

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVAS DE MEIO DE CULTIVO PARA
A PRODUÇÃO DA ERITROPOETINA HUMANA
RECOMBINANTE EXPRESSA EM CÉLULAS CHO EM
SUSPENSÃO**

ALEXANDRE BORGES MURAD

**RIO DE JANEIRO
2015**

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ALEXANDRE BORGES MURAD

AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVAS DE MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DA ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE EXPRESSA EM CÉLULAS CHO EM SUSPENSÃO

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

**RIO DE JANEIRO
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M972 Murad, Alexandre Borges

Avaliação de alternativas de meio de cultivo para a produção da eritropoetina humana recombinante expressa em células CHO em suspensão / Alexandre Borges Murad. – Rio de Janeiro, 2015.

xx,103 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2015.

Bibliografia: f. 69-82

1. Células CHO. 2. Cultivo celular. 3. Eritropoetina humana recombinante. 4. Meio de cultivo. I. Título.

CDD 616.0277

Trabalho realizado no Laboratório de
Tecnologia Viroológica – Bio-
Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz,
sob a orientação do D.Sc. Rodrigo
Coelho Ventura Pinto e do D.Sc.
Álvaro Paiva Braga de Sousa.



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVAS DE MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DA ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE EXPRESSA EM CÉLULAS CHO EM SUSPENSÃO

ORIENTADORES: D. Sc. Rodrigo Coelho Ventura Pinto

D. Sc. Álvaro Paiva Braga de Sousa

Dissertação aprovada em 03 de março de 2015

Examinadores:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marta Cristina de Oliveira Souza".

D. Sc. Marta Cristina de Oliveira Souza
Fiocruz/Presidente

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ariane Leites Larentis".

D. Sc. Ariane Leites Larentis
Fiocruz

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Aldo Tonso".

D. Sc. Aldo Tonso
USP

Rio de Janeiro
2015

À minha família e amigos,

Todas as conquistas almejadas e alcançadas foram possíveis pelo apoio incondicional de todos vocês. Agradeço, de todo o meu coração, a todos pelo carinho e pela confiança!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus que, independente de crença, fé ou religião, sempre me mostrou os melhores caminhos e os melhores desafios para vencer constantemente.

À Fiocruz e Bio-Manguinhos, pela oportunidade de fazer o MPTI, pelo incentivo de sempre buscar o conhecimento e o aperfeiçoamento, como ser humano e profissional.

À minha família, em especial meu pai Paulo Eduardo Murad, minha mãe Rita de Cássia Borges Murad, meu irmão Leonardo Borges Murad e minha cunhada Luana Dalben Murad. Amo muito todos vocês! Sem vocês, eu não seria ninguém!

Aos meus orientadores, D. Sc. Rodrigo Coelho Ventura Pinto e D. Sc. Álvaro Paiva Braga de Sousa que, além de considera-los profissionais excepcionais, eu os considero dois grandes amigos. Sou muito grato por tudo que aprendi com vocês.

À coordenação e secretaria do MPTI, Dra. Sheila Farage por toda luta e defesa que fez e sempre fará em prol dos seus alunos e à Zaíra por todo cuidado e atenção prestados. Meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus queridos amigos do Projeto EPO, Alvio Cardero, Anna Carolina Marinho, Danilo Parmera, Eduardo Ruback, Esther Gutierrez, Ethiene Corrêa, Luana de Souza, Maíra Pellegrini, Marina Vergne, Tânia Pato e Tiago Pereira por todas as conversas, motivações e por me fazer acreditar que tenho amigos sempre por perto!

À Natália Pedra Gonçalves, por simplesmente tudo! Por toda amizade, desde o primeiro dia de mestrado, por todas as conversas e, principalmente, por todo carinho. Esse mestrado não seria o mesmo sem você! Obrigado por estar fazendo parte deste momento tão especial da minha vida! Eu amo você!

Aos meus amados irmãos de MPTI! André Vinícius, Ariane Barcellos, Artur Boechat, Camila Xavier, Christina Cerqueira, Jéssica Yukie, Maria Carolina Martins, Mayra Martho, Monique Stávale, Perielva Vasconcelos, Priscila Ramos Martins, Robson Cruz e Vivian Pereira. Minha mais nova família! Já disse uma vez e sempre direi: amo muito vocês!

Aos amigos do LATEV, LATER, LATIM e do LECC/UFRJ, por todo apoio prestado que foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

Aos amigos da vida, Artur de Souza, Bernardo de Noronha, Caroline Moutinho, Erick Maia, Flávio Matassoli, Gabriel Vincenzi, Gustavo Rademacher, Henrique Hatano, Jean de Oliveira Santos, Leonardo Montanholi, Pedro Leão, Thiago Patrão e Wesley de Paiva Santos. Mais uma vez, obrigado! Vocês podem contar comigo pra tudo como eu conto com vocês!

Ao órgão fomentador FIOTEC, pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

“Os homens devem moldar seu caminho. A partir do momento em que você vir o caminho em tudo o que fizer, você se tornará o próprio caminho.”

Miyamoto Musashi.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS.....	XV
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XX
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Produção de biofármacos em cultivos celulares.....	4
1.2 – Glicosilação.....	6
1.3 – Sistemas de cultivo.....	10
1.3.1 – Cultivo em frascos.....	10
1.3.2 – Cultivo em biorreatores.....	11
1.3.2.1 – Biorreatores do tipo tanque agitado.....	12
1.4 – Modos de operação.....	13
1.4.1 – Batelada simples.....	14
1.4.2 – Batelada alimentada.....	14
1.4.3 – Contínuo e contínuo com reciclo celular.....	15
1.5 – Meios de cultivo para células animais.....	17
1.5.1 – Fatores que interferem na produção e qualidade dos biofármacos.....	18
1.5.1.1 – Carboidratos.....	18
1.5.1.2 – Aminoácidos.....	19
1.5.1.3 – Sais minerais.....	21
1.5.1.4 – Vitaminas.....	21
1.5.1.5 – Nucleotídeos.....	22
1.5.1.6 – Elementos-traço.....	22
1.5.1.7 – Soro fetal bovino.....	23
1.5.1.8 – Fatores físicos-químicos.....	23
2 – PROPOSTA DE TRABALHO.....	26
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 – Material.....	27
3.1.1 – Linhagem celular e banco de células de trabalho.....	27

3.1.2 – Meio de cultivo controle.....	27
3.1.3 – Meios de cultivo alternativos.....	27
3.1.4 – Sistemas de cultivo.....	29
3.2 – Métodos.....	29
3.2.1 – Quantificação celular.....	29
3.2.2 – Análise bioquímica para determinação da concentração de glicose e lactato.....	30
3.2.3 – Determinação da concentração de Eritropoietina humana recombinante (EPOhr).....	30
3.2.4 – Criação do banco de células de trabalho.....	31
3.2.5 – Descongelamento de células CHO para experimentação.....	32
3.2.6 – Sub-cultivos das células CHO e cinética comparativa entre os meios.....	32
3.2.7 – Cultivo em biorreator.....	33
3.2.8 – Cálculo das taxas específicas e rendimentos.....	35
4 – RESULTADOS.....	37
4.1 – Cultivos celulares para adaptação de células CHO com meios alternativos e cinéticas comparativas.....	37
4.1.1 – Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHO TM – Utility e SFM4CHO TM	39
4.1.2 – Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHO TM – Utility e HyCell TM sem HT.....	42
4.1.3 – Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHO TM – Utility e CD FortiCHO TM	47
4.1.4 – Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHO TM – Utility e Cellvento TM CHO-110 sem HT.....	50
4.1.5 – Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHO TM – Utility e CPCHO TM	54
4.1.6. – Integral de Células Viáveis (ICV).....	57
4.2. – Cultivo em biorreator com meio SFM4CHO TM	59
5 – DISCUSSÃO.....	62
6 – CONCLUSÃO.....	67
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Letra grega “alfa”
AG	Aparelho de Golgi
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
AMPK	Enzima quinase ativada por AMP
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Brasil
Asn	Aminoácido Asparagina
BHK	Células de rim de filhotes de hamster (do inglês, <i>baby kidney hamster</i>)
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
°C	Graus Celsius
CDA	Conjugado Droga-Anticorpo
CHO	Células de ovário de hamster chinês (do inglês, <i>Chinese hamster ovary</i>)
CIGB	Centro de Engenharia Genética de Biotecnologia/Cuba (do espanhol, <i>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología</i>)
CIM	Centro de Imunologia Molecular/Cuba (do espanhol, <i>Centro de Inmunología Molecular</i>)
CMC	Carboximetilcelulose
COPPE	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia
CO ₂	Dióxido de carbono
DHFR	Diidrofolato Redutase (do inglês, <i>Dihydrofolate Reductase</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPO	Relativo à Alfaepoetina
EPOhr	Eritropoetina humana recombinante

[EPOhr] _{max}	Concentração máxima de EPOhr produzida
EUA	Estados Unidos da América
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalA	Ácido Galacturônico
GalN	Galactosamina
Glc	Glicose
GlcA	Ácido Glucurônico
GlcN	Glicosamina
GlcNac	Carboidrato N-acetilglicosamina
GS	Glutamina Sintetase
HEK293	Células de rim de embrião humano 293 (do inglês, <i>Human Embryonic Kidney</i>)
HK	Enzima Hexoquinase
HPV	Vírus do Papiloma Humano (do inglês, <i>Human Papiloma Virus</i>)
HT	Hipoxantina e Timidina
ICV	Integral de Células Viáveis
IC95%	Intervalo de Confiança com 95% de confiança
IdoA	Ácido Idurônico
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IFN- γ	Interferon- γ
IGF	Fator de Crescimento tipo-Insulina
IP	Iodeto de Propídio
Kdn	Ácido 2-ceto-3-deoxinônico

LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica
LECC	Laboratório de Engenharia do Cultivo Celular
Ln	Logaritmo Neperiano
μ_{exp}	Taxa específica de crescimento celular da fase exponencial
Man	Carboidrato Manose
ManA	Ácido Manurônico
ManN	Manosamina
ManNAc	N-Acetilmanosamina
MEM	Meio Essencial Mínimo
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Ministério da Saúde
MSX	Droga Metionina Sulfoximida
MTX	Droga Metotrexato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
Neu5Ac	Ácido N-Acetilneuramínico
Neu5Gc	Ácido N-Glicolilneuramínico
OD	Oxigênio dissolvido
OGT	Enzima N-Acetilgalactosamina transferase
OMS	Organização Mundial de Saúde
OST	Enzima Oligossacariltransferase
PAF	Programa de Assistência Farmacêutica do Ministério da Saúde
PEG	Polietileno Glicol
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>Phosphate-buffered saline</i>)
pCO ₂	Pressão parcial de CO ₂
PFK/PFK1	Enzima Fosfofrutoquinase

P	Produtividade
pH	Potencial hidrogeniônico
q _{EPOhr}	Taxa específica de formação de eritropoietina
q _{Glic}	Taxa específica de consumo de glicose
q _{Lact}	Taxa específica de produção de lactato
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
Ser	Aminoácido Serina
SFB	Soro Fetal Bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
t _d	Tempo de duplicação
Thr	Aminoácido Treonina
tPA	Ativador de Plasminogênio tecidual (do inglês, <i>tissue-type Plasminogen Activator</i>)
TT	Transferência de Tecnologia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v/v	Volume por volume
VDTEC	Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico
VPROD	Vice-Diretoria de Produção
V _{vd}	Volume de reciclo por volume de biorreator por dia
V _{vm}	Volume de gás por volume de biorreator por minuto
X _{aa}	Denominação para qualquer aminoácido
\bar{X}_v	Média das células viáveis
Xyl	Xilose
Y _{X/Glic}	Coefficiente de rendimento celular a partir da concentração de glicose

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 1. Tipos de oligossacarídeos N-ligados. Os oligossacarídeos estão ligados sempre ao resíduo Asn da sequência Asn-X-Ser/Thr e apresentam diversas estruturas (rica em manose, híbrida ou complexa). Adaptado de Stanley et al, 2009.....	8
Figura 2. Desenho esquemático dos tipos de frascos e garrafas utilizadas para o cultivo celular.....	10
Figura 3. Esquema simplificado de um biorreator do tipo tanque agitado e alguns dos seus componentes – impelidor, motor, termostato, um duto para retirada de amostra e efluentes, chicanas e duto para entrada de gases. Adaptado de Li et al, 2009.....	13
Figura 4. Esquema simplificado de um cultivo realizado em batelada simples.....	14
Figura 5. Esquema simplificado de um cultivo realizado em batelada alimentada.....	15
Figura 6. Esquema simplificado de um cultivo realizado em sistema contínuo.....	15
Figura 7. Esquema simplificado de um cultivo realizado em sistema contínuo com perfusão.....	16
Figura 8. Desenho esquemático da metodologia do sub-cultivo para realização das cinéticas. A figura mostra, de forma resumida, as etapas que precedem as cinéticas, incluindo o inóculo inicial até a adaptação em garrafas rotatórias.....	34
Figura 9. Células CHO em meio TransFx-C™. Conforme foi observado e destacado pelos círculos vermelhos, algumas células perderam a característica de crescimento em suspensão e voltaram ao estado de aderência. Aumento de 250x.....	40
Figura 10. Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHO™ - Utility e SFM4CHO™, respectivamente. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d).....	42
Figura 11. Produtividade e metabolismo de células CHO no meio SFM4CHO™ - Utility e SFM4CHO™. ◇ - Concentração de EPOhr; □ - Taxa específica de formação de EPOhr; △ - Concentração de glicose no meio; ○ - Taxa específica de consumo de glicose; + - Concentração de lactato no meio; × - Taxa específica de produção de lactato.....	44
Figura 12. Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHO™ - Utility e HyCell™ sem HT, respectivamente. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d).....	46

- Figura 13.** Produtividade e metabolismo de células CHO nos meios SFM4CHOTM - Utility e HyCellTM sem HT, respectivamente. ◇ - Concentração de EPOhr; □ - Taxa específica de formação de EPOhr; △ - Concentração de glicose no meio; ○ - Taxa específica de consumo de glicose; + - Concentração de lactato no meio; × - Taxa específica de produção de lactato..... 47
- Figura 14.** Células CHO em meio CD FortiCHOTM. Conforme foi observado e destacado pelos círculos vermelhos, grande parte das células cultivadas neste meio formaram múltiplos grumos, dificultando os processos de contagem e adaptação no próprio meio. Aumento 250x..... 49
- Figura 15.** Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHOTM - Utility e CD FortiCHOTM. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d)..... 50
- Figura 16.** Produtividade e metabolismo de células CHO no meio SFM4CHOTM - Utility e CD FortiCHOTM, respectivamente. ◇ - Concentração de EPOhr; □ - Taxa específica de formação de EPOhr; △ - Concentração de glicose no meio; ○ - Taxa específica de consumo de glicose; + - Concentração de lactato no meio; × - Taxa específica de produção de lactato..... 52
- Figura 17.** Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHOTM - Utility e CellventoTM CHO-110 sem HT. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d). * Este gráfico se repete para facilitar a comparação dos resultados..... 54
- Figura 18.** Produtividade e metabolismo de células CHO nos meios SFM4CHOTM - Utility e CellventoTM CHO-110, respectivamente. ◇ - Concentração de EPOhr; □ - Taxa específica de formação de EPOhr; △ - Concentração de glicose no meio; ○ - Taxa específica de consumo de glicose; + - Concentração de lactato no meio; × - Taxa específica de produção de lactato..... 55
- Figura 19.** Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHOTM - Utility e CPCHOTM. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d)..... 57
- Figura 20.** Produtividade e metabolismo de células CHO nos meios SFM4CHOTM - Utility e CPCHOTM. ◇ - Concentração de EPOhr; □ - Taxa específica de formação de EPOhr; △ - Concentração de glicose no meio; ○ - Taxa específica de consumo de glicose; + - Concentração de lactato no meio; × - Taxa específica de produção de Lactato..... 59
- Figura 21.** Gráfico com os valores da Integral de Células Viáveis (ICV) ao longo do cultivo para os meios CD FortiCHOTM, CPCHOTM, HyCellTM sem HT, SFM4CHOTM - Utility, SFM4CHOTM e CellventoTM CHO-110..... 60

- Figura 22.** Células CHO viáveis, viabilidade e produtividade em meio SFM4CHOTM em biorreator. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. A linha tracejada indica o início da troca de meio. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d); ◇ - Concentração de EPOhr; □ - Taxa específica de formação de EPOhr; △ - Concentração de glicose no meio; ○ - Taxa específica de consumo de glicose. No canto inferior direito do gráfico é apresentada a concentração máxima de produto ($[EPOhr]_{max}$)..... **62**
- Tabela 1.** Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabelas de adaptação/expansão celular no meio HyCellTM. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller..... **39**
- Tabela 2.** Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabelas de adaptação/expansão celular no meio TransFx-CTM. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo; o retângulo indica o cultivo feito em meio TransFx-CTM; GR – Garrafa Rotatória/Roller..... **39**
- Tabela 3.** Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio SFM4CHOTM. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller..... **41**
- Tabela 4.** Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio HyCellTM sem HT. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller..... **45**
- Tabela 5.** Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio CD FortiCHOTM. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller..... **48**
- Tabela 6.** Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio CellventoTM CHO-110 sem HT. Cada valor apresentado está com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller..... **53**
- Tabela 7.** Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio CPCHOTM. Cada valor apresentado está com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller..... **56**

Tabela 8. Resumo das taxas, concentração e rendimentos das cinéticas dos meios testados. T_d – Tempo de duplicação; $X_{v_{max}}$ – Concentração máxima de células vivas; μ_{exp} – Taxa específica de crescimento exponencial por dia; [Glicose] – Concentração inicial de glicose; q_{Glic} – Taxa média específica de consumo de glicose; [Lactato] – Concentração de lactato formado; q_{Lact} – Taxa média específica de formação de lactato; $[EPOhr]_{max}$ – Concentração máxima de EPOhr produzida; q_{EPOhr} – Taxa média específica de formação de eritropoetina; P – Produtividade do cultivo em gerar EPOhr ao dia; $Y_{X/Glic}$ – Rendimento da formação de células por glicose consumida, durante o cultivo.....

RESUMO

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, os cultivos celulares passaram a ser uma importante plataforma para a produção dos biofármacos, que são proteínas recombinantes com fins terapêuticos, obtidos através de processos biotecnológicos. A manutenção das condições ideais de cultivo é de grande importância para a obtenção do produto conforme especificações de qualidade e requisitos de segurança. Desta forma, os meios de cultivo promovem o ambiente e fornecimento de nutrientes ideais às células, garantindo o funcionamento normal do metabolismo, do crescimento celular e a correta síntese do biofármaco. Neste projeto foi realizada a comparação de diferentes alternativas de meios de cultivo comerciais, livres de soro fetal bovino e componentes animais, com o meio de cultivo atualmente utilizado para o cultivo em suspensão de células CHO secretoras de EPOhr, observando-se a capacidade de promoção de crescimento, produtividade da molécula e metabolismo. Os experimentos foram conduzidos a partir do descongelamento de criotubos de um banco de células de trabalho, com células CHO secretoras de EPOhr. As células foram adaptadas em diferentes meios de cultivo e em sistemas de cultivo de frascos e garrafas. Ao final da etapa de adaptação direta, foram realizadas cinéticas comparativas com o meio utilizado atualmente. As cinéticas (candidato e controle) foram iniciadas a partir da última etapa de adaptação, durando de quatro a nove dias, dependendo das condições de cultivo. Dos meios testados, três apresentaram condições melhores ou iguais ao do meio padrão SFM4CHO™ - Utility. Os meios SFM4CHO™ e Cellvento™ CHO-110 apresentaram melhor capacidade de promoção de crescimento ($2,42 \times 10^6$ células/mL e $4,6 \times 10^6$ células/mL, respectivamente), enquanto o meio CPCHO™ apresentou maior produtividade e taxa específica de formação da EPOhr ($P = 12,16 \mu\text{g}/\text{dia}$ e $q_{\text{EPOhr}} = 7,3 \mu\text{g}/10^6 \text{ células}/\text{dia}$, respectivamente). Os meios de cultivo SFM4CHO™ e Cellvento™ CHO-110 apresentaram boa capacidade de sustentar a proliferação, alcançando concentração máxima de células viáveis superior ao meio de cultivo controle, indicando possuir melhor promoção de crescimento. O meio CPCHO™ apresentou melhor produção de EPOhr, em comparação ao meio de cultivo padrão. Os resultados sugerem que os três meios mencionados acima podem ser mais estudados para embasar o seu uso como alternativa de matéria prima numa eventual substituição de meio de cultivo, como a descontinuação do meio atualmente utilizado no processo.

Palavras-chave: Células CHO; Cultivo celular; Eritropoetina humana recombinante; Meio de cultivo;

ABSTRACT

The development in the field of molecular biology allowed cell culture to play an important role in the production of biological drugs. Biopharmaceuticals are recombinant proteins used for therapy purposes that are obtained by biotechnological processes. Providing the ideal cell culture conditions is extremely important for the synthesis of a biological product that must comply with quality specifications and safety requirements. The culture medium provides physiological environment and nutrients required, thus it has to guarantee the normal cell metabolism, cellular growth and correct biopharmaceutical synthesis by the cells. In the present project it was performed an evaluation between different media free of calf serum and animal components and the standard medium presently used in CHO cell culture for the production of hrEPO, comparing cell growth promotion capability, productivity and cell metabolism. The experiments were executed by thawing one vial of hrEPO producing CHO cells from the working bank. The cells were directly adapted in different culture media and culture systems (flasks and bottle). By the end of the adapting stage, it was performed a kinetic evaluation (candidate media and standard medium) starting from the last adaptation stage and its duration was variable subjected to the culture conditions. It was observed that three tested media showed better or similar results comparing to the standard medium (SFM4CHO-Utility). The SFM4CHO™ and Cellvento™ CHO-110 media demonstrated good capability to promote cell growth (2.4×10^6 cells/mL and 4.6×10^6 cells/mL, respectively), while CPCHO™ medium showed a better product yield and specific hrEPO production rate ($P_{CPCHO} = 12.2 \mu\text{g/day}$ and $q_{EPOhr_CPCHO_m} = 7.3 \mu\text{g}/10^6$ cells/day, respectively). In comparison with the standard medium, SFM4CHO™ and Cellvento™ CHO-110 media demonstrated a better capability for cell growth while the CPCHO™ medium showed better product yield. The results indicate that the three mediums stated above should be more thoroughly evaluated to support their use as alternative raw material for an eventual medium substitution, such as the discontinuation of the currently used in the process.

Key-words: CHO cell; Cell culture; Culture media; Human recombinant erythropoietin;

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a demanda internacional por medicamentos de alto valor agregado, como os biofármacos, vem se tornando prioridade em diversos países e, conseqüentemente, vários governos vêm reduzindo seus gastos com a compra para atender suas demandas de medicamentos excepcionais de alto custo, incorporando a produção atrelada a políticas de autossuficiência (Angle 2012). Em linhas gerais, os biofármacos são classificados como produtos terapêuticos de natureza biológica, produzidos por processos biotecnológicos, onde são utilizados organismos ou células vivas e geralmente envolvendo bioprocessos para gera-los (Rader 2008). Nos polos produtores de biofármacos, como Estados Unidos e União Europeia, esta categoria de medicamento cresce progressivamente. Apenas nos Estados Unidos, entre 2010 e 2014, 147 produtos farmacêuticos foram aprovados, entre os quais 38 – 26% dos fármacos criados – são da classe dos biofármacos. A mesma observação pode ser feita para a Europa (Walsh 2014).

Após a primeira aprovação de um biofármaco para o uso em seres humanos em 1982 – Humulin, Insulina humana recombinante (Eli Lilly) – novos biofármacos entraram no mercado, tendo nas últimas duas décadas um crescimento exponencial, contabilizando um número aproximado de 60 biofármacos produzidos e liberados para consumo. Com a demanda acentuada por essa nova classe de medicamentos, o mercado farmacêutico apresenta alta taxa de retorno financeiro. A exemplo, 37 produtos farmacêuticos que se enquadram nessa classe e considerados bem sucedidos atingiram mais de US\$ 1 bilhão em vendas em 2013, só nos Estados Unidos (Walsh 2014).

Algumas empresas, visando o retorno garantido pelo mercado criado pelo uso do medicamento original, passaram a desenvolver medicamentos denominados biossimilares. Quando a patente dos biofármacos já descritos expira, outras empresas que não detinham os direitos de produção podem produzi-los, gerando os biossimilares. A vantagem dos biossimilares é encontrada no preço, já que estes costumam ser mais baratos, em comparação ao produto-matriz (Walsh 2014).

Alguns exemplos podem ser citados, como os conjugados droga-anticorpo (CDA) – anticorpos monoclonais associados a medicamentos para tratamento de certas doenças, geralmente para câncer (Mylotarg/Wyeth e Kadcyla/Genentech) – os biofármacos que recebem uma molécula de polietileno glicol (PEG), como o PEG-Interferon ou o acréscimo de uma cadeia de ácido siálico na molécula de eritropoetina, como na α -Darbepoetina (Elgrie & Browne 2001; Walsh 2014).

O Brasil está incluído neste contexto por intermédio do Ministério da Saúde (MS) e algumas de suas instituições federais. O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), alinhado a sua missão, trabalha no intuito de desenvolver e produzir novos biofármacos que atenderão as necessidades de saúde pública da população.

Com a nacionalização de processos produtivos de medicamentos que eram importados a preços elevados, grande parte da população brasileira passou a ter acesso a medicamentos de alto valor agregado por intermédio do Sistema Único de Saúde (SUS), que distribui gratuitamente esses itens. A partir desta estratégia, Bio-Manguinhos passa a fazer parte do grupo de fornecedores do MS, no âmbito do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica. Neste momento, Bio-Manguinhos/Fiocruz dá um salto tecnológico na produção de medicamentos, o que aumenta a sua variedade produtiva e fortalece seu posto no programa de desenvolvimento industrial e tecnológico do governo federal. Este fato mostra a intenção do governo federal em fortalecer a área tecnológica do país e reduzir a dependência nacional de imunobiológicos e biofármacos importados.

A decisão do governo brasileiro em obter imunobiológicos e biofármacos com qualidade e distribuir gratuitamente para a população possui como exemplo a parceria entre Cuba e Brasil. Por intermédio da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ) e de Bio-Manguinhos os dois países estreitaram relações cooperativas e firmaram acordos de transferência de tecnologia de biofármacos de interesse do Ministério da Saúde do Brasil. Estes acordos foram firmados entre o Centro de Imunologia Molecular (CIM/Cuba) e o Centro de Engenharia Genética de Biotecnologia (CIGB/Cuba) com Bio-Manguinhos, visando à transferência parcial ou total dos processos produtivos da Eritropoetina humana recombinante (EPOhr), Alfaepoetina, e da Interferona alfa 2b (Alfainterferona), respectivamente. Ao mostrar o grande valor para economia brasileira,

os acordos de transferência de tecnologia – TT – levam à redução de gastos com a compra desses medicamentos pelos cofres públicos, fortalecendo a economia nacional.

O fornecimento gratuito dos componentes especializados (PAF – Programa de Assistência Farmacêutica/MS), representados por inúmeros biofármacos de alto custo, resulta em gastos significativos para o governo. Após a assinatura da TT (2004) e obtenção do registro junto à Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2006, o Ministério da Saúde passa a adquirir esses biofármacos de Bio-Manguinhos (laboratório público produtor), promovendo assim ações de desenvolvimento produtivo no complexo industrial da saúde, conforme disposto na portaria Nº 1554 de 30 de Julho de 2013. Alfaepoetina humana recombinante (EPO), um dos biofármacos que faz parte do portfólio de Bio-Manguinhos desde 2006 é indicada para pacientes com anemia por insuficiência renal crônica, anemia resultante do tratamento para a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em regime terapêutico com Zidovudina e pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico (Alfaepoetina 2011). Após assinado o acordo de Transferência de Tecnologia, Bio-Manguinhos vem se preparando gradualmente para a incorporação de toda produção de EPOhr, desde a produção do Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA), baseado em sistema de cultivo de células animais, até seu processamento final, culminando na completa nacionalização da tecnologia de produção.

1.1. Produção de biofármacos em cultivos celulares

Os cultivos celulares são empregados para produção de compostos químicos e produtos de origem biológica. Atualmente, com o avanço da biotecnologia e da engenharia genética, os cultivos celulares foram os sistemas encontrados para a produção dos biofármacos, que são proteínas recombinantes com fins terapêuticos, obtidos através de processo biotecnológicos (Stryjewska et al 2013). A biotecnologia industrial aplicada na área dos biofármacos foi inicialmente impulsionada com a produção em larga escala da penicilina, durante a Segunda Guerra Mundial, evoluindo com o respaldo dos avanços no campo da biologia molecular para criação de sistemas de obtenção de moléculas complexas de uso terapêutico (Stryjewska et al 2013).

Diversos organismos podem ser cultivados e utilizados industrialmente para produção de inúmeros metabólitos primários, como aminoácidos, vitaminas e metabólitos secundários (antibióticos, agentes antitumorais e anti-helmínticos), enzimas e proteínas recombinantes expressas por sistemas biológicos, ao qual a proteína de interesse não é nativa (Adrio & Demain 2010). Muitos micro-organismos como *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* são utilizados na produção de produtos biológicos simples que não necessitam de modificações pós-traducionais ou apresentam modificações básicas, não sendo necessária à utilização de células com maquinaria enzimática mais complexa (Rabert et al 2013; Wang et al 2014; Jappelli et al 2014). Entretanto, quando a proteína recombinante precisa de modificações pós-traducionais complexas para ter sua atividade biológica completa, estabilidade funcional e a qualidade requerida, torna-se necessário o emprego de células eucariontes superiores que são capazes de realizar as modificações pós-traducionais necessárias (Meyer et al 2013).

A modificação pós-traducional mais comum e que ocorre em todas as células animais é a glicosilação, onde as proteínas recombinantes recebem cadeias de carboidratos em regiões específicas da cadeia de aminoácidos (Li & d'Anjou 2009). Diversas linhagens celulares são empregadas na expressão de proteínas recombinantes, dando destaque às células de mamíferos, sendo as mais utilizadas as HEK 293 (células de rim humano embrionário), CHO (células de ovário de hamster chinês) e BHK (células de rim de filhotes de hamster). Em alguns casos o animal transgênico, como coelhos e cabras, podem ser utilizados obtendo-se o produto solúvel no leite produzido pelo tecido geneticamente modificado (glândulas mamárias), como o Atryn – uma antitrombina alfa recombinante – secretado no leite de cabras transgênicas (Walsh 2014).

Entretanto, não só células de mamíferos são empregadas para a expressão dessas moléculas. Atualmente, células de insetos e de plantas têm sido estudadas e, conseqüentemente, utilizadas para a produção de biofármacos. Células de inseto que utilizam sistemas de expressão virais foram empregadas para a produção de vacinas, como a Flublok (Sciences; Meriden/EUA) contra o vírus *Influenza* e a Cervarix (GlaxoSmithKline/Grã-Bretanha) contra o HPV (Vírus do Papiloma Humano) e, recentemente, uma proteína recombinante expressa por células vegetais – que expressam a proteína e a armazenam nos vacúolos celulares – Elelyso (Protalix Biotherapeutics/Pfizer), foi aprovado para o uso em seres humanos pelos EUA (Walsh 2014).

Mesmo com novos sistemas de expressão desenvolvidos, a célula CHO é a mais utilizada em processos de produção de proteínas recombinantes para uso terapêutico (Meleady et al 2011; Wuest et al 2012). Mediante o emprego das células CHO nos cultivos celulares para produção de proteínas recombinantes, diversas estratégias podem ser aplicadas para o aprimoramento da expressão proteica. Desde a obtenção de um vetor mais competente na expressão da proteína recombinante, sistemas de amplificação, o emprego de genes que expressam fatores de crescimento, o controle de apoptose e ainda a suplementação do meio de cultivo com componentes que beneficiam o crescimento celular (Hee et al 2013; Khan 2013). Com relação aos sistemas de amplificação, os mais empregados são os da Dihidrofolato Redutase (DHFR) e Glutamina Sintetase (GS) (Chartrain & Chu 2008). O processo começa quando o gene da DHFR ou da GS é retirado do genoma da população de células CHO que será usada

para a expressão da proteína de interesse. Após a deleção, o vetor com o gene-alvo junto com o gene que expressa a DHFR ou a GS é transfectado nas células CHO e dá-se início ao processo de seleção criado pelo sistema de amplificação (Omasa et al 2010). Para verificar a integração do vetor no genoma das células transfectadas, as mesmas são tratadas, em diferentes concentrações, com substâncias inibidoras como o metotrexato (MTX) para o sistema com DHFR ou metionina sulfoximida (MSX) para o sistema com GS. As células que integraram o vetor ao seu material genético passarão a expressar em grande quantidade o gene da DHFR ou GS para suprir a inibição química e consequentemente co-expressarão o produto do gene-alvo (Matasci et al 2009). O grau de resistência desejado ao inibidor vai depender das concentrações aplicadas durante a seleção. Após a confirmação da resistência desejada, a população resistente passa a expressar a DHFR ou GS e co-expressar a proteína de interesse no meio de cultivo sem adição do MTX ou MSX (Butler 2004). O nível de expressão não depende apenas dos inibidores químicos, mas de inúmeras outras características, como o vetor empregado, o local de inserção do vetor no cromossoma da célula, da linhagem celular utilizada e do meio de cultivo empregado na produção da proteína recombinante (Matasci et al 2009).

A seleção feita pelos inibidores gera células que expressam grandes quantidades da proteína de interesse. Isso está relacionado ao fato da integração do gene de interesse ocorrer no mesmo sítio de integração do gene de seleção no cromossoma da célula (Omasa et al 2010). As subpopulações que sobreviveram ao processo de seleção são clonadas, de acordo com seu nível de produtividade da proteína-alvo e pela taxa de crescimento. Para garantir a constante expressão do gene de interesse, se faz necessário o uso de uma rotina de verificação da produção da proteína, já que a produtividade pode reduzir em cultivos de longa duração (Omasa et al 2010).

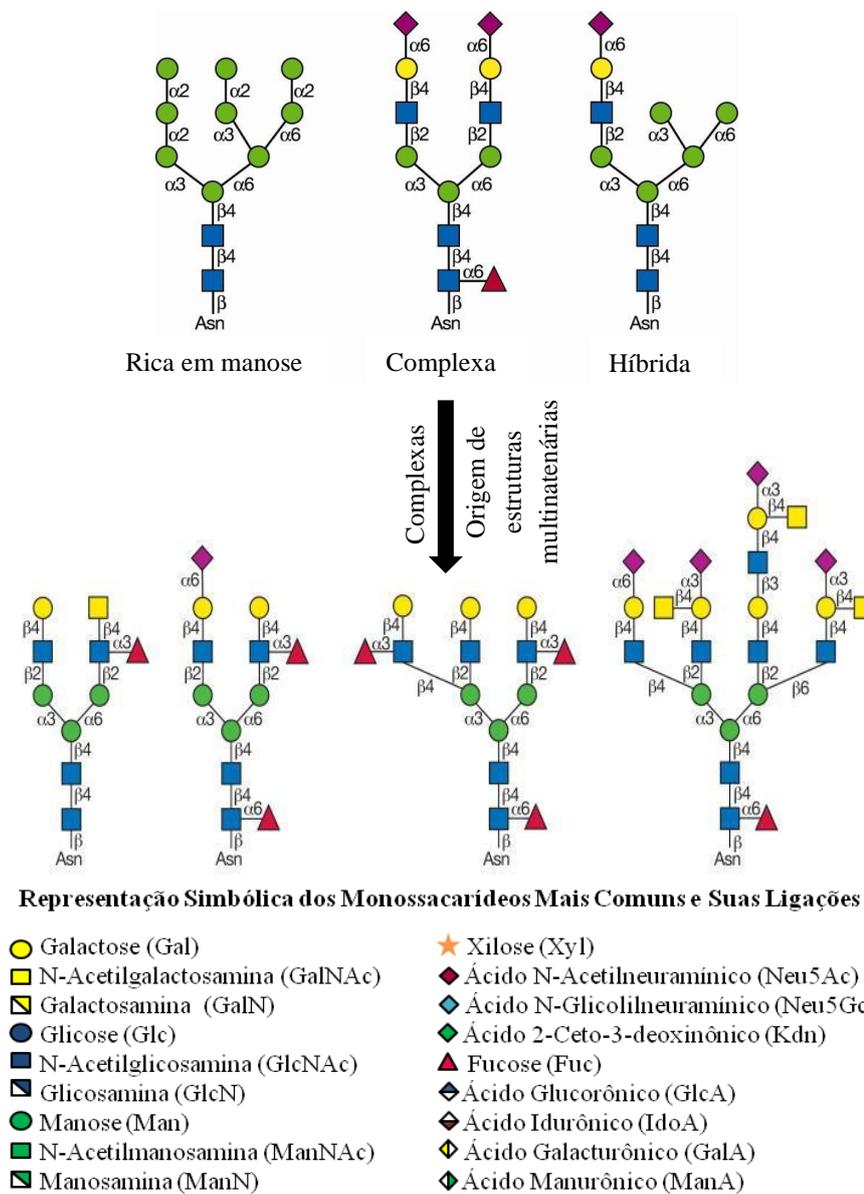
1.2. Glicosilação

A glicosilação é modificação pós-traducional mais comum realizada por células eucariontes e consiste na ligação enzimática de cadeias oligossacarídicas em determinados aminoácidos das proteínas expressas pelas células. Existem dois tipos de glicosilação, gerando os N-glicanos e os O-glicanos (Li & d'Anjou 2009). Essas ligações são possíveis na presença de enzimas situadas no aparelho de Golgi (AG) e no retículo endoplasmático rugoso (RER) das células, podendo variar de atividade de acordo com a espécie origem da linhagem, levando à formação de diferentes

glicofomas. As N-glicosilações são as modificações pós-traducionais mais comuns e são realizadas por fungos e outros eucariotos superiores, como as células vegetais e animais. O processo de N-glicosilação começa quando um oligossacarídeo precursor composto de três resíduos de glicose na porção não reduzida da sequência manose-9-N-Acetilglicosamina-2 ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) é gerado pela adição de monossacarídeos associados a nucleotídeos e fica ancorado em uma molécula lipídica denominada dolicol-pirofosfato, formando a estrutura glicose-3-manose-9-N-Acetilglicosamina-dolicol pirofosfato ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$) (Butler 2008). A transferência da estrutura central $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ para a cadeia polipeptídica ocorre durante a tradução do mRNA no RER e é catalisada pela enzima oligossacariltransferase (OST), formando uma ligação N-glicosídica. No caso dos N-glicanos, a estrutura central liberada do dolicol-fosfato é ancorada em resíduos de Asparagina presentes na sequência consenso asparagina-Xaa-Serina/Treonina (Asn-Xaa-Ser/Thr) da proteína recombinante, onde Xaa pode ser qualquer aminoácido, exceto Prolina (Helenius & Aebi 2004). Os oligossacarídeos são aparados por glicosidases, como a α -manosidase 1, residentes na membrana do RER antes da proteína ser transportada para o aparelho de Golgi e, dependendo da linhagem de célula animal utilizada, novos padrões de glicosilação podem ocorrer, diferenciando as glicofomas produzidas (Butler 2008).

Em células animais como a célula CHO e células HEK 293, por exemplo, existem variedades de exoglicosidases e glicosiltransferases presentes no AG capazes de remodelar o *core* $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, criando uma gama de glicofomas heterogêneas com regiões antenárias variadas, como as antenas ricas em resíduos de Manose, híbridas, complexa com ou sem resíduos de Fucose e estruturas multiantenárias, conforme mostrado na figura 1 (Li & d'Anjou 2009; Hossler et al 2009; Butler 2008; Stanley et al 2009). Uma característica interessante é o fato de oligossacarídeos ancorados com galactose terminal possuírem uma taxa maior de sialilação (inserção de ácido siálico no *core* oligossacarídico). A sialilação das proteínas recombinantes torna-se importante no âmbito de muitas glicoproteínas utilizadas como biofármacos, pois este fenômeno garante características fundamentais, como a sua atividade biológica, maior tempo de circulação da proteína no organismo (previne a remoção de proteínas pelo fígado) e baixa antigenicidade (Durocher & Butler 2009). Os níveis de sialilação podem variar, de acordo com a linhagem celular, proteína recombinante e condições de cultivo, como concentração de nutrientes e fatores físico-químicos (Durocher & Butler 2009). As

diferentes vertentes citadas acima são estudadas com certa frequência. Em especial, estudos sobre a disponibilidade e diferentes concentrações de nutrientes e metabólitos estão entre os assuntos mais pesquisados (Aghamohseni et al 2014; Borys et al 2010; Liu et al 2014).



Outros Monossacarídeos

Usar uma letra dentro do símbolo para especificar, caso necessário

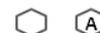


Figura 1. Figura ilustrativa dos tipos de sacarídeos e oligossacarídeos N-ligados que podem ser ligados à proteína de interesse. Os oligossacarídeos estão ligados sempre ao resíduo Asn da sequência Asn-X-Ser/Thr e apresentam diversas estruturas (rica em manose, híbrida ou complexa). Adaptado de Stanley et al 2009.

Esta grande variedade de estruturas pode ser definida pelos termos macro-heterogeneidade e micro-heterogeneidade (Butler 2008). A macro-heterogeneidade é caracterizada pela possibilidade de ocupação das sequências consenso ao longo da

cadeia polipeptídica pelos N-glicanos, mesmo em pontos de baixa acessibilidade (Butler 2008). Como a formação de pontes dissulfeto nos polipeptídeos também ocorre ao mesmo tempo da tradução do mRNA, algumas sequências consenso podem não receber o N-glicano. Devido a este fato, a mesma proteína pode apresentar glicofomas diferentes no mesmo organismo. Já a micro-heterogeneidade é caracterizada pela diversidade dos N-glicanos ancorados na mesma proteína. Este fato acontece quando nem todas as reações catalisadas pelas transferases do AG são executadas corretamente na estrutura final do N-glicano, podendo criar diferentes estruturas, principalmente nas estruturas complexas (Butler 2008).

Existe outro tipo de glicosilação, a O-glicosilação, onde o N-acetil-galactosamina (GalNAc) é ligado covalentemente pela ação da N-Acetilgalactosamina transferase (OGT) em resíduos de Ser ou Thr da proteína, gerando O-glicanos (Li & d'Anjou 2009; Brockhausen et al 2009). Os resíduos de Ser e Thr podem apresentar três estados: intactas – sem a presença de qualquer molécula acoplada – fosforilada ou com O-glicanas ligadas (Hart et al 1996; Lubas et al 1997). Os O-glicanos são estruturas menores do que os N-glicanos e são inseridos após a etapa de tradução no aparelho de Golgi, quando a proteína está totalmente enovelada. Após a inserção do GalNAc nos resíduos de Ser ou Thr, até oito estruturas centrais podem ser formadas, devido ao grande número de transferases que agem após a inserção da estrutura principal (Butler 2008; Hart & Akimoto 2009). Atualmente, já se sabe que as O-glicanas têm a função de regular a conformação proteica, facilitar a montagem da estrutura multimérica da proteína, assim como a estabilidade estrutural da mesma e que as modificações nos O-glicanos são dinâmicas e podem ter o propósito regulatório da molécula (Bektas & Rubenstein 2011).

Como previamente citado, a linhagem de células CHO são as mais empregadas nos cultivos celulares para a produção de proteínas recombinantes de uso terapêutico. Este fato é explicado pela alta produtividade, robustez, biossegurança, facilidade na manipulação genética e pela habilidade em criar padrões de glicosilação similares aos padrões humanos (Meleady et al 2011; Rahimpour et al 2013), além disso, por ser a célula mais utilizada, apresenta maior quantidade de informação disponível. Rahimpour e colaboradores (2013) discutem que apesar da célula CHO apresentar um baixo nível de produção, em comparação à célula procariótica ou eucariótica inferior, os níveis e

complexidade da glicosilação que a célula CHO possui compensa a relativa baixa produtividade.

1.3. Sistemas de cultivo

Para a realização da produção de biofármacos, dois sistemas de cultivo são bastante explorados: o cultivo de células em frascos (estáticos, em garrafas rotatórias e frascos *spinner* em pequena escala) e o cultivo de células em biorreatores para obtenção de um maior volume produtivo para obter uma maior massa do produto de interesse. Os cultivos de células em frascos e em garrafa, geralmente, são utilizados para expansão da linhagem celular, como preparação do inóculo para o cultivo em biorreatores ou adaptação das células ao cultivo em suspensão. O biorreator é utilizado para aumentar a escala do cultivo e, por consequência, é empregado na produção, tanto experimental quanto industrial (Véliz et al 2008).

1.3.1. Cultivo em frascos

Os cultivos realizados em frascos e garrafas, exemplificados na figura 2, são muito utilizados como propagador do inóculo. Nos frascos estáticos T-25 e T-75, o inóculo costuma ser basal para dar início à propagação do cultivo celular, não sendo inferior a 10^5 células por mililitro, devido ao volume do frasco e necessidade de concentração mínima ótima para a propagação (Lu et al 2007).

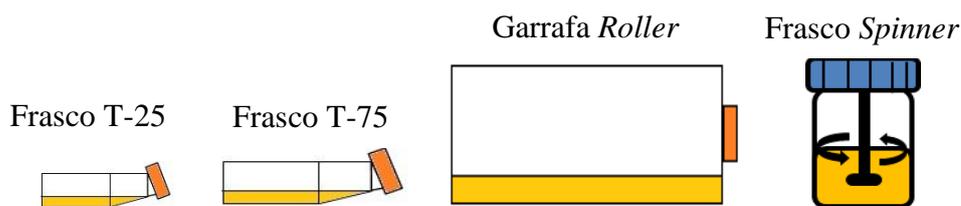


Figura 2. Desenho esquemático dos tipos de frascos e garrafas utilizadas para o cultivo celular.

O escalonamento do cultivo celular é realizado para se obter maior superfície ou volume, possibilitando a obtenção de mais biomassa e, conseqüentemente, maior produtividade. Tal processo pode ser empregado em garrafas rotatórias do tipo *Roller*. As garrafas rotatórias são garrafas cilíndricas que ficam em constante movimento em uma base que apresenta rolamentos, permitindo que as células ali presentes entrem em contato constantemente com o meio de cultivo. Apesar da iminente substituição das garrafas rotatórias por novas tecnologias – frascos *spinner* e frasco *shakers* –

(Amanullah et al 2010; Bleckwein et al 2005), vacinas com base na utilização destas garrafas se encontram em fase de desenvolvimento, onde importantes resultados foram obtidos (Chou et al 2012).

Outra opção de frasco que pode ser utilizado no escalonamento de cultivos celulares são os frascos do tipo *spinner* (Kallel et al 2002). É um frasco que apresenta, ligada à tampa, uma barra magnética com uma hélice que se estende até o fundo do frasco (Bleckwein et al 2005), ou um pêndulo com a mesma função de agitação. Este sistema já foi muito utilizado nos últimos 10-20 anos, mas atualmente está sendo substituído pelos sistemas de frascos agitados do tipo *shakers*, que, como principal característica, apresentam maior facilidade de manipulação (Amanullah et al 2010).

1.3.2. Cultivo em biorreatores

Os biorreatores permitem o cultivo apropriado de micro-organismos e células – tanto animais quanto células vegetais – permitindo o monitoramento e controle dos parâmetros de processo e com a vantagem de poderem alcançar maiores volumes de cultivo (escalonamento), visando à escala industrial (Véliz et al 2008). Os biorreatores possuem algumas classificações, porém uma bastante utilizada é em relação à homogeneidade da distribuição celular.

Os biorreatores possuem, pelo menos, duas fases dentro dos seus vasos: a fase líquida – referente ao meio de cultivo – e a fase sólida (referente às células cultivadas). Os equipamentos que conseguem uniformizar a fase líquida com a fase sólida, ou seja, as células encontram-se difundidas no meio, são considerados biorreatores homogêneos. Os equipamentos que apresentam uma divisão de fases e não apresentam células difundidas na fase líquida, são denominados biorreatores heterogêneos (Véliz et al 2008). O enfoque dado neste trabalho foi aos biorreatores homogêneos devido ao escalonamento dos cultivos celulares e futuras produções de EPOhr em biorreatores homogêneos de tanque agitado.

Biorreatores homogêneos: são os mais empregados no desenvolvimento e na indústria, pela facilidade que eles apresentam para monitorar o ambiente do cultivo e permitem realizar correções que não alterem a fisiologia celular (Véliz et al 2008). Os biorreatores homogêneos mais utilizados são os biorreatores de tanque agitado, do tipo *wave* e *air-lift*.

Biorreatores heterogêneos: são assim denominados por apresentarem duas fases em seu interior, uma onde as células utilizadas para a produção do produto de interesse ficam imobilizadas em compartimentos contendo superfícies ou em leito biocompatível, simulando o tecido de origem da célula e a outra sendo a circulação de meio de cultivo para nutrir essas células aderidas. Estes biorreatores foram desenvolvidos para atender ao uso de células com características aderentes, o que representa uma desvantagem no que se refere ao monitoramento das condições de cultivo, pois não é possível realizar uma amostragem homogênea da população celular presente no biorreator. Devido à característica do crescimento celular (semelhante a um tecido), nem todas as células têm o aporte necessário de nutrientes e oxigênio, criando diferentes níveis de crescimento e fases metabólicas em um mesmo cultivo e a dificuldade no escalonamento da matriz aderente (Véliz et al 2008).

1.3.2.1. Biorreatores do tipo tanque agitado

Os biorreatores em aço inox do tipo tanque agitado são os mais utilizados na indústria, mesmo já existindo novas alternativas para o cultivo celular como os biorreatores *single use* (Eibl et al 2010; Hsu et al 2012). Os sistemas de tanque agitado apresentam como vantagem a sua simplicidade operacional, a facilidade no monitoramento, controle e escalonamento da produção do biofármaco (Warnock & Al-Rubeal 2006; Jain & Kumar 2008). Porém, a formação de bolhas e as tensões de cisalhamento que podem danificar as células durante o cultivo são desvantagens que este biorreator apresenta (Kunas & Papoutsakis 2009).

Basicamente, este tipo de biorreator é composto por um vaso (geralmente feito de vidro borossilicato) resistente ao calor, quando o uso do biorreator é voltado para a pesquisa em pequenos volumes e de aço inoxidável, quando utilizado escala industrial (50 L – 15.000 L) (Véliz et al 2008). Este biorreator possui diversos componentes ilustrados na figura 3 (tubulações, válvulas, bombas, motores e sensores), que estão envolvidos nas operações necessárias para a condução do cultivo, como a injeção de meio e suplementos, agitação, aeração, exaustão, monitoramento, colheita e etc. Esses periféricos podem ser feitos de diversos materiais (silicone, polímeros e aço inox) dependendo da escala em questão. O sistema que caracteriza este tipo de biorreator é o de agitação, apresentando impelidores movidos por um motor, de acoplagem mecânica ou magnética. Os biorreatores também apresentam chicanas que são estruturas presentes

nas paredes internas do vaso que evitam o fenômeno de vórtice, favorecendo a homogeneização ideal do conteúdo do biorreator (Saudid et al 2013).

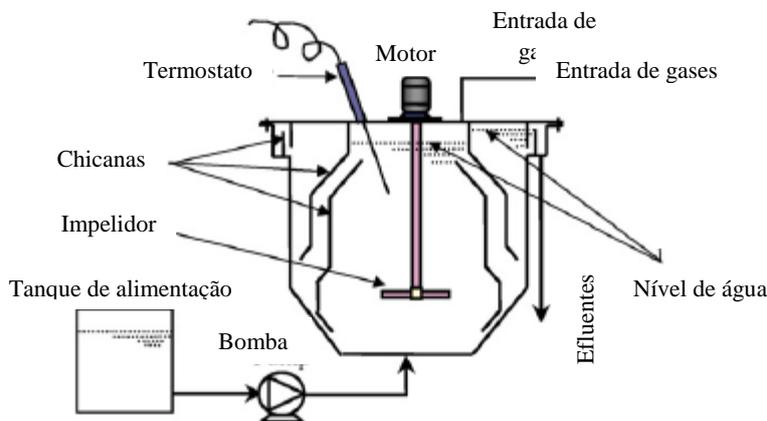


Figura 3. Esquema simplificado de um biorreator do tipo tanque agitado e alguns dos seus componentes – impelidor, motor, termostato, um duto para retirada de amostra e efluentes, chicanas e duto para entrada de gases. Adaptado de Li et al 2009.

O biorreator de tanque agitado pode ser operado em diversos modos, devido a sua simples característica operacional, sendo possível realizar ajustes e modificações nas suas correntes de entrada e saída, resultando na sua supremacia como sistema de produção de biofármacos em grande escala. Desde a produção de células-tronco (Olmer et al 2012), produção de biomassa para produzir a vacina da gripe (Hundt et al 2011), anticorpos (Tuveson et al 2008) e proteínas recombinantes, como a Eritropoetina humana recombinante (Chuan et al 2006) e a Isoflavona (Kokotkiewicz et al 2013) em quantidades relevantes para comercialização em massa.

1.4. Modos de operação

Os quatro principais modos de operação de cultivo em biorreatores são: cultivo descontínuo (conhecido como batelada ou *batch*), cultivo descontínuo alimentado (caracterizado como batelada alimentada ou *fed-batch*), cultivo contínuo e contínuo com retenção de células, também denominado como contínuo com perfusão (Véliz et al 2008). Cada modo de operação é empregado de acordo com as características que o processo apresenta, como características da linhagem celular empregada (estabilidade genética para expressão da proteína de interesse, capacidade da linhagem em suportar concentrações elevadas de metabólitos tóxicos e resistência às condições físico-químicas do biorreator) e a necessidade do mercado pelo produto gerado, determinando a capacidade produtiva do sistema (Véliz et al 2008).

1.4.1. Batelada simples

Este é o modo mais simples de cultivo em biorreatores. Como esquematizado na figura 4, este sistema consiste no cultivo realizando-se um inóculo em um volume determinado de meio que será coletado ao final do processo. Neste processo, não ocorre acréscimo de nutrientes ao longo da corrida nem reciclo celular ou do meio metabolizado. Durante este processo, ocorre heterogeneidade metabólica, exposição prolongada do biofármaco a condições que podem deteriorá-lo, além de esgotamento dos nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos para a célula (Véliz et al 2008).

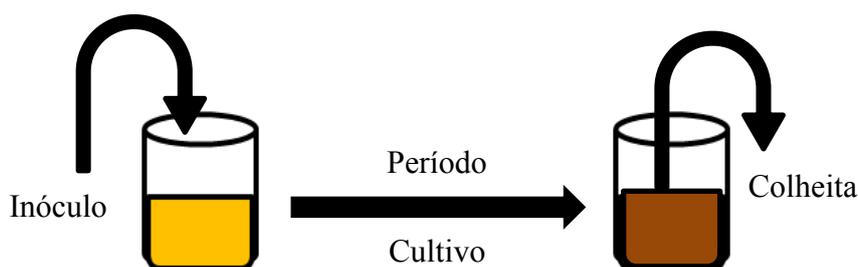


Figura 4. Esquema simplificado de um cultivo realizado em batelada simples.

Mediante tais fatos, é muito utilizado para produção de biológicos e compostos resistentes a eventuais degradações, tendo como base celular micro-organismos ou células eucarióticas. Estudos mais recentes mostram o uso da batelada simples como padrão para definir parâmetros experimentais para a aplicação de outros modos de operação, como a batelada alimentada (Vanz et al 2014; Moreno et al 2013).

1.4.2. Batelada alimentada

Em bioprocessos utilizando o modo de condução do cultivo celular denominado de batelada alimentada, ocorre suplementação de nutrientes ao meio de cultivo inicial e o volume de operação varia de acordo com a capacidade do vaso do biorreator, como mostrado na figura 5. O cultivo começa com um volume inicial padrão e ao longo do processo, novas quantidades de meio de cultivo ou determinados nutrientes são adicionados ao volume inicial, viabilizando uma sobrevivência mais longa do cultivo celular e uma maior produtividade relativa do biológico, porém o problema do acúmulo de metabólitos tóxicos permanece, além do maior tempo de exposição do produto alvo a condições desfavoráveis, o que prejudica a produção de produtos mais lábeis (Véliz et al 2008).

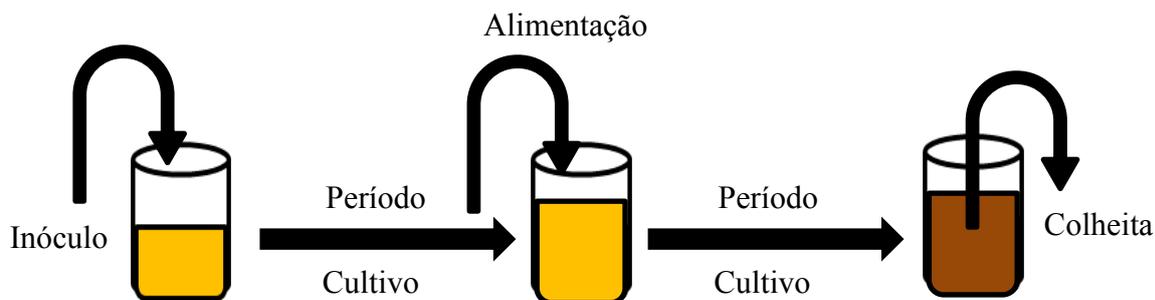


Figura 5. Esquema simplificado de um cultivo realizado em batelada alimentada.

O emprego da batelada alimentada auxilia na extensão da viabilidade celular e, conseqüentemente, aumenta os níveis de produção da proteína de interesse (Ren et al 2013), assim como é possível aperfeiçoar a produção de certos compostos alternativos com o uso da batelada alimentada (Zhang et al 2014).

1.4.3. Contínuo e contínuo com reciclo celular (perfusão)

O modo contínuo baseia-se, conforme figura 6, na troca constante de meio metabolizado por meio de cultivo novo, a fim de prolongar a duração da corrida. Ao retirar o meio metabolizado, células presentes no cultivo também são retiradas, juntamente com os metabólitos tóxicos e o produto de interesse, permitindo a recuperação constante do mesmo. Esta troca e retirada, quando feita de forma racional, ou seja, vinculada à velocidade específica de crescimento das células, evita a lavagem do biorreator – retirada em excesso de células do cultivo – proporcionando um maior tempo de corrida e uma maior viabilidade celular, o que favorece a produção da proteína recombinante. Já o processo contínuo com reciclo celular é mais complexo e mais eficaz, ao se tratar de produção de biofármacos (Véliz et al 2008).

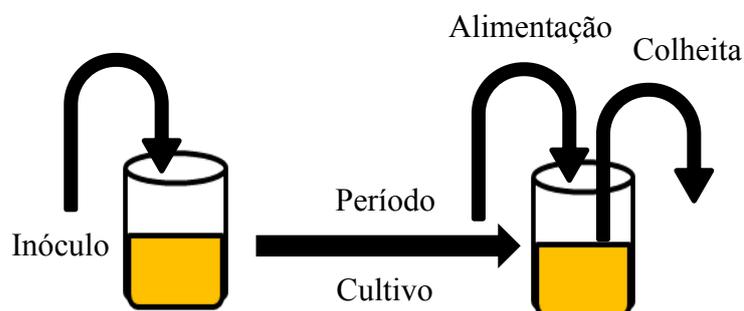


Figura 6. Esquema simplificado de um cultivo realizado em sistema contínuo.

O modo contínuo com perfusão segue a mesma linha do modo contínuo, porém com a vantagem de reter as células durante a troca do meio, não sendo necessário o vínculo entre a taxa de perfusão e a taxa específica de crescimento, conforme figura 7.

Este processo permite a troca constante de meio metabolizado por meio de cultivo novo e uma corrida prolongada que gera um alto índice de viabilidade celular e concentração celular, conseqüentemente, maior produção do biológico. Diversos dispositivos podem ser usados com o objetivo de reter as células durante o modo contínuo com perfusão. Podem ficar externamente ao biorreator, igual ao da figura 7, ou podem ficar dentro do biorreator. Normalmente, eles são baseados em separação por campo gravitacional ou centrífugo e filtração, mas todos dependentes do tamanho e densidade da célula a ser retida e separada do meio retirado. Estes dispositivos têm algumas desvantagens, os baseados em filtração podem apresentar entupimento e os dispositivos baseados em centrifugação podem sofrer com a adesão celular nas paredes do dispositivo e entupimento dos dutos de saída. Para amenizar os problemas, algumas estratégias são adotadas como sistemas de refrigeração que induzem a formação de agregados celulares, facilitando a sedimentação das células retidas e estruturas pulsantes que previnem a adesão celular nos compartimentos de drenagem (Castilho & Medronho 2002).

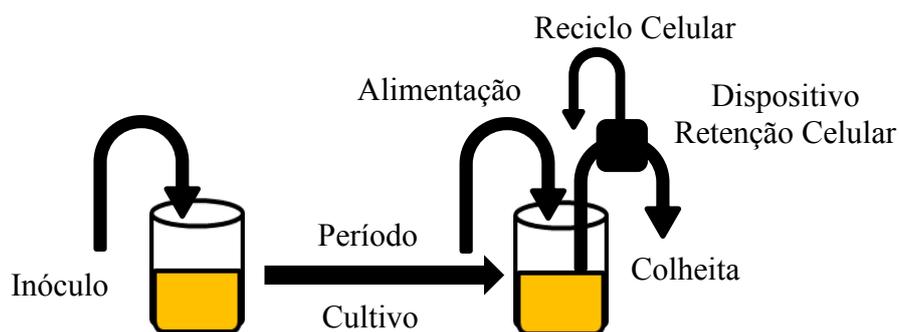


Figura 7. Esquema simplificado de um cultivo realizado em sistema contínuo com reciclo celular.

A grande vantagem dos modos contínuos, de uma forma geral, é a homogeneidade das condições de cultivo, garantindo a produção de produtos com baixa variabilidade. Gorenflo e colaboradores (2004) já haviam documentado a vantagem do modo contínuo com retenção de biomassa que garantia níveis altíssimos de densidade celular e taxas de produtividade superiores a uma ordem de grandeza, em comparação com o modo de batelada simples. Um fator muito importante que garante os elevados níveis descritos pelo modo em perfusão é a capacidade de manter os metabólitos tóxicos a níveis não-letais, favorecendo a longevidade do cultivo (Petiot et al 2011; Yeo et al 2013).

1.5. Meios de cultivo para células animais

Os meios de cultivo são compostos por componentes que oferecem nutrientes e condições ambientais ideais às células presentes no cultivo, possibilitando o funcionamento normal do metabolismo e do crescimento celular. Os primeiros relatos de meios de cultivo datam do século XIX, onde estes eram compostos de diferentes sais em suas concentrações ótimas com o propósito de cultivar e manter vivas células animais. Desde então, pouca coisa foi estudada até Harry Eagle que, em 1955, desenvolveu o meio basal MEM (Meio Essencial Mínimo), servindo de base para o desenvolvimento de outros meios mais completos. O desenvolvimento do MEM foi o marco inicial para a pesquisa na área e hoje existem diversas linhas de desenvolvimento com base na criação de novos meios de cultivo (Van der Valk et al 2010; Jordan et al 2013). A partir dos meios basais, os meios de cultivo podem ser classificados como meios complexos por apresentarem componentes de proporção não definida (extratos e hidrolisados) e meios definidos, que apresentam a proporção de todos os componentes da sua formulação em concentrações conhecidas. Os meios livres de soro (meios que não necessitam da suplementação com soro, podendo conter extratos e hidrolisados), os meios livres de proteína (não apresentam proteínas de alto peso molecular, mas apresentam peptídeos na sua composição) e os meios livres de componentes de origem animal (não apresentam nenhum componente de origem animal ou humana, porém podem apresentar componentes não-definidos, como extratos de levedura ou de plantas), em essência, são considerados meios complexos (Van der Valk et al 2010). Os meios quimicamente definidos não apresentam proteínas, hidrolisados ou extratos de composição desconhecida, só contendo componentes conhecidos, como hormônios e fatores de crescimento purificados. Os novos meios de cultivo estudados e desenvolvidos são baseados na união dos diferentes tipos de meios de cultivo, visando à melhor resposta da célula e à melhoria do processo e do produto de interesse (Van der Valk et al 2010).

Conforme Van der Valk e colaboradores (2010) e Jordan e colaboradores (2013) discutem em seus trabalhos, atualmente a grande maioria das pesquisas voltadas para este campo visa à criação de meios quimicamente definidos (meio de cultivo que não contém proteínas, hidrolisados ou qualquer outro componente de composição desconhecida) e livres de soro fetal bovino. O motivo dessa padronização no processo se dá pelo fato de que algumas substâncias ou fatores podem alterar os perfis de

expressão e de glicosilação de certas proteínas recombinantes e prejudicar sua produção (Gawlitzeck et al 2009). A busca por meios quimicamente definidos é impulsionada por questões regulatórias (retirada de componentes de origem animal) e de homogeneidade de insumos para a produção (quimicamente definidos, eliminando a variação lote-a-lote) (Van der Valk et al 2010).

1.5.1. Fatores que interferem na produção e qualidade do biofármaco

Inúmeros fatores ou compostos presentes nos meios de cultivo podem alterar o perfil metabólico celular, impactando na proliferação, expressão da proteína e processo de glicosilação, refletindo assim na qualidade da proteína recombinante. A seguir, foram listados alguns destes fatores e como eles podem afetar o produto de interesse, além de fatores físico-químicos referentes às condições de cultivo, como faixa de pH, temperatura, osmolalidade, concentração de gases e tensões de cisalhamento. Nos dois últimos casos, é importante destacar que, apesar de não serem fatores ligados diretamente à composição do meio, existem elementos e características específicas da sua formulação que podem amortizar os efeitos negativos de estresses hidrodinâmicos causados pela aeração intensa e a agitação.

1.5.1.1. Carboidratos

Os carboidratos exercem diversos papéis no cultivo celular. Os sacarídeos são importantes fontes de energia e também possuem função estrutural, como no processo de glicosilação (Wang et al 2010). Exercendo seu papel de principal fonte de energia do meio, a concentração ideal de glicose é necessária para a manutenção do cultivo celular em condições adequadas. Estudos mostram que níveis aceitáveis de glicose no meio influenciam diretamente o crescimento celular e a produtividade da proteína recombinante (Dowd et al 2001).

O correto balanço da quantidade de componentes presentes no meio é de extrema importância, uma vez que a presença de altas concentrações de glicose acarreta na produção de altos níveis metabólitos, como o lactato – até 50 mM ou 4,5 g/L – que podem ser tóxicos para o cultivo, inibindo o crescimento celular (Zhou et al 2011). Zhou e colaboradores (2011) ainda citam a necessidade de adição de compostos alcalinos para regular o pH do meio que tende a acidificar por causa do lactato e, como consequência da adição de mais compostos, a osmolaridade do meio também é alterada.

O conjunto destes fatores pode inibir o crescimento celular e levar a uma produção reduzida da proteína recombinante (Cruz et al 2000; Lao & Toth 1997).

Devido ao grande consumo de glicose pelas células e, em consequência, o alto nível de lactato no meio de cultivo, estratégias de controle do consumo de glicose e produção de lactato vêm sendo estudadas para aprimorar a produtividade e a longevidade celular, durante o período de cultivo (Mulukutla et al 2010). A regulação de certas enzimas metabólicas como a hexoquinase (HK) e fosfofrutoquinase (PFK ou PFK1) e a regulação metabólica por proteínas sinalizadoras e elementos de controle de crescimento, como insulina, fator de crescimento do tipo-insulina (IGF), o proto-oncogene cMyc e proteína quinase ativada por AMP (AMPK) são possíveis gene-alvos que podem ser transfectados e favorecer o cultivo, aumentando a produtividade da linhagem celular que expressa a proteína de interesse (Mulukutla et al 2010).

Além da função energética, os carboidratos apresentam a função de integrar as cadeias laterais de oligossacarídeos ancoradas nas proteínas pelo processo da glicosilação. Inúmeras glicofomas podem ser geradas com grande variabilidade de estruturas de glicanos ancoradas em regiões específicas do esqueleto proteico como efeito da composição de açúcares do meio de cultivo, que influencia nas estruturas antenárias adicionadas à proteína (Butler 2008) e a grande quantidade de enzimas da célula relacionada neste processo, onde, por exemplo, para ocorrer a sialilação, diversas sialiltransferases precisam estar presentes (Murphy et al 2013).

1.5.1.2. Aminoácidos

Os aminoácidos são nutrientes para o desenvolvimento da linhagem celular no cultivo e para a expressão da proteína recombinante de interesse. Todo meio de cultivo precisa ter todos os vinte aminoácidos, tanto os essenciais quanto os não essenciais, para que possam exercer suas funções estruturais e energéticas na célula e secreção da proteína recombinante (Kyriakopoulos et al 2013). Os aminoácidos são as unidades primordiais que formam as proteínas recombinantes. Além da função estrutural, os aminoácidos servem como pontos de ancoragem para a ocorrência das modificações pós-traducionais e sua disposição estrutural pode interferir na mesma, promovendo ou inibindo sítios de glicosilação (Ben-Dor et al 2004).

Em termos energéticos, a glutamina é o aminoácido mais importante e está presente nos meios de cultivo por sua versatilidade (Hossler et al 2009). Este aminoácido pode ser usado para integrar as proteínas recombinantes expressas pelas células, na síntese de nucleotídeos e como fonte de energia. Apesar das funções que a glutamina desempenha, o aminoácido é quimicamente instável, o que não permite a estocagem do meio em temperaturas acima de 4°C e a sua esterilização por meio de calor (Butler & Christie 1994).

Uma consequência desfavorável do uso da glutamina é o fato da liberação de amônio no meio de cultivo, resultado da degradação do aminoácido pelas células e da molécula ser quimicamente instável. A liberação do íon amônio pela célula decorre do processo de utilização da glutamina no ciclo do ácido tricarboxílico, principal rota metabólica para a alta geração de energia celular aeróbica (Butler & Christie 1994). A glutamina pode ser utilizada pela célula para retroalimentar o ciclo do ácido tricarboxílico, gerando intermediários do ciclo, contribuindo para a manutenção do mesmo e preservando a respiração aeróbica da célula no cultivo (Alberts et al 2010). Concentrações de amônio acima de 5,1 mM podem ser tóxicas para a célula e interferem no pH intracelular, afetando as modificações pós-traducionais realizadas no aparelho de Golgi, que são dependentes do pH (Chen & Harcum 2005; Xing et al 2008). Uma alternativa que pode diminuir a concentração de amônio no meio é a troca da glutamina por glutamato (Van der Valk et al 2010). A vantagem do uso do glutamato é a liberação de uma molécula de amônio para cada molécula de glutamato, o que não ocorre com a glutamina que tem a taxa de duas moléculas de amônio para cada molécula de glutamina. Assim, menos amônio é liberada no meio, diminuindo a sua influência inibitória e aumentando a longevidade do cultivo (Huang et al 2006).

Outra estratégia que vem sendo explorada é a utilização de um dipeptídeo, mais especificamente, L-alanil-L-glutamina (Imamoto et al 2013). Este dipeptídeo é mais estável e mais solúvel do que a L-glutamina livre. Apesar da redução da taxa de crescimento celular, os níveis de produtividade da proteína de interesse aumentaram quando a L-glutamina foi totalmente substituída pelo dipeptídeo. Além do aumento na produtividade, ficou evidenciada uma redução de amônio no meio de cultivo, devido à estabilidade da molécula e o consumo mais equilibrado do dipeptídeo (Imamoto et al 2013).

1.5.1.3. Sais minerais

Além dos nutrientes orgânicos, as células animais necessitam do aporte de sais minerais presentes no meio de cultivo (Gong et al 2006), em especial os íons cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}). O íon Ca^{2+} é considerado um dos mais importantes cátions metálicos por sua participação ativa em mecanismos intracelulares, regulando a transcrição de genes, a mitose celular e apoptose (Crabtree 2001).

O íon Mg^{2+} está envolvido no co-transporte de outros íons pelas membranas celulares e ajuda na regulação de, no mínimo, trezentas enzimas presentes no metabolismo celular, síntese de ácidos graxos, estabilização ribossomal e síntese proteica (Gong et al 2006). Devido à importância dos sais minerais na manutenção celular, a presença no meio de cultivo é de vital importância, onde a disponibilidade pode interferir no crescimento e na produção da proteína recombinante de interesse.

1.5.1.4. Vitaminas

As vitaminas contidas nos meios de cultivo desenvolvidos para as células animais costumam estar presentes em pequenas concentrações e apresentam importante influência no crescimento celular e na secreção de proteínas heterólogas. A sua participação no controle da mitose celular e apoptose garantem às vitaminas grande importância na formulação dos meios de cultivo e necessidade de um balanço muito bem afinado com as demandas metabólicas da linhagem celular empregada (Ishaque & Al-Rubeai 2002).

O grupo de vitaminas da família do complexo B costuma estar presente em diversos meios de cultivo para células animais atuando como cofatores e coenzimas no metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Na ausência de determinadas vitaminas do complexo B, altos níveis de apoptose foram detectados, demonstrando a sua importância na suplementação do meio. Outras vitaminas devem ser adicionadas, como as vitaminas lipossolúveis (E, D, A e K) e o ácido ascórbico (vitamina C) (Moraes et al 2008).

A vitamina E ajuda a combater as espécies reativas de oxigênio geradas no cultivo. A vitamina D regula o transporte de íons cálcio do meio pela célula. A vitamina A tem papel fundamental na diferenciação e no crescimento celular, a vitamina K é

importante no processamento proteico realizado pela célula e o ácido Ascórbico é essencial na síntese de colágeno pela célula animal (Moraes et al 2008).

1.5.1.5. Nucleotídeos

Os precursores de nucleotídeos modulam as concentrações intracelulares dos próprios nucleotídeos, resultando em diferentes níveis de sialilação e estruturas antenárias (Hossler et al 2009). Baker e colaboradores (2001) mostraram que suplementando o meio de cultivo com Glicosamina e uridina, os níveis de N-acetil-hexosamina intracelular foram elevados, aumentando a presença de estruturas antenárias no cultivo de células CHO secretoras de inibidores de metaloproteinases teciduais 1, porém reduzindo os níveis de sialilação da proteína.

Entretanto, Gu & Wang (1998) usaram de mesma técnica e suplementaram um cultivo de células CHO produtoras de Interferon- γ (IFN- γ) com N-Acetilmanosamina (precursor do ácido siálico) com o intuito de aumentar a sialilação nas moléculas de IFN- γ e o resultado foi positivo, resultando em um aumento da sialilação das cadeias de carboidratos. A suplementação aumentou os níveis de ácido siálico circulante em até trinta vezes comparado ao cultivo-controle. Estes resultados mostraram que os níveis de açúcares nucleotídicos interferem diretamente na glicosilação das proteínas recombinantes e sua suplementação no meio de cultivo é importante fator para a qualidade da glicosilação e consequentemente da glicoproteína.

1.5.1.6. Elementos-traço

Os elementos-traço são elementos inorgânicos, em sua grande maioria compostos por metais, e servem como cofatores para ativação completa de certas proteínas essenciais no metabolismo celular (Merchant et al 2006). Alguns metais, como ferro, cobre, manganês, molibdênio e vanádio existem em diversos estados oxidados estáveis em meio aquoso e representam metais importantes para as reações redox do organismo. Devido à sua importância metabólica, os elementos-traço precisam fazer parte do meio de cultivo para serem utilizados como nutrientes pelas células.

Contudo, as mesmas propriedades essenciais dos elementos-traço podem ser prejudiciais e causar danos celulares. Alguns elementos têm seu potencial citotóxico exacerbado quando entram em contato com o oxigênio (Imlay 2003). Em metais como o ferro e o selênio, a dose letal e a dose recomendada para consumo humano são muito

próximas e o mesmo acontece com outros animais, o que requer uma homeostase por parte dos organismos para não ocorrer o desequilíbrio (Merchant et al 2006).

1.5.1.7. Soro Fetal Bovino (SFB)

O soro fetal bovino é uma mistura complexa formada de diversos fatores de crescimento, vitaminas, proteínas e outros compostos que são considerados essenciais para a proliferação e manutenção celular e para a correta síntese do biofármaco/proteína recombinante (Van der Valk et al 2010). No entanto, o SFB possui desvantagens que desencorajam a continuidade do seu uso nas aplicações biotecnológicas para a produção de insumos para saúde – falta de padronização dos soros, ocorrendo variação nos cultivos e no produto final de acordo com o lote de insumo utilizado, contaminação por vírus, príons e um maior número de etapas de purificação da proteína recombinante (Berlec & Strukelj 2013).

Apesar dos cultivos celulares apresentarem resultados melhores com o uso do SFB, como descrito por Grillberger e colaboradores (2009), as autoridades regulatórias no âmbito da vigilância sanitária vêm encorajando a busca de alternativas para a substituição do SFB. Dado este motivo, sugere-se o uso de substâncias definidas que exerçam as mesmas funções do SFB, como proteínas e hormônios sintéticos, para alcançar os mesmo efeitos no processo de produção. A preocupação em substituir os meios com soro por meios livres de soro não é recente. Alternativas para o SFB são estudadas desde a década de 90. Por exemplo, Keen & Rapson (1995) desenvolveram um meio de cultivo livre de soro fetal bovino para a produção, em grande escala de um anticorpo monoclonal produzido por células CHO, o CAMPATH-1H. Entretanto, a melhor opção para a substituição do SFB é o uso dos meios quimicamente definidos. Devido aos avanços na área de meio de cultivo, diversos processos biotecnológicos já empregam os meios livres de soro para cultivar suas respectivas linhagens celulares e obter boas taxas de produtividade celular (Chu & Robinson 2001; Rodrigues et al 2012; Zhang et al 2013).

1.5.1.8. Fatores físico-químicos

Diversos fatores físico-químicos podem interferir na produção do biofármaco/proteína recombinante. Um fator de grande relevância é a temperatura de cultivo que tem impacto no crescimento celular e, conseqüentemente, na expressão da

proteína recombinante. Dependendo da linhagem celular, as variações de temperatura podem interferir na produção e nas modificações pós-traducionais (Vergara et al 2012).

Em células de mamíferos, que tem a temperatura ótima de crescimento estabelecida em 37°C, as variações térmicas podem ser benéficas ou prejudiciais (Yoon et al 2006a). Estudos mostram que uma diminuição na temperatura do cultivo (de 37°C para 32°C) pode levar a um aumento na produtividade da proteína recombinante, porém interferir nos padrões de glicosilação gerados pelo sistema biológico, como no caso da EPOhr que tem níveis de sialilação menores em temperaturas mais baixas que 37°C (Bollati-Fogolín et al 2005; Trummer et al 2006).

Se a temperatura é considerada um fator importante na expressão da proteína, o pH dentro do reator também exerce importante papel. De acordo com Yoon e colaboradores (2006b), uma pequena variação na faixa de pH (de 7,0 a 7,2) pode intensificar a produção sem prejudicar as modificações pós-traducionais sofridas pela proteína. Entretanto, uma maior variação na faixa de pH pode causar alterações nos perfis de glicosilação (Muthing et al 2003), salientando a importância de se manter as condições de cultivo constante/homogêneas, onde o modo de operação escolhido tem grande influência.

As concentrações de gases dentro do biorreator e o valor de saturação de oxigênio – oxigênio dissolvido (OD) – também têm papel importante na glicosilação. Com relação à concentração de gases, a pressão parcial de CO₂ (pCO₂) tem ligação direta com a sialilação, onde quanto maior a pCO₂, menor o nível da glicosilação (Zanghi 1999). Já em relação ao oxigênio dissolvido, o efeito nas modificações pós-traducionais varia de acordo com a linhagem celular e a proteína expressa. Em uma faixa de 10 a 100% de saturação, a linhagem consegue realizar suas modificações sem alterações relevantes (Butler 2006; Restelli et al 2006).

Com relação às tensões de cisalhamento – forças vetoriais que as células estão expostas dentro do biorreator devido à agitação para homogeneizar o meio – elas podem provocar alterações no tamanho das ramificações de carboidratos gerados durante a glicosilação no seu sítio específico de ancoragem. Estudos mostram que altos níveis de danos provocados pelas tensões de cisalhamento são suficientes para reduzir o tamanho da cadeia polissacarídica localizada na posição Asn 184 na proteína tPA (ativador de plasminogênio tecidual) (Senger & Karim 2003).

A osmolaridade é um importante parâmetro no processo de cultivo celular. Este fenômeno causa alterações no rendimento, glicosilação e sialilação da proteína recombinante (Konno et al 2012). Diferentes níveis de osmolaridade já foram testados em diversas linhagens celulares, onde a faixa ótima de crescimento celular encontra-se entre 280 a 320 mOsm – miliosmol (Takagi et al 2001). As células CHO, por exemplo, quando entram em situação de hiperosmolaridade, podem alterar sua conformação celular. As células CHO nessa condição apresentam um maior volume e redução no seu crescimento, porém a produtividade da proteína recombinante pode apresentar incremento significativo, em comparação com a mesma linhagem em condições normais (Takagi et al 2001; Zhang et al 2010). Outro motivo para a necessidade do controle da osmolaridade é a capacidade de altos níveis de pressão osmótica causar apoptose nas linhagens celulares, como foi observado em células CHO, independentemente de qualquer outro fator que também leva à apoptose, como a depleção de nutrientes (Han et al 2009).

2. PROPOSTA DE TRABALHO

Direcionado pela necessidade de alternativas para o insumo meio de cultivo utilizado atualmente no processo de transferência de tecnologia, antecipando uma eventual descontinuação do mesmo, o presente projeto busca analisar o comportamento dos cultivos de células de ovário de hamster chinês (CHO) e o padrão de secreção da EPOhr, em sistemas de frascos do tipo T25cm², T75cm², garrafas rotatórias e em biorreator de tanque agitado, utilizando diferentes meios de cultivo, afim de encontrar meios alternativos que apresentam características semelhantes às encontradas no meio de cultivo atualmente utilizado (SFM4CHO[®] – Utility).

Objetivo principal:

Comparar diferentes alternativas de meios de cultivo comerciais livres de soro fetal bovino e componentes animais com o meio de cultivo atualmente utilizado para o cultivo em suspensão de células CHO secretoras de EPOhr.

Objetivos específicos:

- i) Estudar o comportamento dos cultivos das células CHO secretoras de EPOhr em frascos estáticos e garrafas rotatórias utilizando diferentes meios de cultivo livres de soro fetal bovino e componentes de origem animal, em relação ao meio atualmente utilizado no processo;
- ii) Avaliar o perfil metabólico das culturas das células CHO secretoras de EPOhr, utilizando como parâmetro as taxas de crescimento celular, de produção de EPOhr e consumo de nutrientes nos cultivos celulares realizados com os diferentes meios testados;
- iii) Avaliar o comportamento de crescimento e o consumo de glicose das células CHO secretoras de EPOhr em biorreator do tipo tanque agitado em modo contínuo;

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em Bio-Manguinhos, no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), sob o escopo do Projeto de Transferência de Tecnologia da Alfaeopetina, da Vice-Diretoria de Produção (VPROD).

3.1. Material

3.1.1. Linhagem celular e Banco de Células de Trabalho

Células de ovário de hamster chinês (CHO – Chinese Hamster Ovary) recombinantes adaptadas ao crescimento em suspensão expressando a molécula da Eritropoetina humana recombinante (EPOhr), oriundas da transferência de tecnologia com Cuba foram utilizadas neste presente trabalho.

3.1.2. Meio de cultivo controle

O meio SFM4CHO™ – Utility (Thermo Hyclone® GE) foi utilizado como parâmetro de controle nestes experimentos por se tratar do meio de cultivo empregado para o cultivo da linhagem em questão para produção, em larga escala, da EPOhr. Trata-se de um meio livre de SFB, onde foram misturados os componentes fornecidos nas proporções de 49,0g/L do Base Powder e 30g/L do Medium Powder. O meio necessitou de suplementação de 2mM/L de L-glutamina (Sigma-Aldrich®), 11,0g/L de Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (Merck) e 5g/L de Pluronic® F – 68 (Thermo Hyclone GE).

3.1.3. Meios de cultivo alternativos

Ao todo, sete meios de cultivo alternativos foram utilizados, além do meio de cultivo controle. Destaca-se que os meios de cultivo testados são meios comerciais, protegidos por patentes e grande parte das informações sobre sua composição não são disponibilizadas para o consumidor:

- SFM4CHO[™] (Thermo Hyclone[®] GE): meio livre de proteínas e soro fetal bovino, onde seus componentes foram misturados na proporção de 19,83g/L do meio pronto com de suplementação de 4mM/L de L-glutamina (Sigma-Aldrich[®]), 2,2g/L de NaHCO₃ (Merck) e 1,0g/L de Pluronic[®]- F68 (Thermo Hyclone[®] GE);
- HyCell[™] (Thermo Hyclone[®] GE): meio livre de soro fetal bovino e de proteínas de origem animal, onde seus componentes foram misturados na proporção de 25,4g/L do meio pronto com suplementação de 4mM/L de L-glutamina (Sigma-Aldrich[®]) e 2,2g/L de NaHCO₃ (Merck);
- HyCell[™] sem HT (Thermo Hyclone[®] GE) apresenta o mesmo preparo do HyCell[™] convencional, sendo apenas diferente pela ausência de Hipoxantina e Timidina (HT);
- HyCell TransFx-C[™] (Thermo Hyclone[®] GE): meio livre de proteínas e soro fetal bovino, onde seus componentes foram misturados na proporção de 19,25g/L de meio pronto com suplementação de 4mM/L de L-glutamina (Sigma-Aldrich[®]) e 3,2g/L de NaHCO₃ (Merck);
- CD FortiCHO[™] (Gibco[®]): meio livre de proteínas de origem animal e soro fetal bovino, aonde seus componentes já vieram misturados – não possui apresentação em pó – no volume de 1 (um) litro. Necessitou de suplementação de 4mM/L de L-glutamina (Sigma-Aldrich[®]) e não precisa de adição de Pluronic[®]- F68 (Thermo Hyclone[®] GE);
- Cellvento[™] CHO-110 (Merck Millipore[™]): meio quimicamente definido, livre de componentes de origem animal e soro fetal bovino. Seus componentes foram misturados na proporção de 27,5g/L de meio pronto com suplementação de 4mM/L de L-glutamina (Sigma-Aldrich[®]), 2,0g/L de NaHCO₃ (Merck) e 3mL/L de solução de Citrato de Ferro (III) Amoniacal 10 mM (Merck). O meio não necessitou da suplementação de nenhum surfactante e, segundo, instrução dos fabricantes, não foi feita suplementação com HT;
- CPCHO[™] (Diagnovum): meio livre de proteínas de origem animal e soro fetal bovino. Apresenta, em sua composição, extrato de levedura para enriquecimento do meio para atingir um melhor desempenho. Seus componentes foram misturados na proporção de 15,89g/L de meio pronto em pó com suplementação de 2g/L de NaHCO₃ (Merck), 1,0g/L de Pluronic[®]- F68 (Thermo Hyclone[®] GE),

20mg/L de Citrato Férrico micron (Merck) e 5mg/L de rInsulina/Insulina recombinante (Merck). O meio já vem suplementado com L-Glutamina.

3.1.4. Sistemas de cultivo

As células CHO descongeladas do banco de células de trabalho foram cultivadas e propagadas, inicialmente, em frascos estéreis para cultivo de células de poliestireno do tipo T25 cm² e T75 cm² (Corning®). Após sucessivos sub-cultivos e com densidade celular suficiente, as células foram transferidas para garrafas de maior volume – até 300mL – do tipo rotatórias (Corning®), para o início dos experimentos. As garrafas rotatórias foram mantidas sob agitação por agitadores apropriados para o sistema em estufa a 37°C sem a necessidade de atmosfera controlada de CO₂.

3.2. Métodos

3.2.1. Quantificação celular

As células pré-cultivadas foram quantificadas pelo método de exclusão do corante vital Azul de Trypan a 0,5% v/v (Gibco® Invitrogen™) para identificação de células mortas (Kuchler 2000) e por coloração com Cristal Violeta (Sanford et al 1950) na proporção de Cristal Violeta 0,1% + Ácido Cítrico 2,1% + Triton X-100 0,01% para identificação de células totais. O método de exclusão do Azul de Trypan se baseia na coloração das células que perderam a sua permeabilidade seletiva de membrana, adicionando 50µL da solução de Azul de Trypan em 50µL de suspensão celular recém-aliquotada. A contagem foi manual e feita em hemocitômetro *Bright-line*® (Reichert) ao microscópio óptico Leica MPS 60 (Leica).

A quantificação de células totais foi realizada pela técnica de contagem de núcleos corados com solução ácida de Cristal Violeta. Por se tratar de uma linhagem celular adaptada ao cultivo em suspensão, as células presentes no cultivo tendem a formar grumos, o que impossibilitou o uso de técnicas de contagem direta como o método de exclusão por Azul de Trypan unicamente. Para realizar a contagem, 1mL de suspensão celular foi retirado do cultivo e centrifugado a 1500xg por quatro minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1mL de solução ácida de Cristal Violeta. A mistura foi agitada vigorosamente em agitador do tipo vórtice e a contagem dos núcleos corados foi feita em hemocitômetro *Bright-line*® (Reichert) em microscópio óptico Leica MPS 60 (Leica).

Para quantificar o total de células viáveis do cultivo, calculou-se a diferença entre o total de células totais e o total de células mortas. Após os referentes cálculos e contagens, avaliou-se a viabilidade celular pela divisão entre o total de células viáveis pelo número de células totais. Todas as contagens em hemocitômetro foram feitas em duplicata técnica, onde cada garrafa de cultivo foi contada duas vezes para fazer a quantificação celular.

3.2.2. Análise bioquímica para determinação da concentração de glicose e lactato

Todos os meios de cultivo e suas respectivas amostragens foram analisadas tanto para concentração de glicose quanto para de lactato pelo analisador bioquímico YSI 2700 Analyser (Yellow Springs Instruments, EUA) do laboratório LECC/COPPE - UFRJ. A análise consiste em uma pequena amostragem do sobrenadante das alíquotas retiradas diariamente, ao longo dos cultivos. Essa amostragem passa por membranas sensibilizadas com enzimas que reconhecem, separadamente, a concentração de glicose e de lactato.

3.2.3. Determinação da concentração de Eritropoetina humana recombinante (EPOhr)

A eritropoetina humana recombinante presente nos sobrenadantes dos cultivos realizados foi quantificada por técnica de Imunoensaio Enzimático direto/indireto (ELISA). O kit utilizado na quantificação da EPOhr foi o *Human Erythropoietin Quantikine® IVD® ELISA kit* (R&D Systems), onde todos os reagentes utilizados em cada etapa do experimento foram fornecidos no kit.

Para realizar a quantificação de EPOhr presente nos sobrenadantes, segundo orientação do fabricante, foi feita uma diluição seriada das amostras testadas para achar a faixa ideal de detecção do kit de ELISA. Após a diluição, a placa já sensibilizada com o anticorpo anti-EPO foi preparada com 100µL do reagente “*EPO Assay Diluent*” em cada poço, 100µL dos “*EPO Standard 0 – 200 mU*”, 100µL dos controles – positivo e negativo – e 100µL das amostras diluídas. Ao fim desta etapa, a placa ficou incubando por duas horas na bancada em temperatura ambiente.

Com o passar da primeira incubação, todo o conteúdo dos poços da placa foi retirado e seco com a ajuda de papel absorvente. Com os poços secos, foi adicionado 200µL “*EPO Conjugate*” – o segundo anticorpo, anti-EPO conjugado a uma enzima

Peroxidase – e a placa foi levada à incubação por mais duas horas na bancada em temperatura ambiente. Após a segunda incubação, todo o conteúdo dos poços foi retirado e cada poço foi lavado com “*EPO Wash Buffer 1x*” por quatro vezes. Depois das lavagens, foi adicionado 200µL da “*Substrate Solution (Reagent A + Reagent B)*” em cada poço e a placa ficou incubando por vinte minutos na bancada em temperatura ambiente, evidenciando a coloração azul nos poços onde ocorreu a ligação entre a EPOhr do sobrenadante e os anticorpos do kit ELISA.

Decorrido o tempo da terceira incubação, foi adicionado 100µL da “*Stop Solution*” em cada poço para revelação do teste. A intensidade da coloração de revelação foi medida em leitor de micro-placa no comprimento de onda de 450nm com correção para 600nm para aumentar a precisão da leitura. Com a adição da “*Stop Solution*”, os poços que antes eram azuis apresentaram coloração amarelada. Os resultados obtidos foram transferidos para uma planilha virtual, onde foram analisados por intermédio de comparação com a curva padrão do teste, de acordo com a orientação do fabricante do kit ELISA.

3.2.4. Criação do banco de células de trabalho

As células CHO utilizadas neste trabalho foram preservadas em criotubos mantidos em nitrogênio líquido a -196°C. Para realizar o congelamento e posterior formação do banco de células de trabalho, as células pré-cultivadas de um banco mestre de células e que se encontravam no nono sub-cultivo foram quantificadas pelos métodos descritos no item 4.2.1, concentradas em um tubo Falcon[®] e centrifugadas à 750xg por dez minutos. Após centrifugação, foi feito o descarte do sobrenadante e as células foram ressuspensas em meio de congelamento contendo 91,5% (v/v) do meio SFM4CHO - Utility[™], 7,5% (v/v) de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 1% (v/v) de CMC a 3%. O conteúdo do cultivo foi distribuído em criotubos de 1mL com um total de 33 criotubos, a uma concentração celular de $1,7 \times 10^7$ células viáveis/mL e viabilidade de 95,4%. Os criotubos foram mantidos em freezer à -70°C por 24 horas dentro de um recipiente chamado Mr. Frosty[™] Freezing Container (Thermo Hyclone[®] GE) que contém Isopropanol, ajudando no congelamento lento das alíquotas.

Passadas 24 horas, os criotubos foram transferidos para o tanque de nitrogênio líquido a -196°C e assim, criando um banco de trabalho que foi utilizado nos experimentos deste trabalho.

3.2.5. Descongelamento de células CHO para experimentação

Para realizar os experimentos, os criotubos do banco de células de trabalho foram descongelados, mediante necessidade do uso das células. A cada meio de cultivo novo testado, um criotubo foi descongelado para o início da adaptação e cinética comparativa. Os criotubos usados foram retirados do tanque de nitrogênio e descongelados rapidamente em banho-maria a 37°C. De um Falcon® de 50mL (Corning®) com 15mL de meio SFM4CHO™ - Utility também a 37°C, foram retirados 3mL de meio SFM4CHO™ - Utility do tubo Falcon® e com a mesma pipeta, o conteúdo de 1mL do criotubo foi retirado para ser homogeneizado com conteúdo da pipeta e o meio presente no tubo Falcon®. Após a homogeneização, retirou-se uma alíquota do homogeneizado e foi feita a contagem de células mortas e vivas. Após as contagens, as células foram mantidas em estufa a 37°C por quatro dias até o próximo sub-cultivo.

3.2.6. Sub-cultivos das células CHO e cinética comparativa entre os meios

Para a realização dos experimentos, as células descongeladas utilizadas foram cultivadas, seguindo as orientações dos fabricantes. Inicialmente, as células foram cultivadas em dois frascos T25 cm², na concentração inicial que varia de 2,0x10⁵ a 4,0x10⁵ células viáveis/mL e com viabilidade sempre acima de 80,0% em meio SFM4CHO™ - Utility, mediante métodos descritos no item 4.2.1. Concomitantemente ao descongelamento, uma terceira garrafa é gerada – oriunda do mesmo criotubo – e cultivada nos mesmos parâmetros das outras duas para servir de reserva para eventuais problemas.

Para propagar o inóculo, o mesmo procedimento foi realizado com os cultivos em T25 cm², aumentando o volume do frasco e concentração celular – de T25 cm² para T75 cm². Um passo adicional foi feito, onde em um dos frascos T75 cm² o meio SFM4CHO™ - Utility foi trocado pelo meio alternativo a ser testado, durante o sub-cultivo. Esta etapa é crucial, podendo ser necessária repeti-la, caso a célula não apresente uma boa adaptação ao meio testado.

Foram realizados mais dois sub-cultivos com cada frasco T75 cm² pré-inoculado, perante os moldes do item 4.2.1. O primeiro consistiu no aumento de frascos T75 cm² de um para três frascos para ter densidade celular suficiente para o segundo sub-cultivo que foi a adaptação das células às garrafas rotatórias. Na segunda passagem, o conteúdo

dos três frascos deve ser suficiente para gerar um inóculo de $2,0 \times 10^5$ a $4,0 \times 10^5$ células viáveis para 100mL de volume de meio dentro de uma garrafa rotatória mantida em estufa a 37°C sob agitação de 2,75 rpm por quatro dias. No último sub-cultivo antes do início da cinética comparativa, o conteúdo presente na garrafa rotatória foi passado para outras duas garrafas rotatórias com 150mL de meio alternativo em cada uma das duas garrafas necessárias para o experimento. A figura 8 demonstra, de maneira simplificada, todas as etapas de adaptação até o primeiro dia da cinética. O tempo de duração da cinética variou entre cinco a nove dias. Todo o protocolo aqui descrito foi realizado com meio SFM4CHO™ – Utility em paralelo para realização da cinética-controle em cada experimento. Levando em consideração apenas a primeira cinética-controle como parâmetro de comparação com os demais meios de cultivo alternativos, todas as outras cinéticas em SFM4CHO™ - Utility foram realizadas para avaliar as condições de cultivo, verificando se algum fator externo ao meio foi responsável por variação na sua performance (por exemplo, problemas com estufa ou agitador).

As cinéticas consistiram em retiradas de alíquotas de 3mL diárias das garrafas rotatórias. Os resultados obtidos foram provenientes de duplicatas biológicas, média de dois cultivos em condições idênticas. Um dos três mililitros retirados foi empregado para quantificação de células mortas, totais, viáveis e viabilidade. Os outros dois mililitros foram centrifugados e o sobrenadante foi congelado para posterior análise bioquímica e mensuração da produção da EPOhr, via Imunoensaio Enzimático (ELISA).

3.2.7. Cultivo em Biorreator

Após as cinéticas comparativas em cultivo em garrafas rotatórias, foi realizado o cultivo em biorreator do tipo tanque agitado da Bioengineering (RALF). Seguindo o mesmo protocolo dos itens 4.2.5 e 4.2.6, realizaram-se duas cinéticas onde foram inoculadas $2,0 \times 10^5$ células viáveis/mL em 2,0L de meios de cultivo suplementados com 4mM de L-Glutamina (SFM4CHO™ e Cellvento™ CHO-110 sem HT) em um vaso com capacidade de 3,7 L com a taxa de aeração entre 0,002 a 0,005vvm, com agitação a 150rpm, pH controlado na faixa de 7,2 a 7,4 e saturação de oxigênio a 50% . As células foram cultivadas em batelada simples até o quarto dia. A partir do quarto dia, foi dado início ao cultivo no biorreator operando em modo contínuo com a taxa de troca de 0,5vvd de meio de cultivo. Os métodos de quantificação celular e de produção de EPOhr foram os mesmos descritos nos itens 4.2.1., 4.2.2. e 4.2.3. aplicados nas cinéticas

em garrafas rotatórias. O último meio que poderia ser testado no biorreator seria o CPCHO™. Tal fato não ocorreu por problemas de logística, onde não foi fornecida quantidade suficiente de meio para a realização do experimento.

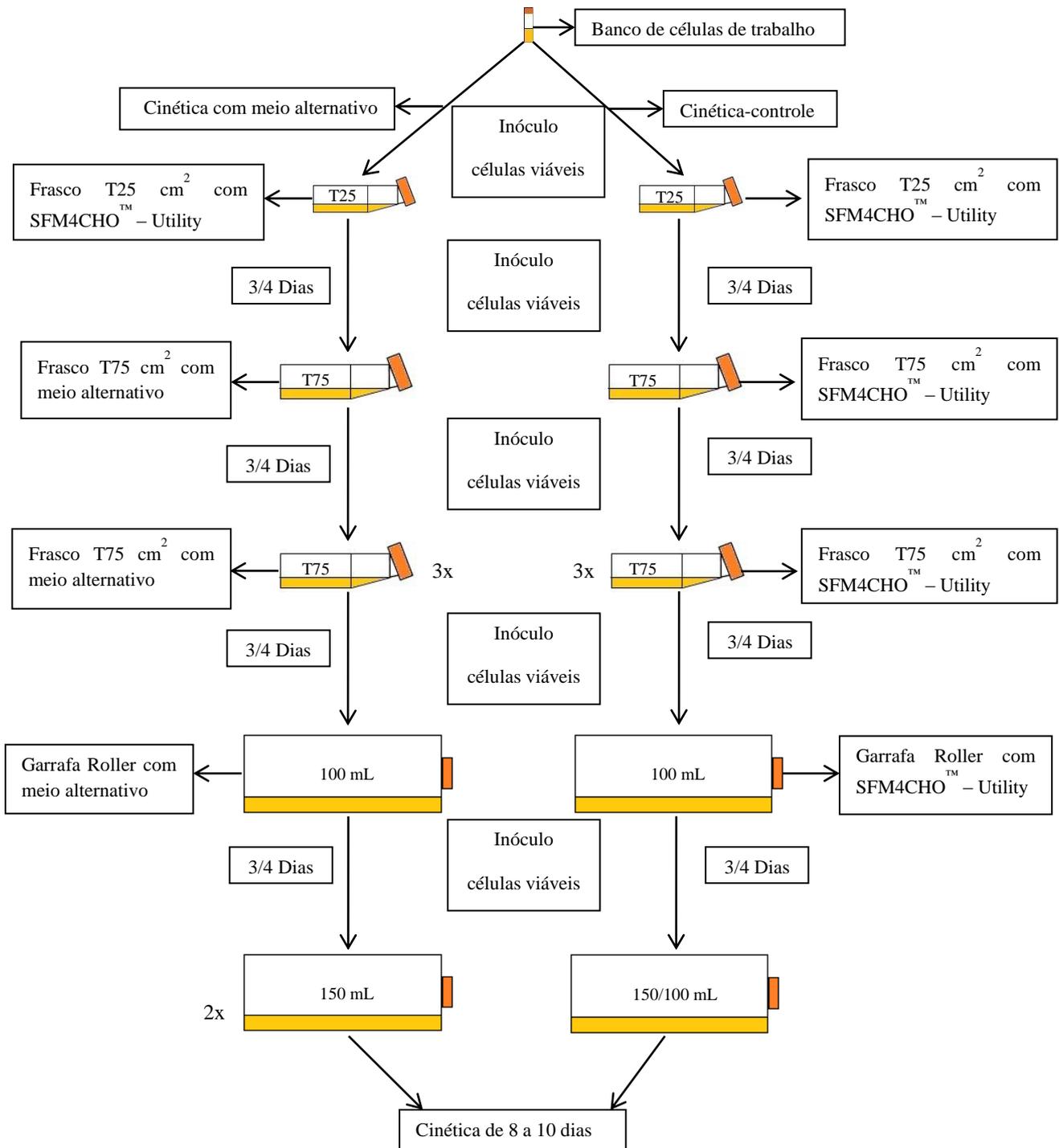


Figura 8. Desenho esquemático da metodologia do sub-cultivo para realização das cinéticas. A figura mostra, de forma resumida, as etapas que precedem as cinéticas, incluindo o inóculo inicial até a adaptação em garrafas rotatórias.

3.2.8. Cálculo das taxas específicas e rendimentos

A partir dos resultados obtidos das análises realizadas nos sobrenadantes das cinéticas foram calculados a taxa específica de crescimento celular da fase exponencial (μ_{exp}), o tempo de duplicação celular (t_d), os valores de integral de células viáveis (ICV), taxa específica de formação de eritropoietina (q_{EPOhr}), taxa específica de consumo de glicose (q_{Glic}), taxa específica de formação de lactato (q_{Lact}), o coeficiente de rendimento celular a partir da concentração de glicose ($Y_{X/Glic}$) e a produtividade (P).

A taxa específica de crescimento celular determinada na fase exponencial de crescimento (μ_{exp}) foi gerada por meio do *coeficiente angular* da regressão exponencial dos valores de concentração de células viáveis do cultivo pelo tempo.

O tempo de duplicação (t_d) na fase exponencial do cultivo foi calculado segundo a Equação 2, a partir do μ_{exp} .

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{exp}} \quad \text{Equação 2}$$

A integral de células viáveis (ICV) foi calculada segundo a Equação 3. Para avaliar a equação, foi empregado o método dos trapézios, onde “ n ” corresponde ao número de amostras experimentais utilizadas.

$$ICV = \int_{t_0}^t X_v dt \approx \sum_{i=1}^n \left[\frac{X_{i-1} + X_i}{2} * (t_i - t_{i-1}) \right] \quad \text{Equação 3}$$

A taxa específica de formação de eritropoietina (q_{EPOhr}) foi calculada pela Equação 4a (modo batelada) e Equação 4b (modo contínuo).

$$q_{EPOhr} = \frac{1}{X} \frac{d[EPOhr]}{dt} \approx \frac{1}{\bar{X}_v} * \frac{\Delta[EPOhr]}{\Delta t} \quad \text{Equação 4a}$$

$$q_{EPOhr} = \left(D * P + \frac{d[EPOhr]}{dt} \right) * \frac{1}{X_v} \approx \left(D * \overline{[EPOhr]} + \frac{\Delta[EPOhr]}{\Delta t} \right) * \frac{1}{\bar{X}_v} \quad \text{Equação 4b}$$

Onde, $\Delta[EPOhr]$ corresponde à diferença dos valores da concentração de eritropoietina no sobrenadante no tempo i e $i+1$ e $\overline{[EPOhr]}$, à média dos valores da concentração de eritropoietina no sobrenadante no tempo i e $i+1$.

A taxa específica de consumo de glicose (q_{Glic}) foi calculada pela Equação 5a (modo batelada) e 5b (modo contínuo).

$$q_{Glic} = \frac{1}{X} \frac{d[Glic]}{dt} \approx \left| \frac{1}{\bar{X}_v} * \frac{\Delta[Glic]}{\Delta t} \right| < 0 \quad \text{Equação 5a}$$

$$q_{Glic} = \left(D([Glic]_{alim} - [Glic]) + \frac{d[Glic]}{dt} \right) * \frac{1}{X_v} \approx$$

$$\left((D([Glic]_{alim} - [\overline{Glic}]) + \frac{\Delta[Glic]}{\Delta t}) * \frac{1}{\bar{X}_v} \right) \quad \text{Equação 5b}$$

Onde, $\Delta[Glic]$ corresponde à diferença dos valores da concentração de glicose no sobrenadante no tempo i e $i+1$, $[Glic]_{alim}$, à concentração de glicose na alimentação e $[\overline{Glic}]$, à média da concentração de glicose no sobrenadante no tempo i e $i+1$. Os resultados das equações 5a e 5b levaram em consideração o módulo do valor numérico, uma vez que o consumo seria expresso por um valor negativo.

A taxa específica de formação de lactato (q_{Lact}) foi calculada pela Equação 6a (modo batelada) e 6b (modo contínuo).

$$q_{Lact} = \frac{1}{X} \frac{d[Lact]}{dt} \approx \frac{1}{\bar{X}_v} * \frac{\Delta[Lact]}{\Delta t} \quad \text{Equação 6a}$$

$$q_{Lact} = \left(D * P + \frac{d[Lact]}{dt} \right) * \frac{1}{X_v} \approx \left(D * [\overline{Lact}] + \frac{\Delta[Lact]}{\Delta t} \right) * \frac{1}{\bar{X}_v} \quad \text{Equação 6b}$$

Onde, $\Delta[Lact]$ corresponde à diferença dos valores da concentração de glicose no sobrenadante no tempo i e $i+1$ e $[\overline{Lact}]$, à média da concentração de lactato no sobrenadante no tempo i e $i+1$.

O rendimento celular a partir da concentração de glicose foi calculado de acordo com a equação 7.

$$Y_{X/Glic} = \frac{\mu}{q_{Glic}} \quad \text{Equação 7}$$

A produtividade (P) foi calculada dividindo o valor máximo de concentração da EPOhr pelo tempo de cultivo.

4. RESULTADOS

O trabalho analisou diversos meios de cultivo quanto ao desempenho do cultivo e da expressão da proteína EPOhr, em comparação ao meio de cultivo padrão utilizado para a produção da proteína.

4.1. Cultivos celulares para adaptação de células CHO com os meios alternativos e cinéticas comparativas

Os resultados obtidos a seguir foram provenientes de sub-cultivos realizados com o intuito de saber se as células CHO utilizadas neste estudo seriam capazes de crescer e se adaptar rapidamente aos novos meios de cultivo testados. Todas as adaptações foram originadas a partir do descongelamento de um criotubo do banco de trabalho mantido em nitrogênio líquido. Foram realizados os cultivos de adaptação com os meios alternativos, juntamente com o meio padrão SFM4CHO™ - Utility como controle.

Os meios HyCell™ e TransFxC™ (ambos da Thermo Hyclone® GE) apresentaram resultados abaixo do esperado durante a etapa de adaptação. Como visto na tabela 1, a adaptação ao meio HyCell™ não foi bem sucedida. Após a substituição dos meios, entre as passagens 2 e 3, ocorre uma queda de $2,1 \pm 0,30 \times 10^6$ células viáveis/mL para $1,4 \pm 0,06 \times 10^6$ células viáveis/mL e de 86,5% para 77,3%, na viabilidade do cultivo. Ao longo da observação o cultivo não consegue recuperar concentrações e viabilidades celulares ideais, terminando o período de adaptação em 53,6%.

Conforme citado anteriormente, o meio de cultivo TransFxC™ também não foi considerado apto para a sequência dos experimentos. Apesar de apresentar uma concentração celular dentro dos valores esperados apresentados na tabela 2 – $2,3 \times 10^6$ células totais e 95,2% de viabilidade – as células demonstraram um comportamento anormal ao serem cultivadas nesse meio.

Tabela 1. Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabelas de adaptação/expansão celular no meio HyCellTM. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller.

	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais/mL (x10 ⁶)	Células Mortas/mL (x10 ⁵)	Células Viáveis/mL (x10 ⁶)	Viabilidade (%)
SFM4CHO TM - Utility	(0)	Criotubo	0,7±0,06	0,6±0,06	0,6±0,17	90,3±0,03
	1 (4)	T-25	2,1±0,80	1,2±0,11	1,9±0,72	94,7±0,03
	2 (7)	T-75	2,1±0,04	0,9±0,03	2,0±0,01	96,3±0,02
	3 (11)	T-75	2,5±0,40	1,1±0,31	2,4±0,41	95,3±0,01
	4 (14)	T-75	2,1±0,13	0,8±0,32	2,0±0,11	96,0±0,01
	5 (18)	T-75	2,0±0,27	1,1±0,52	1,8±0,18	94,3±0,02
	6 (21)	GR	2,1±0,19	1,3±0,18	2,0±0,17	94,0±0,00
	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais/mL (x10 ⁶)	Células Mortas/mL (x10 ⁵)	Células Viáveis/mL (x10 ⁶)	Viabilidade (%)
HyCell TM	(0)	Criotubo	1,9±0,12	2,5±0,74	1,7±0,04	87,3±0,03
	1 (4)	T-25	1,7±0,03	1,3±0,14	1,6±0,01	92,8±0,01
	2 (8)	T-75	2,5±0,30	3,3±0,08	2,1±0,30	86,5±0,02
	3 (11)	T-75	1,9±0,06	4,2±0,00	1,4±0,06	77,3±0,01
	4 (15)	T-75	0,2±0,08	1,3±0,08	0,1±0,09	42,5±0,23
	5 (18)	GR	0,3±0,00	1,6±0,20	0,2±0,15	53,6±0,10

Tabela 2. Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabelas de adaptação/expansão celular no meio TransFx-CTM. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo; o retângulo indica o cultivo feito em meio TransFx-CTM; GR – Garrafa Rotatória/Roller.

	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais/mL (x10 ⁶)	Células Mortas/mL (x10 ⁵)	Células Viáveis/mL (x10 ⁶)	Viabilidade (%)
SFM4CHO TM - Utility	(0)	Criotubo	0,7±0,06	0,6±0,06	0,6±0,17	90,3±0,03
	1 (4)	T-25	2,1±0,80	1,2±0,11	1,9±0,72	94,7±0,03
	2 (7)	T-75	2,1±0,04	0,9±0,03	2,0±0,01	96,3±0,02
	3 (11)	T-75	2,5±0,40	1,1±0,31	2,4±0,41	95,3±0,01
	4 (14)	T-75	2,1±0,13	0,8±0,32	2,0±0,11	96,0±0,01
	5 (18)	T-75	2,0±0,27	1,1±0,52	1,8±0,18	94,3±0,02
	6 (21)	GR	2,1±0,19	1,3±0,18	2,9±0,17	94,0±0,00
	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais/mL (x10 ⁶)	Células Mortas/mL (x10 ⁵)	Células Viáveis/mL (x10 ⁶)	Viabilidade (%)
HyCell TM sem HT	(0)	Criotubo	0,5±0,02	0,7±0,28	0,5±0,05	86,5±6,01
	1 (3)	T-25	2,6±0,19	0,5±0,11	2,5±0,20	97,9±0,57
	2 (6)	T-75	1,5±0,10	0,5±0,18	1,4±0,11	96,4±1,41
	3 (10)	T-75	2,3±0,31	1,4±0,21	2,1±0,29	95,2±2,48
	4 (13)	T-75	2,4±0,11	0,5±0,04	2,3±0,11	98,0±0,21
	5 (17)	T-75	1,9±0,29	2,2±0,07	1,6±0,30	88,0±0,07
6 (20)	GR	1,4±0,07	1,8±0,11	1,3±0,06	87,6±0,07	

O comportamento anormal das células em meio TransFx-C™ pôde ser visto na figura 9, onde as células voltaram ao seu estado aderente, dificultando a contagem manual. Outro fator avaliado que contribuiu para não dar prosseguimento aos experimentos com este meio foi o propósito do mesmo, no qual foi desenvolvido para ajudar no processo de transfecção da célula pelo vetor de expressão do gene de interesse e não para o crescimento em um bioprocessos.

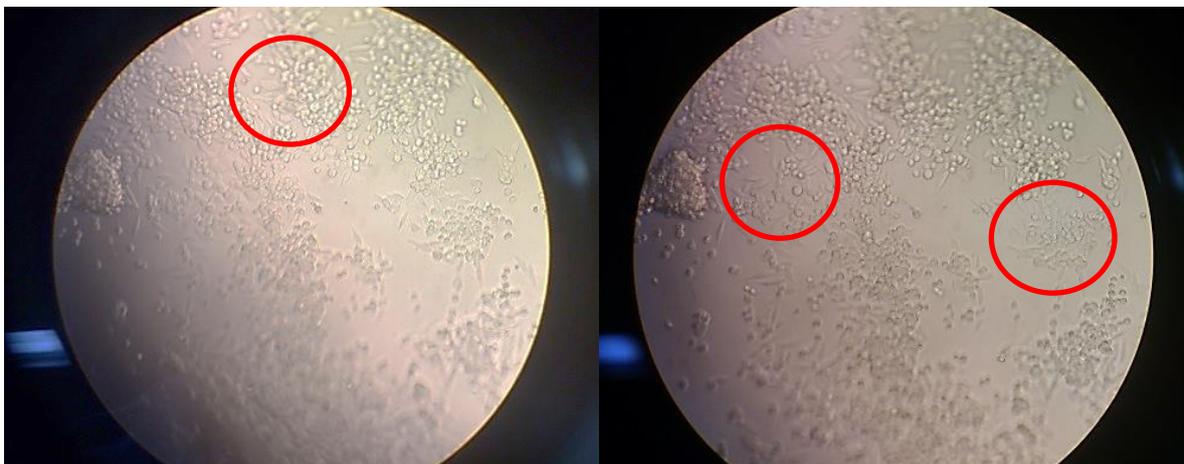


Figura 9. Células CHO em meio TransFx-C™. Conforme foi observado e destacado pelos círculos vermelhos, algumas células perderam a característica de crescimento em suspensão e voltaram ao estado de aderência. Aumento de 250x.

Após o período de adaptação e amplificação celular aos meios testados, as células foram transferidas para garrafas rotatórias partindo de concentrações de $2,0 \times 10^5$ a $4,0 \times 10^5$ células viáveis/mL pelo período de até nove dias. Os meios SFM4CHO™, HyCell™ sem HT, CD FortiCHO™, Cellvento™ CHO-110 sem HT e CPCHO™ foram escolhidos para realizar os experimentos por apresentarem condições ideais para adaptação celular e tiveram cinéticas realizadas em paralelo com o meio SFM4CHO™ – Utility. As cinéticas foram interrompidas quando o número de células mortas foi maior que o número de células viáveis e, conseqüentemente, a viabilidade atingia níveis abaixo de 50%. O objetivo da cinética foi comparar o crescimento celular, taxa específica de proliferação, taxa específica de produção da EPOhr, consumo de glicose e produção de lactato. A partir dos dados gerados, gráficos foram montados para facilitar a comparação da resposta celular em diferentes meios com o meio padrão SFM4CHO – Utility™.

4.1.1. Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHO™ – Utility e SFM4CHO™

De acordo com a tabela 3, foi possível adaptar as células CHO no meio SFM4CHO™. Apesar de não manter os mesmos níveis de viabilidade (acima de 90%) o cultivo de adaptação com SFM4CHO™ apresentou concentração de células mais alta, ao longo da adaptação, alcançando seu valor máximo na 4ª passagem após descongelamento (2ª passagem após troca do meio) – $5,4 \pm 0,01 \times 10^6$ células viáveis/mL, em comparação ao meio controle.

Tabela 3. Tabela de expansão celular em meio SFM4CHO™ – Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio SFM4CHO™. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHO™ - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller.

	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais/mL ($\times 10^6$)	Células Mortas/mL ($\times 10^5$)	Células Viáveis/mL ($\times 10^6$)	Viabilidade (%)
SFM4CHO™ - Utility	(0)	Criotubo	0,7 \pm 0,06	0,6 \pm 0,06	0,6 \pm 0,17	90,3 \pm 0,03
	1 (4)	T-25	2,1 \pm 0,80	1,2 \pm 0,11	1,9 \pm 0,72	94,7 \pm 0,03
	2 (7)	T-75	2,1 \pm 0,04	0,9 \pm 0,03	2,0 \pm 0,01	96,3 \pm 0,02
	3 (11)	T-75	2,5 \pm 0,40	1,1 \pm 0,31	2,4 \pm 0,41	95,3 \pm 0,01
	4 (14)	T-75	2,1 \pm 0,13	0,8 \pm 0,32	2,0 \pm 0,11	96,0 \pm 0,01
	5 (18)	T-75	2,0 \pm 0,27	1,1 \pm 0,52	1,8 \pm 0,18	94,3 \pm 0,02
	6 (21)	GR	2,0 \pm 0,19	1,3 \pm 0,18	2,0 \pm 0,17	94,0 \pm 0,00
SFM4CHO™	(0)	Criotubo	1,1 \pm 0,03	0,8 \pm 0,07	1,0 \pm 0,04	93,0 \pm 0,01
	1(4)	T-25	1,5 \pm 0,00	0,5 \pm 0,21	1,5 \pm 0,02	96,7 \pm 0,01
	2 (8)	T-75	2,9 \pm 0,01	2,3 \pm 0,50	2,7 \pm 0,06	92,1 \pm 0,02
	3 (11)	T-75	2,6 \pm 0,10	0,4 \pm 0,02	2,2 \pm 0,13	84,1 \pm 0,01
	4 (15)	T-75	6,4 \pm 0,01	9,9 \pm 1,59	5,4 \pm 0,15	84,5 \pm 0,03
	5 (18)	GR	1,4 \pm 0,00	1,9 \pm 0,40	1,2 \pm 0,04	86,2 \pm 0,03

Após a adaptação, o meio de cultivo SFM4CHO™ apresentou uma maior densidade celular. Conforme visto na figura 10, a densidade de células viáveis alcançada no meio SFM4CHO™ foi de $2,4 \pm 0,1 \times 10^6$ células viáveis/mL, enquanto o maior valor alcançado pelas células cultivadas no meio controle foi de $1,8 \pm 0,1 \times 10^6$ células viáveis/mL, onde o desvio-padrão dos valores citados revela uma diferença significativa entre eles. Entretanto, o cultivo em SFM4CHO™ não conseguiu manter a mesma faixa de viabilidade, mantendo-se entre 80% e 90% na maior parte do cultivo e baixando de 80% após o 6º dia, em relação ao meio controle SFM4CHO™ – Utility, que

apresentou viabilidade superior a 90% até o 4º dia, entre 80% e 90% entre o 5º e 7º dia e inferior a 80% após o 7º dia. Em relação ao crescimento na fase exponencial, a taxa específica de proliferação (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d) observados no meio alternativo apresentou melhores valores ($\mu_{\text{expSFM4CHO}} = 0,97\text{d}^{-1}$ e $\mu_{\text{expUtility}} = 0,8\text{d}^{-1}$) e de t_d ($t_{d\text{SFM4CHO}} = 0,71\text{d}$ e $t_{d\text{Utility}} = 0,87\text{d}$), indicando uma maior capacidade de promover a proliferação celular do meio SFM4CHOTM.

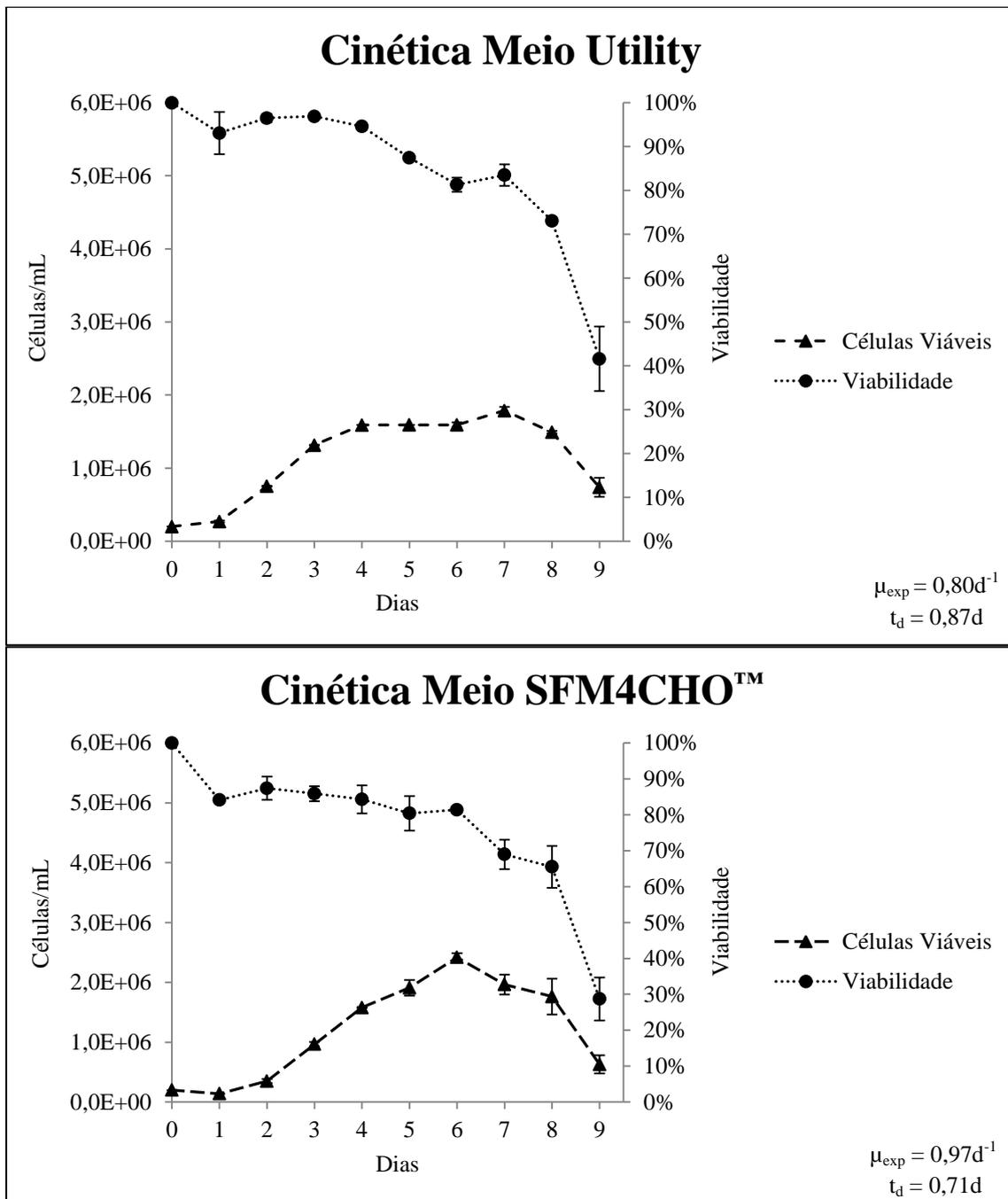


Figura 10. Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHOTM - Utility e SFM4CHOTM, respectivamente. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d).

Juntamente com as análises de crescimento celular, foram analisados parâmetros metabólicos entre os dois meios de cultivo, como o consumo de glicose, produção de lactato e secreção de EPOhr no meio de cultivo, ao longo da cinética. Os resultados estão presentes na figura 11. O meio alternativo SFM4CHOTM apresentou maior concentração de glicose inicial, em comparação ao meio padrão SFM4CHOTM – Utility ([Glicose]_{SFM4CHO} = 7,0g/L e [Glicose]_{Utility} = 3,5g/L). A taxa específica média de consumo deste nutriente foi maior no meio alternativo quando comparado com o controle ($q_{\text{Glic_SFM4CHO_m}} = 0,82\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{\text{Glic_Utility_m}} = 0,40\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$). Mesmo apresentando um q_{Glic} maior, a produção de lactato no meio SFM4CHOTM, medida pelo (q_{Lact}), é relativamente menor que o q_{Lact} do meio SFM4CHOTM – Utility, quando comparados com o meio controle ($q_{\text{Lact_SFM4CHO_m}} = 0,45\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{\text{Lact_Utility_m}} = 0,29\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$). Por apresentar maior concentração de glicose, o rendimento celular a partir do consumo de glicose ($Y_{\text{X/Glic}}$) no meio SFM4CHOTM também foi maior, quando comparado ao meio SFM4CHOTM – Utility ($Y_{\text{X/Glic_SFM4CHO}} = 0,95 \times 10^6\text{células}/\text{g}$ e $Y_{\text{X/Glic_Utility}} = 0,37 \times 10^6\text{células}/\text{g}$).

Apesar de garantir uma maior densidade celular, a média da taxa específica de formação da eritropoietina ($q_{\text{EPOhr_m}}$), a produtividade (P) e a concentração máxima de produto ($[\text{EPOhr}]_{\text{max}}$) secretado ao fim da cinética no meio SFM4CHOTM ($q_{\text{EPOhr_SFM4CHO_m}} = 3,9\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$, $P_{\text{SFM4CHO}} = 4,0\mu\text{g}/\text{dia}$ e $[\text{EPOhr}]_{\text{max_SFM4CHO}} = 36,2\mu\text{g}/\text{mL}$) foram menores, em comparação aos valores apresentados no meio SFM4CHOTM – Utility ($q_{\text{EPOhr_Utility_m}} = 5,7\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$, $P_{\text{Utility}} = 6,6\mu\text{g}/\text{dia}$ e $[\text{EPOhr}]_{\text{max_Utility}} = 59,0\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.1.2. Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHOTM – Utility e HyCellTM sem HT.

Em substituição ao meio TransFx-CTM, a partir do terceiro sub-cultivo, foi utilizado o meio HyCellTM sem HT e fez-se o uso do cultivo reserva em SFM4CHOTM Utility para dar sequência ao sub-cultivo e adaptação ao novo meio. As células CHO cultivadas no meio HyCellTM sem HT apresentaram resultados satisfatórios – concentração máxima de células totais de $1,9 \times 10^6$ e viabilidade de 88,0% - e, a partir deste meio, foi dada sequência à cinética, como exemplificado na tabela 4.

O meio de cultivo HyCellTM sem HT apresentou uma densidade celular semelhante ao meio controle, Apesar da semelhança dos valores de concentração celular, o cultivo

em meio HyCell™ sem HT não conseguiu manter a mesma faixa de viabilidade, mantendo-se entre 80% e 90% até o 4º dia e baixando de 80% após o 5º dia, em relação ao meio controle SFM4CHO™ – Utility, que apresentou viabilidade superior a 90% até o 4º dia, entre 80% e 90% entre o 5º e 7º dia e inferior a 80% após o 7º dia.

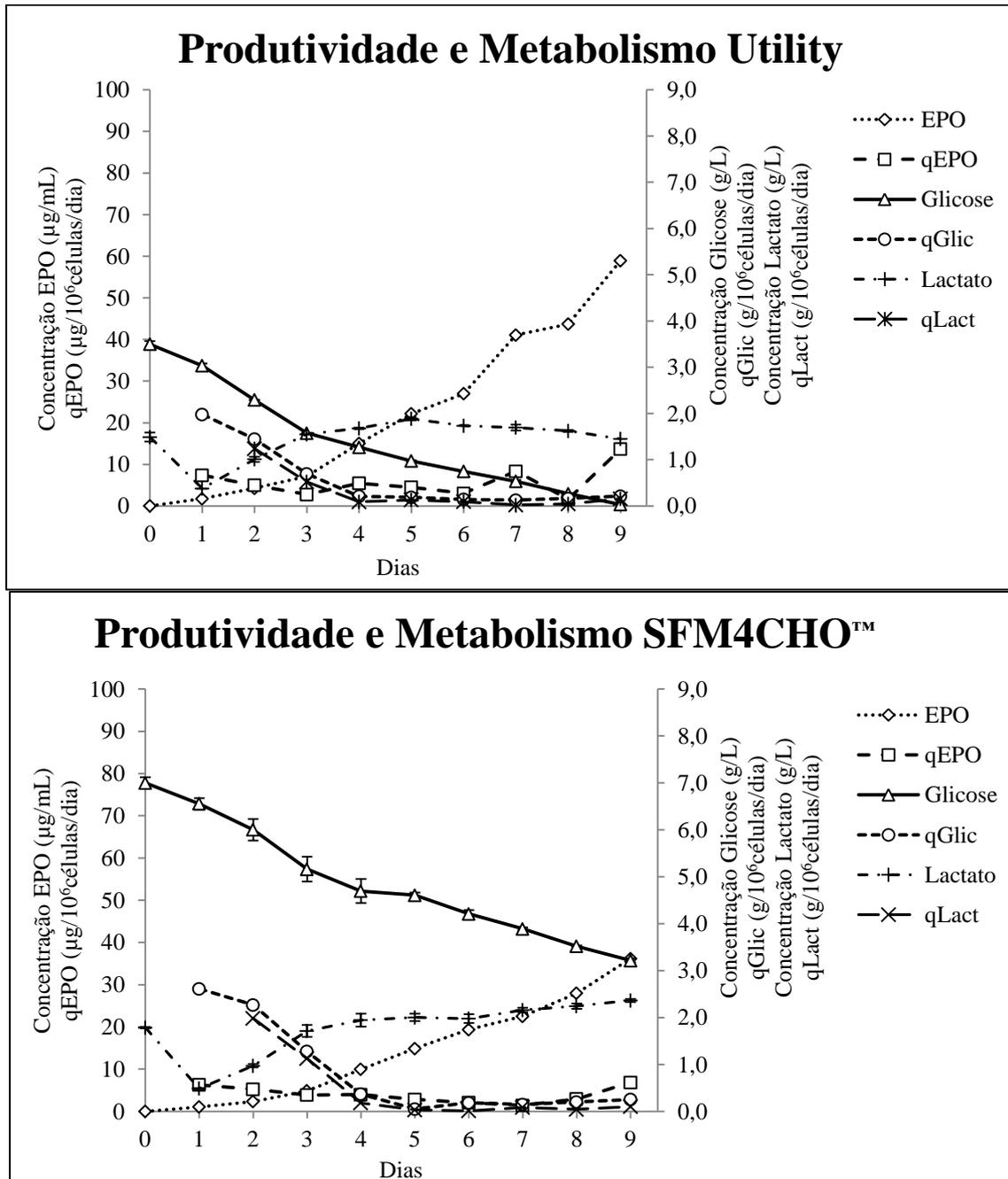


Figura 11. Produtividade e metabolismo de células CHO no meio SFM4CHO™ - Utility e SFM4CHO™. ◇ - Concentração de EPOhr; □ - Taxa específica de formação de EPOhr; △ - Concentração de glicose no meio; ○ - Taxa específica de consumo de glicose; + - Concentração de lactato no meio; × - Taxa específica de produção de lactato.

Conforme visto na figura 12, a densidade de células viáveis alcançada no meio HyCell™ sem HT foi de $1,7 \pm 0,2 \times 10^6$ células viáveis/mL no quarto dia, enquanto o

maior valor alcançado pelas células cultivadas no meio controle foi de $1,8 \pm 0,1 \times 10^6$ células viáveis/mL no sétimo dia, não apresentando diferença significativa quando o desvio-padrão de cada valor máximo é analisado. No entanto, o meio controle manteve uma concentração celular superior a $1,5 \times 10^6$ células viáveis/mL por um período de 5 dias.

Tabela 4. Tabela de expansão celular em meio SFM4CHO™ – Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio HyCell™ sem HT. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHO™ - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller.

	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais/mL ($\times 10^6$)	Células Mortas/mL ($\times 10^5$)	Células Viáveis/mL ($\times 10^6$)	Viabilidade (%)
SFM4CHO™ - Utility	(0)	Criotubo	0,7 \pm 0,06	0,6 \pm 0,06	0,6 \pm 0,17	90,3 \pm 0,03
	1 (4)	T-25	2,1 \pm 0,80	1,2 \pm 0,11	1,9 \pm 0,72	94,7 \pm 0,03
	2 (7)	T-75	2,1 \pm 0,04	0,9 \pm 0,03	2,0 \pm 0,01	96,3 \pm 0,02
	3 (11)	T-75	2,5 \pm 0,40	1,1 \pm 0,31	2,4 \pm 0,41	95,3 \pm 0,01
	4 (14)	T-75	2,1 \pm 0,13	0,8 \pm 0,32	2,0 \pm 0,11	96,0 \pm 0,01
	5 (18)	T-75	2,0 \pm 0,27	1,1 \pm 0,52	1,8 \pm 0,18	94,3 \pm 0,02
	6 (21)	GR	2,1 \pm 0,19	1,3 \pm 0,18	2,0 \pm 0,17	94,0 \pm 0,00
	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais/mL ($\times 10^6$)	Células Mortas/mL ($\times 10^5$)	Células Viáveis/mL ($\times 10^6$)	Viabilidade (%)
HyCell™ sem HT	(0)	Criotubo	0,5 \pm 0,02	0,7 \pm 0,28	0,5 \pm 0,05	86,5 \pm 6,01
	1 (3)	T-25	2,6 \pm 0,19	0,5 \pm 0,11	2,5 \pm 0,20	97,9 \pm 0,57
	2 (6)	T-75	1,5 \pm 0,10	0,5 \pm 0,18	1,4 \pm 0,11	96,4 \pm 1,41
	3 (10)	T-75	2,3 \pm 0,31	1,4 \pm 0,21	2,1 \pm 0,29	95,2 \pm 2,48
	4 (13)	T-75	2,4 \pm 0,11	0,5 \pm 0,04	2,3 \pm 0,11	98,0 \pm 0,21
	5 (17)	T-75	1,9 \pm 0,29	2,2 \pm 0,07	1,6 \pm 0,30	88,0 \pm 0,07
	6 (20)	GR	1,4 \pm 0,07	1,8 \pm 0,11	1,3 \pm 0,06	87,6 \pm 0,07

Em relação ao crescimento na fase exponencial, a taxa específica de proliferação (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d) observados no meio alternativo apresentou valores ($\mu_{\text{expHyCell}} = 0,48\text{d}^{-1}$ e $\mu_{\text{expUtility}} = 0,80\text{d}^{-1}$) e de t_d ($t_{d\text{HyCell}} = 1,44\text{d}$ e $t_{d\text{Utility}} = 0,87\text{d}$), indicando que o meio não teve capacidade de promover a proliferação celular como o meio controle.

Juntamente com as análises de crescimento celular, foram analisados parâmetros metabólicos entre os dois meios de cultivo, como o consumo de glicose, produção de lactato e secreção de EPOhr no meio de cultivo, ao longo da cinética. Os resultados estão presentes na figura 13. O meio alternativo HyCell™ sem HT apresenta maior

concentração de glicose, em comparação ao meio padrão SFM4CHOTM – Utility ([Glicose]_{SFM4CHO} = 8,3g/L e [Glicose]_{Utility} = 3,5g/L). A taxa específica de consumo deste nutriente foi maior no meio alternativo quando comparado com o controle ($q_{\text{Glic_HyCell_m}} = 0,57\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{\text{Glic_Utility_m}} = 0,40\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$). Mesmo apresentando um q_{Glic} maior, a produção de lactato no meio HyCellTM sem HT, medida pelo (q_{Lact}), é similar ao q_{Lact} do meio SFM4CHOTM – Utility, quando comparados com o meio controle ($q_{\text{Lact_HyCell_m}} = 0,35\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{\text{Lact_Utility_m}} = 0,29\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$).

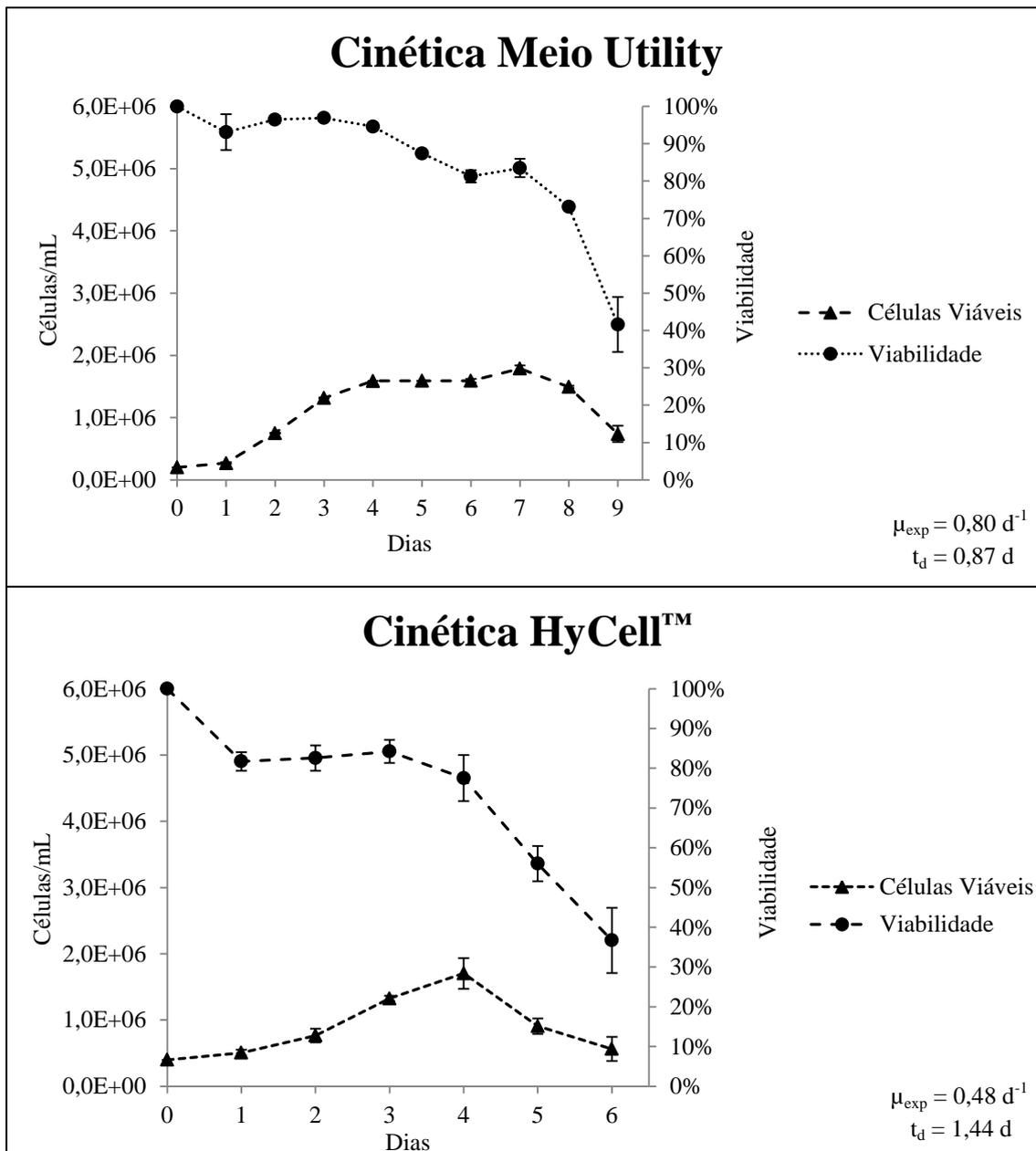


Figura 12. Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHOTM - Utility e HyCellTM sem HT, respectivamente. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d).

Apesar de apresentar maior concentração de glicose, o rendimento celular a partir do consumo de glicose ($Y_{X/Glic}$) no meio HyCell™ sem HT foi similar ao do meio SFM4CHO™ – Utility ($Y_{X/Glic_HyCell} = 0,33 \times 10^6$ células/g e $Y_{X/Glic_Utility} = 0,37 \times 10^6$ células/g).

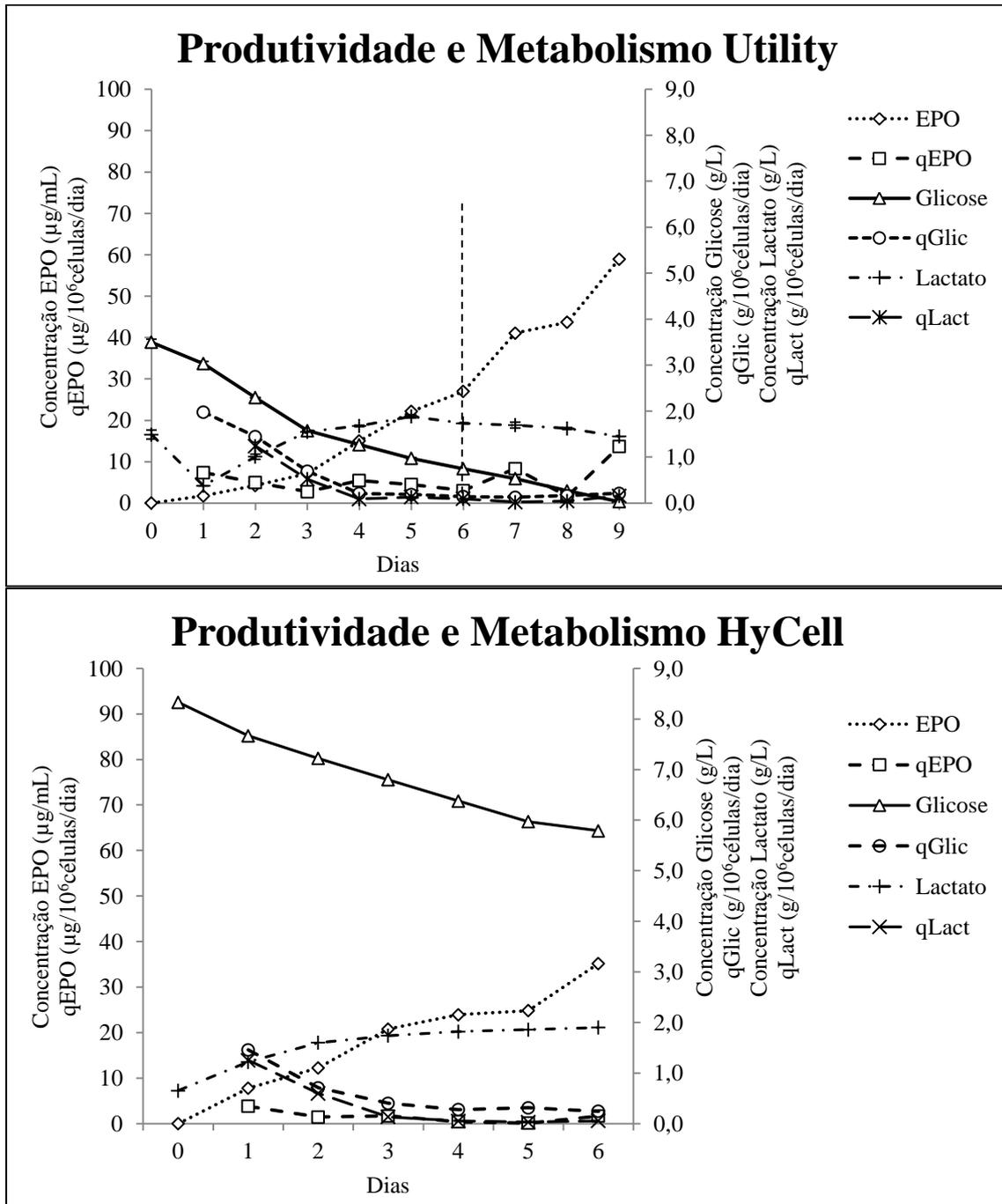


Figura 13. Produtividade e metabolismo de células CHO nos meios SFM4CHO™ - Utility e HyCell™ sem HT, respectivamente. \diamond - Concentração de EPOhr; \square - Taxa específica de formação de EPOhr; \triangle - Concentração de glicose no meio; \circ - Taxa específica de consumo de glicose; $+$ - Concentração de lactato no meio; \times - Taxa específica de produção de lactato.

Como apresentou menor densidade celular, a média da taxa específica de formação da eritropoietina (q_{EPOhr_m}) e a produtividade (P) ($q_{\text{EPOhr}_{\text{HyCell}_m} = 1,5\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $P_{\text{HyCell}} = 5,9\mu\text{g}/\text{dia}$) foram menores, em relação ao meio SFM4CHOTM - Utility ($q_{\text{EPOhr}_{\text{Utility}_m} = 5,7\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $P_{\text{Utility}} = 6,6\mu\text{g}/\text{dia}$). A concentração máxima de produto ($[\text{EPOhr}]_{\text{max}}$) secretado ao final da cinética no meio HyCellTM sem HT ($[\text{EPOhr}]_{\text{max}_{\text{HyCell}}} = 35,2\mu\text{g}/\text{mL}$) foi maior, em relação aos valores apresentados no meio SFM4CHOTM - Utility no sexto dia do experimento ($[\text{EPOhr}]_{\text{max}_{\text{Utility}}} = 27,0\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.1.3. Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHOTM - Utility e CD FortiCHOTM.

Na adaptação ao meio de cultivo fornecido pela Gibco[®], o CD FortiCHOTM, fez-se necessário o uso da garrafa reserva, a partir do terceiro sub-cultivo para continuar com a adaptação e foi preciso aumentar o número de passagens para dar continuidade ao processo, conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM - Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio CD FortiCHOTM. Cada valor está representado com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo. GR - Garrafa Rotatória/Roller.

	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais ($\times 10^6$)	Células Mortas ($\times 10^5$)	Células Viáveis ($\times 10^6$)	Viabilidade (%)
SFM4CHO TM - Utility	(0)	T-25	0,7±0,06	0,6±0,06	0,6±0,17	90,3±0,03
	1 (4)	T-75	2,1±0,80	1,2±0,11	1,9±0,72	94,7±0,03
	2 (7)	T-75	2,1±0,04	0,9±0,03	2,0±0,01	96,3±0,02
	3 (11)	3x T-75	2,5±0,40	1,1±0,31	2,4±0,41	95,3±0,01
	4 (14)	3x T-75	2,1±0,13	0,8±0,32	2,0±0,11	96,0±0,01
	5 (18)	GR	2,0±0,27	1,1±0,52	1,8±0,18	94,3±0,02
	6 (21)	GR	2,1±0,19	1,3±0,18	2,0±0,17	94,0±0,00
	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais ($\times 10^6$)	Células Mortas ($\times 10^5$)	Células Viáveis ($\times 10^6$)	Viabilidade (%)
CD FortiCHO TM	(0)	Criotubo	0,8±0,02	0,6±0,32	0,8±0,05	93,1±0,04
	1 (4)	T-25	3,1±0,16	1,8±0,14	2,9±0,014	94,4±0,00
	2 (7)	T-75	2,1±0,39	0,5±0,00	2,0±0,39	97,6±0,01
	3 (11)	T-75	2,6±0,32	1,0±0,07	2,5±0,33	96,2±0,01
	4 (14)	T-75	1,9±0,33	0,5±0,12	1,8±0,33	97,1±0,01
	5 (18)	T-75	2,6±0,48	1,3±0,04	2,5±0,48	95,1±0,01
	6 (21)	GR	1,6±0,09	1,3±0,11	1,5±0,08	91,7±0,00

Passagem

SFM4CHOTM -

Este fato ocorreu devido ao grande número de células grumadas presentes nos cultivos com o meio CD FortiCHO™, inclusive no estágio de expansão para garrafas rotatórias como pode ser visto na figura 14. Por isso, a terceira e quarta passagens – destacadas por um retângulo – foram feitas em meio SFM4CHO™ - Utility para tentar uma nova adaptação no meio testado. Durante a adaptação, a concentração máxima de células atingida foi de $2,6 \pm 0,48 \times 10^6$ células/mL e 97,6% de viabilidade.



Figura 14. Células CHO em meio CD FortiCHO™. Conforme foi observado e destacado pelos círculos vermelhos, grande parte das células cultivadas neste meio formaram múltiplos grumos, dificultando os processos de contagem e adaptação no próprio meio. Aumento 250x.

Com relação à cinética, o meio de cultivo CD FortiCHO™ apresentou resultados similares ao meio padrão SFM4CHO™ - Utility. Entretanto, não foi dada sequência à cinética devido à formação de grumos que impossibilitaram o andamento do experimento, a partir do quarto dia de crescimento em garrafas rotatórias. Conforme visto na figura 15, a densidade de células viáveis alcançada no meio CD FortiCHO™ foi de $2,6 \pm 0,4 \times 10^6$ células viáveis/mL no quarto dia, enquanto o maior valor alcançado pelas células cultivadas no meio padrão foi de $1,8 \pm 0,1 \times 10^6$ células viáveis/mL com viabilidade entre 80% e 90% durante toda a cinética. Em relação ao crescimento na fase exponencial, a taxa específica de proliferação (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d) observados no meio alternativo apresentou valores ($\mu_{\text{expFortiCHO}} = 0,40\text{d}^{-1}$ e $\mu_{\text{expUtility}} = 0,80\text{d}^{-1}$) e de t_d ($t_{d\text{FortiCHO}} = 1,73\text{d}$ e $t_{d\text{Utility}} = 0,87\text{d}$), indicando que o meio não teve capacidade de promover a proliferação celular como o meio controle.

Juntamente com as análises de crescimento celular, foram analisados parâmetros metabólicos entre os dois meios de cultivo, como o consumo de glicose, produção de lactato e secreção de EPOhr no meio de cultivo, ao longo da cinética. Os resultados estão presentes na figura 16.

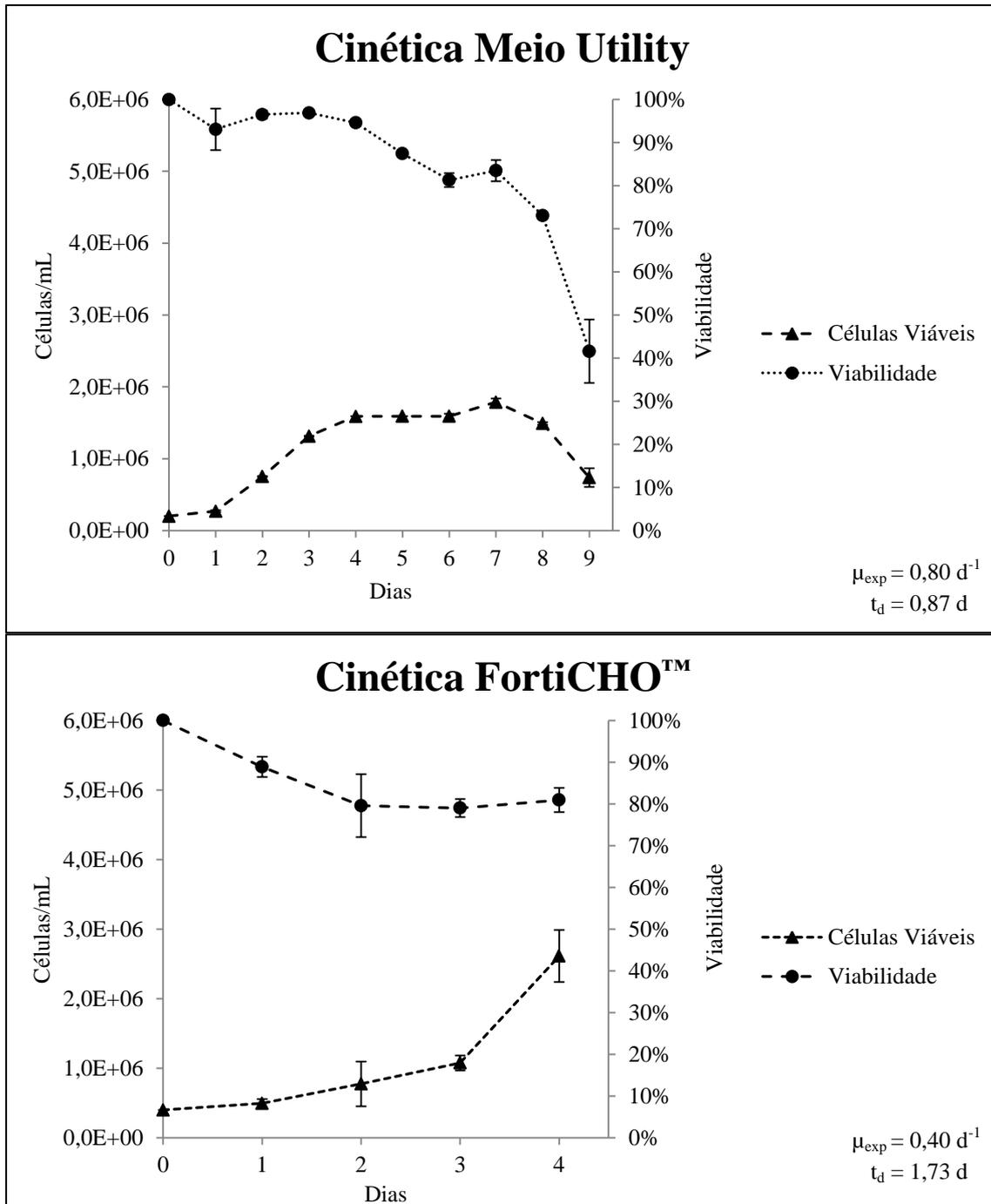


Figura 15. Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHO™ - Utility e CD FortiCHO™. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d). * Este gráfico se repete para facilitar a comparação dos resultados.

O meio alternativo CD FortiCHO™ apresenta maior concentração de glicose inicial, em comparação ao meio padrão SFM4CHO™ – Utility ($[Glicose]_{FortiCHO} = 5,8\text{g/L}$ e $[Glicose]_{Utility} = 3,5\text{g/L}$). A taxa específica de consumo deste nutriente foi maior no meio alternativo quando comparado com o controle ($q_{Glic_FortiCHO_m} = 1,1\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{Glic_Utility_m} = 0,4\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$). Por apresentar um q_{Glic} maior, a produção de lactato no meio CD FortiCHO™, medida pelo (q_{Lact}), é maior que o q_{Lact} do meio SFM4CHO™ – Utility ($q_{Lact_FortiCHO_m} = 0,6\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{Lact_Utility_m} = 0,3\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$). Apresentando maior concentração de glicose, o rendimento celular a partir do consumo de glicose ($Y_{X/Glic}$) no meio CD FortiCHO™ foi maior que o do meio SFM4CHO™ – Utility ($Y_{X/Glic_FortiCHO} = 1,48 \times 10^6\text{células/g}$ e $Y_{X/Glic_Utility} = 0,37 \times 10^6\text{células/g}$).

Apesar de apresentar maior densidade celular, a média da taxa específica de formação da eritropoietina (q_{EPOhr_m}) e a produtividade (P) ($q_{EPOhr_FortiCHO_m} = 1,9\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $P_{FortiCHO} = 6,0\mu\text{g}/\text{dia}$) foram menores, em relação ao meio SFM4CHO™ - Utility ($q_{EPOhr_Utility_m} = 5,7\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$, $P_{Utility} = 6,6\mu\text{g}/\text{dia}$). A concentração máxima de produto ($[EPOhr]_{max}$) secretado no meio CD FortiCHO™ ao final da cinética ($[EPOhr]_{max_FortiCHO} = 23,9\mu\text{g/mL}$) foi maior em relação aos valores apresentados no meio SFM4CHO™ – Utility no quarto dia do experimento ($[EPOhr]_{max_Utility} = 15,1\mu\text{g/mL}$).

4.1.4. Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHO™ – Utility e Cellvento™ CHO-110 sem HT.

O meio de cultivo Cellvento™ CHO-110 sem HT apresentou melhores resultados, em comparação ao meio padrão SFM4CHO™ - Utility. Durante a etapa de adaptação, ambos os cultivos apresentaram características semelhantes, desde o número máximo de células – $2,3 \pm 0,07 \times 10^6\text{células/mL}$ em meio Cellvento™ CHO-110 sem HT e $2,5 \pm 0,40 \times 10^6\text{células/mL}$ em meio SFM4CHO™ - Utility – a uma faixa ótima de viabilidade celular, sempre acima dos 90% de viabilidade, como demonstrado na tabela 6.

Conforme visto na figura 17, a densidade de células viáveis alcançada no meio Cellvento™ CHO-110 foi de $4,6 \pm 0,4 \times 10^6\text{células viáveis/mL}$, enquanto o maior valor alcançado pelas células cultivadas no meio padrão foi de $1,8 \pm 0,1 \times 10^6\text{células viáveis/mL}$, onde os desvios-padrão dos valores apresentados mostraram uma diferença

significativa entre eles. A viabilidade se manteve entre 90% e 100% até o quinto dia e reduzindo para abaixo de 80% no sétimo dia, em comparação ao meio controle SFM4CHOTM – Utility, que apresentou viabilidade superior a 90% até o 4º dia, entre 80% e 90% entre o 5º e 7º dia e inferior a 80% após o 7º dia.

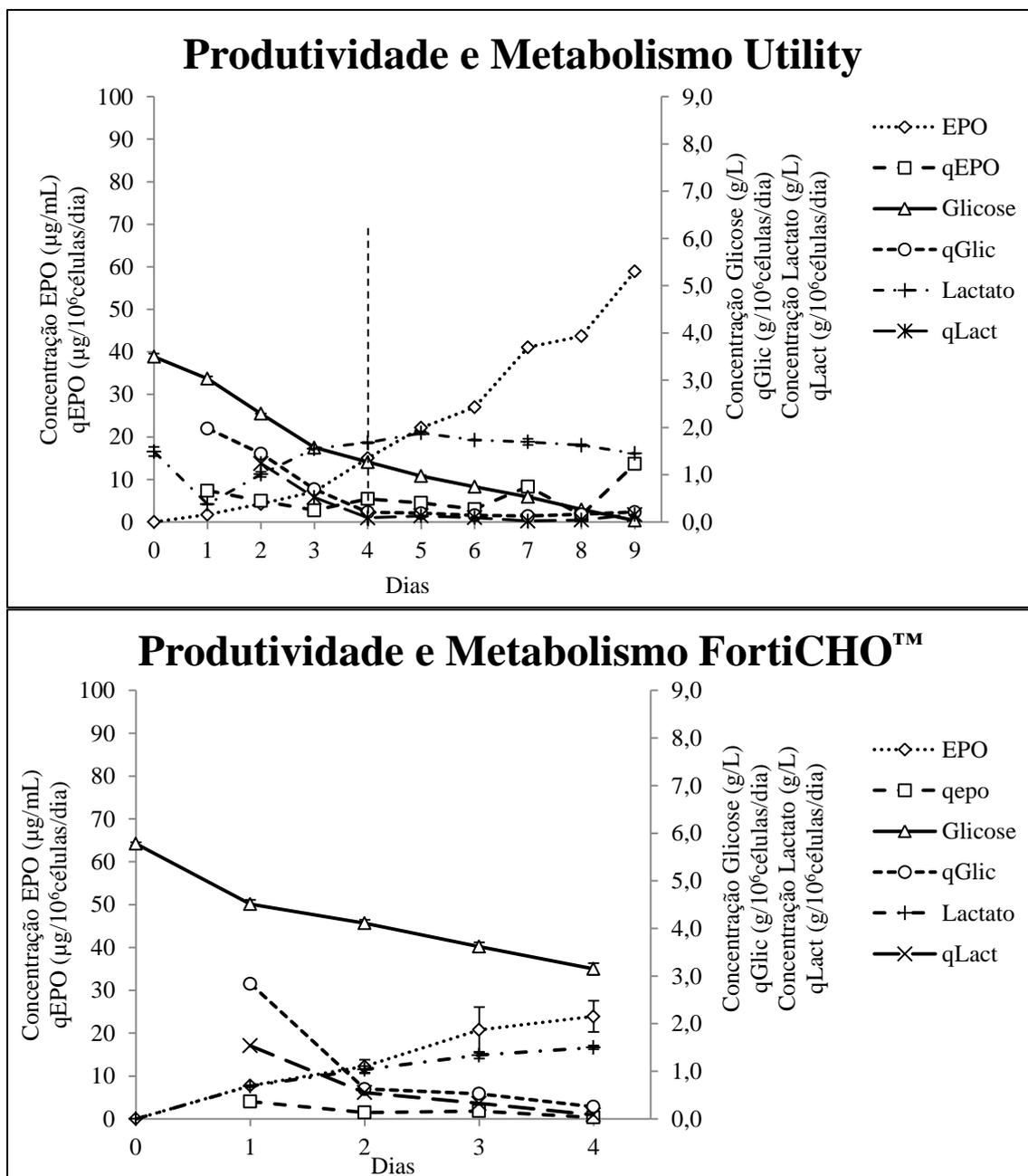


Figura 16. Produtividade e metabolismo de células CHO no meio SFM4CHOTM - Utility e CD FortiCHOTM, respectivamente. \diamond - Concentração de EPOhr; \square - Taxa específica de formação de EPOhr; \triangle - Concentração de glicose no meio; \circ - Taxa específica de consumo de glicose; $+$ - Concentração de lactato no meio; \times - Taxa específica de produção de lactato.

Em relação ao crescimento na fase exponencial, a taxa específica de proliferação (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d) observados no meio alternativo apresentou valores ($\mu_{expCHO-110} = 0,82d^{-1}$ e $\mu_{expUtility} = 0,80d^{-1}$) e de t_d ($t_{dCHO-110} = 0,80d$ e $t_{dUtility} = 0,87d$),

indicando que o meio teve capacidade de promover a proliferação celular semelhante ao encontrado no meio controle.

Tabela 6. Tabela de expansão celular em meio SFM4CHOTM – Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio CellventoTM CHO-110 sem HT. Cada valor apresentado está com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHOTM - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller.

	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais (x10 ⁶)	Células Mortas (x10 ⁵)	Células Viáveis (x10 ⁶)	Viabilidade (%)
SFM4CHO TM - Utility	(0)	Criotubo	0,7±0,06	0,6±0,06	0,6±0,17	90,3±0,03
	1 (4)	T-25	2,1±0,80	1,2±0,11	1,9±0,72	94,7±0,03
	2 (7)	T-75	2,1±0,04	0,9±0,03	2,0±0,01	96,3±0,02
	3 (11)	T-75	2,5±0,40	1,1±0,31	2,4±0,41	95,3±0,01
	4 (14)	T-75	2,1±0,13	0,8±0,32	2,0±0,11	96,0±0,01
	5 (18)	T-75	2,0±0,27	1,1±0,52	1,8±0,18	94,3±0,02
	6 (21)	GR	2,1±0,19	1,3±0,18	2,0±0,17	94,0±0,00
	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais (x10 ⁶)	Células Mortas (x10 ⁵)	Células Viáveis (x10 ⁶)	Viabilidade (%)
Cellvento TM CHO-110	(0)	Criotubo	0,6±0,04	0,7±0,14	0,5±0,06	90,7±0,01
	1 (3)	T-25	1,2±0,10	0,5±0,11	1,1±0,09	96,0±0,01
	2 (7)	T-75	2,3±0,07	1,0±0,07	2,2±0,06	95,9±0,00
	3 (10)	T-75	1,9±0,05	1,2±0,46	1,8±0,10	93,5±0,03
	4 (14)	T-75	2,1±0,04	1,5±0,32	2,0±0,01	93,0±0,01
	5 (17)	GR	1,3±0,11	0,8±0,21	1,2±0,29	94,0±0,00

Juntamente com as análises de crescimento celular, foram analisados parâmetros metabólicos entre os dois meios de cultivo, como o consumo de glicose, produção de lactato e secreção de EPOhr no meio de cultivo, ao longo da cinética. Os resultados estão presentes na figura 18. O meio alternativo CellventoTM CHO-110 sem HT apresenta maior concentração de glicose inicial, em comparação ao meio padrão SFM4CHOTM – Utility ([Glicose]_{CHO-110} = 7,5g/L e [Glicose]_{Utility} = 3,5g/L). A taxa específica de consumo deste nutriente foi maior no meio alternativo quando comparado com o controle ($q_{Glic_CHO-110_m} = 0,51g/10^6$ células/dia e $q_{Glic_Utility_m} = 0,40g/10^6$ células/dia). Mesmo apresentando um q_{Glic} maior, a produção de lactato no meio CellventoTM CHO-110 sem HT, medida pelo (q_{Lact}), foi menor que o q_{Lact} do meio SFM4CHOTM – Utility ($q_{Lact_CHO-110_m} = 0,3g/10^6$ células/dia e $q_{Lact_Utility_m} = 0,3 g/10^6$ células/dia). Apresentando maior concentração de glicose, o rendimento celular a partir do consumo de glicose ($Y_{X/Glic}$) no meio CellventoTM CHO-110 sem HT foi maior que o

do meio SFM4CHOTM - Utility ($Y_{X/Glic_CHO-110} = 1,10 \times 10^6$ células/g e $Y_{X/Glic_Utility} = 0,37 \times 10^6$ células/g).

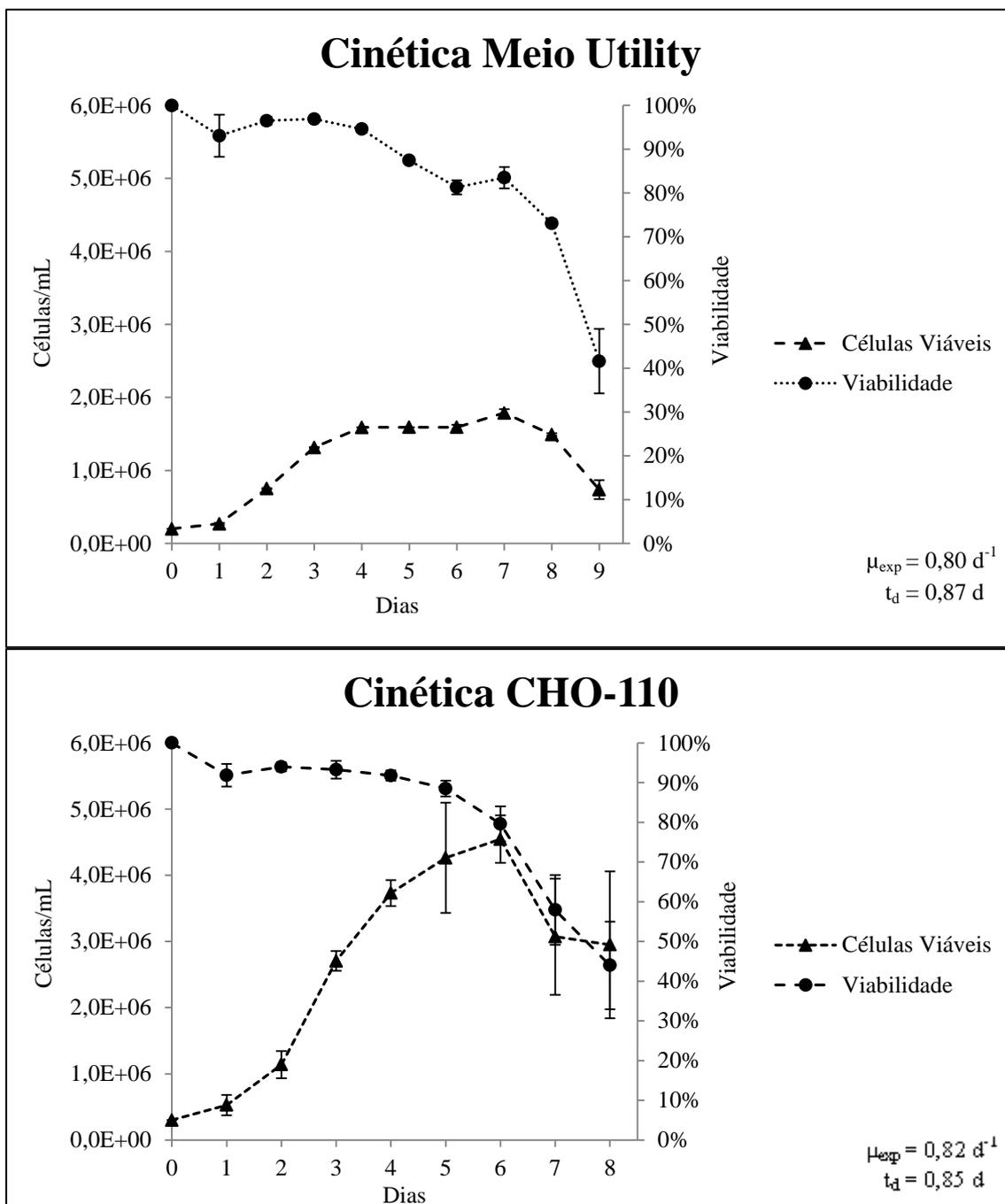


Figura 17. Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHOTM - Utility e CellventoTM CHO-110 sem HT. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d). * Este gráfico se repete para facilitar a comparação dos resultados.

Além de apresentar maior densidade celular, a média da taxa específica de formação da eritropoietina (q_{EPOhr_m}) e a produtividade (P) ($q_{EPOhr_CHO-110_m} = 4,7 \mu\text{g}/10^6$ células/dia e $P_{CHO-110} = 11,9 \mu\text{g}/\text{dia}$) foram maiores, com exceção do q_{EPO} , em relação aos valores apresentados pelo meio SFM4CHOTM - Utility ($q_{EPOhr_Utility_m} =$

$5,7\mu\text{g}/10^6$ células/dia, $P_{\text{Utility}} = 6,6\mu\text{g}/\text{dia}$). A concentração máxima de produto ($[\text{EPOhr}]_{\text{max}}$) secretado no meio Cellvento™ CHO-110 sem HT ao fim do cultivo ($[\text{EPOhr}]_{\text{max_CHO-110}} = 95,1 \mu\text{g}/\text{mL}$) foi maior em relação aos valores apresentados pelo meio SFM4CHO™ – Utility no oitavo dia de cultivo ($[\text{EPOhr}]_{\text{max_Utility}} = 43,7 \mu\text{g}/\text{mL}$).

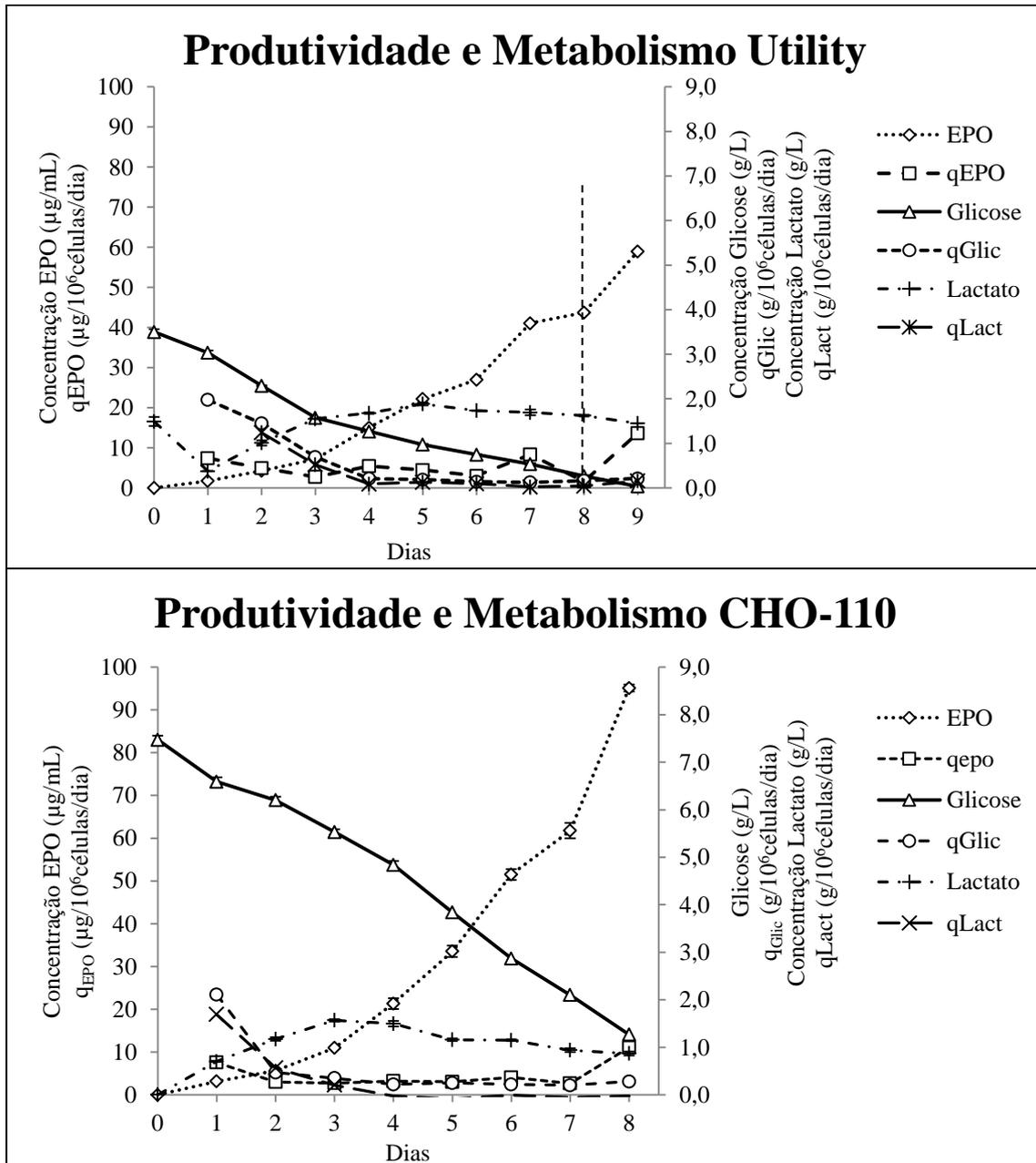


Figura 18. Produtividade e metabolismo de células CHO nos meios SFM4CHO™ – Utility e Cellvento™ CHO-110, respectivamente. \diamond - Concentração de EPOhr; \square - Taxa específica de formação de EPOhr; \triangle - Concentração de glicose no meio; \circ - Taxa específica de consumo de glicose; $+$ - Concentração de lactato no meio; \times - Taxa específica de produção de lactato.

4.1.5. Adaptação e cinética comparativa entre os meios SFM4CHO™ – Utility e CPCHO™.

O último meio de cultivo testado, CPCHO™ apresentou resultados similares, em comparação ao meio padrão SFM4CHO™ - Utility. Conforme a tabela 7 foi possível realizar a adaptação das células no meio CPCHO™. Apesar de não alcançar os mesmos índices de células totais que o meio SFM4CHO – Utility™, $1,9 \pm 0,14 \times 10^6$ de células em meio CPCHO™ em comparação com $2,5 \pm 0,40 \times 10^6$ em meio SFM4CHO™ – Utility, a viabilidade sempre se manteve alta com valores próximos ou acima de 90% de viabilidade.

Tabela 7. Tabela de expansão celular em meio SFM4CHO™ – Utility e tabela de adaptação/expansão celular no meio CPCHO™. Cada valor apresentado está com seu respectivo desvio-padrão. A linha tracejada indica a substituição do meio SFM4CHO™ - Utility pelo meio alternativo. GR – Garrafa Rotatória/Roller.

	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais/mL ($\times 10^6$)	Células Mortas/mL ($\times 10^5$)	Células Viáveis/mL ($\times 10^6$)	Viabilidade (%)
SFM4CHO™ - Utility	(0)	Criotubo	0,7 \pm 0,06	0,6 \pm 0,06	0,6 \pm 0,17	90,3 \pm 0,03
	1 (4)	T-25	2,1 \pm 0,80	1,2 \pm 0,11	1,9 \pm 0,72	94,7 \pm 0,03
	2 (7)	T-75	2,1 \pm 0,04	0,9 \pm 0,03	2,0 \pm 0,01	96,3 \pm 0,02
	3 (11)	T-75	2,5 \pm 0,40	1,1 \pm 0,31	2,4 \pm 0,41	95,3 \pm 0,01
	4 (14)	T-75	2,1 \pm 0,13	0,8 \pm 0,32	2,0 \pm 0,11	96,0 \pm 0,01
	5 (18)	T-75	2,0 \pm 0,27	1,1 \pm 0,52	1,8 \pm 0,18	94,3 \pm 0,02
	6 (21)	GR	2,1 \pm 0,19	1,3 \pm 0,18	2,0 \pm 0,17	94,0 \pm 0,00
	Passagem (Dia)	Frasco/Garrafa	Células Totais ($\times 10^6$)	Células Mortas ($\times 10^5$)	Células Viáveis ($\times 10^6$)	Viabilidade (%)
CPCHO™	(0)	Criotubo	0,6 \pm 0,01	0,7 \pm 0,18	0,5 \pm 0,01	87,8 \pm 0,03
	1 (4)	T-25	2,0 \pm 0,11	1,2 \pm 0,11	1,8 \pm 0,10	93,8 \pm 0,00
	2 (7)	T-75	1,5 \pm 0,15	0,6 \pm 0,07	1,4 \pm 0,16	96,3 \pm 0,01
	3 (11)	T-75	1,9 \pm 0,14	1,9 \pm 0,04	1,7 \pm 0,14	90,1 \pm 0,01
	4 (13)	T-75	1,9 \pm 0,06	1,9 \pm 0,11	1,7 \pm 0,07	89,9 \pm 0,01
	5 (17)	GR	1,8 \pm 0,12	1,2 \pm 0,07	1,7 \pm 0,13	93,6 \pm 0,01

Conforme visto na figura 19, a densidade de células viáveis alcançada no meio CPCHO™ foi de $1,8 \pm 0,2 \times 10^6$ células viáveis/mL no quarto dia, enquanto o maior valor alcançado pelas células cultivadas no meio controle foi de $1,8 \pm 0,1 \times 10^6$ células viáveis/mL no sétimo dia, onde os desvios-padrão dos valores máximos apresentados não indicam diferença significativa entre eles. A viabilidade se manteve entre 80% e 90% até o quarto dia e reduzindo para abaixo de 80% no quinto dia, em comparação ao meio controle SFM4CHO™ – Utility, que apresentou viabilidade superior a 90% até o 4º

dia, entre 80% e 90% entre o 5º e 7º dia e inferior a 80% após o 7º dia. Entretanto, as células grumaram durante a cinética, o que prejudicou tanto a contagem quanto a sobrevivência das células no meio de cultivo.

Em relação ao crescimento na fase exponencial, a taxa específica de proliferação (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d) observados no meio alternativo apresentou valores ($\mu_{expCPCHO} = 1,10d^{-1}$ e $\mu_{expUtility} = 0,80d^{-1}$) e de t_d ($t_{dCPCHO} = 0,63d$ e $t_{dUtility} = 0,87d$), indicando que o meio teve capacidade de promover a proliferação celular superior ao do meio controle.

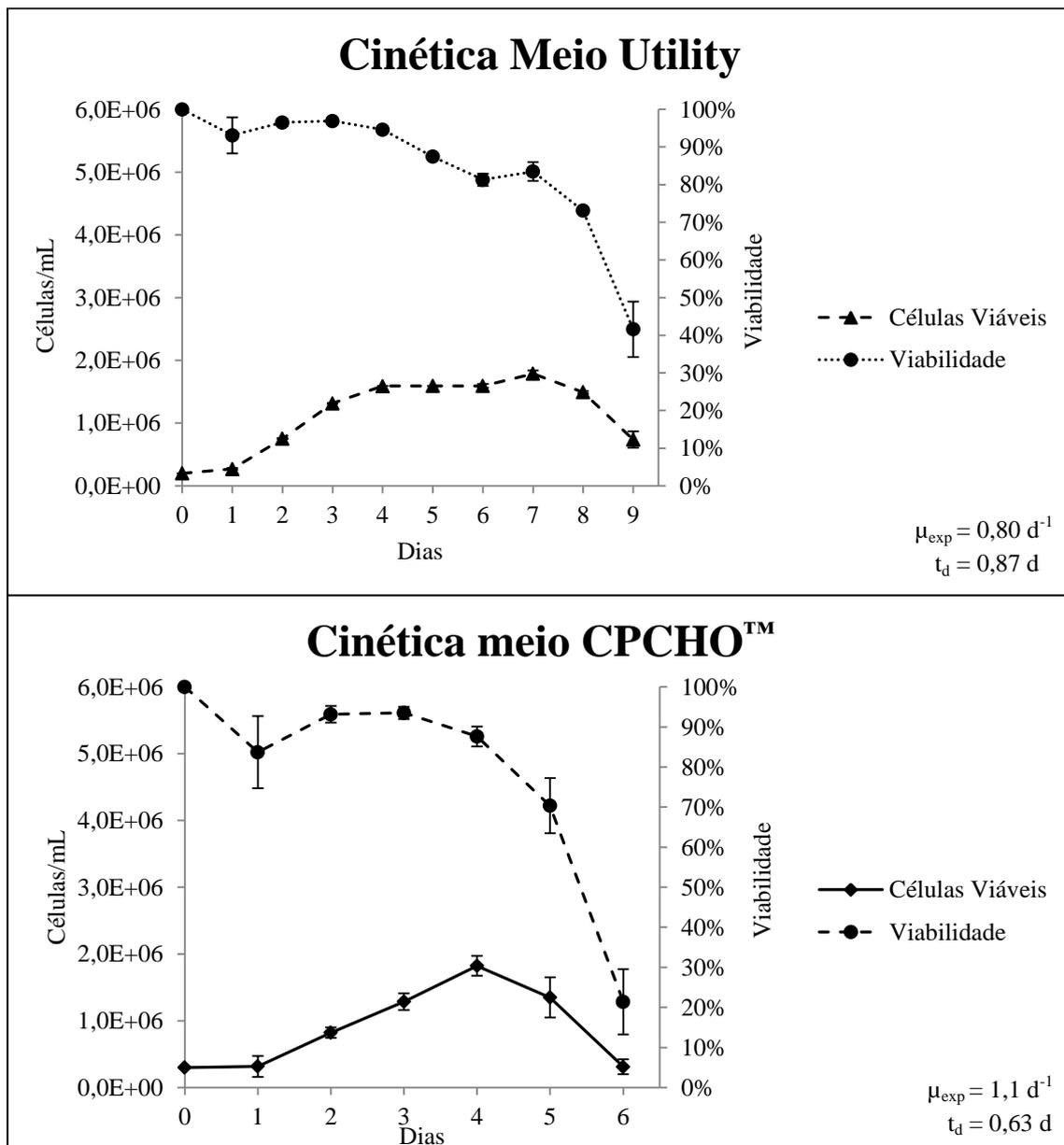


Figura 19. Células CHO viáveis e viabilidade em meio SFM4CHO™ - Utility e CPCHO™. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d).

Juntamente com as análises de crescimento celular, foram analisados parâmetros metabólicos entre os dois meios de cultivo, como o consumo de glicose, produção de lactato e secreção de EPOhr no meio de cultivo, ao longo da cinética. Os resultados estão presentes na figura 20. O meio alternativo CPCHOTM apresenta maior concentração de glicose inicial, em comparação ao meio padrão SFM4CHOTM – Utility ([Glicose]_{CPCHO} = 4,5 g/L e [Glicose]_{Utility} = 3,5g/L). A taxa específica de consumo deste nutriente foi maior no meio alternativo quando comparado com o controle ($q_{\text{Glic_CPCHO_m}} = 0,95\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{\text{Glic_Utility_m}} = 0,40\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$). Por apresentar um q_{Glic} maior, a produção de lactato no meio CD FortiCHOTM, medida pelo (q_{Lact}), foi maior que o q_{Lact} do meio SFM4CHOTM – Utility ($q_{\text{Lact_CPCHO_m}} = 1,46\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{\text{Lact_Utility_m}} = 0,29\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$). Mesmo apresentando maior concentração de glicose, o rendimento celular a partir do consumo de glicose ($Y_{\text{X/Glic}}$) no meio CD FortiCHOTM foi menor que o do meio SFM4CHOTM – Utility ($Y_{\text{X/Glic_CPCHO}} = 0,23 \times 10^6\text{células}/\text{g}$ e $Y_{\text{X/Glic_Utility}} = 0,37 \times 10^6\text{células}/\text{g}$).

Apesar de não apresentar maior densidade celular, a média da taxa específica de formação da eritropoietina ($q_{\text{EPOhr_m}}$) e a produtividade (P) ($q_{\text{EPOhr_CPCHO_m}} = 7,3\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $P_{\text{CPCHO}} = 12,2\mu\text{g}/\text{dia}$) foram maiores, em relação aos valores apresentados pelo meio SFM4CHOTM - Utility ($q_{\text{EPOhr_Utility_m}} = 5,7\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $P_{\text{Utility}} = 6,6\mu\text{g}/\text{dia}$). A concentração máxima de produto ($[\text{EPOhr}]_{\text{max}}$) secretado no meio CPCHOTM ao fim do experimento ($[\text{EPOhr}]_{\text{max_CPCHO}} = 72,9\mu\text{g}/\text{mL}$) também foi maior, em relação aos valores apresentados no meio SFM4CHOTM – Utility no sexto dia de cultivo ($[\text{EPOhr}]_{\text{max_Utility}} = 27,0\mu\text{g}/\text{mL}$).

Os dados de todas as cinéticas – tempo de duplicação, concentração máxima de células viáveis, taxa específica de crescimento exponencial por dia, concentração inicial de glicose, taxa média específica de consumo de glicose, concentração média de lactato formado, taxa média específica de formação de lactato, concentração máxima de EPOhr produzida, taxa média específica de formação de eritropoietina, produtividade do cultivo e rendimento da formação de células por glicose consumida – no último dia de cultivo foram resumidos na tabela 8.

4.1.6. Integral de Células Viáveis

A partir dos dados gerados, ao longo das cinéticas, foi criado o gráfico com a integral de células viáveis (ICV) (figura 21). O meio CellventoTM CHO-110 sem HT

apresentou o maior valor de ICV ao final do cultivo ($2,2 \times 10^7$ células.dia/mL), seguido dos meios SFM4CHOTM-Utility e o SFM4CHOTM ($1,1 \times 10^7$ células.dia/mL e $1,2 \times 10^7$ células.dia/mL, respectivamente). Os testes com os meios CPCHOTM e HyCellTM sem HT, que apresentaram menor tempo de cultivo (6 dias), alcançaram valores semelhantes entre si ($5,9 \times 10^6$ células.dia/mL e $5,7 \times 10^6$ células.dia/mL, respectivamente) no entanto, uma ordem de grandeza menor do que os meios SFM4CHOTM-Utility e SFM4CHOTM. O meio CD FortiCHOTM foi o que apresentou menor período de cultivo (4 dias), alcançando ICV de $3,9 \times 10^6$ células.dia/mL.

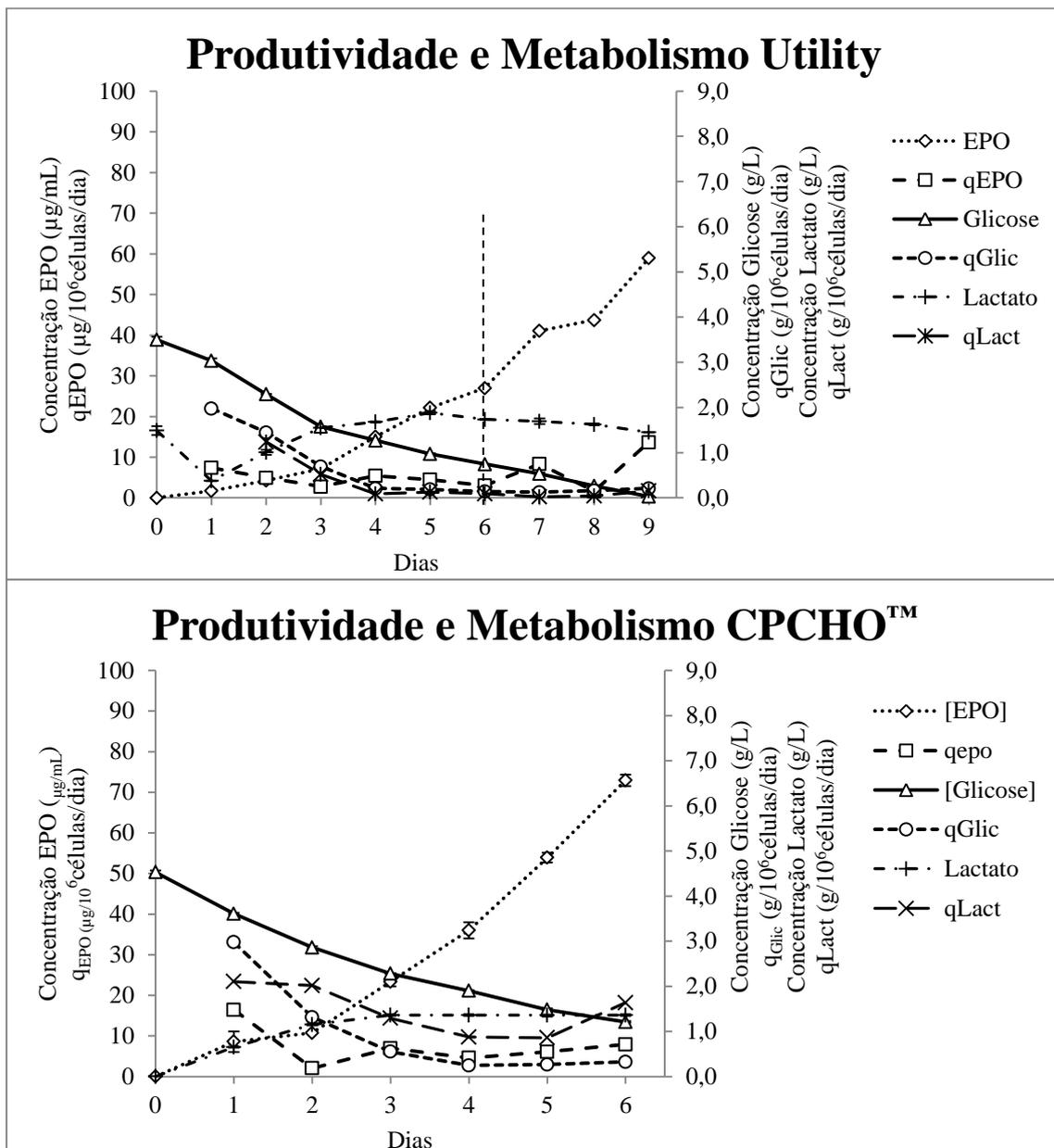


Figura 20. Produtividade e metabolismo de células CHO nos meios SFM4CHOTM-Utility e CPCHOTM. ◇ - Concentração de EPOhr; □ - Taxa específica de formação de EPOhr; △ - Concentração de glicose no meio; ○ - Taxa específica de consumo de glicose; + - Concentração de lactato no meio; × - Taxa específica de produção de Lactato.

Tabela 8. Resumo das taxas, concentração e rendimentos das cinéticas dos meios testados no último dia de cultivo. T_d – Tempo de duplicação; $X_{v_{max}}$ – Concentração máxima de células vivas; μ_{exp} – Taxa específica de crescimento exponencial por dia; $[Glic_0]$ – Concentração inicial de glicose; q_{Glic} – Taxa média específica de consumo de glicose; $[Lact_{max}]$ – Concentração máxima de lactato formado; q_{Lact} – Taxa média específica de formação de lactato; $[EPOhr]_{max}$ – Concentração máxima de EPOhr produzida; q_{EPOhr} – Taxa média específica de formação de eritropoetina; P – Produtividade do cultivo em gerar hrEPO ao dia; $Y_{X/Glic}$ – Rendimento da formação de células por glicose consumida, durante o cultivo.

Meios	T_d (d)	$X_{v_{max}}$ (10^6 céls/mL)	μ_{exp} (d^{-1})	$[Glic_0]$ (g/L)	q_{Glic} (g/ 10^6 células/dia)	$[Lact_{max}]$ (g/L)	q_{Lact} (g/ 10^6 células/dia)	$[EPOhr]_{max}$ (μ g/mL)	q_{EPOhr} (μ g/ 10^6 células/dia)	P (μ g/dia)	$Y_{X/Glic}$ (10^6 células/g)
SFM4CHO™ Utility	0,87	1,8	0,80	3,50	0,40	1,45	0,29	58,98	5,70	6,55	0,37
SFM4CHO™	0,71	2,4	0,97	7,00	0,82	1,77	0,45	36,19	3,94	4,02	0,95
HyCell™	1,44	1,7	0,48	8,33	0,57	1,54	0,35	35,16	1,53	5,86	0,33
CD FortiCHO™	1,73	2,6	0,40	5,78	1,06	0,91	0,63	23,93	1,93	5,98	1,48
Cellvento™ CHO-110	0,85	4,6	0,82	7,50	0,51	1,01	0,28	95,11	4,68	11,89	1,10
CPCHO™	0,63	1,8	1,10	4,53	0,95	1,03	1,46	72,93	7,32	12,16	0,23

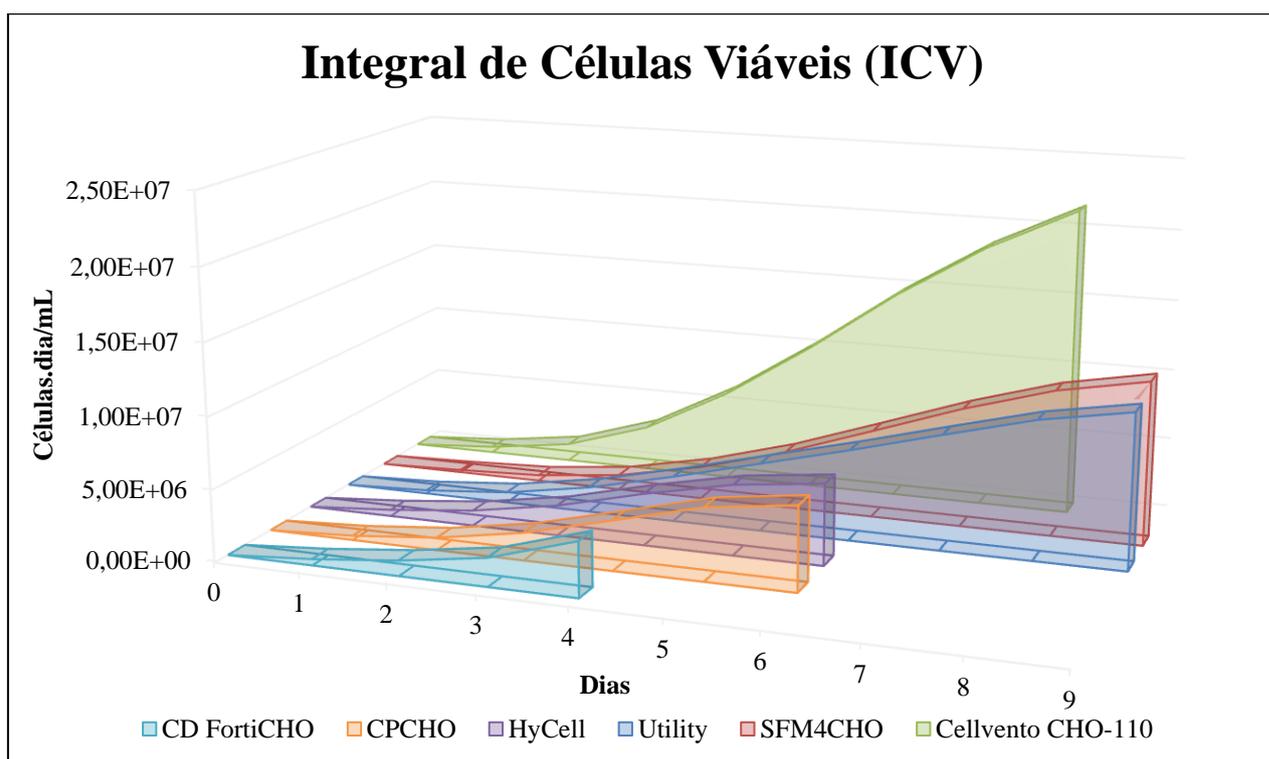


Figura 21. Gráfico com os valores da Integral de Células Viáveis (ICV) ao longo do cultivo para os meios CD FortiCHO™, CPCHO™, HyCell™ sem HT, SFM4CHO™ - Utility, SFM4CHO™ e Cellvento™ CHO-110.

4.2. Cultivo em Biorreator

Após os cultivos realizados em garrafas rotatórias, os melhores meios de cultivo foram testados no biorreator em modo contínuo. O primeiro meio testado foi o

Cellvento™ CHO-110 sem HT, porém, não se obteve crescimento após inóculo do biorreator. O meio SFM4CHO™ também foi utilizado no biorreator de tanque agitado em modo contínuo por apresentar, entre todos, as condições de cultivo mais parecidas com o meio SFM4CHO™ - Utility. Após o inóculo, a cultura celular foi cultivada em batelada simples até o quarto dia. A partir do quarto dia, foi iniciado o cultivo em modo contínuo a uma taxa de 0,5vvd de troca de meio de cultivo. O SFM4CHO™ apresentou baixa concentração de células viáveis, não mantendo a mesma faixa de viabilidade da cinética em garrafa rotatória. Conforme observado na figura 22, a densidade de células viáveis alcançada no meio SFM4CHO™ em modo contínuo foi de $1,8 \pm 0,2 \times 10^6$ células viáveis/mL. A viabilidade se manteve entre 80% e 90% até o terceiro dia e reduzindo para abaixo de 80% no quarto dia. Em relação ao crescimento na fase exponencial, a taxa específica de proliferação (μ_{exp}) observado no meio alternativo foi de $0,84 d^{-1}$, obtendo um t_d de 0,83d, semelhante aos valores obtidos no período de operação contínua ($0,70 d^{-1}$ e $0,91 d^{-1}$). Conforme observado na figura 22, a partir de uma concentração inicial de glicose de 7,0g/L, houve um consumo deste nutriente até alcançar uma concentração de 4g/L, quando foi iniciado o modo contínuo com uma taxa de troca de 0,5vvd (1L/dia). Durante esta fase do cultivo a taxa específica média de consumo de glicose foi de $1,2 g/10^6$ células/dia. A produção de EPO (figura 22) alcançou título máximo de $8,8 \mu g/mL$, mantendo-se relativamente estável ao redor neste valor durante a fase de operação contínua. A taxa específica média de formação do produto durante a fase contínua foi de $2,92 \mu g/10^6$ células/dia, semelhante à média desta taxa na fase inicial do cultivo (batelada), $2,83 \mu g/10^6$ células/dia.

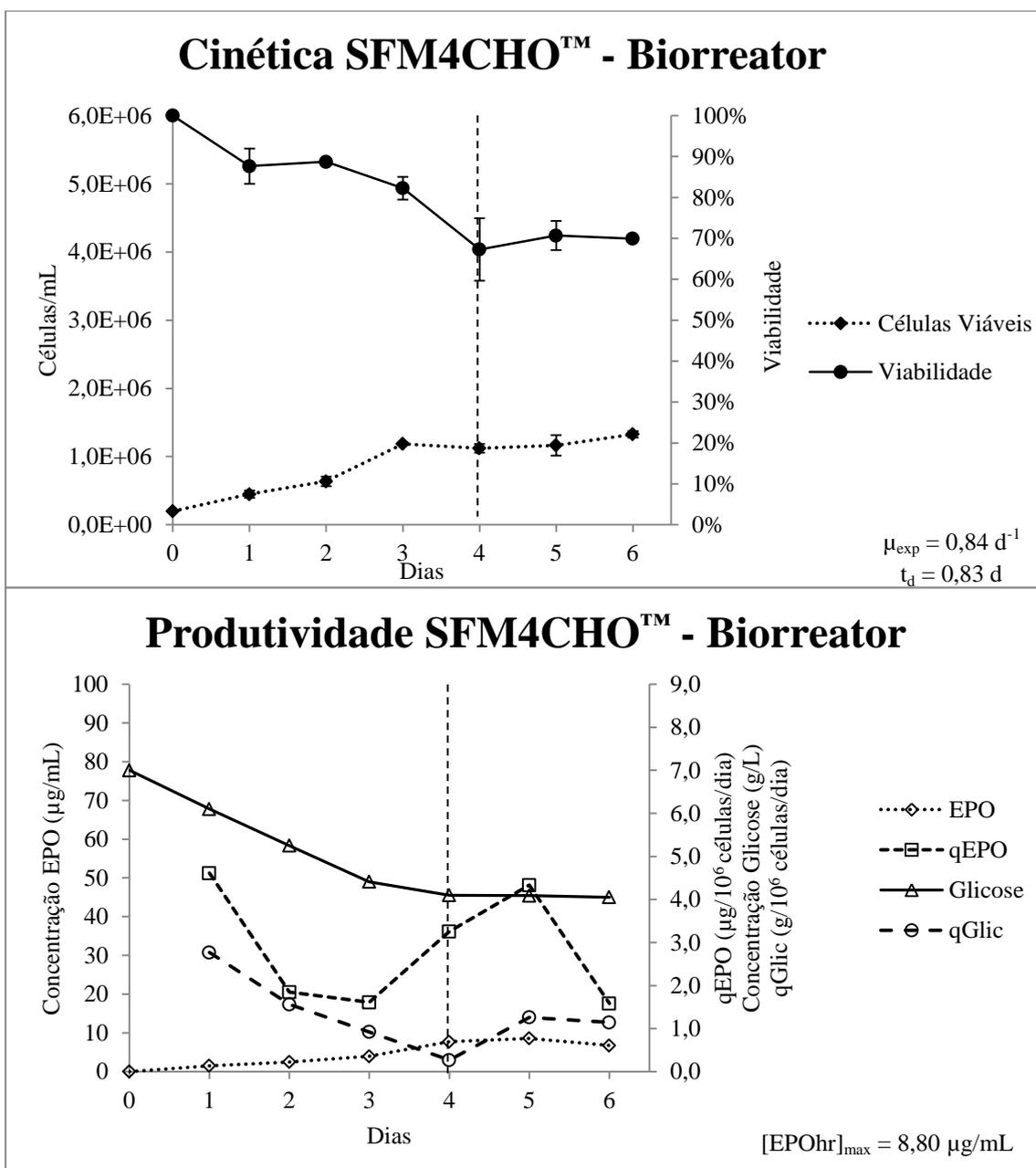


Figura 22. Células CHO viáveis, viabilidade e produtividade em meio SFM4CHO™ em biorreator. ▲ - Células viáveis; ● - Viabilidade. A linha tracejada indica o início da troca de meio. No canto inferior direito do gráfico são apresentados os valores de taxa específica de proliferação na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_d); ◇ - Concentração de EPOhr; □ - Taxa específica de formação de EPOhr; △ - Concentração de glicose no meio; ○ - Taxa específica de consumo de glicose. No canto inferior direito do gráfico é apresentada a concentração máxima de produto ($[EPOhr]_{max}$).

5. Discussão

O trabalho em questão testou sete meios de cultivo comerciais diferentes e os comparou com o meio de cultivo controle, onde as células utilizadas no trabalho estão adaptadas, o SFM4CHOTM – Utility (Thermo Hyclone[®] GE). A principal motivação do trabalho se baseia na importância de se qualificar diferentes fornecedores para insumos-chaves do processo produtivo. Em caso de desabastecimento de um insumo por motivos diversos (insumo descontinuado, problemas na linha de produção, aquisições corporativas, entre outros) é necessário que o produtor tenha uma alternativa de fornecedor qualificado e que o insumo esteja de acordo com as características do registro do produto junto à agência reguladora (Johnson 2006).

Por se tratarem de meios de cultivo comerciais, muitas informações dos insumos testados são proprietárias dos fornecedores e não são liberadas ao público, dificultando o esclarecimento correto das funções dos componentes dos meios. A maioria dos meios testados (exceção do meio CPCHOTM) é quimicamente definido, onde, geralmente, estes meios são idealizados e desenvolvidos para aprimorar o crescimento celular e expressão da proteína recombinante, através do melhor controle do metabolismo celular e melhor aproveitamento dos nutrientes presentes no meio (Altamirano et al 2000; Huang et al 2010).

A estratégia de comparação dos meios partiu de uma adaptação direta, onde o meio de cultivo inicial é substituído completamente pelo meio alternativo e mantido por um número limitado de passagens. Esta estratégia foi adotada com a intenção de se identificar meios que tivessem o desempenho semelhante ao meio original, evitando a seleção de subpopulações da linhagem e, conseqüentemente, sem alterar significativamente as características do cultivo e produto (Van der Valk et al 2010; Jayme 1991). Apesar de pequena variação no número de sub-cultivos entre as diferentes adaptações, as mesmas foram feitas de modo a manter o mesmo perfil para assegurar a padronização nesta. Dos sete meios testados, dois não obtiveram sucesso na etapa de adaptação – HyCellTM (Thermo Hyclone[®] GE) e TransFx-CTM (Thermo Hyclone[®] GE).

No primeiro meio de cultivo citado anteriormente, as células não alcançaram concentrações ($1,10 \pm 0,09 \times 10^5$ células viáveis/mL) e viabilidade celular (42,5% de viabilidade) satisfatórias, impossibilitando o início da cinética comparativa. Em relação ao segundo meio de cultivo citado, as células apresentaram um comportamento atípico durante a etapa de adaptação. Conforme as figuras 9 e 10 muitas células perderam a capacidade de crescimento em suspensão, apresentando características de crescimento aderente que impossibilitaram os métodos de contagem e, conseqüentemente, a continuidade da adaptação no meio TransFx-C™. De acordo com as instruções fornecidas pela empresa responsável pela fabricação do meio, algumas linhagens celulares não conseguem crescer de maneira direta, sendo necessário realizar a adaptação sequencial (Van der Valk et al 2010; Sinacore et al 2000).

Os outros cinco meios de cultivo conseguiram resultados satisfatórios nas etapas de adaptação celular direta e foi possível iniciar as cinéticas comparativas. Os meios de cultivo testados foram o SFM4CHO™ (Thermo Hyclone® GE), HyCell™ sem HT (Thermo Hyclone® GE), CD FortiCHO™ (Gibco®), Cellvento™ CHO-110 sem HT (Merck) e CPCHO™ (Diagnovum). Em todos os meios, as células obtiveram uma boa adaptação ($5,4 \times 10^6$ células viáveis/mL e 96,7% de viabilidade – SFM4CHO™; $2,5 \times 10^6$ células viáveis/mL e 98,0% de viabilidade – HyCell™ sem HT; $2,9 \times 10^6$ células viáveis/mL e 97,6% de viabilidade – CD FortiCHO™; $2,2 \times 10^6$ células viáveis e 96,0% de viabilidade – Cellvento™ CHO-110 sem HT; $1,8 \times 10^6$ células viáveis e 96,3% de viabilidade – CPCHO™).

Importante fator a ser mantido durante os testes é a capacidade de promoção da proliferação celular. Assim como comentado anteriormente, a manutenção das características no meio testado serve como um indicativo aparente da influência do meio sobre o metabolismo celular e, conseqüentemente, sobre as características do produto (Dowd et al 2001; Huang et al 2010). Desta forma, em comparação com o meio controle, alguns meios conseguem alcançar concentrações máximas de células viáveis semelhantes (SFM4CHO™, HyCell™ sem HT, CPCHO™, na faixa de $1,5 - 2,0 \times 10^6$ células viáveis/mL). No entanto, os meios HyCell™ sem HT e CPCHO™ não mantiveram a fase estacionária por período semelhante ao do meio padrão (aproximadamente 5 dias), que durou cerca de 1 dia para ambos os meios.

Antagonicamente, esses dois meios apresentaram taxas específicas de crescimento bem diferentes ao meio SFM4CHO™ - Utility ($\mu_{\text{exp_utility}} = 0,80\text{d}^{-1}$), onde o HyCell™ sem HT apresentou um valor significativamente baixo ($\mu_{\text{exp_HyCell}} = 0,48\text{d}^{-1}$) e o CPCHO™, significativamente alto ($\mu_{\text{exp_CPCHO}} = 1,10\text{d}^{-1}$). O meio SFM4CHO™, apresentou concentração celular superior ao Utility, mantendo o cultivo na faixa de $2,0 - 2,5 \times 10^6$ células viáveis/mL por cerca de 4 dias. A taxa específica de crescimento observada foi de $0,97\text{d}^{-1}$, não se diferenciando muito da taxa do meio padrão, no entanto a viabilidade celular sustentada por este meio se manteve abaixo de 80% após o primeiro dia de cultivo. Apesar das diferenças observadas para os meios citados, as faixas observadas são compatíveis com os valores observados na literatura para processos em batelada utilizando gerações semelhantes aos dos meios utilizados (Véliz et al 2008; Fenge & Lüllau 2006).

Os resultados não foram considerados como indicativos de uma mudança relevante no perfil de proliferação celular e geração de biomassa, como pode ser observado na figura 31, onde a ICV apresenta o mesmo comportamento até o 6º dia para os meios citados acima. O meio Cellvento™ CHO-110 sem HT pode ser considerado um exceção ao comportamento descrito anteriormente, onde as concentrações celulares alcançaram a faixa $3,0 - 4,5 \times 10^6$ células viáveis/mL e com viabilidade celular semelhante ao meio controle, assim com a sua taxa específica de crescimento na fase exponencial ($\mu_{\text{exp_CHO-110}} = 0,82\text{d}^{-1}$). Devido à baixa desempenho do meio CD FortiCHO™, este não foi considerado na discussão, pois apresentou a formação de muitos grumos conforme descrito anteriormente.

As diferenças observadas entre os meios podem ser atribuídas à disponibilidade de glicose inicialmente em cada formulação. O meio SFM4CHO™ apresenta alta concentração de glicose em sua composição ($[\text{Glicose}]_{\text{SFM4CHO}} = 7,0\text{g/L}$), aumentando a fonte de carboidrato livre, em comparação ao meio controle ($[\text{Glicose}]_{\text{Utility}} = 3,5\text{g/L}$). Comparativamente, os cultivos apresentaram um aproveitamento semelhante da glicose nos dois meios SFM4CHO™, considerando que a disponibilidade de glicose está diretamente relacionada ao incremento do seu consumo, o que resulta em um incremento na proporção de duas vezes na taxa de consumo ($q_{\text{Glic_SFM4CHO_m}} = 0,82\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{\text{Glic_Utility_m}} = 0,40\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$), compatível com o dobro de disponibilidade de glicose no meio testado. No entanto, o mesmo incremento não foi observado na taxa de formação do metabólito lactato, alcançando um incremento na

ordem 1,5 vezes ($q_{\text{Lact_SFM4CHO_m}} = 0,45\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$ e $q_{\text{Lact_Utility_m}} = 0,29\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$) (Gódia & Cairó 2006).

Assim como o SFM4CHOTM, o meio HyCellTM sem HT também apresenta alta concentração de glicose em sua composição ($[\text{Glicose}]_{\text{HyCell}} = 8,3\text{g}/\text{L}$), no entanto não resulta em incremento proporcional na sua taxa de consumo ($q_{\text{Glic_HyCell_m}} = 0,57\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$) e formação de lactato ($q_{\text{Lact_HyCell_m}} = 0,35\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$). O meio CellventoTM CHO-110 sem HT também apresenta alta concentração de glicose em sua composição e, assim como o HyCellTM sem HT, este incremento não tem impacto significativo nas taxas específicas de consumo de glicose ($q_{\text{Glic_HyCell_m}} = 0,51\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$) e formação de lactato ($q_{\text{Lact_CHO-110_m}} = 0,28\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$), sugerindo que se tratam de meios que proporcionam um melhor balanço metabólico para a célula (Altamirano et al 2000; Huang et al 2010). O meio CPCHOTM, apesar de conter glicose em concentração semelhante ao padrão (4,5g/L), apresentou maiores taxas específicas de consumo do nutriente ($q_{\text{Glic_CPCHO_m}} = 0,95\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$) e formação de lactato ($q_{\text{Lact_CPCHO_m}} = 1,46\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$). Correlacionando o consumo de glicose com a formação de biomassa, utilizando o $Y_{\text{X/Glic}}$, é possível observar que os meios SFM4CHOTM e CellventoTM CHO-110 sem HT apresentaram próximos a $1,00 \times 10^6$ células/g de nutriente, enquanto os demais apresentaram valores abaixo de $0,37 \times 10^6$ células/g, inclusive o meio controle.

A produtividade dos meios testados foi comparada utilizando a concentração máxima de produto ao final do cultivo, sua taxa específica de formação e a produtividade, em relação aos mesmos dados fornecidos pelo meio SFM4CHOTM - Utility, nos respectivos dias de cultivo. Os meios que obtiveram maiores produtividades ao fim da cinética foram os CellventoTM CHO-110 sem HT (oitavo dia) e CPCHOTM (sexto dia), alcançando concentrações máximas acima de $72\mu\text{g}/\text{mL}$, comparado ao meio controle (próximo a $59\mu\text{g}/\text{mL}$, no último dia de cinética). Em relação aos dias de término de cada cinética citada, o meio SFM4CHOTM - Utility apresentou concentrações menores de EPOhr ($43,7\mu\text{g}/\text{mL}$ e $27,0\mu\text{g}/\text{mL}$, no oitavo e sexto dia, respectivamente), mostrando um desempenho maior dos meios alternativos. Os outros meios testados apresentaram concentrações finais de EPOhr inferiores a $37\mu\text{g}/\text{mL}$. Observando a taxa específica de produção da molécula, o meio CPCHOTM foi o que apresentou maior valor médio ($7,32\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$), enquanto o HyCellTM sem HT apresentou a menor taxa

(1,53 $\mu\text{g}/10^6$ células/dia). Os outros meios apresentaram taxas médias próximas ao valor do meio padrão (5,70 $\mu\text{g}/10^6$ células/dia).

O teste realizado em biorreator de 2L, em cultivo contínuo, foi possível somente em dois meios (por motivos de disponibilidade do equipamento). O primeiro meio testado foi o Cellvento™ CHO-110 sem HT, que não foi bem sucedido, pois não houve proliferação após o seu inóculo. De acordo com o fabricante, existe disponível no mercado uma versão apropriada para o cultivo em biorreatores. Este fato levanta a hipótese de que a formulação testada não apresenta protetores contra as tensões de cisalhamento geradas pelo ambiente hidrodinâmico do biorreator (Chisti 2001; Godoy-Silva et al 2009). O meio SFM4CHO™, por apresentar características mais semelhantes ao meio padrão em garrafas rotatórias, foi escolhido para ser utilizado no cultivo em biorreator. Apesar da semelhança observada nas garrafas rotatórias, o meio testado não conseguiu sustentar concentrações celulares semelhantes à versão SFM4CHO™ - Utility (Pinto 2007; Véliz 2007). O processo produtivo utilizando o meio SFM4CHO™ - Utility é capaz de alcançar concentrações celulares na ordem de 5-10x10⁶ quando operado em modo contínuo. Neste processo a troca de meio é iniciada quando a concentração celular alcança 1x10⁶ células viáveis/mL (Pinto 2007).

A mesma estratégia foi adotada no experimento com o meio alternativo, no entanto mesmo após a operação em modo contínuo por três dias consecutivos (baseado em uma troca de meio de 1L/dia – 0,5vvd), a concentração celular se manteve estável em torno 1,0 - 1,3x10⁶ células viáveis/dia, com viabilidade inferior a 80%. A produtividade no teste (8,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no sobrenadante da fase contínua) também foi inferior à observada no processo industrial, que alcança títulos aproximados de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no sobrenadante durante a fase contínua. Esses títulos alcançados estão provavelmente relacionados à baixa densidade celular conseguida na escala de bancada. Apesar de mantidas as mesmas condições operacionais (aeração e troca de meio), outros importantes fatores como a geometria do biorreator e velocidade de agitação podem interferir no crescimento celular, sendo necessário maior aprofundamento desses aspectos (Fenge & Lüllau 2006; Godoy-Silva et al 2006; Véliz et al 2008; Godoy-Silva et al 2009).

6. Conclusão

Sete meios de cultivo comerciais (SFM4CHOTM, HyCellTM, HyCellTM sem HT e TransFx-CTM - Thermo Hyclone[®] GE; CD FortiCHOTM - Gibco[®]; CellventoTM CHO-110 sem HT – Merck; e CPCHOTM - Diagnovum/Merck) foram testados em comparação ao meio controle SFM4CHOTM – Utility, ao longo deste trabalho. Do total, dois não apresentaram resultados positivos no período de adaptação e escalonamento, não sendo dada sequência às cinéticas comparativas – HyCellTM (Thermo Hyclone[®] GE) e TransFx-C (Thermo Hyclone[®] GE).

Após a realização dos experimentos necessários, os meios de cultivo que apresentaram resultados iguais ou melhores que o meio controle SFM4CHOTM – Utility foram os meios SFM4CHOTM (Thermo Hyclone[®] GE), CellventoTM CHO-110 sem HT (Merck) e CPCHOTM (Diagnovum/Merck), os quais permitiram um melhor crescimento celular, melhor aproveitamento dos recursos e uma maior taxa de produção e secreção de EPOhr no meio metabolizado.

Considerando os resultados descritos, é possível sugerir que o meio SFM4CHO mantém o cultivo com um perfil metabólico e proliferativo mais semelhante ao SFM4CHOTM - Utility, provavelmente porque se trata de uma versão aprimorada do meio controle, sendo o candidato mais provável a ser utilizado como alternativa no processo produtivo. Os meios CellventoTM CHO-110 sem HT e CPCHOTM obtiveram desempenho superior quanto aos aspectos estudados, o que pode ter impacto no processo de síntese da glicoproteína. No entanto, para se determinar a real influência das diferentes fórmulas dos meios, é necessária uma abordagem analítica mais aprofundada, principalmente no que se refere ao perfil glicobiológico da Eritropoetina sintetizada.

Em decorrência dos resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se que os seguintes aspectos sejam estudados em trabalhos futuros:

- O estudo comparativo em garrafas rotatórias entre o meio de cultivo controle – SFM4CHOTM - Utility – e novos meios de cultivo comerciais para o cultivar linhagens celulares de CHO;

- Cultivo em biorreator em diferentes modos de operação (batelada, batelada alimentada, contínuo e contínuo com perfusão) dos meios que apresentarem melhores condições de crescimento e produção da EPOhr;
- Análise bioquímica dos meios de cultivo testados – não somente glicose e lactato, como glutamina e amônio;
- Estudos para avaliação do comportamento celular no meio de cultivo alternativo – análise de ciclo celular e apoptose celular;
- Estudos para avaliação das características físico-químicas e bioquímicas da EPOhr expressa e secretada no meio de cultivo, através de focalização isoelétrica e métodos cromatográficos.

7. Referências Bibliográficas

Adrio JL, Demain AL. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioeng Bugs*, 2010 Mar-Apr;1(2):116-31;

Aghamohseni H, Ohadi K, Spearman M, Krahn N, Moo-Young M, Scharer JM, Butler M, Budman HM. Effects of nutrient levels and average culture pH on the glycosylation pattern of camelid-humanized monoclonal antibody. *J Biotechnol*, 2014 Jul; 186:98-109;

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Química celular e biossíntese. *Biologia Molecular da Célula*, 5ª edição. Artmed Editora, 2010;

Alfaepoetina humana recombinante. Maria da Luz F. Leal. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, [2011]. Bula de remédio;

Altarimano C, Paredes C, Cairó JJ, Gòdia F. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol Prog*, 2000; 16(1): 69-75;

Amanullah A, Otero JM, Mikola M, Hsu A, Zhang J, Aunins J, Schreyer HB, Hope JA, Russo AP. Novel micro-bioreactor high throughput technology for cell culture process development: reproducibility and scalability assesement of fed-batch CHO cultures. *Biotechnol Bioeng*, 2010 May;106(1):57-67;

Angle. *Biopharmaceuticals: entering a new world*. 2012 Apr; 1-52;

Baker KN, Rendall MH, Hills AE, Hoare M, Freedman RB, James DC. Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2001 May;(73):188-202;

Bektas M, Rubenstein DS. The role of intracellular protein O-glycosylation in cell adhesion and disease. *J Biomed Research*, 2011 May; 25(4): 227-36;

Ben-Dor S, Esterman N, Rubin E, Sharon N. Biases and complex patterns in the residues flanking protein N-glycosylation sites. *Glycobiology*, 2004 Feb;14(2):95-101;

Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeast and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biot*, 2013 Apr;40:257-74;

Bleckwejn NA, Bentley WE, Shiloach J. Production of recombinant protein using the HeLa S3-vaccinia virus expression system: bioreactor perfusion and effects of post-infection temperature. *Biosci Biotech Bioch*, 2005 Jun;69(6):1065-72;

Bollati-Fogolín M, Forno G, Nimtz M, Conradt HS, Etcheverrigaray M, Kratje R. Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: effect on productivity and product quality. *Biotechnol Progr*, 2005 Jan-Feb;21:17-21;

Borys MC, Linzer DIH, Papoutsakis ET. Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by Chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner. *Biotechnol Bioeng*, 1994 Nov; 43(6): 505-14;

Borys MC, Dalal NG, Abu-Absi NR, Khattak SF, Jing Y, Xing Z, Li ZJ. Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2010 Apr;105:1048-57;

Brockhausen I, Schachter H, Stanley P. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1896/>;

Butler M. Genetic engineering of animal cells in culture. In: Butler M (ed.), *Animal cell culture and technology*. Garland Science/BIOS Scientific Publishers, Grã-Bretanha; 2004. p. 111-24;

Butler M. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 2006 Mar;50(1:3):57-76;

Butler M. Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. (eds.), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*. Editora Roca, São Paulo; 2008. p. 122-35;

Castilho LR, Medronho, RA. Cell retention for suspended-cell perfusion cultures. *Advances Biom Eng/Biotechnol*, 2002; 74: 129-69;

Chartrain, M.; Chu, L. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9(6), 447-467;

Chen P, Harcum SW. Effects of Amino Acid Additions on Ammonium Stressed CHO Cells. *J Biotechnol*, 2005, 117:277-86;

Chisti Y. Hydrodynamic damage to animal cells. *Critical Rev Biotechnol*, 2001; 21(2):67-110;

Christie A, Butler M. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *J Biotechnol*, 1994 Nov;37(3):277-90;

Chou A-H, Liu C-C, Chang C-P, Guo M-S, Hsieh S-Y et al. Pilot scale production of highly efficacious and stable enterovirus 71 vaccine candidates. *PLoS ONE*, 2012 Apr;7(4): e34834;

Chu L, Robinson DK. Industrial choices for protein production by large-scale culture. *Curr Opinion Biotechnol*, 2001; 12: 180-7;

Chuan KH, Lim SF, Martin L, Yun CY, Loh SOH, Lasne F, Son, Z. Caspase activation, sialidase release and changes in sialylation pattern of recombinant human erythropoietin produced by CHO cells in batch and fed-batch cultures. *Cytotechnology*, 2006 Jun; 51(2):67-79;

Clincke MF, Mölleryd C, Zhang Y, Lindskog E, Walsh K, Chotteau V. Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE Bioreactor™. Part I. Effect of the cell density on the process. *AIChE*, 2013 May-Jun;29(3):768-77;

- Crabtree GR. Calcium, calcineurin and the control of transcription. *J Biol Chem*, 2001 Jan;(276):2313-6;
- Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo JL. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Tech*, 2000 Jul;27(1-2):43-52;
- Dowd JE, Kwok KE, Piret JM. Glucose-based optimization of CHO-cell perfusion cultures. *Biotechnol Bioeng*, 2001 Oct;75(2):252-6;
- Durocher Y, Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol*, 2009 Dec;20(6):700-7;
- Eibl R, Kaiser S, Lombriser R, Eibl D. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biot*, 2010 Mar;86(1):41-9;
- Elgrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant*, 2001; 16[Suppl 3]:3-13;
- Fenge C, Lüllau E. Cell Culture Bioreactors. In: Ozturk SS, Hu W-S. (eds.), *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. Editora CRC, Flórida (EUA); 2006. p. 155-224;
- Gawlitsek M, Estacio M, Fürch T, Kiss R. Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2009 Aug;103(6):1164-75;
- Glazyrina J, Materne EM, Dreher T, Storm D, Junne S, Adams T, Greller G, Neubauer P. High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor. *Microb Cell Fact*, 2010 May;9(42):1-11;
- Gódia F, Cairó JJ. Cell Metabolism. In: Ozturk SS, Hu W-S. (eds.), *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. Editora CRC, Flórida (EUA); 2006. p. 81-113;
- Godoy-Silva R, Mollet M, Chalmers JJ. Evaluation of the effect of chronic hydrodynamical stresses on cultures of suspended CHO-6E6 cells. *Biotechnol Bioeng*, 2006 Sep; 102:1119-30;

Godoy-Silva R, Chalmers JJ, Casnocha SA, Bass LA, Ma N. Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnol Bioeng*, 2009 Mar; 103:1103-17;

Gong X, Li D, Li X, Fang Q, Han X, Wu Y, Yang S, Shen BQ. Fed-batch culture optimization of a growth-associated hybridoma cell line in chemically defined protein-free media. *Cytotechnology*, 2006 Sep;52(1):25-38;

Gorenflo VM, Pfeifer TA, Lesnicki G, Kwan EM, Grigliatti TA, Kilburn DG, Piret JM. Production of a self-activating CBM-factor X fusion protein in a stable transformed Sf9 insect cell line using high cell density perfusion culture. *Cytotechnology*, 2004 Mar;44(3):93-102;

Grillberger L, Kreil TR, Nasr S, Reiter M. Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnol J*, 2009 Feb;4(2):186-201;

Gu X, Wang DI. Improvement of interferon-gamma sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnol Bioeng*, 1998 Jun;58(6):353-60;

Han YK, Koo TY, Lee GM. Enhanced interferon- β production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperatures. *Biotechnol Prog*, 2009 Sep-Oct; 25(5):1440-47;

Hart GW, Akimoto Y. The O-GlcNAc Modification. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 18. Acesso em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1954/>;

Hart GW, Kreppel LK, Comer FI, Arnold CS, Snow DM, Ye Z, Cheng X, DellaManna D, Caine DS, Earles BJ, Akimoto Y, Cole RN, Hayes BK. O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology*, 1996 Oct; 6(7): 711-6;

Hee CK, Jeong YT, Kwak CY, Choi O, Kim JH. Effect of mild-thiol reducing agents and α 2,3-sialyltransferase expression on secretion and sialylation of recombinant EPO in CHO cells. *J Microbiol Biot*, 2013 May;23(5):699-706;

Helenius A, Aebi, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmatic reticulum. Annual Rev. of Biochem., 2004; 73:1019-49;

Ho L, Greene CL, Schmidt AW, Huang LH. Cultivation of HEK 293 cell line and production of a member of the superfamily of G-protein coupled receptors for drug discovery applications using a highly efficient novel bioreactor. Cytotechnology, 2004 Jul;45(3):117-23;

Hossler P, Khattak SF, Li ZJ. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. Glycobiology, 2009 Sep;19(9):936-49;

Hsu WT, Aulakh RPS, Traul DL, Yuk IH. Advanced microscale bioreactor system: a representative scale-down model for bench-top bioreactors. Cytotechnology, 2012 Dec;64(6):667-78;

Huang H, Yi X, Zhang Y. Improvement of Vero cell growth in glutamate-based culture by supplementing ammoniagenic compounds. Process Biochem, 2006 Dec; 41(12):2386-92;

Huang Y-M, Hu WW, Rustandi E, Chang K, Yusuf-Makagiansar H, Ryll T. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. Biotechnol Prog, 2010; 26(5):1400-10;

Hundt, B, Mölle, N, Stefaniak, S, Dürrwald R, Weyand J. Large pilot scale cultivation process study of adherent MDBK cells for porcine Influenza A virus propagation using a novel disposable stirred-tank bioreactor. BMC Proc, 2011May;5(Suppl 8):P128;

Imamoto Y, Tanaka H, Takahashi K, Konno Y, Suzawa T. Advantages of AlaGln as an additive to cell culture medium: use with anti-CD20 chimeric antibody-producing POTELLIGENT™ CHO cell lines. Cytechnology, 2013; 65:135-43;

Imlay JA. Pathways of oxidative damage. Annu Rev Microbiol, 2003;(57):395-418;

Ishaque A, Al-Rubeai M. Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by *bcl-2* during hybridoma cell culture. Apoptosis, 2002 Jun; 7(3):231-9;

Jain E, Kumar A. Upstream process in antibody production: Evaluation of critical parameters. Biotechnol Adv, 2008 Jan-Feb;26(1):46-72;

Jappelli R, Perrin MH, Lewis KA, Vaughan JM, Tzitzilonis C, Rivier JE, Vale WW, Riek R. Expression and functional characterization of membrane-integrated mammalian corticotropin releasing factor receptors 1 and 2 in *Escherichia coli*. PLoS ONE, 2014 Jan;9(1):e84013;

Jordan M, Voisard D, Berthoud A, Tercier L, Kleuser B, Baer G, Broly H. Cell culture medium improvement by rigorous shuffling of components using media blending. Cytotechnology, 2013 Jan;65(1):31-40;

Johnson T. Promises and pitfalls of cell line adaptation. Some basic protocols. BioProcess Intern, 2006 May; [Suppl]:52-6;

Kallel H, Zaïri H, Rourou S, Essafi M, Barbouche R, Dellagi K, Fathallah DM. Use of Taguchi's methods as a basis to optimize hybridoma cell line growth and antibody production in a spinner flask. Cytotechnology, 2002 May;39(1):9-14;

Khan KH. Gene expression in mammalian cells and its applications. Adv Pharm Bull, 2013 Aug;3(2):257-63;

Keen MJ, Rapson NT. Development of serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line. Cytotechnology, 1995 Oct;17(3):153-63;

Kimura R, Miller WM. Effects of elevated pCO₂ and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells. Biotechnol Bioeng, 1996 Oct; 52(1):152-60;

Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Kowalski W, Badura A, Piekus N, Bucinski A. Isoflavone production in *Cyclopia subternata* vogel (honeybush) suspension cultures grown in shake flasks and stirred-tank bioreactor. Appl Microbiol Biot, 2013 Jul; (97):8467-77;

Konno Y, Kobayashi Y, Takahashi K, Takahashi E, Sakae S, Wakatani M et al. Fucose content of monoclonal antibodies can be controlled by culture medium osmolality for high antibody-dependent cellular cytotoxicity. Cytotechnology, 2012 May;64(3):249-65;

Kuchler RJ. Biochemical methods in cell culture and virology. Dowden, Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, USA. 2000;

Kunas KT, Papoutsakis ET. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotechnol Bioeng*, 2009 Aug; 102(4):977-9;

Kyriakopoulos S, Polizzi KM, Kontoravdi C. Comparative analysis of amino acid metabolism and transport in CHO variants with different levels of productivity. *J Biotechnol*, 2013 Sep, 168:543-51;

Lao M, Toth D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Prog*, 1997 Sep-Oct;13(5):688-91;

Li, H, d'Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic. *Curr Opin Biotechnol*, 2009Dec; 20(6):678-84;

Li J, Zheng G, He J, Chang S, Qin Z. Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor. *Biotechnol Adv*, 2009 Apr;(27):573-7;

Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep*, 2010 Jun;7(2):269-91;

Liu B, Spearman M, Doering J, Lattová E, Perreault H, Butler M. The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *J Biotechnol*, 2014 Nov; 170:17-27;

Lu C, Gonzalez C, Gleason J, Gangi J, Yang JD. A T-flask based screening platform for evaluating and identifying plant hydrolysates for a fed-batch cell culture process. *Cytotechnology*, 2007 Sep;55(1):15-29;

Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA. O-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmatic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*, 1997 Apr; 272(14): 9316-24;

Matasci, M.; Hacker, D. L.; Baldi, L.; Wurm, F. M. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discov. Today Technol.*,2009, 5(2-3), e37-e42.

Meleady P, Doolan P, Henry M, Barron N, Keenan J, O'sullivan F, Clarke C, Gammell P, Melville MW, Leonard M, Clynes M. Sustained productivity in recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. *BMC Biotechnol*, 2011 Jul;11(78):1-11;

Merchant SS, Allen MD, Kropat J, Moseley JL, Long JC, Tottey S, Terauchi AM. Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta*, 2006 Jul;1763 (7):578-94;

Meyer S, Lorenz C, Baser B, Wördehoff M, Jäger V, Van Den Heuvel J. Multi-host expression system for recombinant production of challenging proteins. *PLoS ONE*, 2013 Jul;8(7):e66874;

Ministério de Estado da Saúde (Brasil). Portaria nº. 1554, de 30 de julho de 2013. Dispõe sobre as regras de financiamento e execução do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). *Diário Oficial da União* 12 set 2013;Seção 1;

Moraes AM, Mendonça RZ, Suazo CAT. Meios de Cultura para Células Animais. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. (eds.), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*. Editora Roca, São Paulo; 2008. p. 105-19;

Moreno AD, Tomás-Pejó E, Ibarra D, Ballesteros M, Olsson L. Fed-batch SSCF using steam-exploded wheat straw at high dry matter consistencies and a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain: effect of laccase supplementation. *Biotechnol Biofuels*, 2013 Nov; 6(160):1-10;

Mulukutla BC, Khan S, Lange A, Hu WS. Glucose Metabolism in Mammalian Cell Culture: New Insights For Tweaking Vintage Pathways. *Trends in Biotech*, 2010; 28(9):476-84;

Murphy PV, André S, Gabius HJ. The third dimension of reading the sugar code by lectins: design of glycoclusters with cyclic scaffolds as tools with the aim to define correlations between spatial presentation and activity. *Molecules*, 2013 Apr;18(4):4026-53;

Muthing J, Kemminer SE, Conradt HS, Sagi D, Nimtz M, Karst U, Peter-Katalinic J. Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of

clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnol Bioeng*, 2003 Aug;83(3):321-34;

Olmer R, Lange A, Selzer S, Kasper C, Haverich A, Martin U, Zweigerdt R. Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors. *Tissue Eng*, 2012 Oct;18(10):772-84;

Omasa T, Onitsuka M, Kim WD. Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Curr. Pharm. Biotech*, 2010, 11(3):233-40;

Petiot E, Jacob D, Lanthier S, Lohr V, Ansorge S, Kamen AA. Metabolic and kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK 293 cell culture. *BMC Biotechnol*, 2011 Sep;11(84):1-12;

Pinto RCV. Separação de células CHO utilizando hidrociclones. Rio de Janeiro; 2007. Doutorado [Tese em Engenharia Química] – COPPE/UFRJ;

Rabert C, Weinacker D, Pessoa Jr A, Farías JG. Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Braz J Microb*, 2013 Oct;44(2): 351-6;

Rader RA. (Re)defining biopharmaceutical. *Nature Biotechnol*, 2008 Jul;26(7):743-51;

Rahimpour A, Vaziri B, Moazzami R, Nematollahi L, Barkhordari F, Kokabee L, Adeli A, Mahboudi F. Engineering the cellular protein secretory pathway for enhancement of recombinant tissue plasminogen activator expression in Chinese hamster ovary cells: effects of CERT and XBP1s genes. *J Microbiol Biot*, 2013 Aug;23(8):1116-22;

Ren Q, Henes B, Fairhead M, Thöny-Meyer L. High level production of tyrosinase in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*, 2013 Feb;13(18):1-10;

Restelli V, Wang MD, Huzel N, Ethier M, Perrault H, Butler M. The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2006 Jun;94(3):481-94;

Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Comparison of commercial serum-free media for CHO-K1 cell growth and monoclonal antibody production. *Intern J Pharmaceut*, 2012; 437:303-5;

Sanford KK, Earle WR, Evans VJ, et al. The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *J National Cancer Inst*, 1950; 11:773-95;

Sauaid SM, Krishnan J, Ling TH, Veluri MVPS. Enhancement of oxygen mass transfer and gas holdup using palm oil in stirred tank bioreactors with xanthan solutions as simulated viscous fermentation broths. *BioMed Research Intern*, 2013;2013:409675;

Senger RS, Karim MN. Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. *Biotechnol Prog*, 2003 Jul-Aug;19(4):1199-209;

Shah D, Naciri M, Clee P, Al-Rubeai M. NucleoCounter – an efficient technique for the determination of cell number and viability in animal cell culture processes. *Cytotechnology*, 2006 May;51(1):39-44;

Sinacore MS, Drapeau D, Adamson SR. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Mol Biotechnol*, 2000;15:249-57;

Singh V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology*, 1999 Jul;30(1-3):149-58;

Slivac I, Sreck VG, Radosevic K, Kmetec I, Kniewald Z. Aujeszki's disease virus production in disposable bioreactor. *J Biosc*, 2006 Sep;31(3):363-8;

Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1917/>

Stryjewska A, Kiepusa K, Librowski T, Lochynski S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacol Rep*, 2013;65(5):1075-85;

Takagi M, Moriyama T, Yoshida T. Effects of shifts up and down in osmotic pressure on production of tissue plasminogen activator by Chinese hamster ovary cells in suspension. *J Biosc Bioeng*, 2001 Feb;91(5):509-14;

Trummer E, Fauland K, Seidinger S, Schriebl K, Lattenmayer C, Kunert R, Vorauer-Uhl K, Weik R, Borth N, Katinger H et al. Process parameter shifting: Part II: biphasic

cultivation – a tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2006 Aug;94(6):1045-52;

Turesson O, Uhe C, Rozkov A, Lüllau E. Development of generic transient transfection process at 100L scale. *Cytotechnology*, 2008 Feb;56(2):123-36;

Van Der Valk J, Brunner D, De Smet K, Svenningsen ÅF, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G. Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol in Vitro*, 2010 Jun;24(4):1053-63;

Vanz AL, Nimtz M, Rinas U. Decrease of UPR- and ERAD-related proteins in *Pichia pastoris* during metanol-induced secretory insulin precursor production in controlled fed-batch cultures. *Microb Cell Fact*, 2014 Feb;13(23):1-19;

Varley J, Birch J. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology*, 1999 May;29(3):177-205;

Véliz EC. Proceso de Producción de Eritropoyetina Humana Recombinante [PowerPoint]. Produção CIM-Cuba, 2007;

Véliz EC, Rodríguez G, Cardero AF. Biorreactores para Células Animais. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. (eds.), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*. Editora Roca, São Paulo; 2008. p. 216-54;

Vergara M, Becerra S, Díaz-Barrera A, Berrios J, Altamirano C. Simultaneous environmental manipulations in semi-perfusion cultures of CHO cells producing rh-tPA. *Electr J Biot*, 2012 Nov;15(6):1-9;

Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnol*, 2014 Oct; 10(32):992-1000;

Wang C, Wu J, Xu Z-K. High-density glycosylation of polymer membrane surfaces by click chemistry for carbohydrate-protein recognition. *Macromol Rapid Commun*, 2010 Jun;31(12):1078-82;

Wang J-R, Li Y-Y, Xu S-D, Li P, Liu J-S, Liu D-N. High-level expression. of pro-form lipase from *Rhizopus oryzae* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Intern J Mol Science*, 2014 Dec;15(1):203-17;

Warnock JN, Al-Rubeai M. Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells. *Biotechnol Appl Biochem*, 2006 Jul;(45):1-12;

Wuest DM, Harcum SW, Lee KH. Genomics in mammalian cell culture bioprocess. *Biotechnol Adv*, 2012 Nov; 30: 629-38;

Xing Z, Li Z, Chow V, Lee SS. Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods. *Biotechnol Prog*, 2008 May-Jun;24(3):675-83;

Yeo D, Kiparissides A, Cha JM, Aguilar-Gallardo, C, Polak JM, Tsiridis E, Pistikopoulos EN, Mantalaris A. Improving embryonic stem cell expansion through the combination of perfusion and bioprocess model design. *PLoS ONE*, 2013 Dec;8(12): e81728;

Yoon SK, Hong JK, Choo SH, Song JY, Park HW, Lee GM. Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. *J Biot*, 2006a Apr; 122(4):463-72;

Yoon SK, Kim SH, Song JY, Lee GM. Biphasic culture strategy for enhancing volumetric erythropoietin productivity of Chinese hamster ovary cells. *Enzyme Microb Tech*, 2006b Nov;(39):362-5;

Zanghi JA, Schmelzer AE, Mendonza TP, Knop RH, Miller WM. Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO₂ or pH. *Biotechnol Bioeng*, 1999 Oct;65(2):182-91;

Zhang X, Garcia IF, Baldi L, Hacker DL, Wurm FM. Hyperosmolality enhances transient recombinant protein yield in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Letters*, 2010 Nov;32(11):1587-92;

Zhang H, Wang H, Liu M, Zhang T, Zhang J, Wang X, Xiang W. Rational development of a serum-free medium and fed-batch for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. *Cytotechnology*, 2013; 65:363-78;

Zhang H, Liu Q, Cao Y, Feng X, Zheng Y, Zou H, Liu H, Yang J, Xian M. Microbial production of sabinene – a new terpene-based precursor of advanced biofuel. *Microb Cell Fact*, 2014 Feb;13(20):1-10;

Zhou M, Crawford Y, Ng D, Tung J, Pynn AFJ, Meier A, Yuk IH, Vijayasankaran N, Leach K et al. Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese hamster ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *J Biot*, 2011 Apr;153(1-2):27-34

