ 100 bilhões, com demanda para atingir o dobro nos próximos anos.<sup>91</sup> O sucesso de CHO está associado à sua adaptabilidade ao cultivo em altas densidades e culturas em suspensão, além da adaptação às condições livres de fatores de crescimento celular presentes em soro derivados de animais.

Enquanto as células CHO foram o campo de trabalho da produção de proteínas recombinantes, a linha HEK 293 cresceu e destacou-se como *workhorse* na produção de proteínas recombinantes humanas, devido suas modificação e funções pós-traducionais,<sup>46</sup> utilizando-se DNA viral por técnica de transfecção de cálcio desenvolvida por Graham e Van der Eb.<sup>92</sup> Essa linhagem celular e seus derivados HEK 293T, 293S, 293FTM, 293SG têm sido frequentemente usadas após HeLa, em estudos de biologia celular e como seus clones derivados apresentaram adaptação a novas condições de crescimento, como o cultivo em altas densidades celulares para a produção de biofarmacêuticos com ênfase em proteínas recombinantes humana. Essa vantagem juntamente com a alta fidelidade de expressão das proteínas em ensaios bioquímicos, possibilitaram a geração e amplificação de produção durante os bioprocessos existentes na indústria.<sup>93,94</sup>

A linhagem celular HEK 293T (Figura 4) modificada geneticamente para conter o antígeno T do vírus SV40 (símio vírus 40) é um derivado importante na produção de r-proteínas devido a capacidade de processamento proteolíticos pós-tradução e a facilidade de transfecção dessas células<sup>95</sup>, dada a replicação epissomal de um plasmídeo que transporta a origem de replicação correspondente, aumentando o rendimento total do processo de produção.<sup>96</sup> Essa capacidade de replicação em sistemas de expressão gênica transitória de HEK293T representam uma maneira eficaz de encurtar o tempo necessário para rastrear candidatos terapêuticos funcionais e para permitir a sua rápida produção.<sup>97</sup>



**Figura 4.** Microscopia eletrônica de varredura das células HEK293T. Adaptado de CHANG, H.Y. et al.<sup>98</sup> e SOKOLOVA, V. et al.<sup>99</sup>

As células HEK293T exibem forma poligonal ou invaginada (Figura 4A) em seu estado natural, e os contatos célula-célula são semelhantes em todas as superfícies por meio de conexões de filopódios finos (Figura 4B). Originalmente essas conexões requerem um contato aderido à superfície e em situações de estresses podem apresentar uma forma arredondada. A taxa de duplicação dessas células dura cerca de 24h e rapidamente possuem uma tendência a formar *clusters* de células, aglomerados de células, quando não se encontram homogênea sobre a superfície de contato.<sup>94</sup>

Além dos métodos de transfecção transitória, é possível encontrar em células CHO e PER.C6 métodos de transfecção estável, que diferenciam-se principalmente pela incorporação total do DNA no cromossomo tornando-os mais produtivos em comparação a produtividade específica e volumétrica durante a produção de r-proteínas nessas células.<sup>100,101</sup>

## 2.4 Modos de produção de r-proteínas

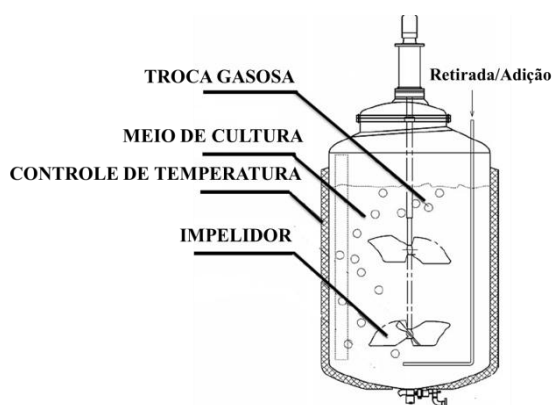
As condições do crescimento celular e quantidade de produtividade específica durante a produção de r-proteínas em célula de mamíferos oscilam levemente entre as linhagens escolhidas e o modo de produção pretendido ocasionando grandes impactos durante as etapas de recuperação e purificação.<sup>102</sup>

Os parâmetros de viabilidade e densidade celular durante o processo são modulados a partir de fatores, como: concentração inicial de nutrientes disponíveis e a produção de metabolitos tóxicos.<sup>102</sup>

Essa modulação pode ocorrer em sistemas fechados, ensaios descontínuos, bateladas, quando a produção específica e volumétrica está associado ao esgotamento de substrato limitante no término do cultivo. Uma forma de variar esse processo é repeti-lo para melhorar a viabilidade celular que costuma alcançar entre 1 e  $4 \times 10^6$  células/mL, dependendo da linhagem celular e do meio utilizado durante o processo de produção. Por meio de coletas

periódicas seguidas pela adição de meio fresco até completar o volume de trabalho, a repetição fornece novos nutrientes necessários as células reduzindo também a heterogeneidade das condições de cultivo, porém essa troca constante apresenta riscos de contaminação e esterilização no preparo do biorreator para a nova a corrida.<sup>103,104</sup>

Na indústria biofarmacêutica o biorreator clássico, tanque agitado (STR), é comumente utilizado como sistema de produção para o cultivo de células animais em suspensão ou aderidas a microcarreadores, em especial na produção de anticorpos monoclonais (mAbs),<sup>104</sup> já que esse biorreator alia a versatilidade da automação e padronização no uso dos impelidores (pás), injeção de gases e controle do pH do meio, garantindo um ambiente em que o pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura e concentração de nutrientes sejam distribuídos no meio de forma homogênea, a fim de evitar a morte celular e consequentemente garantir a sua viabilidade ao longo do cultivo(Figura 5).<sup>3</sup>



**Figura 5.** Representação do biorreator de tanque agitado (STR). Adaptado de KUYSTERMANS e AL-RUBEAI.<sup>104</sup>

Estudos realizados em reatores descritos na Figura 5 avaliaram a influência dos parâmetros de operação, como rotação e velocidade do impelidor – frequência de agitação com variação temporal - sobre a quantidade e a qualidade da adesão celular e da produção final de proteínas.<sup>104</sup> Quando se tem homogeneidade do meio de cultura e a manutenção na taxa de transferência de massa de oxigênio entre 40 a 60% da saturação de ar no meio líquido conseguida pela agitação correta, controle de pH entre 6,8-7,8 pela distribuição homogênea dentro do biorreator, e a temperatura ideal entre 35,5-37 °C, as proteínas produzidas terão maiores probabilidades de resposta ativa, importantes para confiabilidade do biofármaco produzido.<sup>104-106</sup>

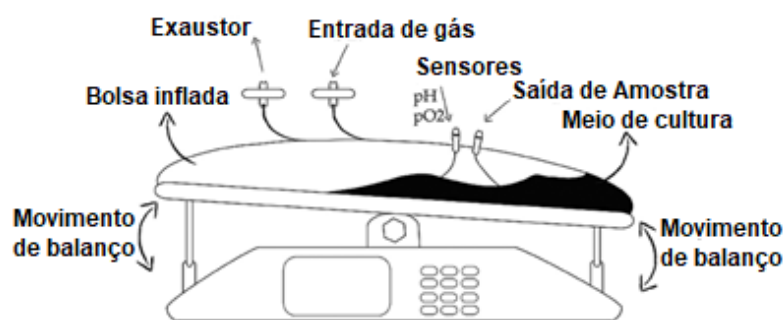
Para a produção de proteínas em célula de mamíferos em escala industrial, processos de batelada alimentada alcançam densidade celular  $8-12 \times 10^6$  células/mL e têm sua viabilidade celular modulada por adição controlada de nutrientes em intervalos específicos.<sup>102</sup> São denominados ensaios descontínuos alimentados, batelada alimentada, suplementação intermitente ou contínua de substrato, que permitem aumento da produtividade celular e manutenção da velocidade de crescimento.<sup>107</sup> Empregando uma estratégia de alimentação contínua ou programada para fornecimento dos nutrientes à medida que cultura celular atinge a fase exponencial, essa alimentação auxilia no aumento da densidade celular e consequentemente a produção específica dessas células e a produtividade total dos produtos já que é possível o prolongamento das fases exponencial e estacionária do processo.<sup>108-110</sup>

Ainda que o processo de batelada alimentada seja simples e flexível, é válido ressaltar que não é recomendável para a produção de proteínas lábeis à temperatura ou sujeitas a ação de proteases e glicosidases, devido ao longo tempo de residência dentro do biorreator.<sup>103,108</sup> Outro ponto relevante no estabelecimento desse modo de produção são as estratégias de alimentação que permitam minimizar a exposição aos metabólitos tóxicos ao crescimento celular como lactato e amônia e as concentrações de glicose e glutamina.<sup>109,111</sup> Com as trocas de meios constantes durante o processo de produção, é importante também o controle da osmolalidade, a qual tende a aumentar com a introdução de meios mais concentrados e com o acúmulo de lactato ao longo do processo.<sup>108</sup>

Na produção de mAbs os ensaios de batelada alimentada são capazes de produzir uma concentração maior do produto de anticorpo devido ao tempo prolongado durante o qual a cultura pode sustentar sua fase exponencial. A alimentação real de nutrientes deve ser cuidadosamente controlada para evitar a apoptose<sup>112</sup> e para evitar inibir o crescimento, reduzindo a formação de metabólitos residuais<sup>113,114</sup>, como lactato e amônia, certificando-se de não privar a cultura de quaisquer nutrientes essenciais.<sup>114</sup> Ainda na produção de mAbs utilizando-se células CHO, ensaios de batelada alimentada, como forma de avaliar a osmolalidade do meio e a produtividade específica dessas células, foram testados três valores para osmolalidade do sistema durante as adições de meio fresco, combinada com a modulação de autofagia. O valor de 450 mOsm/kg conduziu, na cultura celular, a produtividade específica quatro vezes maior, resultando no dobro da produção total de mAbs com relação as células controle. Com relação ao perfil glicano dos mAbs produzidos, influenciados pela alteração da osmolalidade, não foram identificados, mostrando-se segundo os autores como modo de produção eficiente.<sup>115</sup>

Estudos com células CHO para aumentar a expressão do fator de coagulação recombinante VII (rFVII) otimizaram peptídeos-sinal em cinco tipos de meio de cultura sem derivados de animais em modo batelada alimentada. A alta expressão proteica de rFVII com peptídeo sinal IgK durante a cultura de suspensão foi combinada a uma alimentação com meio contendo 5 g/L de glicose produzindo 6,76 mg/L rFVII durante o processo de batelada. Após estudos da concentração residual de glicose no meio, foram testados três concentrações de meios adicionais de alimentação e o meio contendo 5 g/L de glicose e 5 mM de glutamina produziu a maior expressão de rFVII de 20 mg/L durante 10 dias cultura de suspensão. Análises da densidade celular e do ciclo celular obtiveram uma alta porcentagem de células na fase estacionária e na fase exponencial. Em resumo, de acordo com os autores a expressão de rFVII foi melhorada com sucesso através da otimização do peptídeo sinal e a alimentação com meio fresco.<sup>94</sup>

Outro biorreator disponível para modos de cultivo em batelada alimentada, combina a conveniência de um sistema descartável, dada a facilidade de substituição de bolsas de cultivo a cada novo processo, conseqüentemente reduzindo risco de contaminação com o conhecido sistema STR. Os chamados SUBs, HyClone S.U.B®, Millipore® (CellReady™), ou Xcellerex® (XDR™), por meio de ondulações promovidas pelo balanço de uma plataforma com função sigmoideal e alta sensibilidade, utilizam bolsas de plástico estéril (CellBag™) contendo meio de cultivo e uma mistura de gases de interesse seletivo para cultura celular e produção de proteínas<sup>116-118</sup> (Figura 6).



**Figura 6.** Estrutura e componentes do biorreator WAVE. Fonte: (CARVALHO, S.Lucas et al.,2017)<sup>119</sup>

Conforme apresentado pela Figura 6, o meio de cultura em movimento tem seu fluido distribuído de acordo com o ângulo de balanço, influenciado também pelo volume de cultura e a geometria da *bag* em ambos os lados do ponto de rotação. O controle desse sistema

análogo ao STR que alia taxa de aeração, ângulo de balanço, taxa de balanço e volume de cultura no oxigênio com base no número de Reynolds (variável adimensional que está relacionada com o grau de turbulência no sistema), provoca um aumento na eficiência do processo de cultivo celular entre os ângulos máximos positivos e negativos do movimento de balanço.<sup>116-118</sup>

É possível estudar e analisar modos de produção usando o cultivo contínuo com reciclo de células, o qual opera com uma vazão de substrato na entrada e um fluxo de saída contendo células, produto e substrato não consumido. Essa retirada de células pode ser reciclada parcialmente ou em sua totalidade, mantendo a quantidade de células produtoras proporcional ao volume de trabalho e garantindo o número máximo de passagens, viabilidade celular do lote utilizado, diminuindo assim os custos de produção e aumentando as possibilidades em produções com grandes volumes de trabalho.<sup>107,120,121</sup> Já cultivos contínuos com retenção das células, com o intuito de minimizar a baixa produtividade volumétrica do processo com reciclo de células, devem estabelecer um fluxo de alimentação de meio fresco e um fluxo de saída para a remoção do produto formado. A diferença entre os dois processos está nos equipamentos de retenção acoplados à saída do fluxo no cultivo contínuo com retenção, já que a partir do fluxo de saída são produzidos dois fluxos: o sobrenadante isento ou quase isento de células, contendo o produto de interesse e as células concentradas, que são constantemente recicladas no biorreator.<sup>122</sup>

Estudos utilizando uma linhagem celular híbrida humana, F2N78, desenvolvida a partir da fusão somática de células HEK 293 para a produção mAbs analisaram o desempenho da cultura em batelada alimentada e culturas em perfusão. Durante a produção em modo de perfusão, a viabilidade celular foi mantida acima de 90%, enquanto que no modo batelada alimentada foi significativamente diminuído após o 7º dia de cultivo e a densidade celular viável foi mantida  $> 1,0 \times 10^7$  células/mL para perfusão e  $7,5 \times 10^6$  células/mL em batelada alimentada. Além da produção obter 1,8 vezes mais mAbs durante a perfusão, houve também diferenças aparentes na qualidade das proteínas produzidas. As proteínas produzidas em batelada alimentada variaram devido ao acúmulo de amônia e pressão osmótica. A cultura de perfusão foi capaz de produzir mais de 4000 mg da quantidade total de IgG, enquanto a cultura em batelada alimentada produziu menos de 1000 mg de quantidade de IgG devido à queda precoce de viabilidade e densidade celular durante os ensaio de batelada alimentada, limitada pela fonte de carbono durante o intervalo de alimentação das células, demonstrando que o processo de perfusão durante a produção de mAbs se mostrou mais eficiente.<sup>123</sup>

## 2.5 Escalonamento de produção

A ampliação e manutenção da cultura de células de mamíferos é problema recorrente no processo de produção industrial. Quando se reporta a produção de r-proteínas em células de mamíferos, dificuldades são encontradas, tanto com relação ao custo de produção quanto a eficácia do processo a fim de garantir o produto final para suprir as demandas do mercado.<sup>4,82</sup>

O conceito central no aumento da eficiência no processo de escalonamento está intimamente relacionado entre o aderente, o contato induzido, e a cultura celular. Este conceito busca a maximização da área superficial de crescimento no volume do vaso ou plataforma de cultura. Quanto maior a área de superfície de crescimento incorporada em um determinado volume, maior quantidade de células será produzida a partir desse volume, criando assim, um processo mais eficiente.<sup>124</sup>

Como o cultivo de células de mamíferos requer maior controle das condições de meio de cultura, em especial para células HEK293T: suprimento de CO<sub>2</sub> a 5% e cuidados com estresse mecânico, dada as densidades celulares de inóculo que variam entre 2x10<sup>5</sup> e 1x10<sup>6</sup> células/mL em grandes volumes de sobrenadante de cultura. Então, a viabilidade e a produtividade celular são dadas pelo aumento do volume de trabalho atrelado ao biorreator escolhido para produção, juntamente com o aumento na densidade celular dependente da adaptação da linhagem celular.<sup>125</sup>

Durante a ampliação do processo, a transferência de oxigênio, homogeneidade do meio, acúmulo de resíduos e sensibilidade ao cisalhamento deverão ser considerados para construção do bioprocessos e da escolha do biorreator.<sup>3</sup> Além dos parâmetros físicos citados, há uma dependência de nutrientes disponíveis e da formulação dos meios de cultura e das alimentações; pH e a osmolalidade do meio de cultivo; e o oxigênio dissolvido. Todas as variáveis podem ter um efeito significativo tanto na formação das estruturas dos glicanos nas r-proteínas produzidas pelas células durante a fase exponencial e estacionária no processo, como no controle da heterogeneidade do sistema.<sup>126,127</sup>

Quando trata-se de cultivo celular em mamíferos em grande escala esses critérios citados influenciam diretamente na produtividade volumétrica do processo e aos efeitos do estresse mecânico. Fatores críticos como: estabilidade, crescimento e densidade celular serão determinados pela resistência ao cisalhamento e por todas as fases adaptativas de crescimento as quais as células são submetidas. Para que a produtividade seja alcançada, é importante enfatizar e definir os critérios de avaliação da capacidade celular em suportar o sistema sendo eles: viabilidade celular e progressão na concentração de células viáveis. Então, para



conseguir aumentar sua produtividade em sua totalidade durante o escalonamento deve-se incluir desde as fases de adaptação e crescimento celular – importantes para o desenvolvimento do aumento de escala – nos biorreatores até as avaliações de impacto das células – sensibilidade ao cisalhamento – no biorreator visando a produtividade,<sup>128</sup> definindo assim o processo de produção como consistente ou não.

### **2.5.1 Condições e características de cultivo de células de mamífero**

Como o aumento de volume de trabalho movimenta maior produtividade e densidade celular, o pH disponível no meio de cultura pode auxiliar ou impedir a adesão celular e baixas de pHs prejudicam o funcionamento vital das células. O menor pH aceitável é 7,0 e abaixo de 6,8, há inibição total do crescimento. Essas variações de pH acontecem durante o ciclo celular, após retroalimentação do meio e atuam diretamente na adesão e distribuição celular.<sup>129</sup> Durante a retroalimentação do sistema, é importante controlar a osmolalidade do sistema - sais à base de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{HCO}_3^-$  influenciam diretamente, então a presença desses sais nas formulações do meio usado podem desequilibrar o sistema.<sup>108</sup> Os valores para uma osmolalidade adequada nos cultivos de células animais variam entre 260 e 320 mOsm/kg.<sup>130</sup>

A proliferação celular e os processos de adesão podem ser contornados com a manipulação de meios suplementados com fatores de crescimento, hidrolisados de plantas ou derivados de animais. Para a indústria, o uso de derivados de animais deve ser carenciado ao máximo, devido ao risco de contaminação e biossegurança, como também a identificação de príons como o agente causador de encefalopatias espongiformes transmissíveis. Outro ponto considerado é a dificuldade de processamento e altos custos de purificação durante as etapas de purificação.<sup>131</sup>

Outro fator relevante que une o controle de pH e a proliferação celular, além do controle inibitório da cultura celular, são as concentrações de nutrientes disponíveis no meio, os quais devem ser o mais constante e homogêneo possível na presença de produtos tóxicos do metabolismo. É válido ressaltar que o aumento da osmolalidade pode promover um acréscimo na produção específica das células, mas não necessariamente um aumento significativo da concentração de produto no meio, já que o estresse hiperosmótico pode induzir a apoptose ou a necrose celular, reduzindo a concentração de células.<sup>130</sup>

Durante o cultivo celular, a alimentação de fonte de carbono é rotineiramente utilizada para facilitar o crescimento celular, e uma variedade de componentes e hidrolisados que contêm glicose, aminoácidos, lipídios e outros fatores para manter a cultura são usados.<sup>132,133</sup> Mas deve-se ressaltar que a alimentação de glicose pode ocasionar o acúmulo prejudicial de lactato e amônio, subproduto da metabolização meios de cultura.<sup>134,135</sup> O controle desses efeitos de inibição da proteína produção e alteração da glicosilação nas proteínas produzidas podem ser contornados por meio de adição diária de baixas concentrações de glutamina ao invés de adição de meio fresco completo com altas concentrações de glicose e glutamina evitando-se esse acúmulo desnecessário.<sup>113,136</sup>

A alta sensibilidade ao cisalhamento nas células de mamífero implicam aos bioprocessos empregados às essas células uma tendência a reduzir a intensidade de agitação no sistema, buscando equilibrar a necessidade de um ambiente homogêneo, as trocas ou transferências de oxigênio efetivas e a tendência de agregação excessiva dessas células nas superfícies de contato, microcarreadores, e ao cisalhamento desequilibrando a produtividade específica dessas células.<sup>137</sup>

Com relação aos microcarreadores usados durante os cultivos, para ancoragem celular e adaptação das células em suspensão, é possível obter um rendimento de até 200 milhões de células por mililitro devido ao aumento na área superficial da cultura, mesmo em pequenos volumes de trabalho. Dado o aumento da área de contato por unidade de volume, cerca de  $20\text{cm}^2/\text{mL}$ , e diâmetro que varia de 100-300  $\mu\text{m}$ , a densidade celular quando comparados as culturas de monocamadas em garrafas de cultivo atingem melhores confluências, já que são distribuídos homogêneo no meio facilitando o fornecimento de nutrientes e eliminação de subprodutos metabólicos e as transferências gasosas. Geralmente são escolhidas superfícies recobertas por colágeno, mas podem ser compostas por polímeros, celulose, dextrano ou gelatina. A matriz desses microcarreadores é biologicamente inerte e fornece um substrato forte, mas não rígido, capaz de suportar a agitação do meio dentro dos biorreatores e manter-se disperso homogêneo durante a confluência celular.<sup>129,137</sup>

Foram analisados os efeitos no crescimento, produção e metabolismo celular em células CHO produzindo fosfatase alcalina placentária humana (SEAP) com três diferentes condições de cultura, sendo eles: (a) crescimento livre em suspensão, (b) uso de microcarreador Cytodex 3 e (c) microcarreador Cytopore 1. O crescimento celular variou entre a cultura em suspensão e as culturas com microcarreadores. As células aderidas aos carreadores tenderam ao cisalhamento e ao estresse pela agitação e forças hidrodinâmicas. Notou-se uma melhor

atividade metabólica para a cultura Cytodex 3, evidenciado pelo consumo maior de glicose e glutamina variando entre 0,5-1 g a mais para demais culturas e produção de lactato superior a 10mM para as demais culturas. A produtividade específica de SEAP analisadas refletiu esse melhor desempenho, o qual para culturas Cytodex 3 obtiveram 15% densidades celular viável e 33% de produtividade específica em comparação a cultura Cytopore 1 que obteve valores aproximadamente 4 vezes menor para densidade celular e produtividade específica. Segundo os autores os contrastes encontrados nas células CHO produtoras e na produtividade específica das culturas, as culturas em suspensão ainda foram a mais alta já que não houve efeitos negativos de cisalhamento, seguido pelas culturas Cytodex 3 e Cytopore 1.<sup>138</sup>

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi a adaptação das células HEK 293T produtoras de rhPDGF-BB com crescimento aderente a superfície em cultivos com garrafas, sistema Fibra Stage e *spinners* para estudo detalhado de crescimento, viabilidade celular e metabolismo.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

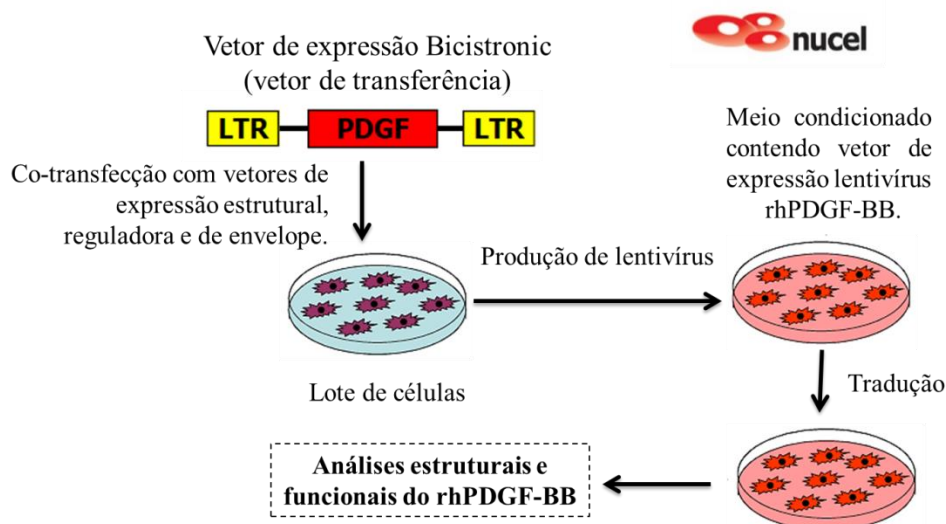
- Adaptar e cultivar células HEK 293T aderentes superprodutores de proteína rhPDGF-BB;
- Escalonar a produção em frascos do tipo *Fibra Stage* e *spinner*;
- Avaliar o desempenho com relação a adaptação e metabolismo celular em ambos frascos;
- Comparar e delinear a melhor condição de cultivo visando a adaptação ao cultivo em suspensão para produção de rhPDGF-BB em HEK 293T.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 Obtenção dos clones superprodutores rhPDGF-BB**

O cDNA de PDGF-BB foi obtido a partir de RNA de fibroblastos ou megacariócitos utilizando a reação de transcrição reversa com primers específicos para PDGF-B. O cDNA foi clonado no vetor pNU-0, que contém todos os elementos do vetor pIQ-ID com exceção da região de recombinação Gateway. A avaliação da integridade da sequência do PDGF-BB foi

verificada por sequenciamento de DNA. Segue-se a clonagem em vetor lentiviral contendo gene eGFP e essas partículas lentivirais se tornaram funcionais produzindo PDGF-B em linhagem 293T (Figura 7).



**Figura 7.** Linha de produção de rhPDGF-BB realizada pelo NUCEL.

Conforme descrito na Figura 7, os clones super produtores de rhPDGF-BB foram obtidos e testados no Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) incorporado à Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo (USP) e cedidos a esta pesquisa em agosto de 2017. Para delinear e analisar o melhor perfil comportamental dessas células, foi considerado como 1ª passagem o subcultivo realizado em nosso laboratório (subcultivo 1) e serviu como comparativo para processos posteriores.

O número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e microscópio com contraste de fase. A viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão por *Trypan*.<sup>130</sup>

#### 4.2 Elaboração de meio de cultura

O meio de cultivo utilizado foi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco – ref 12100-046) (Tabela 1) tamponado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB) e concentrações variáveis de [2-10% v/ v].

**Tabela 1. Composição do meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)**

Componentes	Concentração (mg/L)
AMINOÁCIDOS	
Glicina	30,0
Cloridrato de L-Arginina	84,0
L-cistina 2HCl	63,0
L-Glutamina	584,0
Cloridrato de L-Histidina-H <sub>2</sub> O	42,0
L-isoleucina	105,0
L-Leucina	105,0
Cloridrato de L-Lisina	183,0
L-metionina	146,0
L-fenilalanina	30,0
L-Serine	66,0
L-Treonina	42,0
L-triptofano	95,0
Di-hidrato de sal dissódico de L-tirosina	16,0
L-valina	104,0
VITAMINAS	
Cloreto de colina	4,0
Pantotenato de D-cálcio	4,0
Ácido fólico	4,0
Niacinamida	4,0
Cloridrato de piridoxina	4,0
Riboflavina	0,4
Cloridrato de tiamina	4,0
I-Inositol	7,2
SAIS INORGÂNICOS	
Cloreto de Cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	200,0
Nitrato férrico (Fe (NO <sub>3</sub> ))	0,1
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	97,67
Cloreto de Potássio (KCl)	400,0
Cloreto de Sódio (NaCl)	6400,0
Fosfato de sódio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	125,0
OUTROS	
D-Glicose (Dextrose)	4500,0
Vermelho de fenol	15,0

Fonte: Dulbecco, R. and Freeman, G. (1959) *Virology* 8:396<sup>139</sup>

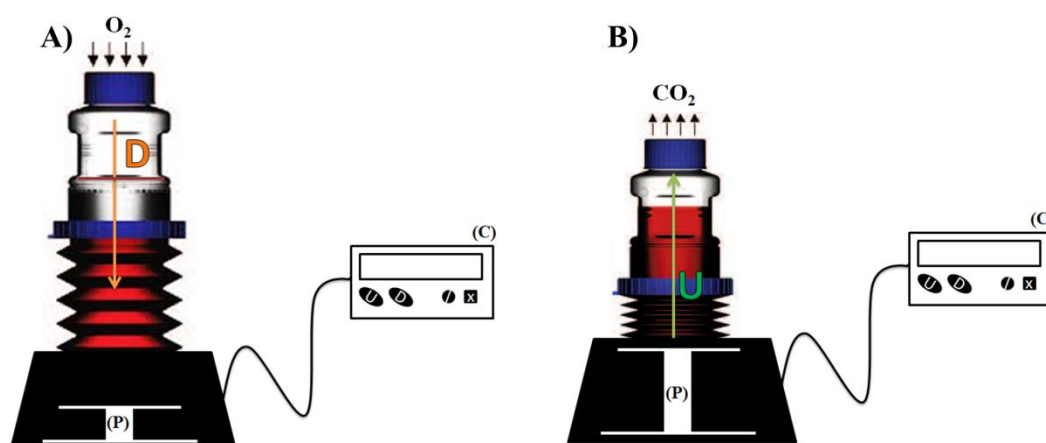
### 4.3 Adaptação e cultivo celular aderente em frascos

As células de linhagem 293T produtoras de rhPDGF-BB foram cultivadas em garrafas com volume de trabalho 5-15 mL em adesão à superfície, temperatura 37 °C em incubadora

com circulação de CO<sub>2</sub> 5% saturado em umidade. O número de células neste cultivo foi de 1,0x10<sup>5</sup> células/mL.

#### 4.4 Adaptação e cultivo celular em suspensão em Fibra Stage

As células de linhagem HEK 293T produtoras de rhPDGF-BB foram cultivadas no FibraStage® (New Brunswick Scientific) (Figura 8), um sistema em leito fluidizado descartável, com volume de trabalho 500 mL e crescimento aderido em 10 g de discos FibraCel® (Polipropileno e fibra de poliéster não-tecido), temperatura 37 °C em incubadora com circulação de CO<sub>2</sub> 5% saturado em umidade. A velocidade do fluxo de subida (U- *Up*) e descida (D- *Down*) do meio foi 1,5 mm/seg com 10seg de tempo de retenção conforme instruções do fabricante (Figura 8).



**Figura 8.** Estrutura FibraStage ligado a plataforma (P) e ao controlador (C). A) Ilustração do movimento de descida (D) do meio; B) Ilustração do movimento de subida (U) do meio. Adaptado: <http://www.knbs.co.kr/pdf/fibrastagebrochure.pdf>

Como descrito na Figura 8, quando a plataforma (P) é ligada a sanfona localizada na base do frasco movimenta o meio contido dentro da garrafa descrito pela seta laranja (D) na Figura 8A permitindo a expansão e o compressão do meio, deixando os discos cobertos por apenas uma película fina de líquido, a qual auxilia na transferência de oxigênio e na remoção do excesso de CO<sub>2</sub>. Quando a plataforma (P) acoplada à garrafa é comprimida, o meio é forçado para fora da sanfona, transbordado sobre as células por meio de um orifício no meio da garrafa, conforme descrito, pela seta verde (U) na Figura 8B. Essa movimentação também facilita a absorção de nutrientes e a remoção de resíduos celulares. Todo o controle no tempo

de subida e descida do meio e o tempo de retenção em ambas posições são controladas e monitoradas pelo visor de controle (C).

O meio de cultivo utilizado foi DMEM enriquecido com [2% v/v] de SFB. Foram realizados ensaios em duplicatas usando esse sistema. Os cultivos celulares com 13 dias (576 h) foram inoculados com  $5,0 \times 10^7$  células/mL para ambos ensaios. Foram analisados nos meios metabolizados a relação do consumo de glicose e produção de lactato e glutamina. Durante o cultivo foi realizado controle do pH e monitoramento da aparência colorimétrica do meio.

#### **4.5 Adaptação e cultivo celular a microcarreadores em *spinner***

Foram realizados ensaios de adesão celular a microcarreadores composto de uma camada superficial de colágeno desnaturado  $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  covalentemente ligado a uma matriz de dextrana - Cytodex 3 (GE®) - na proporção 5 g de Cytodex 3 hidratados com 500 mL PBS (livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) por 3 horas à temperatura ambiente com agitação eventual e esterilizado em autoclave por 15-20 min à  $121^\circ\text{C}$ .

O cultivo celular foi realizado em frasco tipo *spinner* de 250 mL contendo 100 mL de volume de trabalho com meio DMEM enriquecido com 10% SFB sob agitação magnética à 30-60 rpm com 20 dias de cultivo (480h) com concentração 3g/L de microcarreadores e inóculo de  $2,0 \times 10^7$  células/mL a  $37^\circ\text{C}$  em incubadora com circulação de  $\text{CO}_2$  e 5% saturado em umidade.

#### **4.6 Remoção das células aderidas ao microcarreador**

Para realizar a contagem de células viáveis e não viáveis das células aderidas ao microcarreador as amostras contendo 1 mL de meio condicionado e Cytodex 3 foram lavadas com 2mL de tampão fosfato salina (PBS) e após 10 min o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado tripsina+PBS+EDTA 1:1 e incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 15 min. O sobrenadante e foi removido e agrupado com 2mL de meio DMEM + 10% SFB e centrifugado à 5.000 rpm por 3 min. As células decantadas foram ressuspensas com 2 mL PBS + tripan 0,05%.<sup>140</sup>

#### **4.6 Concentração de células e viabilidade celular**

A concentração celular foi determinada pelo método da exclusão por azul de tripan<sup>130</sup> dada pela diferença entre a contagem de células totais viáveis e não-viáveis e realizada em câmara de Neubauer (Equação 1). Foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  da suspensão da amostra com o

corante azul de tripan na câmara de contagem e visualizadas em microscópio óptico. A viabilidade foi calculada a partir da razão entre a concentração de células viáveis (não coradas com azul de tripan) e a concentração de células totais (coradas e não coradas) em percentual. Quando necessário foi realizada diluição da amostra em tampão fosfato salina (PBS).<sup>140</sup>

$$X_{TOTALS} - X_{MORTAS} = X_{VIÁVEIS} \quad (\text{Equação 1), sendo}$$

$X_{TOTALS}$  : Células totais viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas);

$X_{MORTAS}$  : Células não viáveis (coradas);

$X_{VIÁVEIS}$  : Células viáveis não coradas (coradas).

#### **4.7 Análises de metabólitos residuais do meio de cultivo**

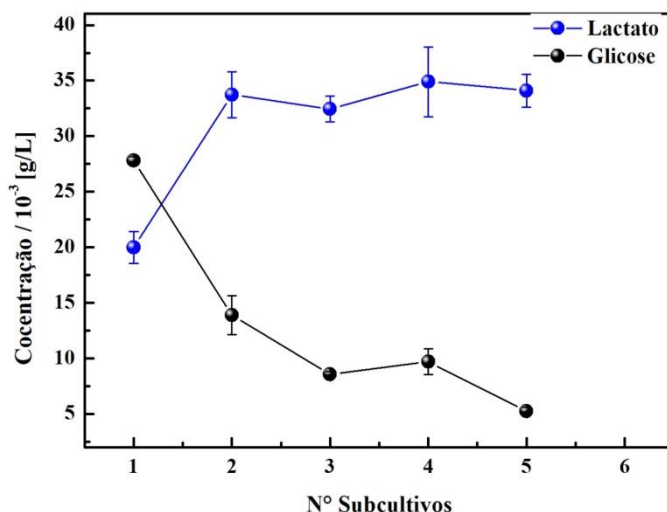
As análises do consumo de glicose, lactato e glutamina foram analisadas em alíquotas com um intervalo de cultura de 72 h / 120 h / 168 h para sistema FibraStage, *spinner* e garrafas de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup>, utilizando-se fotometria de ponto final com sistema colorimétrico para determinação de glicose HK Liquiform (Labtest- ref.: 133) medidas da absorbância em 505 nm, sistema colorimétrico para a determinação quantitativa do lactato enzimático (Labtest – ref.: 138) medidas de absorbância em 550 nm (conforme instruções do fabricante) e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), modelo Flexar da PerkinElmer, coluna de exclusão iônica Shim-pack SCR-101H (SHIMADZU) para análises das concentrações de glicose, lactato e glutamina dos meios condicionados. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 5 mM, sob fluxo de 0,6 mL/min e a temperatura fixada em 40 °C. As análises colorimétricas e em cromatografia foram realizadas pelas integrantes do projeto Caterina Gioia e Nátalia Oliveira.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1 Ensaios de adaptação celular em frascos e Fibra Stage**



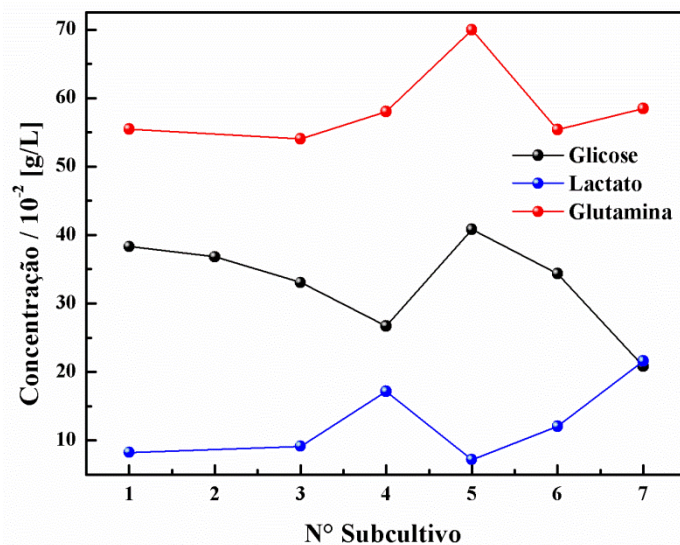
Após o recebimento das linhagem celular cedida pelo NUCCEL, as células HEK293T superprodutoras foram adaptadas ao crescimento em garrafas de cultivo estacionário com 25 cm<sup>2</sup> (T25) e expansão para 75 cm<sup>2</sup> (T75) (Figura 9).



**Figura 9.** Concentração de glicose e lactato residual durante a fase de crescimento nas garrafas T75 analisadas por fotometria. Número de subcultivos: 48 h. Lactato (azul) e Glicose (preto). Fator de divisão eixo y 10<sup>-3</sup>.

Foram medidas por colorimetria as concentrações de glicose e lactato residual dos meios condicionados das garrafas T75 durante os cinco primeiros subcultivos com intervalos de 48 h delineando um perfil inicial dessas células como mostra a Figura 9. A medida em que o número de horas aumentou com a sequência dos subcultivos, a glicose disponível no meio foi progressivamente consumida, uma redução média de  $5,63 \times 10^{-5}$  g/L ao longo dos 5 subcultivos, inversamente proporcional ao nível de lactato detectado, um aumento médio de  $3,9 \times 10^{-5}$  g/L ao longo desses mesmos subcultivos. Essa relação reflete o início da fase de crescimento exponencial da cultura, a qual as células consomem mais glicose para o crescimento e manutenção das funções vitais e redirecionam a fonte de carbono, já que esta é a fonte primária para a produção de compostos energéticos e precursores para a síntese de biomassa.<sup>141</sup>

Com o intuito de avaliar e descrever o metabolismo e o desempenho celular nas garrafas estacionárias as alíquotas de meio condicionado foram submetidas a análise em HPLC para melhor compreensão do perfil metabólico produzido (Figura 10).



**Figura 10.** Concentração residual de glicose, lactato e glutamina na fase de crescimento das garrafas T75 por HPLC. Glicose (preto), Lactato (azul) e Glutamina (vermelho). Fator de divisão eixo y  $10^{-2}$ .

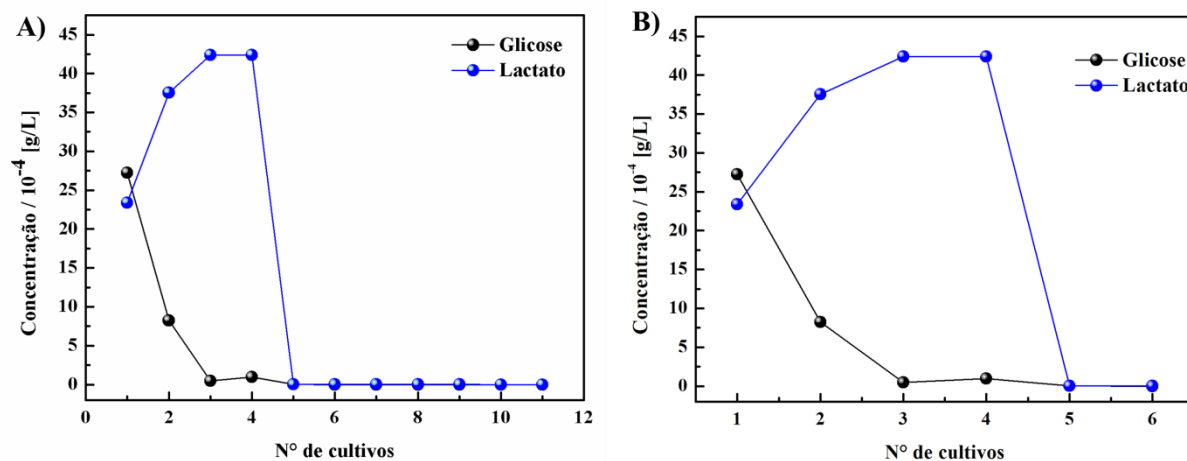
Para as análises em HPLC além dos níveis de glicose e lactato residual, foi detectado também os níveis de glutamina como apresentado na Figura 10. Este metabólito é capaz de descrever possíveis inibições de crescimento celular já que a presença de amônia, um sub produto oriundo da reação de glutaminase, possui efeito tóxico evidente ainda que em concentrações 10 vezes menores em relação ao lactato.<sup>142</sup>

O perfil metabólico durante os subcultivos manteve uma linearidade de consumo de glicose médio de 0,04 g/L no intervalo do 1º ao 4º subcultivo, totalizando 96 h e no mesmo intervalo a produção de lactato aumentou em média 0,03 g/L. Durante o 2º subcultivo das garrafas, com 48h incluídos no intervalo entre o 2º e o 3º ponto da curva, os níveis de lactato e glutamina residual não foram detectados, indicando consumo de glicose para produção de biomassa, aumentando o crescimento celular.

No 5º subcultivo (120 h), os níveis de glicose glutamina e lactato residual eram 0,4 g/L, 0,7 g/L e 0,07 g/L, respectivamente. Isso demonstra que os níveis de glicose e glutamina encontravam-se aproximadamente no mesmo nível de concentração que reflete uma fase estacionária antecipada ou uma metabolização mais lenta dessas células em função da desregulação das células. A partir desse ponto, os níveis de glicose e glutamina residual foram decaindo em média 0,1 g/L e 0,08 g/L respectivamente, e em contra partida o nível e lactato aumentou em média 0,09 g/L que reflete outra mudança no metabolismo das células, devido à disponibilidade de glicose e glutamina no meio para consumo. Houve reinício do crescimento

celular estendendo-se até o final do subcultivo, marcado pela concentração residual de glicose e lactato em 0,2 g/L.

Após a confirmação da fase de crescimento exponencial das células nas garrafas T75, a produção foi escalonada para um volume de 500 mL utilizando-se sistema de cultura de leito fixo descartável FibraStage® e foram retiradas alíquotas do meio condicionado em intervalos 48 e 72 h e analisadas por colorimetria (Figura 11).

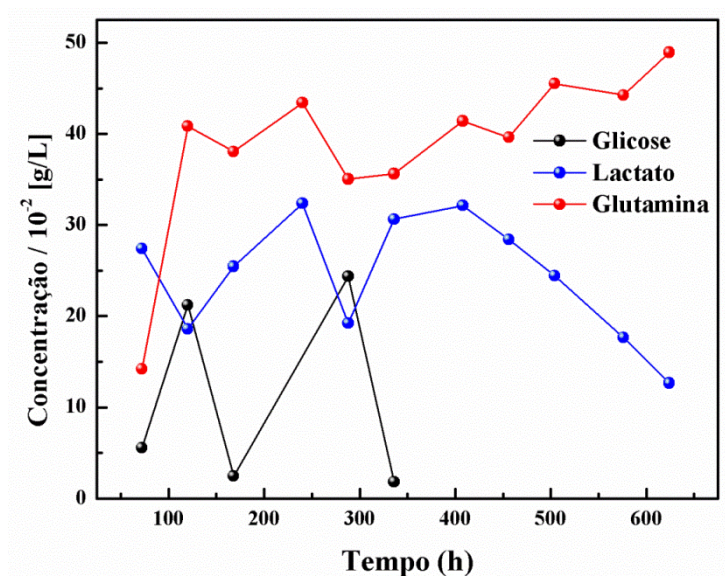


**Figura 11.** Concentração residual de glicose e lactato no 1° ensaio FibraStage por fotometria. Lactato (azul) e Glicose (preto). Fator de divisão eixo y 10<sup>-4</sup>. A) Perfil metabólico de todos os cultivos B) Os seis primeiros pontos de cultivo.

O perfil metabólico obtido a partir da colorimetria dos meios ao longo do 1° ensaio do FibraStage pode ser observado na Figura 11A. Os níveis de glicose e lactato variaram apenas nos cinco primeiros pontos para ambos os metabólitos, o que sugere morte celular após 300h aproximadamente. Observando apenas os primeiros cinco pontos de cultivo (Figura 11B) os níveis de glicose e lactato residual variaram inversamente, já que após conversão de glicose em piruvato juntamente com a oxidação do NADH e a ação da lactato *desidrogenase* o piruvato é convertido a lactato que representa o desvio do fluxo do carbono para produção de biomassa.<sup>143</sup> A concentração de glicose foi consumida em média  $9 \times 10^{-5}$  g/L a medida que o número de cultivo aumentava, já a produção de lactato alcançou uma média de  $1,18 \times 10^{-4}$  g/L levando em consideração que entre o 3° e 4° cultivo o nível se manteve similar tanto para glicose como para lactato, indicando metabolização lenta ou fase estacionária das células.

Como observado nas imagens (Figura 11A e B), a ausência de valores de concentração de glicose e lactato residual a partir do 5° cultivo (300 h) geraram dúvida, podendo estar atrelada a problemas de detecção da técnica ou a fatores externos como a incubadora de CO<sub>2</sub> e sua redistribuição de ar. Para analisar melhor essa oscilação ou não detecção e entender a

ausência de sinal de metabolização dessas células, as amostras foram submetidas a análise em HPLC (Figura 12).



**Figura 12.** Concentração residual de glicose, lactato e glutamina no 1º ensaio FibraStage por HPLC. Glicose (preto), Lactato (azul) e Glutamina (vermelho). Fator de divisão eixo y  $10^{-2}$ .

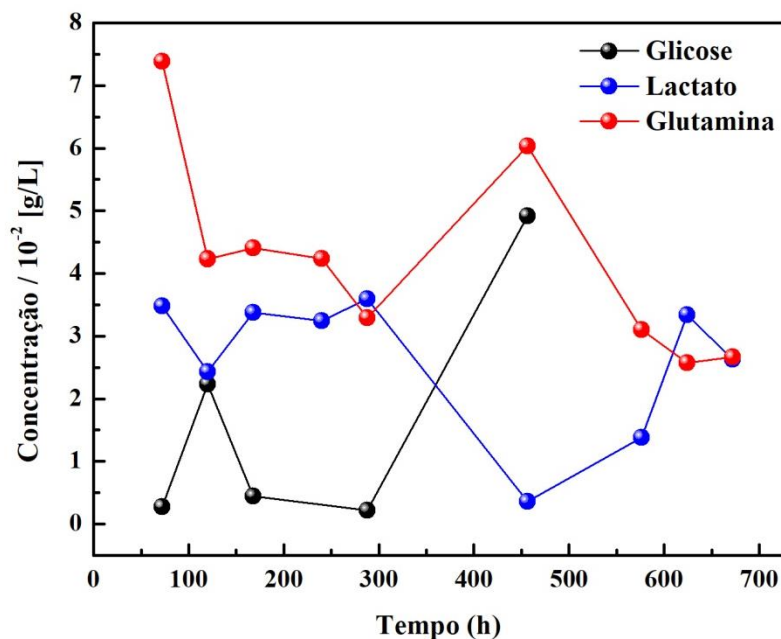
Após submetidas ao HPLC o perfil das amostras do 1º ensaio do FibraStage demonstraram diferenças com relação as ensaios colorimétricos (Figura 12). Os níveis de glicose e lactato residual foram detectados até o 5º cultivo e 11º cultivo, respectivamente. Essa diferença de detecção está relacionada com a afinidade e seguridade da técnica escolhida, já que a análise para açúcares possuem alta seletividade em relação aos diferentes monossacarídeos e dissacarídeos que são quantificados simultaneamente em uma única análise e a recuperação e coeficiente de variação são precisos.<sup>144</sup> Para as análises colorimétricas a qualidade dos resultados obtidos está relacionada com homogeneização das soluções já que a medição é realizada pela intensidade da luz absorvida pela amostra e a calibração da absorbância é limitada interferindo no resultado obtido.<sup>145</sup>

No tempo 240 h de cultivo não foi quantificável a concentração de glicose residual devido sinal inferior ao limite de detecção do equipamento, correspondente ao intervalo do 3-4º da Figura 12, corroborando do resultado obtido pelo teste colorimétrico que apresentaram concentração entre 0-2 g/L. Ainda no 4º ponto, os níveis de lactato e glutamina residual alcançaram 0,32 g/L e 0,40 g/L respectivamente e registrou-se uma mudança de pH no meio de 7,2 para 7,0 que sinaliza inibição do crescimento. Então neste ponto de cultivo (240 h), foi realizada troca total de meio DMEM + 2% SFB (v/v), reajustando o pH para 7,2.

O término da quantificação de glicose residual pelo aparelho acontece após o 5º ponto (336 h) do cultivo, entretanto os níveis de lactato e glutamina se estendem até o último ponto de cultivo (600 h). Separando a curva de metabólitos em dois momentos: presença de glicose e ausência de glicose. Durante os seis últimos pontos cultivados, ausência de glicose, pode-se perceber as oscilações na concentração de glutamina que se alternou a medida em que a concentração de lactato decaiu até o fim do experimento. Nesse intervalo a concentração de lactato decaiu uma média 0,05 g/L alcançando 0,13 g/L de lactato residual no último ponto de cultivo. As mudanças observadas nesse período estão relacionadas com o consumo de lactato pelas células devido à concentração crítica de glicose no meio. Apesar dos potenciais efeitos deletérios sobre o crescimento e a formação de produto, o lactato também pode servir como fonte de carbono e de energia para as células, principalmente quando a glicose se esgota.<sup>114</sup>

Outra oscilação detectada foi a relação entre o aumento da concentração de lactato e o aumento simultâneo da concentração de glutamina no 7º ponto de cultivo. O aumento rápido de 0,06 g/L na concentração de glutamina, aliada a dificuldade de absorção de glicose igualitária pelas células no interior do FibraStage, neste ponto podem ter gerado um processo reverso no fluxo metabólico das células em virtude da sua participação no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) nas mitocôndrias, produzindo lactato a partir desses aminoácidos para manutenção do crescimento celular dentro do sistema.<sup>146</sup>

Como as concentrações oscilaram muito a partir da metade do experimento, devido ao estado fisiológico inconstante das células, esperado para esse modo de operação em leito fixo descartável, o ensaio no sistema FibraStage foi repetido (Figura 13).



**Figura 13.** Concentração residual de glicose, lactato e glutamina no 2º ensaio Fibrastage por HPLC. Glicose (preto), Lactato (azul) e Glutamina (vermelho). Fator de divisão eixo y  $10^{-2}$ .

No segundo ensaio do Fibrastage as alíquotas retiradas durante os cultivos foram submetidas diretamente ao HPLC (Figura 13). Os valores de lactato, glutamina e glicose residual oscilaram indicando diferentes tempos de metabolização do meio durante o cultivo celular. E as concentrações de glicose residual após 5º ponto de cultivo (450 h) não foram detectáveis pelo HPLC, devido à concentrações mais baixas que o limite de detecção do aparelho.

Com 240 h de experimento a concentração residual de glicose entre o 3º e 4º ponto de cultivo, também não foi quantificada devido baixo limite de detecção. Neste mesmo intervalo, o pH do meio de cultivo caiu à 7 e foi realizado troca total de meio DMEM + 2% SFB (v/v). Evidências de paralisação do crescimento celular exponencial e/ou manutenção lenta do metabolismo celular foram representados pelos níveis de lactato e glutamina que oscilaram nesse intervalo entre 0,01-0,03 g/L e 0,02-0,1 g/L, respectivamente.

O intervalo referente ao 4º e 5º ponto (300-450 h) de cultivo apresentou uma crescente na concentração de glicose e glutamina residual em contra partida um declínio na concentração de lactato. Essa crescente nas concentrações de glicose residual está relacionada com o reequilíbrio da concentração de glicose disponível no meio devido à troca total de meio DMEM + 2% SFB (v/v). Com relação aos níveis de lactato e glutamina, no 5º ponto (300 h) de cultivo para ambos, nota-se uma mudança metabólica, a qual a concentração de lactato sobressai a glutamina com uma diferença de 0,03 g/L.

No tempo 450 h foi detectado o segundo maior pico de concentração de glutamina, sugerindo estresse celular, ainda que o nível de lactato detectado tenha sido próximo a 0. Essa discrepância de glutamina após esse ponto da curva de crescimento poderia significar uma total inibição do crescimento celular devido a presença de amônia –subproduto do metabolismo da glutamina – que altera o pH intracelular no citoplasma ou nos lisossomos e facilita apoptose celular.<sup>147</sup> Porém os níveis de glicose residual detectados não foram detectados, indicando não apenas o funcionamento celular, como altas taxas de densidade celular, visto o alto consumo desse metabólito no sistema.

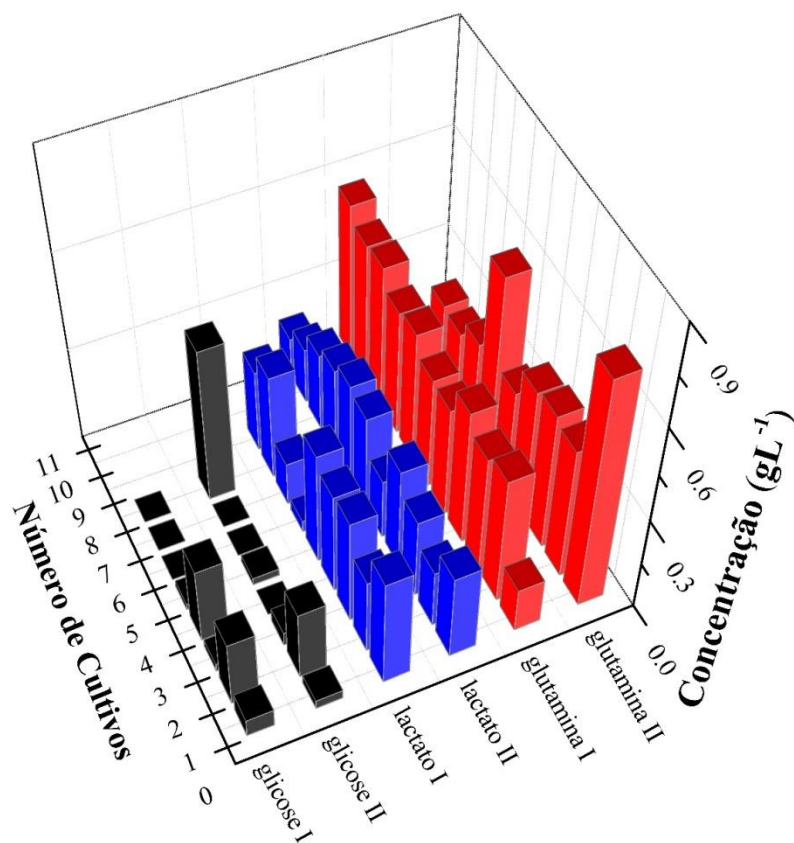
Em fibroblastos humanos sob condição limitada de glicose, a glutamina é consumida como a principal fonte de energia para o crescimento.<sup>148</sup> Então, considerando a formação de *clusters* e o baixo nível de concentração de glicose disponível no meio é observado o nível de glutamina decair até o fim do experimento, indicando um consumo desse metabólito para manutenção das funções vitais e produção de biomassa.

Ainda com relação ao 5° ponto de glicose residual, ao compará-lo com o 6° ponto para lactato e glutamina residual, identificou-se outra mudança metabólica. Verificou-se o decaimento da concentração de lactato com relação ao ponto anterior e um aumento da glutamina também com relação ao ponto anterior. Considerando as 456 h de cultivo do sistema, percebeu-se a concentração de glutamina residual 0,6 g/L próxima aos valores de glicose 0,5 g/L e a concentração de lactato 0,04 g/L próximo a zero, o que pode ter sido fortemente influenciada pela osmolalidade do meio, já que a concentração de glicose atingiu outro equilíbrio após a troca de meio total.

No intervalo de 576 a 672 h percebe-se uma redução média de 0,28 g/L na concentração de glutamina e um aumento médio de 0,25 g/L na taxa de lactato, o consumo de glicose relacionado à alta concentração de células viáveis dentro do sistema foi capaz de consumir toda a concentração de glicose residual do meio, ainda que no 7° ponto tenha sido realizado troca parcial de meio DMEM + 2% SFB(v/v). Isso representa uma mudança na velocidade de consumo dos nutrientes pelas células ligadas ao desregulamento típico em células de mamífero.<sup>149</sup>

Em virtude dessa variação de metabólitos residuais no meio durante os dois ensaios utilizando-se FibraStage foi realizado um comparativo entre os dois cultivos (Figura 14).





**Figura 14.** Comparativo do perfil metabólico do meio condicionado no ensaios Fibrastage I (glicose I, lactato I e glutamina I) e Fibrastage II (glicose II, lactato II e glutamina II) analisados por HPLC. Glicose (preto), Lactato (azul) e Glutamina (vermelho).

Os três metabólitos medidos por HPLC durante os ensaios com Fibrastage podem ser vistos na Figura 14. Os níveis de lactato e glutamina medidos em ambos ensaios apresentam níveis mais altos com relação aos níveis de glicose medidos. Os níveis de glicose residual dos dois ensaios no 4º e 9º ponto variaram bastante de um ensaio para o outro, 0,4 g/L glicose I e 0,02 g/L glicose II para 4º ponto e 0,02 g/L glicose I e 0,5 g/L glicose II. Essa variação está relacionada com as trocas totais de meio DMEM + 2% SFB (v/v) nos ensaios, já que no ensaio Fibrastage I apenas uma troca (3º ponto de cultivo) foi realizada e para o ensaio Fibrastage II duas trocas (4º e 8º ponto de cultivo) foram realizadas. Assim nos níveis de glicose II residual foram registrados picos no 8º cultivo e para glicose I pico no 4º cultivo. Esses pulsos de glicose ocasionados pela realização das trocas de meio sempre foram precedidos de níveis não detectáveis de glicose e aumento na concentração de lactato I e lactato II no mesmo período. A variação observada está diretamente ligada ao fenômeno bastante observado em cultivos *in vitro* de células de mamíferos, a glicólise aeróbia ou “efeito Warburg”<sup>150</sup>, no qual a glicose é preferencialmente convertida em lactato, mesmo em concentrações não limitantes de oxigênio, e ainda que apresente rendimento energético menor



a redução do piruvato a lactato pela lactato desidrogenase (LDH) facilita uma regeneração mais rápida de  $\text{NAD}^+$  (nicotinamida adenina dinucleotídeo) em relação à entrada do piruvato no ciclo TCA e à regeneração via fosforilação oxidativa na mitocôndria.<sup>150</sup> Esse mecanismo permite uma maximização do crescimento celular na presença de nutrientes em excesso. Então como durante os ensaios as células foram submetidas aos pulsos de glicose, pode-se perceber a tendência em consumir glicose e produção de lactato durante ambos experimentos. Assim como encontrado por HENRY *et al.*<sup>151</sup> que obtiveram na fase exponencial de células HEK293 em batelada, mais de 50% da glicose oriundas da glicólise convertidos à produção de lactato na regeneração de  $\text{NAD}^+$ .

Essa relação de consumo de glicose e produção de lactato também sofreu alterações. No 6º ponto de cultivo glicose I e lactato I foram detectados níveis baixíssimo de concentração, 0,02 g/L e 0,1 g/L respectivamente desses metabólitos residuais que demonstra oposição ao perfil encontrado nos pontos anteriores aos pulsos de glicose. Esse comportamento já foi discutido em outros trabalhos com células CHO os quais descreveram um consumo de concomitante de glicose e lactato pela células em níveis críticos de glicose disponível.<sup>152,153</sup> Então, essa baixa nos níveis de glicose I e lactato I estão relacionadas com esse consumo, já que as células encontravam-se com concentrações de glicose mais baixas que o necessário para manutenção do seu estado durante a batelada.

O início do consumo de lactato II no ensaio FibraStage II coincide com o último ponto detectado de glicose II - o pulso de glicose no 8º ponto - que se estende até o final do experimento. Esse consumo de lactato pode ser influenciado pelo queda do pH no meio, em consequência do acúmulo de lactato, e na tentativa de autoregulação do metabolismo as células o convertem a piruvato acumulado no citosol. Martínez *et al.*<sup>146</sup> propuseram que essa conversão de lactato a piruvato em células HEK 293 acontecem de duas formas: conversão de lactato a piruvato no citosol e em seguida são absorção pelas mitocôndrias e a segunda possibilidade é a entrada do lactato primeiramente nas mitocôndrias e depois convertido a piruvato.

Os níveis de glutamina I e II detectados apresentaram diferenças visíveis no 1º e no 6º ponto de cultivo. Essa discrepância entre os valores medidos nesses pontos da glutamina II em relação a glutamina I está relacionada com a concentração de glicose II residual no meio e a velocidade de consumo das células. Já que nesses pontos o nível encontrado de glicose foi menor do que o esperado, tendo em vista o pulso de glicose entregue ao sistema no 5º ponto anterior e a concentração inicial de glicose no início do experimento. Sabe-se que células de

mamíferos desreguladas cultivadas *in vitro* na presença de concentrações de glicose maiores que as necessárias para o crescimento, para manutenção da viabilidade celular, consomem os nutrientes em velocidade muito maior, provocando uma mudança metabólica no ciclo TCA favorecendo a glutaminólise,<sup>110</sup> e conseqüentemente a formação de glutamina nesses pontos.

De modo geral, durante toda batelada os níveis de glutamina I e II residual foram mais elevados do que os outros metabólitos medidos. O acúmulo desse metabólito pode estar relacionado a produção de glutamina pelas células, já que uma molécula de glutamina é capaz de produzir 27 moléculas de ATP quando totalmente oxidada na presença de CO<sub>2</sub>, enquanto uma molécula de glicose chega a produzir 30 moléculas de ATP e essa mesma molécula na ausência de nutrientes disponível às células também é capaz de fornecer precursores para vários biossintéticos e participa na divisão celular rápida.<sup>143</sup>

Assim, a produção de glutamina também relacionou-se com o consumo de glicose em ambos ensaios, o perfil metabólico se manteve inconstante a medida que as horas de cultivo aumentou dada a flexibilidade de no metabolismo celular através do aumento da velocidade de consumo de glutamina<sup>149</sup> promovendo um equilíbrio na densidade celular ao longo do número de cultivos. Dessa forma, em todo o período a concentração residual de glutamina medida variou em todos os intervalos, como uma forma de auto regulação do sistema para adaptar-se a esta situação de escassez energética. HENRY *et al*<sup>151</sup> também verificou essa relação de consumo de glutamina e observou que 16% da entrada de carbono advindos da glicose consumida pelas células HEK 293 foram direcionadas ao ciclo TCA, identificando que a glutamina foi o principal aminoácido consumido na batelada. Ainda que o meio de cultura tenha a presença de outros aminoácidos essenciais os nutrientes mais consumidos – glutamina - são os principais contribuintes para a biossíntese e densidade celular, então o acompanhamento da glutamina descreve as variações na densidade celular.<sup>154</sup>

Atualmente os trabalhos utilizando FibraStage e células de mamíferos encontram-se protegidas em maior parte em depósito de patentes como: Métodos para melhorar o título retroviral no sistema de produção baseado em transfecção usando células eucarióticas (Janeiro/2017), código: US9551010B2; Formulações unitárias de dosagem de fibroblastos dérmicos autólogos (Setembro/2013), código: US8529883B2; Tratamento de cordas vocais com formulação de fibroblastos dérmicos autólogos (Agosto/2016), código: US9415075B2; Métodos para melhorar o título em sistemas de produção baseados em transfecção usando células eucarióticas (Novembro/2013), código: US20130302898A1; inviabilizando a comparação dos resultados obtidos com outros trabalhos utilizando o mesmo sistema.

O trabalho encontrado e desenvolvido por Mizucami *et al.*<sup>155</sup> utilizando Fibrastage descreve um perfil metabólico de células estromais mesenquimais (MSC) com ênfase no aumento da densidade celular realizando trocas de 50% meio metabolizado por meio novo após o 5º dia de cultivo. O perfil obtido Mizucami *et al.*<sup>155</sup> teve uma redução de 0,26 mol/L na concentração de glicose residual do meio e uma produção de lactato 10,4 g/mol, perfil semelhante ao obtido neste trabalho com Fibrastage no 4º e 9º ponto de cultivo para ambos os ensaios - discutido como a glicólise aeróbia do sistema. Os níveis de glutamina residual medidos por Mizucami *et al.*<sup>155</sup> até o 5º ponto foram decaindo em média 0,2 mol/L a cada dia e a produção de amônia atingiu concentração máxima de 1,3 mol/L no 5º dia de cultivo. Esse perfil de diminuição de glutamina nos últimos pontos de cultivo foi similar ao encontrado nas análises de glutamina II no ensaio Fibrastage II, que a partir do 6º ponto de cultivo teve redução média de 0,12 g/L em suas concentrações, ainda que a concentração de amônia nos ensaios dessa pesquisa não tenham sido medidas, acredita-se que nos picos de glutamina a partir do 1º e 6º cultivo a concentração de amônia tenha atingido valores próximos ao calculado por Mizucami *et al.*<sup>155</sup>

O metabolismo desenhado por Mizucami *et al.*<sup>155</sup> mostrou que a produção de lactato em função do consumo de glicose foi inferior ao máximo teórico e não prejudicou o aumento na densidade celular. Após a recuperação enzimática dos discos Fibracell as células foram capazes de manter seu potencial de diferenciação adipócitos e osteócitos, comprovando a eficiência do sistema de cultura.

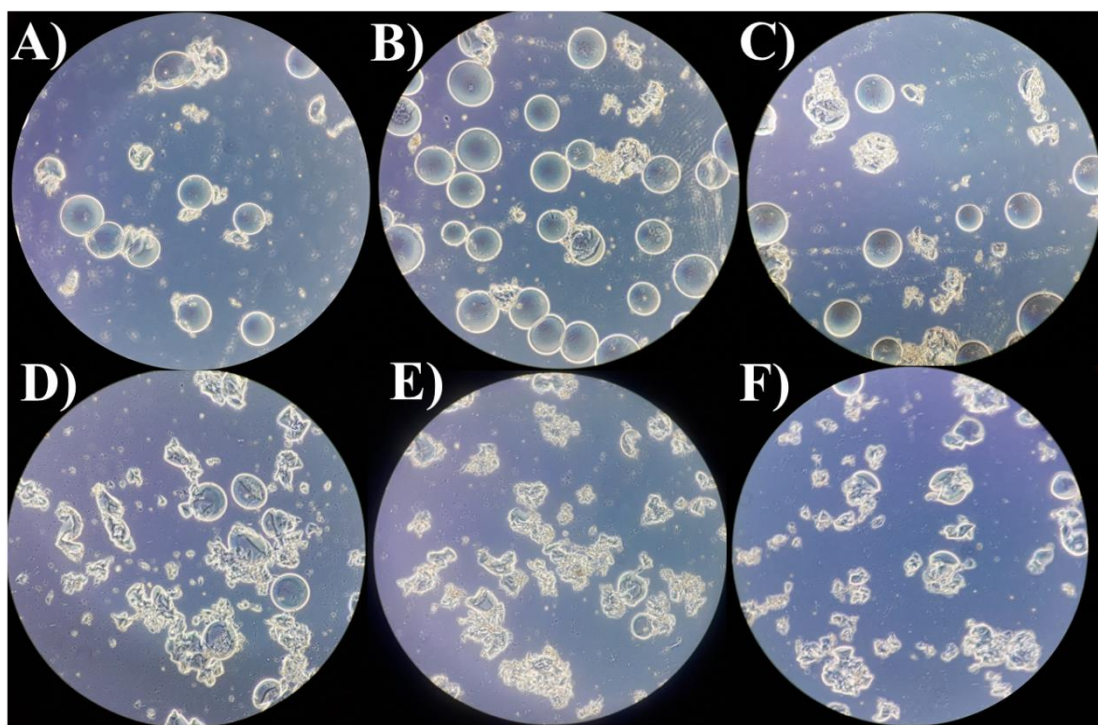
Os ensaios utilizando HEK 293T em Fibrastage nesse trabalho assim como os ensaios de Mizucami *et al.*<sup>155</sup> também revelaram que apesar das diversidades encontradas como o aumento da concentração de lactato e exposição a picos de glicose durante as horas de cultivo – exposição aos interferentes e a desregulação das células – as células foram capazes de manter a produção de PDGF-BB em concentrações variando entre 350-700 ng/mL até o momento (Ensaio e valores discutidos na dissertação da aluna Caterina Gioia, componente do mesmo projeto de pesquisa).

## **5.2 Ensaio de adaptação celular em fracos *spinner* e adesão em Cytodex 3**

No intuito de analisar o desempenho das células HEK 293T em crescimento aderido a microcarreadores em fracos tipo *spinner* e para servir como base para um possível aumento de

escala em biorreator *Wave*, foi testado e analisado o desempenho celular considerando a morfologia celular e consumo de glicose do meio metabolizado.

Para estabelecer um comparativo do desempenho celular ao longo dos dias de cultivo os dados coletados quanto à morfologia foram agrupados em uma linha do tempo que descreveu a ocupação e estado físico desses carreadores (Figura 15).



**Figura 15.** Fases da adesão celular de HEK293T superprodutoras de rhPDGF-BB em Cytodex 3 [3 mg/mL] em frasco *spinner* e volume de trabalho 100mL sob agitação magnética de 60 rpm. A) 5 dias B) 7 dias C) 12 dias D) 16 dias E) 19 dias F) 26 dias.

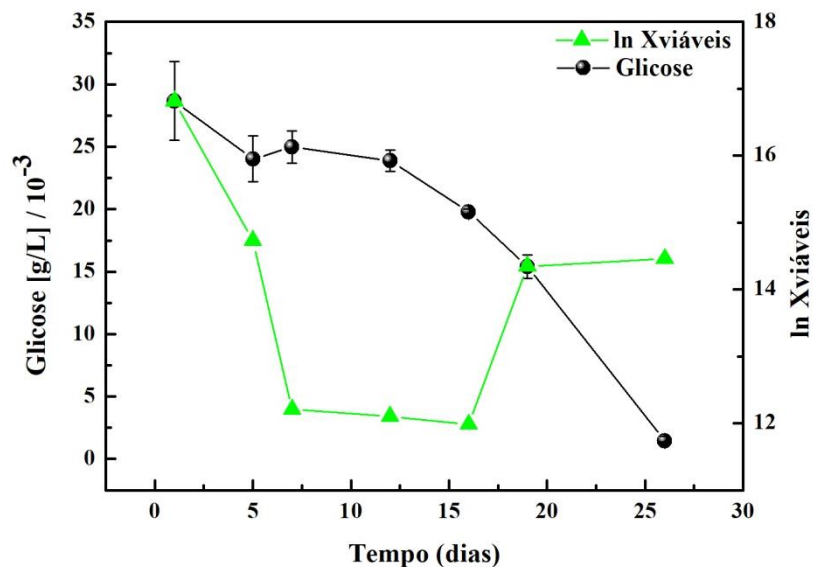
Como ilustrado na Figura 15, as células foram ocupando a superfície dos carreadores a medida que as horas de cultivo aumentavam e a presença de aglomerados disformes de células foram percebidos e todas as análises. Ainda que a superfície do Cytodex 3 seja uniforme e preparada para ancorar as células em toda sua extensão, foi percebido uma tendência a aglomeração das células nas laterais dos carreadores e apenas a partir do 12º dia de cultivo foi visto carreadores com completamente coberto pelas células (Figura 15C). Essa característica pode ser explicada pela tendência a formação de *clusters*, uma particularidade do tipo celular<sup>94</sup> e outra sugere-se também a influência da capacidade angiogênica e mitogênica do PDGF-BB<sup>22</sup> expresso e secretado para o meio condicionado que potencializa a mitose das células aumentando a proliferação celular com a intenção de formar filamentos de

células para construção de neovasos dada sua capacidade de atração dos diferentes tipos celular,<sup>156,157</sup> aumentando as chances das células agruparem-se lado a lado.

À medida que o tempo passou a integridade dos carreadores diminuiu e sua forma arredondada foi substituída por pedaços ou círculos disformes (Figura 15 D e E). Essa alteração no formato é dada pela agitação do meio e a tendência ao cisalhamento no frasco *spinner*, que baseia-se em sistema de tanque agitado<sup>3</sup>. Embora a superfície de contato tenha sido reduzida em função da deformidade física do carreador a confluência das células já aderidas não foi totalmente comprometida (Figura 15 D e E) já que observou-se presença de células aderidas por toda extensão dos carreadores restantes e a confluência com o passar dos cultivos se mantém o mesmo até o fim do experimento (Figura 15F).

Ainda que os carreadores usados tenham perdido a forma original devido à agitação do meio, sua adesão mostrou-se capaz de sustentar a ancoragem ao longo dos dias (Figura 15F). Essa adesão na superfície do Cytodex 3 mesmo que exposta a fatores externos como agitação e dispersão no meio foi estudada em um trabalho com aumento de escala para produção de vesículas extracelulares (VE) terapêuticas produzidas por HEK293T em suspensão. Os resultados mostraram que o rendimento VE alcançou 0,5L devido a alta adesão celular nos microcarreadores concluindo que o uso de Cytodex 3 para aumento de escala contribuiu para o aumento da produtividade final de VE.<sup>158</sup>

As alíquotas retiradas durante o ensaio com Cytodex 3 em frasco *spinner* foram analisadas a quantidade de células viáveis e a quantidade de glicose residual no meio metabolizado foi medido por colorimetria (Figura 16).



**Figura 16.** Concentração de glicose residual medida por fotometria, no experimento com Cytodex 3 [3 mg/mL] em frasco *spinner*. Perfil das células viáveis medidas pela linearização das concentrações de células viáveis calculadas pela diferença das células totais.

O perfil de viabilidade das células em função do tempo demonstrou decaimento na concentração nos três primeiros pontos a partir do inóculo durante a fase de adaptação ao sistema *spinner*. (Figura 16) A concentração inicial de células de  $2 \times 10^7$  células/mL chegou a  $2 \times 10^5$  células/mL no terceiro ponto da curva (7 dias) referente a Figura 16B. No intervalo entre o 3° e 5° ponto da curva (7 - 16 dias) a concentração viável de células não variou muito e a média nos três pontos foi de  $1,8 \times 10^5$  células/mL referentes às Figuras 15B 15C e 15D embora a concentração de glicose residual foi progressivamente diminuindo. Durante esse período percebe-se uma fase estacionária das células iniciada antecipadamente devido ao estresse sofrido durante os 7 primeiros dias de adaptação. Foi observado também um aumento na concentração de células viáveis do 6° ponto da curva, concentração de  $1,7 \times 10^6$  células/mL, para o 7° ponto (19 dias) com concentração de  $1,9 \times 10^6$  células/mL chegando ao fim do experimento (Figura 16). Esse aumento na densidade celular está ligado ao início da fase exponencial da cultura de células que coincide com a queda abrupta de glicose residual no meio. Essa variação da concentração assim como no experimento FibraStage pode estar relacionada com a velocidade de consumo das células para manutenção do aumento na viabilidade celular.<sup>149</sup>

Esse aumento exponencial nas células viáveis tardiamente durante o processo de batelada também foi identificado por HSU *et al.*<sup>159</sup> em estudos com fibroblastos derivados de tecido em cultura em suspensão utilizando microcarreadores. Após um período de 3 dias, o cultivo contendo Cytodex 3 obteve 12% a mais de eficiência de fixação celular e taxa de

crescimento na superfície, assim a avaliação da ancoragem celular após esse período demonstrou que o carreador auxiliou no processo de viabilidade celular.

De modo geral, o uso de Cytodex 3 durante o ensaio cumpriu o papel de ancoragem celular, porém não foi capaz de suportar a agitação do sistema transformando a superfície de contato em círculos disformes. A integridade física dos carreadores pode ter afetado a concentração de células viáveis final na batelada. Para estudos futuros, uma concentração maior de microcarreadores e células no inóculo podem ser testada para melhorar esse desempenho, tendo em vista que a velocidade de rotação do meio encontrou-se na menor velocidade necessária para homogeneização do meio.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente trabalho buscou avaliar o metabolismo de células HEK 293T aderentes em dois aumentos de escala: FibraStage e *spinner*, assim como o estudo de adaptação, crescimento e viabilidade celular. Tendo em vista os objetivos propostos por essa dissertação, foram obtidos os perfis metabólicos das células submetidas ao sistema de cultura de leito fixo descartável e estudos de viabilidade e adesão celular dessas células a microcarreadores e tanques mecanicamente agitados.

Em ambos ensaios de batelada repetida, a viabilidade das células suportou as alterações do sistema sendo eles: exposição a metabólitos inibitórios ao crescimento, lactato e glutamina, e sensibilidade ao cisalhamento para ambos ensaios. Ao comparar a eficiência dos resultados, os ensaios em FibraStage foram capazes de descrever a auto regulação das células e mudanças no metabolismo devido a movimentação da fonte de carbono disponível – glicose- para o fluxo metabólico responsável no instante de estresse. Como a produção de glutamina e o consumo concomitante de lactato e glicose para manutenção da viabilidade celular e regulação da densidade celular.

O uso de microcarreadores para facilitar a adaptação ao meio em suspensão não mostrou aumento de células viáveis ao final do experimento. Até a adaptação das células ao sistema, houve perda de  $1,9 \times 10^7$  células/mL, que representou um decaimento progressivo na confluência celular nos primeiros cinco dias de cultivo. Ao final do experimento, a confluência celular era aproximadamente a metade do valor inicial, demonstrando que ajustes na concentração de microcarreadores e agitação do meio poderão contribuir para aumento na densidade celular e para melhorar a metodologia proposta.

Assim, os estudos para a compreensão dos mecanismos utilizados pelas células durante as oscilações do metabolismo no escalonamento tanto em ensaios FibraStage como em *spinner* mostraram que a produção em batelada por um período de 5-7 dias é capaz de manter as células com níveis não críticos ao metabolismo, porém, quando o cultivo se estende sem o reciclo das células e sem alimentação no sistema, interferentes como presença de lactato e amônia – subproduto da glutamina – afetaram a regulação das células desequilibrando o fluxo metabólicos das células.

Com relação à adesão celular para cultivos em suspensão durante o escalonamento, o tamanho do inóculo foi suficiente para manter uma concentração de células viáveis no sistema que ocuparam os carreadores ainda que disformes. Com a elucidação da adesão e viabilidade celular a otimização da concentração de carreadores em função do volume de trabalho e a otimização da agitação intermitente poderão atingir volumes de trabalho compatíveis a biorreator *Wave*. e auxiliarem durante o escalonamento da produção.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Baldi, L.; Muller, N.; Picasso, S.; Jacquet, R.; Girard, P.; Huy, P. T.; Derow, E.; Wurm, F. M. ;*Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 148.
2. Wurm, F. M. ;*Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1393.
3. Nienow, A. W. ;*Cytotechnology* **2006**, *50*, 9.
4. Laidler, K. J. ;*Chem. Kinet.* **1987**, 212.
5. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes *Diretrizes 2017-2018*; 2018.
6. Papatheodorou, K.; Papanas, N.; Banach, M.; Papazoglou, D.; Edmonds, M. Complications of Diabetes 2016. *J. Diabetes Res.* **2016**.
7. Muduli, I. C.; P. P, A.; Panda, C.; Behera, N. C. ;*Indian J. Surg.* **2015**.
8. Bansal, D.; Gudala, K.; Muthyala, H.; Esam, H. P.; Nayakallu, R.; Bhansali, A. ;*J. Diabetes Investig.* **2014**.
9. Falanga, V. ;*Lancet* **2005**, *366*, 1736.
10. Campos, A. C. L.; Borges-Branco, A.; Groth, A. K. ;*ABCD. Arq. Bras. Cir. Dig. (São Paulo)* **2007**, *20*, 51.
11. Tsuboi, R.; Rifkin, D. B. ;*J.Exp.Med.* **1990**.
12. Cross, K. J.; Mustoe, T. A. Growth factors in wound healing. *Surg. Clin. North Am.* **2003**.



13. Wu, L.; Kumar, S. B.; Porrás-Reyes, B. H.; Gramates, P. H.; Mustoe, T. A. ;*Ann. Plast. Surg.* **1994**.
14. Greenhalgh, D. G.; Sprugel, K. H.; Murray, M. J.; Ross, R. ;*Am. J. Pathol.* **1990**.
15. Falanga, V. The chronic wound: Impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells, Mol. Dis.* **2004**.
16. Martí-Carvajal, A. J.; Gluud, C.; Nicola, S.; Simancas-Racines, D.; Reveiz, L.; Oliva, P.; Cedeño-Taborda, J. Growth factors for treating diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**.
17. Zaulyanov, L.; Kirsner, R. S. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clin. Interv. Aging* **2007**.
18. Fang, R. C.; Galiano, R. D. A review of becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Biol. Targets Ther.* **2008**.
19. IDF *Eighth edition 2017*; 2017.
20. Kim, H.; Park, J. S.; Yong, J. C.; Kim, M. O.; Yang, H. H.; Kim, S. W.; Ji, W. H.; Lee, J. Y.; Kim, S.; Houge, M. A.; Ii, M.; Yoon, Y. S. ;*Stem Cells* **2009**.
21. Schratzberger, P.; Walter, D. H.; Rittig, K.; Bahlmann, F. H.; Pola, R.; Curry, C.; Silver, M.; Krainin, J. G.; Weinberg, D. H.; Ropper, A. H.; Isner, J. M. ;*J. Clin. Invest.* **2001**.
22. Jeong, J. O.; Kim, M. O.; Kim, H.; Lee, M. Y.; Kim, S. W.; Ii, M.; Lee, J. U.; Lee, J.; Choi, Y. J.; Cho, H. J.; Lee, N.; Silver, M.; Wecker, A.; Kim, D. W.; Yoon, Y. sup ;*Circulation* **2009**.
23. Boulton, A. J. M. ;*Handb. Clin. Neurol.* **2014**, 126, 97.
24. Boulton, A. J.; Vileikyte, L.; Ragnarson-Tennvall, G.; Apelqvist, J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* **2005**.
25. Lavery, L. A.; Armstrong, D. G.; Wunderlich, R. P.; Tredwell, J.; Boulton, A. J. M. ;*Diabetes Care* **2003**.
26. Dai, N.; Tram, T.; Lai, P.; Ee, R. ;*Antibiotics* **2017**, 6, 14.
27. Sargen, M. R.; Hoffstad, O.; Margolis, D. J. ;*J. Diabetes Complications* **2013**.
28. Toscano, C. M.; Sugita, T. H.; Rosa, M. Q. M.; Pedrosa, H. C.; Rosa, R. dos S.; Bahia, L. R. ;*Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**.
29. Tracy, J. A.; Dyck, P. J. B. The Spectrum of Diabetic Neuropathies. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* **2008**.
30. Várkonyi, T.; Kempler, P. Diabetic neuropathy: New strategies for treatment. *Diabetes, Obes. Metab.* **2008**.
31. Hammes, H. P.; Du, X.; Edelstein, D.; Taguchi, T.; Matsumura, T.; Ju, Q.; Lin, J.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; Hannak, D.; Neumaier, M.; Bergfeld, R.; Giardino, I.; Brownlee, M. ;*Nat. Med.* **2003**.

32. Singh Grewal, A.; Bhardwaj, S.; Pandita, D.; Lather, V.; Singh Sekhon, B. ;*Mini-Reviews Med. Chem.* **2015**.
33. Bril, V.; Hirose, T.; Tomioka, S.; Buchanan, R. ;*Diabetes Care* **2009**.
34. Fraser, D. A.; Diep, L. M.; Hovden, I. A.; Nilsen, K. B.; Sveen, K. A.; Seljeflot, I.; Hanssen, K. F. ;*Diabetes Care* **2012**.
35. Mijnhout, G. S.; Kollen, B. J.; Alkhalaf, A.; Kleefstra, N.; Bilo, H. J. G. Alpha lipoic acid for symptomatic peripheral neuropathy in patients with diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J. Endocrinol.* **2012**.
36. Oteng, A.; Groessl, E. J.; Sklar, M.; Chang, M. ;*Intech open* **2014**, 2, 64.
37. Kessler, J. A.; Smith, A. G.; Cha, B.-S.; Choi, S. H.; Wymer, J.; Shaibani, A.; Ajroud-Driss, S.; Vinik, A. ;*Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2015**, 2, 465.
38. Veves, A.; King, G. L. Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects? *J. Clin. Invest.* **2001**.
39. Marston, W. A.; Hanft, J.; Norwood, P.; Pollak, R. ;*Diabetes Care* **2003**.
40. Al-Rubeaan, K.; Al Derwish, M.; Ouizi, S.; Youssef, A. M.; Subhani, S. N.; Ibrahim, H. M.; Alamri, B. N. ;*PLoS One* **2015**, 10, 1.
41. Tufts Center for the Study of Drug Development Cost to Develop and Win Marketing Approval for a New Drug Is \$2.6 Billion.
42. DiMasi, J. A.; Grabowski, H. G.; Hansen, R. W. ;*J. Health Econ.* **2016**.
43. M, G. *Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form.* New York; 2009.
44. Process, T.; New, B. Biopharmaceutical Research & Development : [http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd\\_brochure\\_022307.pdf](http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd_brochure_022307.pdf).
45. Crommelin, D. J. A.; Storm, G.; Verrijk, R.; De Leede, L.; Jiskoot, W.; Hennink, W. E. Shifting paradigms: Biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. *Int. J. Pharm.* **2003**.
46. Walsh, G. **2010**, 32.
47. Leader, B.; Baca, Q. J.; Golan, D. E. ;*Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7, 21.
48. Hai, J.; Serradji, N.; Mouton, L.; Redeker, V.; Cornu, D.; El Hage Chahine, J. M.; Verbeke, P.; Hémadi, M. ;*PLoS One* **2016**.
49. Zhu, J. ;*Biotechnol. Adv.* **2012**, 30, 1158.
50. Care, D. L. S. and H. *2016 Global life sciences outlook*; 2016.
51. Pierce, G. F.; Tarpley, J. E.; Allman, R. M.; Goode, P. S.; Serdar, C. M.; Morris, B.; Mustoe, T. A.; Berg, J. V ;*Am. J. Pathol.* **1994**.
52. Pierce, G. F.; Tarpley, J. E.; Yanagihara, D.; Mustoe, T. a; Fox, G. M.; Thomason, A.

; *Am J Pathol* **1992**.

53. Glenn F. Pierce; Mustoe, T. A. ; *Annu. Rev. ...* **1995**.
54. Ishii, Y.; Hamashima, T.; Yamamoto, S.; Sasahara, M. ; *Pathol. Int.* **2017**, 67, 235.
55. Heldin, C. H.; Westermark, B. ; *Physiol. Rev.* **1999**.
56. Hammacher, A.; Mellström, K.; Heldin, C. H.; Westermark, B. ; *EMBO J.* **1989**.
57. De La Salle, H.; Altenburger, W.; Elkaim, R.; Dott, K.; Dieterlé, A.; Drillien, R.; Cazenave, J. P.; Tolstoshev, P.; Lecocq, J. P. ; *Nature* **1985**.
58. Frödin, M.; Mezheyeuski, A.; Corvigno, S.; Harmenberg, U.; Sandström, P.; Egevad, L.; Johansson, M.; Östman, A. ; *Br. J. Cancer* **2017**.
59. Dirks, R. P. H.; Bloemers, H. P. J. Signals controlling the expression of PDGF. *Mol. Biol. Reports An Int. J. Mol. Cell. Biol.* **1995**.
60. Friedman, S. L.; Wei, S.; Blaner, W. S. ; *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2017**.
61. Breitkopf, K.; Van Roeyen, C.; Sawitza, I.; Wickert, L.; Floege, J.; Gressner, A. M. ; *Cytokine* **2005**.
62. Kuai, J.; Mosyak, L.; Brooks, J.; Cain, M.; Carven, G. J.; Ogawa, S.; Ishino, T.; Tam, M.; Lavallie, E. R.; Yang, Z.; Ponsel, D.; Rauchenberger, R.; Arch, R.; Pullen, N. ; *Biochemistry* **2015**, 54, 1918.
63. Muller, Y. A.; Li, B.; Christinger, H. W.; Wells, J. A.; Cunningham, B. C.; de Vos, A. M. ; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**.
64. Ko, F. N.; Yang, Y. C.; Huang, S. C.; Ou, J. T. ; *J. Clin. Invest.* **1996**.
65. Periyah, M. H.; Halim, A. S.; Saad, A. Z. M. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in Hemostasis. *Int. J. Hematol. Stem Cell Res.* **2017**.
66. Isaac, C.; Ladeira, P. R. S.; Rêgo, F. M. P.; Aldunate, J. C. B.; Ferreira, M. C. ; *Rev Med (São Paulo)* **2010**.
67. Gentile, P.; Garcovich, S.; Bielli, A.; Scioli, M. G.; Orlandi, A.; Cervelli, V. ; *Stem Cells Transl. Med.* **2015**.
68. Qiao, J.; Duan, J.; Zhang, Y.; Chu, Y.; Sun, C. ; *Futur. Sci. OA* **2016**.
69. Bröseler, F.; Tietmann, C.; Hinz, A. K.; Jepsen, S. ; *J. Clin. Periodontol.* **2017**.
70. Leme, J. J.; Rossi Junior, R.; Villa, N. Análise do potencial osteogênico do plasma rico em plaquetas no reparo de cavidades ósseas: estudo histológico em cães<sup>ipt</sup>. *Rev. paul. odontol* **2004**, 26, 8–15.
71. Bartold, P. M.; Xiao, Y.; Lyngstaadas, S. P.; Paine, M. L.; Snead, M. L. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontol.* **2000** **2006**.

72. Călin, C.; Pătrascu, I. Growth factors and beta-tricalcium phosphate in the treatment of periodontal intraosseous defects: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Arch. Oral Biol.* **2016**.
73. Lee, C. H.; Liu, K. S.; Chang, S. H.; Chen, W. J.; Hung, K. C.; Liu, S. J.; Pang, J. H. S.; Juang, J. H.; Chou, C. C.; Chang, P. C.; Chen, Y. T.; Wang, F. S. ;*Med. (United States)* **2015**.
74. Steed, D. L.; Study Group, the D. U. ;*J. Vasc. Surg.* **1995**.
75. Smiell, J. M.; Wieman, T. J.; Steed, D. L.; Perry, B. H.; Sampson, A. R.; Schwab, B. H. ;*Wound Repair Regen.* **1999**.
76. Wieman, T. J.; Smiell, J. M.; Su, Y. ;*Diabetes Care* **1998**.
77. Assenberg, R.; Wan, P. T.; Geisse, S.; Mayr, L. M. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**.
78. Ferrer-Miralles, N.; Domingo-Espín, J.; Corchero, J.; Vázquez, E.; Villaverde, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb. Cell Fact.* **2009**.
79. Shukla, A. A.; Thömmes, J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.* **2010**.
80. Allen, L. In *Process Scale Purification of Antibodies*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 365–389.
81. Bracke, A.; Hoogewijs, D.; Dewilde, S. ;*Anal. Biochem.* **2018**.
82. Chu, L.; Robinson, D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**.
83. Grieger, J. C.; Soltys, S. M.; Samulski, R. J. ;*Mol. Ther.* **2016**.
84. Adrio, J. L.; Demain, A. L. ;*Bioeng. Bugs* **2010**.
85. Demain, A. L.; Vaishnav, P. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*; 2011.
86. Shen, C. F.; Lanthier, S.; Jacob, D.; Montes, J.; Beath, A.; Beresford, A.; Kamen, A. ;*Vaccine* **2012**.
87. Shen, C. F.; Jacob, D.; Zhu, T.; Bernier, A.; Shao, Z.; Yu, X.; Patel, M.; Lanthier, S.; Kamen, A. ;*Vaccine* **2016**.
88. Gaughan, C. L. The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies. *Mol. Divers.* **2016**.
89. Geisse, S.; Henke, M. ;*J. Struct. Funct. Genomics* **2005**.
90. Puck, T. T. ;*J. Exp. Med.* **1958**.
91. Hammond, S.; Swanberg, J. C.; Polson, S. W.; Lee, K. H. ;*Biotechnol. Bioeng.* **2012**.
92. Graham, F. L.; Van Der Eb, A. J. ;*Virology* **1973**.
93. Thomas, P.; Smart, T. G. ;*J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2005**.

94. Peng, L.; Yu, X.; Li, C.; Cai, Y.; Chen, Y.; He, Y.; Yang, J.; Jin, J.; Li, H. ;*Bioengineered* **2016**.
95. Kim, C. H.; Oh, Y.; Lee, T. H. ;*Gene* **1997**.
96. Fliedl, L.; Grillari, J.; Grillari-Voglauer, R. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. *N. Biotechnol.* **2015**.
97. Pham, P. L.; Kamen, A.; Durocher, Y. In *Molecular Biotechnology*; 2006.
98. Chang, H. Y.; Kao, W. L.; You, Y. W.; Chu, Y. H.; Chu, K. J.; Chen, P. J.; Wu, C. Y.; Lee, Y. H.; Shyue, J. J. ;*Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**.
99. Sokolova, V.; Ludwig, A. K.; Hornung, S.; Rotan, O.; Horn, P. A.; Epple, M.; Giebel, B. ;*Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**.
100. Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. a *Current Protocols in Molecular Biology*; 2003.
101. Harmsen, M. M. ;*Bioprocess Int.* **2008**, 6, 28.
102. Chartrain, M.; Chu, L. ;*Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**.
103. CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. *Bioreactors for animal cells. In: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*; 1<sup>a</sup>.; New York, 2008; Vol. 39.
104. Kuystermans, D.; Al-rubeai, M. In *Antibody Expression and Production*; 2011.
105. Collignon, M. L.; Delafosse, A.; Crine, M.; Toye, D. ;*Chem. Eng. Sci.* **2010**, 65, 5929.
106. Fernandes, A. M.; Fernandes, T. G.; Diogo, M. M.; da Silva, C. L.; Henrique, D.; Cabral, J. M. S. ;*J. Biotechnol.* **2007**, 132, 227.
107. Doran, P. M. *Bioprocess engineering principles: Second edition*; 2012.
108. Bibila, T. A.; Robinson, D. K. ;*Biotechnol. Prog.* **1995**.
109. Wlaschin, K. F.; Hu, W. S. Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2006**.
110. Altamirano, C.; Cairó, J. J.; Gòdia, F. ;*Biotechnol. Bioeng.* **2001**.
111. Ljunggren, J.; Häggström, L. ;*Cytotechnology* **1992**.
112. Kuystermans, D.; Al-Rubeai, M. In *Animal Cell Culture*; 2015.
113. Yang, M.; Butler, M. ;*Biotechnol. Prog.* **2002**.
114. Tsao, Y. S.; Cardoso, A. G.; Condon, R. G. G.; Voloch, M.; Lio, P.; Lagos, J. C.; Kearns, B. G.; Liu, Z. ;*J. Biotechnol.* **2005**.
115. Nasserri, S. S.; Ghaffari, N.; Braasch, K.; Jardon, M. A.; Butler, M.; Kennard, M.; Gopaluni, B.; Piret, J. M. ;*Biochem. Eng. J.* **2014**.
116. Singh, V.; Singh, V. ;*Cytotechnology* **1999**.

117. Tang, Y. J.; Ohashi, R.; Hamel, J. F. P. In *Biotechnology Progress*; 2007.
118. Chames, P.; Van Regenmortel, M.; Weiss, E.; Baty, D. Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **2009**.
119. Carvalho, L. S.; Silva, O. B. da; Almeida, G. C. da; Oliveira, J. D. de; Parachin, N. S.; Carmo, T. S. In *Fermentation Processes*; InTech, 2017; Vol. 2, p. 64.
120. Kwon, S.; Yoo, I. K.; Lee, W. G.; Chang, H. N.; Chang, Y. K. ;*Biotechnol. Bioeng.* **2001**.
121. Pörtner, R.; Märkl, H. ;*Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 50, 403.
122. Chotteau, V.; Zhang, Y.; Clincke, M. F. In *Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing*; 2015.
123. Seo, J. S.; Min, B. S.; Kwon, Y. B.; Lee, S. Y.; Cho, J. M.; Park, K. H.; Yang, Y. J.; Maeng, K. E.; Chang, S. J.; Kim, D. Il ;*J. Biosci. Bioeng.* **2016**.
124. Abraham, E.; Gupta, S.; Jung, S.; McAfee, E. In *Mesenchymal Stromal Cells*; 2017.
125. Carvalho, S.; Almeida, G. C. De .
126. Butler, M. Animal cell cultures: Recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**.
127. Restelli, V.; Butler, M. ;*Cell Eng.* **2002**, 61.
128. Rodriguez, G.; Arias, M. A.; Suárez, J.; Chea, M.; Bouzó, L.; Cuervo, R.; Alvarez, I.; Chico, E. In *Animal Cell Technology Meets Genomics*; 2005.
129. Healthcare, G. E.; Sciences, L. **2013**, 1.
130. Freshney, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition*; 2011.
131. Xie, L.; Zhou, W.; Robinson, D. Protein production by large-scale mammalian cell culture. *New Compr. Biochem.* **2003**.
132. Kyriakopoulos, S.; Kontoravdi, C. ;*Biotechnol. Bioeng.* **2014**.
133. Mccoy, R. E.; Costa, N. A.; Morris, A. E. ;*Biotechnol. Prog.* **2015**.
134. Yin, B.; Gao, Y.; Chung, C. yu; Yang, S.; Blake, E.; Stuczynski, M. C.; Tang, J.; Kildegaard, H. F.; Andersen, M. R.; Zhang, H.; Betenbaugh, M. J. ;*Biotechnol. Bioeng.* **2015**.
135. Liu, B.; Spearman, M.; Doering, J.; Lattová, E.; Perreault, H.; Butler, M. ;*J. Biotechnol.* **2014**.
136. Borys, M. C.; Linzer, D. I. H.; Papoutsakis, E. T. ;*Biotechnol. Bioeng.* **1994**.
137. Rodrigues, C. A. V.; Diogo, M. M.; Da Silva, C. L.; Cabral, J. M. S. ;*Biotechnol. Appl. Biochem.* **2011**, 58, 231.
138. Jong, H. N.; Ermonval, M.; Sharfstein, S. T. ;*Biotechnol. Prog.* **2007**.

139. DULBECCO, R.; FREEMAN, G. ;*Virology* **1959**.
140. GE Healthcare Life Sciences *Microcarrier Cell Culture-Principles & Methods*; 2013.
141. Xie, L.; Zhou, W. ;*Biotechnol. Bioprocess. Ser.* **2005**, 30, 349.
142. Cruz, H. J.; Freitas, C. M.; Alves, P. M.; Moreira, J. L.; Carrondo, M. J. T. ;*Enzyme Microb. Technol.* **2000**.
143. Heiden, M. G. Vander; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (80-. )*. **2009**.
144. DuBois, M.; Smith, F.; Rebers, P. A.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K. ;*Anal. Chem.* **2005**.
145. Hanlan, J.; Skoog, D. A.; West, D. M. ;*Stud. Conserv.* **2006**.
146. Martínez-Monge, I.; Albiol, J.; Lecina, M.; Liste-Calleja, L.; Miret, J.; Solà, C.; Cairó, J. J. ;*Biotechnol. Bioeng.* **2019**.
147. Genzel, Y.; Ritter, J. B.; König, S.; Alt, R.; Reichl, U. ;*Biotechnol. Prog.* **2005**.
148. Zielke, H. R.; Zielke, C. L.; Ozand, P. T. ;*Fed Proc* **1984**.
149. Altamirano, C.; Paredes, C.; Illanes, A.; Cairó, J. J.; Gòdia, F. ;*J. Biotechnol.* **2004**.
150. Wahrheit, J.; Nicolae, A.; Heinzle, E. ;*Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**.
151. Henry, O.; Jolicoeur, M.; Kamen, A. ;*Bioprocess Biosyst. Eng.* **2011**.
152. Altamirano, C.; Illanes, A.; Becerra, S.; Cairó, J. J.; Gòdia, F. ;*J. Biotechnol.* **2006**.
153. Brunner, M.; Doppler, P.; Klein, T.; Herwig, C.; Fricke, J. ;*Eng. Life Sci.* **2018**.
154. Hosios, A. M.; Hecht, V. C.; Danai, L. V.; Johnson, M. O.; Rathmell, J. C.; Steinhauser, M. L.; Manalis, S. R.; Vander Heiden, M. G. ;*Dev. Cell* **2016**.
155. Mizukami, A.; Orellana, M. D.; Caruso, S. R.; de Lima Prata, K.; Covas, D. T.; Swiech, K. ;*Biotechnol. Prog.* **2013**.
156. Deuel, T. F.; Kawahara, R. S.; Mustoe, T. A.; Pierce, A. F. ;*Annu. Rev. Med.* **1991**.
157. Deuel, T. ;*Annu. Rev. Med.* **2002**.
158. KOOPAELI, N. N. et al. ;*J. Extracell. Vesicles* **2018**, 7, 80.
159. Hsu, C. Y.; Rancourt, D. E. ;*Mol. Ther.* **2016**.