



**COPPE/UFRJ**

DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDOS  
PARA A PRODUÇÃO DE FATOR VIII RECOMBINANTE

Daniel Tait Vareschini

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Rio de Janeiro

Março de 2009

Vareschini, Daniel Tait

Desenvolvimento de meios de cultivo quimicamente definidos para a produção de Fator VIII recombinante/  
Daniel Tait Vareschini. - Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009.

XI, 70 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Leda dos Reis Castilho

Dissertação (mestrado) - UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2009.

Referências Bibliográficas: p. 65-70.

1. Meios de cultivo quimicamente definidos.
  2. Células BHK. 3. Planejamento de experimentos.
- I. Castilho, Leda dos Reis II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química.  
III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça de cada dia.

Aos meus Pais, por sempre me incentivarem a estudar e buscar sempre o melhor.

A minha namorada Ariza, que mesmo estando longe me dá forças para continuar.

A todos meus amigos de laboratório, pelo companheirismo, pelo comprometimento e pelas conversas altamente produtivas.

A minha orientadora Leda, pelos ensinamentos passados.

Aos amigos do PEQ/COPPE/UFRJ, pelas ajudas nos momentos de dúvida.

Aos órgãos de fomento Capes e FAPERJ.

Obrigado

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M. Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDOS  
PARA A PRODUÇÃO DE FATOR VIII RECOMBINANTE

Daniel Tait Vareschini

Março/2009

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Programa: Engenharia Química

O cultivo de células animais é um processo complexo, principalmente em vista dos requerimentos de nutrientes necessários para a homeostasia celular. O estresse celular causado pelo cultivo *in vitro* de células de origem tecidual desencadeia um desbalanço nas funções metabólicas vitais, o qual provoca o consumo excessivo de nutrientes, a excreção de metabólitos tóxicos e uma geração ineficiente de produtos.

Os requerimentos de células animais por combinações complexas de nutrientes foram satisfeitos, por muitas décadas, principalmente através da utilização de soro fetal bovino. No entanto, este suplemento de origem animal gera problemas ao cultivo relacionados à variabilidade de lote para lote e segurança biológica, razões pelas quais vem sendo substituído por suplementos quimicamente definidos. Neste trabalho, foi utilizado um meio basal desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares da COPPE/UFRJ (PFM-LECC12). O mesmo foi suplementado com nutrientes que foram avaliados através de planejamentos experimentais, para o cultivo de células BHK (*baby hamster kidney*) produtoras de fator VIII, visando atingir maiores níveis de produção da proteína de interesse. As células foram adaptadas ao cultivo em suspensão e a avaliação da produção de fator VIII foi feita utilizando frascos agitados do tipo *spinner*. Dentre os melhores meios testados, três meios quimicamente definidos se destacaram em comparação a meios comercialmente disponíveis.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

DEVELOPMENT OF CHEMICALLY DEFINED CULTURE MEDIA FOR  
PRODUCTION OF RECOMBINANT FACTOR VIII

Daniel Tait Vareschini

March/2009

Advisor: Leda dos Reis Castilho

Department: Chemical Engineering

The culture of animal cells is a complex process. The cellular stress caused by *in vitro* culture of cells triggers an imbalance in vital metabolic functions. This imbalance leads to excessive consumption of nutrients, the excretion of toxic metabolites and an inefficient generation of products.

The need of cells for complex and specific combinations of nutrients has been met for decades mainly by the use of fetal bovine serum. The addition of this animal-derived supplement may cause problems related to batch-to-batch variability and biosafety issues, so that it is being replaced by chemically defined supplements.

In the present work a basal medium (PFM-LECC12) developed at the Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares of COPPE/UFRJ, was supplemented with different nutrients that were evaluated through statistical experimental design, aiming to achieve higher production levels of recombinant human factor VIII. Recombinant BHK (*baby hamster kidney*) cells were adapted to suspension cultivation and assessment the experiments to evaluate the production of factor VIII were performed in *spinner* flasks. Among the best media tested, three chemically defined media are highlighted in comparison to commercially available media.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 O FATOR DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA VIII .....	3
2.1.1 A molécula .....	3
2.1.2 Coagulação sanguínea .....	4
2.1.3 A hemofilia.....	6
2.1.4 A hemofilia do tipo A.....	7
2.2 PRODUÇÃO DE HEMODERIVADOS NO BRASIL .....	8
2.3 PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS EM CÉLULAS ANIMAIS.....	9
2.3.1 Cultivo em suspensão .....	10
2.3.2 Meios de cultivo.....	11
2.3.3 Suplementos nutricionais para o cultivo de células animais .....	16
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 OBJETIVO .....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 LINHAGEM CELULAR .....	22
4.2 MEIOS DE CULTIVO .....	22
4.2.1 Meio basal .....	22
4.2.2 Meio de cultivo com soro .....	22
4.2.3 Suplementos nutricionais.....	23
4.2.4 Meios comerciais avaliados .....	24
4.3 MEIO DE CONGELAMENTO .....	25
4.4 SOLUÇÕES PARA CONTAGEM CELULAR .....	25
4.4.1 Solução de cristal violeta .....	25
4.4.2 Solução de azul de trypan.....	25
4.5 CRIOPRESERVAÇÃO .....	26
4.6 DESCONGELAMENTO .....	26
4.7 TRIPSINIZAÇÃO.....	26
4.8 FORMAÇÃO DO BANCO MESTRE DE CÉLULAS .....	27

4.9	FORMAÇÃO DO BANCO DE TRABALHO DE CÉLULAS .....	27
4.10	CULTIVO ADERENTE .....	28
4.11	CULTIVO EM SUSPENSÃO .....	28
4.12	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	29
4.12.1	<i>Contagem de células totais.....</i>	29
4.12.2	<i>Contagem de células não viáveis.....</i>	29
4.12.3	<i>Determinação de células viáveis e viabilidade .....</i>	30
4.12.4	<i>Determinação da integral de células viáveis .....</i>	30
4.12.5	<i>Determinação do número de passagem celular .....</i>	30
4.12.6	<i>Determinação da concentração de glicose e lactato.....</i>	30
4.12.7	<i>Determinação da concentração de Fator VIII por Immunoblot .....</i>	31
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
5.1	ADAPTAÇÃO AO CULTIVO EM SUSPENSÃO E A CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE SORO 33	
5.1.1	<i>Adaptação a meio livre de soro.....</i>	33
5.2	PLANEJAMENTO FATORIAL COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES E EXTRATO DE LEVEDURA .....	37
5.3	ANÁLISE DE SUPLEMENTOS DEFINIDOS NÃO PROTEICOS .....	44
5.3.1	<i>Análise final do conjunto de experimentos Plackett-Burman .....</i>	49
5.3.2	<i>Demais experimentos com suplementos não proteicos .....</i>	50
5.4	COMPARAÇÃO COM MEIOS COMERCIAIS .....	52
5.4.1	<i>Análise de concentração de células viáveis .....</i>	54
5.4.2	<i>Análise de geração de lactato .....</i>	55
5.4.3	<i>Análise de consumo de glicose .....</i>	57
5.4.4	<i>Análise de concentração de fator VIII.....</i>	58
5.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	61
5.5.1	<i>Avaliação de custo.....</i>	61
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1a – Exemplo de injuria vascular que dá inicio ao processo de coagulação (adaptado de Hemofilia Brasil, 2007).....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 1b – Contração vascular para diminuição do fluxo sanguíneo do local do ferimento (adaptado de Hemofilia Brasil, 2007).....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 1c - Formação da rede de fibrina através da atuação dos complexos de fatores de coagulação (adaptado de Hemofilia Brasil, 2007).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2 – Representação esquemática dos complexos prócoagulantes (Adaptado de FRANCO, 2001). .....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 3 - Regressão não linear utilizando a equação de decaimento exponencial de primeira ordem.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 4 - Meio PFM-LECC12, suplementado com albumina (1g/L), EGF (25mg/L), IGF-I (50µg/L), transferrina (5mg/L), extrato de Levedura (1,5g/L) e Pluronic F-68 (0,1%). .....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 5 - Valores observados versus valores preditos pelo modelo linear para variável ICV em 72 horas.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 6 - Comparação de meios selecionados com meios comerciais .....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 7- Comparação de meios selecionados com meios comerciais. ....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 8 - Comparação de meios selecionados com meios comerciais. ....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 9 - Concentração de fator VIII para os tempos de 48, 72 e 96h.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 10 - Produtividade específica em termos de fator VIII para os tempos de 48, 72 e 96 horas .....</i>	<i>60</i>

## ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1- Composição do meio basal DMEM / Ham's F12 (1:1), adaptado de (CASTILHO et al., 2006).</i> .....	15
<i>Tabela 2 – Procedimento adotado para adaptação a níveis baixos de soro seguindo a estratégia mais lenta (frasco 1).</i> .....	34
<i>Tabela 3 - Procedimento adotado para adaptação a níveis baixos de soro seguindo a estratégia mais rápida (frasco 2).</i> .....	35
<i>Tabela 4 - Níveis de concentração dos suplementos utilizados para o planejamento experimental</i> .....	37
<i>Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental <math>2^{5-1}</math> para avaliar os suplementos proteicos.</i> .....	38
<i>Tabela 6 - Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 1) ..</i>	39
<i>Tabela 7 - Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 2) ..</i>	41
<i>Tabela 8 – Predição de valores através dos modelos das Equações 1 e 2.</i> .....	42
<i>Tabela 9 - Níveis e concentrações dos suplementos não proteicos testados no planejamento Plackett- Burrman</i> .....	44
<i>Tabela 10 - Matriz de planejamento do tipo Plackett-Burman para 16 ensaios com triplicata no ponto central, para avaliação dos suplementos não proteicos.</i> .....	45
<i>Tabela 11 - Resultados obtidos para o Planejamento Plackett -Burman para 11 suplementos não proteicos.</i> .....	46
<i>Tabela 12- Análise dos efeitos para a resposta concentração de fator VIII em 96 horas. Os fatores grifados são aqueles que apresentam significância estatística (<math>p_{valor}</math> inferior ou próximo a 0,1).</i> .....	47
<i>Tabela 13 - Análise dos efeitos para a resposta integral de células viáveis em 96 horas. Os fatores grifados são aqueles que apresentam significância estatística (<math>p_{valor}</math> inferior ou próximo a 0,1).</i> .....	48
<i>Tabela 14 - Análise dos efeitos para a resposta concentração de lactato em 96 horas. Os fatores grifados são aqueles que apresentam significância estatística (<math>p_{valor}</math> inferior ou próximo a 0,1).</i> .....	49
<i>Tabela 15 - ICV máximo obtido em experimentos adicionais.</i> .....	50

<i>Tabela 16 - Análise comparativa entre os melhores meios desenvolvidos ao presente trabalho e meios comerciais.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 17 - Taxa específica de geração de lactato (<math>q_{\text{lactato}}</math>).....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 18 - Taxa específica de consumo de glicose (<math>q_{\text{glicose}}</math>) .....</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 19 - Custo adicional por litro dos suplementos para os experimentos 44, 45 e 46.....</i>	<i>62</i>

# 1. INTRODUÇÃO

O fator VIII é uma das proteínas pertencentes ao sistema de coagulação sanguínea responsáveis pela formação de coágulos que impedem sangramentos excessivos (FRANCO, 2001)

Em pessoas portadoras de hemofilia do tipo A o fator VIII encontra-se deficiente ou ausente, acarretando problemas com diferentes níveis de gravidade, desde aqueles decorrentes de pequenas lesões cotidianas, como manchas roxas, até o sangramento dentro dos músculos e articulações. A hemofilia é um distúrbio genético recessivo ligado ao cromossomo X, atingindo em sua maioria homens (BHATTACHARYYA *et al.* 2003).

No Brasil existem cerca de 8,2 mil hemofílicos e os gastos do governo, que é o responsável por lei pelo custeio dos medicamentos, chega a R\$ 240 milhões por ano em importações de hemoderivados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

No País, o tratamento vem sendo feito através da administração do fator VIII importado, produzido através do fracionamento do plasma sanguíneo. Para que o sangue, que é coletado nos bancos de sangue nacionais, possa ser processado no próprio País, está prevista a construção de uma fábrica de hemoderivados no estado de Pernambuco (HEMOBRAS), que fracionará cerca de 500.000 litros de sangue/ano (CGEE, 2006).

Mesmo assim, o País será capaz de produzir apenas cerca de 35% do fator VIII necessário para o consumo interno. Para suprir esse déficit, tem-se como alternativa o processo de produção da proteína na forma recombinante.

No entanto, devido à complexidade estrutural desta proteína, se faz necessária a utilização de um sistema eficiente de expressão proteica, sendo as células eucarióticas os únicos organismos capazes de realizar corretamente os processos de modificação pós-traducionais que conferem a funcionalidade biológica à proteína (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

Dentre as células animais utilizadas na produção de proteínas recombinantes terapêuticas, as células CHO (*Chinese hamster ovary*) e BHK (*baby hamster kidney*) são o sistema de expressão predominantemente empregado. Estas linhagens apresentam várias características favoráveis à produção de biofármacos, sendo as mais importantes

o padrão de glicosilação similar ao humano, a baixa suscetibilidade a patógenos humanos, no caso de células CHO, e o amplo conhecimento fisiológico e de cultivo que se tem das mesmas (BUTLER, 2008).

Cultivos de células animais, *in vitro*, requerem complexas e específicas combinações de nutrientes, que por várias décadas foram supridas, principalmente, pela utilização de soro fetal bovino. Este suplemento de origem animal, por pressão de agências regulatórias, devido a problemas relacionados à variabilidade de lote para lote e o risco potencial de transmissão de patógenos, vem sendo substituído por suplementos quimicamente definidos (MORAES *et al.*, 2008).

Neste trabalho, primeiramente células recombinantes da linhagem BHK (ATCC CRL 8544) foram adaptadas ao cultivo em suspensão em frascos agitados tipo *spinner*. Para seu cultivo foi utilizado um meio basal desenvolvido no laboratório, livre de soro e proteínas (PFM-LECC12). Este meio basal, composto pela combinação dos meios DMEM e Ham's F12 (1:1) mais suplementos desenvolvidos por CASTILHO *et al.* (2006), foi suplementado com nutrientes selecionados a partir da análise da literatura, os quais foram avaliados através de planejamentos estatísticos de experimentos, visando atingir melhores taxas de crescimento celular e produção da proteína de interesse.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O fator de coagulação sanguínea VIII

#### 2.1.1 A molécula

O fator VIII é uma das proteínas pertencentes ao sistema de coagulação sanguínea que, em sua forma ativada, atua no complexo “tenase” intrínseco, o qual é responsável pela formação de coágulos mais eficientes que impedem sangramentos excessivos (FRANCO, 2001).

Os avanços na área de biologia molecular e bioquímica nas últimas décadas contribuíram para a elucidação da estrutura desta proteína. O produto de transcrição do gene, que é derivado de 26 éxons, é uma molécula de RNA mensageiro de aproximadamente 9000 bases de comprimento, que codifica uma proteína com 2351 aminoácidos (CHAN & HARRIS, 2001).

O fator VIII é constituído por uma estrutura com seqüências repetidas, onde se encontram três domínios A (A1, A2 e A3), dois domínios C (C1 e C2) e um grande domínio central B (HOYER, 1994). A molécula possui 25 sítios de glicosilação, dos quais 19 estão localizados no domínio B, sendo uma molécula altamente glicosilada. (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

No início dos anos 50, descobriu-se a possibilidade de produção de fator VIII a partir do plasma obtido do sangue humano, na forma de crioprecipitado. No entanto, como será comentado adiante, o principal problema deste tipo de produto é o possível risco de contaminação viral (BHATTACHARYYA *et al.* 2003).

A partir de 1984, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e a elucidação da estrutura do fator VIII, processos industriais começaram a ser desenvolvidos para produção do mesmo na forma recombinante, utilizando células de mamíferos geneticamente modificadas, evitando assim a dependência de plasma e minimizando riscos potenciais de transmissão do vírus (CHAN & HARRIS, 2001; BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

Existem dois tipos de fator VIII recombinante no mercado: os produtos ditos de primeira geração, que contêm albumina como estabilizante em sua formulação final, como exemplos, Kogenate/Helixate (Bayer) e Recombinate (Baxter), e os de segunda geração, que utilizam estabilizantes de origem não-animal, como

ReFacto (Genetics Institute) e KogenateFS (Bayer). Estes também são classificados como de cadeia completa, como encontrado naturalmente no sangue humano, e com o domínio B suprimido. As moléculas com domínio B ausente possuem maior estabilidade, uma vez que o domínio B é altamente suscetível à proteólise. A remoção deste domínio não causa efeitos adversos na atividade da proteína, e a omissão desta região reduz o tamanho da molécula, facilitando sua excreção pelas células (BHATTACHARYYA et al., 2003).

Sendo o fator VIII a maior proteína, atualmente em uso cuja clonagem já foi reportada na literatura, seu nível de produção é muito baixo, sendo excepcionalmente difícil de produzir quando comparado a outras proteínas (GARBER, 2000). Segundo revisão feita por BHATTACHARYYA *et al.* (2003), a limitação da expressão do fator VIII pode ser atribuída a três razões principais: a falta de um transporte adequado da molécula prematura entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi; altos níveis de fator de von Willebrand requeridos para estabilização do produto; e a baixa eficiência de chaperonas Bip (*immunoglobulin binding protein*) que medeiam o processo de excreção.

Devido a este baixo rendimento o desenvolvimento de um processo eficiente em larga escala para produção de fator VIII em células animais se torna difícil e demorado, devendo-se considerar também que a molécula apresenta uma baixíssima estabilidade mesmo no corpo humano (BOEDEKER, 1992).

Sendo assim, para que se possa produzir esta proteína, são necessários amplos estudos nas áreas de otimização de sistemas de expressão, desenvolvimento de meios de cultivo, técnicas de cultura, processos de purificação e formulação.

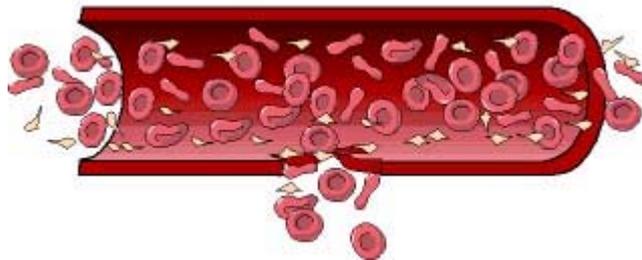
### **2.1.2 Coagulação sanguínea**

O processo de coagulação tem início em decorrência da exposição do sangue a componentes que, normalmente, não estão presentes no interior dos vasos, provocados por uma lesão vascular ou outro tipo de injúria, como exemplificado na Figura 1a. A iniciação do processo se faz pela exposição do fator tecidual (FT) ao espaço intravascular. Em paralelo, o vaso lesionado se contrai para reduzir o fluxo sanguíneo na área, como demonstrado na Figura 1b (FRANCO, 2001).

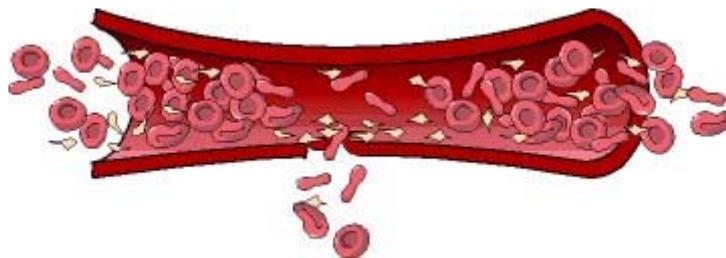
O fator tecidual uma vez exposto ao plasma liga-se ao fator VII ativo (FVIIa), formando um complexo, FT-FVIIa, que tem como substratos principais o fator IX (FIX)

e o fator X (FX), sendo estes últimos clivados à sua forma ativa FIXa e FXa, respectivamente, com subsequente formação de trombina e fibrina. O coagulo de fibrina formado mantém-se no local do ferimento, estancando o sangramento, como exemplificado na Figuras 1c (FRANCO, 2001).

Uma vez ocorrida a formação trombina, esta enzima pode ativar os fatores V (FV) e VIII (FVIII) em suas formas ativadas, FVa e FVIIIa. Estas reações são fundamentais para formação do complexo intrínseco FIXa/FVIIIa, o qual converte o fator X em Xa, e do complexo protrombinase FVa/FXa, que converte protrombina em trombina. Segundo FRANCO, 2001, o complexo intrínseco ativa o fator X com eficiência 50 vezes maior que o complexo FT/FVIIa.



**Figura 1a – Exemplo de injúria vascular que dá início ao processo de coagulação (adaptado de Hemofilia Brasil, 2007).**



**Figura 1b - Contração vascular para diminuição do fluxo sanguíneo do local do ferimento (adaptado de Hemofilia Brasil, 2007).**



**Figura 1c - Formação da rede de fibrina através da atuação dos complexos de fatores de coagulação (adaptado de Hemofilia Brasil, 2007).**

Como demonstrado na Figura 2, que dá uma visão das diferentes reações que ocorrem no processo de coagulação, ambas as reações exibem como produto final a trombina (fator IIa), que converte o fibrinogênio a fibrina, promovendo a ação plaquetária e ativando o fator XIII (FXIII), que estabiliza o coágulo de fibrina, estancando de forma eficiente o sangramento (FRANCO, 2001).

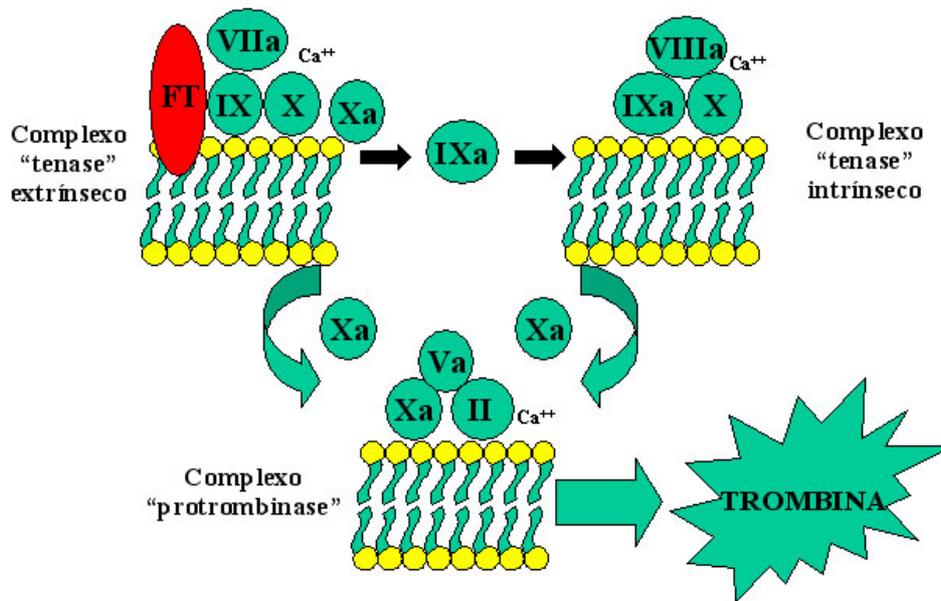


Figura 2 – Representação esquemática dos complexos prócoagulantes (Adaptado de FRANCO, 2001).

### 2.1.3 A hemofilia

A hemofilia é um distúrbio genético hereditário que se origina de uma deficiência no sistema de coagulação sanguínea (FBH, 2009).

A coagulação sanguínea previne a hemorragia prolongada, o aparecimento de equimoses (manchas roxas) e o sangramento em músculos e articulações. Para que a coagulação ocorra, o corpo humano depende de compostos presentes no sangue, chamados de fatores de coagulação, os quais atuam de forma coordenada entre si, como já comentado no item anterior (FRANCO, 2001; FBH, 2009).

Em portadores de hemofilia, o processo de formação da fibrina é ineficiente ou inexistente, e o sangramento, por sua vez, não é estancado devido à falta de um ou mais fatores sanguíneos (FBH, 2009).

Os dois tipos principais de hemofilia são conhecidos como do tipo A e do tipo B. A primeira é a forma mais comum, conhecida como clássica, sendo devida à deficiência

do fator de coagulação sanguínea VIII. Já a hemofilia do tipo B, também conhecida como Doença de Christmas, é devida a uma deficiência do fator de coagulação sanguínea IX (NUNES, 2009).

Segundo dados do Ministério da Saúde divulgados em 2008, em 1º de julho de 2007, o número de pacientes com coagulopatias hereditárias no Brasil era de 11.040, dos quais 6.881 (62,3%) correspondem à hemofilia A, 1.291 (11,7%) à hemofilia B, 2.333 (21,1%) à doença de von Willebrand, 316 (2,9%) a outras coagulopatias e 219 (2,0%) aos demais distúrbios da coagulação ainda sem diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

#### **2.1.4 A hemofilia do tipo A**

A hemofilia do tipo A é um distúrbio genético recessivo que se origina de uma deficiência do fator de coagulação VIII do sistema de coagulação sanguínea (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003). Pacientes portadores deste distúrbio necessitam da administração intravenosa de fator VIII para que a concentração da proteína no sangue seja mantida em níveis normais e assim controlar ou prevenir episódios de sangramento. Esta proteína pode ser obtida do plasma humano, por meio do fracionamento do sangue coletado de doadores (MANNUCCI, 2003).

No entanto, pacientes com coagulopatias hereditárias, como é o caso de portadores de hemofilia, podem potencialmente ser acometidos por infecções transmitidas por transfusão de hemocomponentes e hemoderivados, devido ao grande número de doadores necessários para produção do produto concentrado. As infecções com maior risco de ocorrer são as infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus das hepatites B e C e vírus linfotrópico humano (HTLV) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). No passado recente (décadas de 70 e 80), mais de 40% dos pacientes hemofílicos contraíram HIV a partir dos concentrados de fatores hemoderivados, com inúmeros casos de morte (GARBER, 2000).

Atualmente, com a utilização de técnicas avançadas de inativação viral e um rígido controle de qualidade do sistema de coleta, armazenamento e purificação, os produtos hemoderivados podem ser considerados seguros. No entanto, não se descarta a possibilidade do surgimento de novas doenças ainda desconhecidas como foi o caso do HIV (BERNTORP, 2004).

## **2.2 Produção de hemoderivados no Brasil**

A indústria de hemoderivados desenvolve atividade de alta complexidade, na área biotecnológica. O grande diferencial, que torna a produção de hemoderivados um caso único dentro do universo das indústrias farmacêuticas, é o fato de sua principal matéria-prima ser o plasma humano, que só pode ser obtida a partir de doadores (CGEE, 2006).

No Brasil, o acesso universal e igualitário às ações e serviços de saúde encontra-se inscrito na Constituição Federal Brasileira de 1988 e na Lei Orgânica de Saúde, Lei n.º 8.080/1990. A legislação prevê a atenção aos pacientes com coagulopatias hereditárias, doenças hemorrágicas decorrentes da deficiência quantitativa e/ou qualitativa de um ou mais fatores da coagulação. Segundo relatório divulgado pelo Ministério da Saúde, o Programa Nacional de Coagulopatias Hereditárias deteve um orçamento de 280 milhões de reais em 2007, sendo aproximadamente 85% deste recurso gasto com aquisição de hemoderivados importados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Para que o Brasil possa produzir hemoderivados a partir do sangue coletado nos hemocentros nacionais, está se iniciando a construção de uma fábrica Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (HEMOBRAS), no estado de Pernambuco, que possui uma previsão de fracionamento de cerca de 500.000 litros de sangue/ano (CGEE, 2006). A HEMOBRAS produzirá, além de fator VIII e fator IX, também albumina, imunoglobulinas e colas de fibrina para o uso médico. Esta empresa contribuirá grandemente com a economia do País, suprimindo a demanda nacional por estes produtos. No entanto, no caso do fator VIII, o País será capaz de produzir apenas 35% do volume de demanda para o consumo interno, devido ao baixo nível de fator VIII no plasma e a insuficiência de matéria-prima (CGEE, 2006)

Para suprir este déficit, a principal alternativa é a produção de fator VIII recombinante, como já vem sendo feito em países desenvolvidos (GARBER, 2000). A produção de proteínas recombinantes utilizando células animais é um processo, que além de poder suprir a demanda nacional, eliminaria a grande dependência por matéria prima da indústria de hemoderivados, no caso o sangue humano.

A viabilização deste processo, atualmente depende do desenvolvimento de uma tecnologia nacional. Esta tecnologia envolve a geração de uma linhagem produtora de fator VIII com altos níveis de expressão, o desenvolvimento de meios de cultivos de

baixo custo, que supram as complexas necessidades nutricionais destas células de mamíferos geneticamente modificadas (principal hospedeiro utilizado), associados a processos de cultivo em biorreatores de alto rendimento e processos eficientes de purificação.

### **2.3 Produção de biofármacos em células animais**

O uso de hospedeiros procariotos para a expressão de genes de natureza eucariótica apresenta uma série de limitações que decorrem da incapacidade destes hospedeiros de sintetizar corretamente proteínas heterólogas complexas de origem humana (ALTAMIRANO, 2000). Muitas proteínas sofrem uma série de processos conhecidos como modificações pós-traducionais, essenciais para a funcionalidade biológica das mesmas. A modificação pós-tradução mais relevante e discutida no caso de biofármacos em geral é a N-glicosilação, que requer uma extensa série de etapas de processamento, realizadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (BUTLER, 2008).

O processo de glicosilação é afetado por diversos fatores, incluindo a estrutura tridimensional da proteína, o repertório de enzimas da célula hospedeira, o tempo de permanência no complexo de Golgi e a disponibilidade de doadores intracelulares de monossacarídeos (BUTLER, 2008).

Proteínas expressas em células de mamíferos possuem qualidade e eficácia superiores, devido à capacidade destas células em proporcionar conformação espacial e modificações pós-traducionais corretas às moléculas (WURM, 2004).

Esse é o principal motivo do contínuo aumento verificado na utilização de células de origem animal para a produção de biofármacos, pois outros hospedeiros, como microrganismos e células vegetais, não são capazes de realizar a glicosilação ou outras modificações pós-tradução de acordo com os complexos padrões encontrados nas proteínas humanas (LUBINIECKI, 1998, BUTLER, 2004).

Em 1986, a proteína humana tPA (ativador de plasminogênio tecidual) foi a primeira proteína terapêutica produzida em células de mamíferos recombinantes a obter aprovação para comercialização. Em 2004, cerca de 60 a 70% das proteínas recombinantes de uso terapêutico já eram produzidas em células animais (WURM, 2004).

Dentre as células animais utilizadas para a produção de biofármacos, as linhagens de células de mamíferos, como a de rim de *hamster* neonato (BHK) e de ovário de *hamster* chinês (CHO) se tornaram as células hospedeiras preferidas da indústria biofarmacêutica, uma vez que os padrões de glicosilação característicos dessas células são similares aos padrões humanos (BUTLER, 2008).

A linhagem CHO se apresenta bem caracterizada, é relativamente estável, capaz de produzir proteínas heterólogas de forma eficiente e pode ser cultivada nas formas aderente e em suspensão. Adicionalmente, a linhagem CHO também apresenta baixa suscetibilidade a patógenos humano (DOYLE & GRIFFITHS, 1998).

A linhagem BHK-21, de fibroblastos naturalmente aderentes, porém passíveis de adaptação ao cultivo em suspensão, foi isolada do rim de *hamsters* sírios com um dia de idade (DOYLE & GRIFFITHS, 1998). Tais células podem ser rapidamente adaptadas a culturas livres de soro e processos em suspensão para uma grande gama de bioprocessos, tais como produção de vacinas virais veterinárias e proteínas recombinantes, além de estarem bem caracterizadas em relação ao seu padrão de glicosilação (STACEY, 2000; CRUZ *et al.*, 1999).

Esta linhagem é utilizada industrialmente pela empresa Bayer para a produção de fator VIII recombinante, sendo que este foi o primeiro biofármaco a ser obtido comercialmente utilizando um processo de cultivo contínuo com reciclo celular, também denominado perfusão (GARBER, 2000).

A linhagem BHK é uma linhagem contínua e pode crescer em meios de cultivo quimicamente definidos na ausência de soro ou suplementos proteicos (OZTURK, 2006). No entanto, para que o crescimento nestas condições seja efetivo se faz necessário um processo de adaptação bem sucedido destas células. SINACORE *et al.*, 1999, descrevem exemplos de adaptação a suspensão, em meios livre de soro, para cultivos em alta densidade celular.

### **2.3.1 Cultivo em suspensão**

O cultivo de células animais para a produção de biofármacos pode ser realizado basicamente nas formas aderente e em suspensão. Atualmente, a maioria dos produtos recombinantes provenientes de cultivos celulares é produzida em cultivo em suspensão (WURM, 2004).

Por exemplo, o fator VIII recombinante Kogenate (Bayer), é produzido em biorreatores em modo de perfusão, utilizando células BHK cultivadas em suspensão, chegando a uma produção anual de cerca de 150g (BOEDEKER, 1992; WURM, 2004).

Existem produtos em comercialização como a Eritropoetina (Epogen, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), o primeiro biofarmaco a alcançar o status de *blockbuster* (dado a um fármaco com vendas superando a marca de 1 bilhão de dólares/ano) que ainda utilizam o cultivo na forma aderente. No entanto, este tipo de cultivo, além de exigir grande manipulação apresenta a desvantagens em termos do rendimentos de células por volume em relação a células cultivadas em suspensão em biorreatores do tipo tanque agitado (WURM, 2004).

Linhagens contínuas de células como BHK, CHO, células de mielomas (SP2/0, NS0), e células de rim de embrião humano (HEK) são linhagens que podem ser adaptadas ao crescimento em suspensão facilitando o *scale up* dos processos (OZTURK, 2006).

A adaptação de células à suspensão em meios livres de soro e de proteínas é específica para cada clone, usualmente requerendo reformulações no procedimento e readaptações para clones diferentes (HU & AUNINS, 1997). Além disso, devido às características de clones individuais serem altamente específicas, condições de processo otimizadas raramente podem ser consideradas genéricas, podendo-se destacar diferenças nas taxas de consumo de glicose, de produção de lactato e sensibilidade a situações de estresse mecânico (WURM, 2004).

### **2.3.2 Meios de cultivo**

Para que se possam cultivar células *in vitro* é necessário propiciar às mesmas um meio de propagação que mimetize as condições encontradas *in vivo*. Os meios de cultivo devem propiciar, portanto, condições adequadas de pH e osmolalidade, bem como prover as células de substâncias que as mesmas não podem produzir (MORAES *et al.*, 2008). No caso do fator VIII, uma proteína altamente instável, o meio de cultivo deve assegurar também a estabilidade do produto (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

No organismo de origem, as células têm sua demanda por nutrientes suprida essencialmente por fluidos fisiológicos. Baseando-se nesta idéia, os primeiros pesquisadores da área, no início do século XX, tais como Ross Harrison e, mais adiante,

Alexis Carrel, utilizaram fluidos biológicos como plasma, linfa e soro, para manter em cultivo pedaços de tecidos de origem animal (TSAO *et al.*, 2000; BUTLER, 2004).

Com a evolução desta ciência, por volta de 1950, para que se pudesse garantir a reprodutibilidade dos experimentos, se tornou necessário o desenvolvimento de meios de cultivo com composição definida. EAGLE (1955) foi o primeiro pesquisador a estudar profundamente as necessidades nutricionais de células de mamíferos. Em seu artigo publicado pela revista *Science*, Eagle identificou o papel de metabólitos específicos para o crescimento de linhagens de fibroblasto murino e carcinoma uterino humano (HeLa), definindo assim um meio mínimo essencial para o crescimento celular destas linhagens, conhecido como meio mínimo essencial de Eagle (MEM).

Baseando-se no meio de Eagle, vários pesquisadores propuseram modificações e inclusões de novos nutrientes para o cultivo de outras linhagens celulares. Estes meios foram desenvolvidos não somente visando a reprodutibilidade de experimentos, mas também o aumento da produtividade e a redução dos custos de fabricação (OZTURK, 2006), já que a partir dos anos 1980, células animais passaram a ser utilizadas industrialmente na produção de biofármacos.

Meios comerciais com formulações específicas, de formulação patenteada ou sigilosa, se encontram disponíveis. Mesmo assim, grandes empresas produtoras de biofármacos, líderes de mercado, investem grande parte dos seus esforços no desenvolvimento de formulações próprias (WURM, 2004). Isto ocorre, porque o desenvolvimento de meios de cultivo próprios contribui grandemente para a economia de processo, propiciando um crescimento em altas densidades, porém com custo mais reduzido dos nutrientes (OZTURK, 2006).

Os meios básicos para cultivo celulares, também denominados meios basais, são constituídos por substâncias de baixa massa molar, quimicamente definidas, mas que isoladamente não conseguem proporcionar um bom crescimento celular. Portanto, torna-se necessária uma suplementação com aditivos complexos e, muitas vezes, quimicamente indefinidos, como o soro fetal bovino (MORAES *et al.*, 2008).

#### *A utilização do soro*

O soro é um suplemento que estimula o transporte de glicose, fosfato e aminoácidos e aumenta a permeabilidade das membranas. Tratando-se, fundamentalmente, de um complexo de proteínas úteis para a nutrição, para a adesão

celular, para a proteção biológica (antioxidantes e antitoxinas), além de proporcionar proteção mecânica para células (MORAES *et al.*, 2008).

Os soros mais empregados são os de origem bovina e eqüina, sendo que o soro fetal bovino é um dos suplementos mais efetivos para a multiplicação celular de várias linhagens, devido ao seu elevado conteúdo de fatores de crescimento e às baixas concentrações de imunoglobulinas (MORAES *et al.*, 2008).

No entanto, o soro pode ser uma fonte de contaminações por parasitas, bactérias, fungos, micoplasmas, vírus e príons (WURM, 2004, MORAES *et al.*, 2008, CASTILHO *et al.*, 2006).

Adicionalmente, sua composição e, em conseqüência, sua eficácia como suplemento nutricional apresentam variabilidade de lote para lote, dificultando a padronização do meio de cultura e a própria reprodutibilidade do cultivo. Além disso, trata-se geralmente do componente do meio de cultura de maior custo e, devido à sua alta concentração protéica, dificulta o processo de purificação da proteína de interesse (MORAES *et al.*, 2008).

Além dos aspectos éticos questionáveis, devido ao sacrifício de animais para sua obtenção, existe uma grande pressão, por parte das agências reguladoras, da eliminação de componentes de origem animal, como o soro, da composição de meios de cultura celular para a produção de produtos para a saúde humana, devido ao potencial risco de transmissão de patógenos (MORAES *et al.*, 2008).

É, portanto, compreensível que muitos esforços tenham sido realizados no sentido de reduzir ou eliminar a utilização de soro, substituindo completamente esse componente por outros de natureza quimicamente definida e/ou que não sejam de origem animal.

As formulações de meios de cultivo isentas de soro possuem características variadas, como meios livres de soro com complementações de proteínas ou hidrolisados de origem animal, vegetal ou microbiana, meios livres de proteínas, meios quimicamente definidos ou meios isentos de componentes de origem animal (MORAES *et al.*, 2008). Estas características podem ser combinadas em um dado meio, uma vez que, por exemplo, um meio quimicamente definido pode ou não ser isento de componentes de origem animal.

Entre os anos de 1975 e 1980, Sato realizou substituições de soro por hormônios específicos, fatores de crescimento, fetuína, soro albumina, transferrina e mercaptoetanol, para minimizar complicações decorrentes da utilização do soro em

culturas celulares. Estas substituições ajudaram a satisfazer muitas das funções fundamentais do soro. Entre 1981 e 1987, Barnes elucidou a presença de muitos outros componentes que são importantes para o crescimento celular: proteínas de ligação, proteínas de adesão, enzimas e inibidores, lipídios carreadores de proteínas entre outros, isto tornou possível o crescimento de linhagens em meios livres de soro (SATO & REID, 1978, apud TSAO *et al.*, 2000, BARNES, 1987, apud TSAO *et al.*, 2000).

No entanto, o progresso no desenvolvimento de meios livres de soro foi relativamente lento pela necessidade em se determinar os diferentes nutrientes e requerimentos de proteção e crescimento de cada linhagem celular e pela dificuldade em se identificar e purificar nutrientes ativos encontrados no soro (TSAO *et al.*, 2000).

Logo no início do desenvolvimento de meios definidos livres de soro, a abordagem de meios livres de proteínas foi levada em consideração. HAM (1964) propôs meios definidos livres de proteínas, que possuíam uma complexa composição, incluindo elementos traço essenciais para o crescimento.

Funções individuais do soro podem ser substituídas por suplementos de origem não proteica. Pode-se citar, por exemplo, o carreamento de ferro por citrato férrico substituindo a transferrina, lipoproteínas substituídas por emulsões de lipídios, a detoxificação de radicais livres pela utilização de cistina, cisteína, glutatona e enzimas contendo selênio e ferro, elementos traço e vitamina E, proteção contra tensão de cisalhamento celular utilizando polióis, promoção do crescimento celular utilizando poliaminas, entre outros (TSAO *et al.*, 2000).

Atualmente, umas das formulações propostas por HAM, o meio Ham's F12, é comumente utilizado em uma mistura 1:1 com o meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*), como base para o desenvolvimento de meios livres de soro. Esta formulação é apresentada na Tabela 1.

O meio DMEM é uma modificação feita por Dulbecco que introduz no meio MEM de Eagle uma concentração quatro vezes maior, de aminoácidos, vitaminas e aminoácidos não essenciais (DULBELCO & FREEMAN, 1959 apud BURGNER & BUTLER, 2006).

Uma tendência que tem sem mostrado majoritária para os novos processos de cultivo é a eliminação de componentes de composição indefinida, fazendo com novas pesquisas se voltem para o desenvolvimento de meios de cultivo quimicamente definidos.

**Tabela 1- Composição do meio basal DMEM / Ham's F12 (1:1), adaptado de (CASTILHO *et al.*, 2006).**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>		
<b>Sais Inorgânicos</b>	<b>mg/L</b>	<b>Vitaminas</b>	<b>mg/L</b>
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	154,55	biotina	0,0365
CuSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,0025	panetionato de cálcio	2,24
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,834	cloreto de colina	15,96
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O	0,1	ácido fólico	15,96
KCl	342,5	inositol	21,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	83	nicotinamida	2
MgCl 6H <sub>2</sub> O	123	niacinamida	0,0185
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	200	piridoxal HCl	2
NaCl	6999,5	piridoxina HCl	0,31
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	124,5	riboflavina	0,39
NaHCO <sub>3</sub>	2438	tiamina HCl	0,37
		vitamina B12	0,68
<b>Aminoácidos</b>	<b>mg/L</b>	<b>outros componentes</b>	<b>mg/L</b>
alanina	4,5	glicose	1400
arginina HCl	147,5	piruvato de sódio	110
asparagina H <sub>2</sub> O	15,01	vermelho de fenol	8,15
ácido aspártico	13	hipoxantina	2
cisteína	48,7	ácido tióico	0,1
glutamina	365	ácido lipóico	0,042
ácido glutâmico	7,35	putrescina HCl	0,161
glicina	18,79	timidina	0,73
histidina HCl	32,5	ácido linoleico	0,042
isoleucina	54,47		
leucina	59		
lisina	91,25		
metionina	17,24		
fenialanina	34,5		
prolina	34,5		
serina	26,25		
treonina	53,45		
triptofano	9,02		
tirosina	55,89		
valina	52,85		

Um meio de cultivo pode ser considerado como quimicamente definido quando contém apenas compostos altamente purificados e de composição definida. Estes meios facilitam o controle de qualidade dos processos, diminuindo a variabilidade da produção e aumentando a reprodutibilidade do processo (MORAES *et al.*, 2008), pois todos os componentes podem ser facilmente rastreados e consistentemente produzidos (OZTURK, 2006), além de facilitarem o processo de purificação final do produto.

A seleção e concentração de nutrientes nos meios de cultivo podem ser avaliadas através de extensivos processos de otimização. Muitas variáveis estão envolvidas no metabolismo celular e os componentes do meio podem interagir uns com os outros (OZTURK, 2006; MORAES *et al.*, 2008).

A proporção de cada nutriente consumido por diferentes rotas do metabolismo celular depende do estado metabólico das células (CRUZ *et al.*, 1999). Por isso, para que se possam conceber meios de cultivo quimicamente definidos, é necessário o conhecimento do metabolismo específico da linhagem celular de interesse (WURM, 2004). Para que o meio de cultivo contenha nutrientes essenciais para a síntese de novas células, são necessários substratos para a realização do metabolismo celular, além de compostos que desempenhem funções fisiológicas, catalíticas ou que atuem como cofatores. Tais compostos podem ser sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídios, ácidos orgânicos, proteínas, hormônios, fontes de carbono, fontes de nitrogênio e micronutrientes (íons orgânicos e minerais) (MORAES *et al.*, 2008).

Devido à grande quantidade de nutrientes disponíveis para a suplementação de meios de cultivo, a interação que pode ocorrer entre estes elementos ou entre grupos de elementos e à especificidade em termos de requerimentos nutricionais de cada linhagem celular, a determinação de formulações ótimas de meios de cultivo se torna um processo laborioso.

Neste contexto, o planejamento estatístico de experimentos mostra-se como um caminho racional e eficiente para a determinação direta e rápida do efeito e da interação entre as variáveis analisadas (MORAES *et al.*, 2008). Planejamentos do tipo Plackett-Burman podem ser utilizados como métodos rápidos de seleção de fatores, sendo um passo intermediário, que indica quais suplementos podem ser utilizados em estudos mais completos subsequentes que avaliem as interações específicas entre os componentes e as concentrações ótimas de cada componente (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

### **2.3.3 Suplementos nutricionais para o cultivo de células animais**

Produtos químicos biossintéticos ou compostos purificados de origem microbiana podem substituir elementos de origem animal, necessários para o crescimento celular. O aumento da concentração ou a substituição de componentes é o objeto de estudo de muitos pesquisadores no desenvolvimento de meios de cultivo definidos, sejam estes livres de soro, livres de proteínas ou livres de componentes de

origem animal (HAM, 1964, LEE *et al.*, 1999, NILSSON *et al.*, 1999, SHIBUYA *et al.*, 2002, SCHRÖDER *et al.*, 2004, LIU & CHANG, 2006, CASTILHO *et al.*, 2006, KIM *et al.*, 2006, PARAMPALI *et al.*, 2007).

As principais fontes de carbono e energia utilizadas no cultivo de células animais são glicose e a glutamina. Devido à desregulação do metabolismo de células cultivadas *in vitro*, estes compostos, altamente requeridos para fins biossintético e energético, são intensamente consumidos e em paralelo a este consumo, ocorre a geração de lactato e amônio em quantidades que são tóxicas para as células e levam à indução da morte celular (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

ALTAMIRANO *et al.* (2000) relataram o uso de glutamato como substituinte da glutamina em meios de cultivo de células CHO produtoras de tPA. Segundo os autores o uso da combinação glicose e glutamato promove um aumento significativo no crescimento celular em relação ao meio contendo glicose e glutamina, com uma baixíssima produção de amônia e reduzidos níveis de lactato.

Outra tentativa de regular o fluxo metabólico entre a glicólise e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), é a utilização de componentes intermediários do TCA que poderiam induzir o melhor acoplamento entre estes dois processos, proporcionando uma utilização mais eficiente das fontes de energia para o crescimento celular e reduzindo a formação de intermediários tóxicos. GENZEL *et al.* (2005), verificaram uma redução no acúmulo de amônia, no cultivo de células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), pela substituição de glutamina por piruvato.

Como consequência da rápida glutaminólise que ocorre normalmente em linhagens contínuas, intermediários, como o  $\alpha$ -cetogluturato, entram no TCA em grandes quantidades. Assim, o fluxo de carbono de  $\alpha$ -cetogluturato a oxalacetato é maior do que o fluxo de ingresso de acetilCoA ao TCA, devido à incorporação do  $\alpha$ -cetogluturato vindo da glutamina e também de outros aminoácidos (ALTAMIRANO *et al.*, 2008). Por isso, a adição de ácido oxalacético no meio de cultivo poderia induzir uma maior incorporação de acetil CoA ao TCA, reduzindo o excesso de  $\alpha$ -cetogluturato formado.

O oxalacetato também está presente nos sistemas de transportadores (malato-aspartato e malato-citrato) sendo que a velocidade de intercâmbio destes sistemas poderia limitar a velocidade de regeneração de NAD no citosol. Normalmente, a regeneração de NAD ocorre dentro da mitocôndria. No entanto, a membrana

mitocondrial é impermeável a NADH, de forma que as células necessitam empregar estes sistemas transportadores (*shuttle systems*) para incorporar indiretamente equivalentes de NADH na mitocôndria e, posteriormente, oxidar estes compostos através da cadeia respiratória (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Na literatura, encontram-se citados vários compostos que podem ser utilizados, na definição de meios livres de soro, tais como hidrocortisona, insulina, transferrina, etanolamina e selenito de sódio, assim como fatores de crescimento extraídos de glândulas endócrinas como EGF (fator de crescimento epidérmico) e FGF (fator de crescimento de fibroblastos) (BURGENER & BUTLER, 2006).

A presença de selenito de sódio nos meio de cultivo auxilia na detoxificação de radicais livres, pois o elemento químico selênio é um componente essencial do grupo prostético da enzima glutatona peroxidase. Esta catalisa a reação de oxidação da glutatona, responsável pela redução de peróxidos tóxicos produzidos pelo metabolismo celular sob condições aeróbicas (CASTILHO *et al.*, 2006).

A transferrina é uma importante proteína carreadora de ferro. Sua função é solubilizar o ferro, prevenindo a toxicidade provocada pelo ferro livre e facilitando o transporte do mesmo para dentro das células (BURGENER & BUTLER, 2006). A transferrina humana pode ser produzida na forma recombinante em *Saccharomyces cerevisiae*, especificamente desenvolvida para fornecer uma alternativa à tranferrina de origem humana ou animal (NOVOZYMES, 2009).

Exemplos específicos de hormônios ou fatores de crescimento celular que induzem ou promovem o crescimento incluem insulina recombinante, insulina recombinante contendo seqüências modificadas de aminoácidos e exibindo atividade biológica comparável com a insulina natural assim como fator de crescimento similar à insulina recombinante (SHIBUYA *et al.*, 2002)

Insulina animal é adicionada aos meios de cultivo livres de soro devido à sua habilidade em promover a obtenção de energia e metabolismo anabólico, através da captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio, transporte de aminoácidos. No entanto, muitas ações mitogênicas atribuídas previamente a insulina são devidas a contaminações de soluções com IGF-I (fator de crescimento similar a insulina) nas preparações iniciais. Os fatores de crescimento análogos a insulina (IGF-I e IGF-II) são peptídeos homólogos à insulina e podem ser utilizados como substituintes da mesma, já que muitas das ações metabólicas do IGF sobrepõem-se às da insulina. O IGF-I é

secretado em baixas quantidades por muitos tecidos animais. (BURGENER & BUTLER, 2006).

Fatores de crescimento epidérmico (EGF) são utilizados em meios de cultivo devido à potência mitogênica para uma grande variedade de linhagens celulares. A atividade do EGF também inclui a ativação de vias de sinalização intra-celular que levam a mitogênese (BURGENER & BUTLER, 2006). Além disso, a disponibilidade de precursores de nucleotídeos nos meios de cultivo, como a hipoxantina e timidina, é importante para a multiplicação celular (NELSON & COX, 2000).

O hormônio de crescimento hidrocortisona é um dos hormônios presentes no soro que possui efeitos mitogênicos (LEE *et al.*, 1999). O mesmo tem seu efeito positivo relatado por LEE *et al.* (1999) juntamente com glutamato, serina, metionina, fosfatidilcolina e Pluronic F-68, em formulações de meios livres de soro para produção de eritropoetina em células CHO.

Agentes surfactantes não-iônicos, como o Pluronic F-68, são geralmente aplicados na proteção das células contra efeitos negativos provocados pela agitação e aeração (REITER *et al.*, 2005). A co-purificação de lipídios com Pluronic F-68 durante a purificação do produto fornece evidências de que o polímero Pluronic pode substituir a albumina não somente como surfactante, mas também atuando como carreador de lipídios. Pluronic F-68 pode também prevenir que danos causados a membrana celular possam causar morte celular antes que a reparação da membrana possa ocorrer. O efeito da adição de Pluronic é imediato, independente do mecanismo de atuação, seja agindo no aumento da produtividade ou da manutenção da viabilidade celular (CHAN & HARRIS, 2001).

O ácido ascórbico é um antioxidante hidrofílico, como um agente redutor e antioxidante, ele reage diretamente com radicais de oxigênio, hidroxilas e vários hidroperóxidos de lipídios (CASTILHO *et al.*, 2006).

Ácidos graxos são freqüentemente adicionados aos meios de cultivo livres de soro, para substituir os lipídios presentes no soro. Ácidos graxos saturados ou insaturados, como ácido oleico, podem ser sintetizado normalmente por células animais que possuem enzimas de alongamento e desaturação (ROSENTAL, 1987). No entanto, os ácidos graxos poliinsaturados, como ácido linoleico e ácido linolênico, são nutrientes essenciais para o crescimento celular, devido à sua importância na síntese da membrana celular e na garantia da fluidicidade da mesma (BUTLER *et al.*, 1999). Foi verificado por BUTLER *et al.* (1997), um aumento substancial (60%) na produção de anticorpos

monoclonais produzidos em hibridomas CC9C10, devido à adição de concentrações micro molares de ácido oleico e linoleico, bem como um aumento no crescimento celular destas células de quase 300%, acompanhado de uma redução no consumo de glutamina.

Vários elementos inorgânicos que são encontrados no soro em quantidades traço também podem ser incluídos na formulação de meios de cultivo. Isto inclui Mn, Cu, Zn, Mo, Va, Se, Fe, Ca, Mg, Si, Ni. Muitos destes elementos desempenham um papel importante na atividade de enzimas e são essenciais para sobrevivência das células (BURGENER & BUTLER, 2006).

Conforme reportado por CHAN & HARRIS (2001), a expressão de Fator VIII em célula BHK recombinantes em cultivo em meio isento de proteínas foi significativamente aumentada quando as células são cultivadas na presença de poliois e sulfato de cobre. Em alguns cultivos, foi observado um aumento de 350% na atividade da proteína em relação ao meio basal (CHAN & HARRIS, 2001).

O sulfato de zinco auxilia na detoxificação de oxigênio livre, suprindo o ambiente com átomos de zinco, requeridos pela enzima superóxido dismutase (CASTILHO *et al.*, 2006).

Hidrolisados proteicos e extrato de levedura também podem ser utilizados como alternativa para substituição total ou parcial de soro. Estes hidrolisados podem ser complexos de oligopeptídeos, peptídeos e aminoácidos, obtidos pela hidrólise química ou enzimática de caseína, albumina, leveduras, tecidos animais ou de vegetais, que desempenham um papel essencial de prover fatores de crescimento, fatores antiapoptóticos ou estimuladores da produção de proteínas. O extrato de levedura é utilizado principalmente como fonte de vitaminas, estimulando o crescimento celular (MORAES *et al.*, 2008). SHIBUYA *et al.* (2002) propõem a utilização de extrato de levedura juntamente com hidrolisados de soja e trigo na composição de meios de cultivo livres de soro para o cultivo de células CHO, como substituintes parciais da insulina humana.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo**

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de meios de cultivo quimicamente definidos para o cultivo de células BHK (ATCC CRL-8544) produtoras da proteína recombinante, do sistema de coagulação humano, fator VIII.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Adaptação de clones da linhagem BHK (ATCC CRL-8544) ao cultivo em suspensão, em frascos agitados tipo *spinner*, em meio de cultivo isento de soro fetal bovino;
- Análise da suplementação do meio de cultivo basal PFM-LECC12 com suplementos de origem proteica recombinantes e extrato de levedura;
- Análise da suplementação do meio de cultivo basal PFM-LECC12 com suplementos de origem não-proteica;
- Comparação dos melhores meios obtidos nos planejamentos anteriores com meios de cultivo comercialmente disponíveis.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Linhagem celular

A linhagem BHK (ATCC CRL-8544) produtora de fator VIII, derivada da linhagem BHK-21(C-13), foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*), localizada nos Estados Unidos.

### 4.2 Meios de Cultivo

#### 4.2.1 Meio basal

O meio basal consistiu de uma mistura dos meios de cultivo comerciais DMEM (Cultilab) e Ham's F12 (Cultilab) na proporção de 1:1, acrescidos dos suplementos glutamina (Sigma), etanolamina (Sigma-Aldrich) e ácido cítrico (Sigma), na proporção definida em patente depositada no INPI (CASTILHO *et al.*, 2006), juntamente com Pluronic F-68 (Sigma), reportado como componente que atua para proteção das células a estresse mecânico (CASTILHO, 2001).

À mistura, preparada utilizando-se água ultrapura (Milli-Q), com osmolaridade de 310 +/- 5 mOsm/kg, foram acrescentados glicose (Sigma) e bicarbonato de sódio (Sigma) na concentração final de 4,5 e 2,45 g/L respectivamente. O pH foi corrigido para 7,2, utilizando-se HCl 3M.

Após o preparo, o meio foi esterilizado por filtração, com pressão positiva, utilizando-se membrana com tamanho de poro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar dentro de área limpa de classificação ISO8, sendo deixado em teste de esterilidade por 24 horas, em estufa a 37°C, e em seguida armazenado em geladeira a 4°C, por um prazo máximo de um mês.

#### 4.2.2 Meio de cultivo com soro

O meio de cultivo com soro consistiu da mistura de meio basal acrescido de soro fetal bovino (Cultilab ou Gibco), nas proporções de 1 a 10%, de acordo com a fase de adaptação em que as células se encontravam. O soro, após descongelamento lento em geladeira, foi alicotado, em condições estéreis, em alicotas de 10 mL, as quais foram

armazenadas a temperatura de -20°C. Antes do uso, a alicota de soro a ser utilizada, foi aquecida a temperatura de 37°C.

### 4.2.3 Suplementos nutricionais

#### *Suplementos proteicos e extrato de levedura*

Os suplementos proteicos utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Albucult™, albumina recombinante expressa em *Saccharomyces cerevisiae*, livre de materiais derivados de origem animal, lote: PDP 060107, gentilmente doado por Novozymes (Inglaterra).
- ✓ rEGF (*Epidermal Growth Factor*), fator de crescimento epidérmico recombinante, gentilmente cedido por CIGB (Cuba), lote: 03IFAB707
- ✓ LONG® R<sup>3</sup> IGF-I (*Insulin-like growth factor*), fator de crescimento homólogo a insulina, gentilmente doado por Novozymes (Inglaterra), lote: No BAG-A03
- ✓ Delta Ferrin™, transferrina recombinante produzida em *Saccharomyces cerevisiae* livre de materiais derivados de origem animal, lote: PDP070035, gentilmente doado por Novozymes (Inglaterra).
- ✓ HY Yeast 444, extrato de levedura purificado para cultivo celular, gentilmente cedido por Kerry Bio-Science (Campinas), lote N<sup>o</sup>: 15578.

#### *Suplementos não proteicos*

Os suplementos não proteicos utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Ácido Ascórbico, *L-Ascorbic Acid* - C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (Sigma A4544), Lote: 121K0133;
- ✓ Ácido Linoleico, *Linoleic Acid- Water soluble* - C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> (Sigma L5900), Lote 062K1142;
- ✓ Ácido Oxalacético, *Oxalacetic Acid 98%* - C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (Sigma O7753), Lote: 075K06641;

- ✓ Glutamato, *L-Glutamic Acid sodium salt hydrat* 99-100% -  $C_5H_8NNaO_4$  (Sigma, G5889), Batelada 104K0179;
- ✓ Selenito de Sódio, *Sodium Selenite* 98% -  $Na_2SeO_3$  (Sigma, S5261), Lote: 072K16951;
- ✓ Sulfato de Zinco, *Zinc Sulfate Heptahidrat-*  $ZnSO_4$  (Sigma, Z0251), Lote: 092K0174;
- ✓ Timidina, *Thymidine* 99-100% -  $C_{10}H_{14}N_2O_5$  (Sigma, T1895), Lote 065K0995;
- ✓ Ácido Oleico, *Oleic acid water soluble* -  $C_{18}H_{34}O_2$  (Sigma, O1257), Lote: 083K1153;
- ✓ Sulfato de Cobre, *Copper (II) sulfate pentahydrate* -  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (Sigma, C8027), Lote: 046K0115;
- ✓ Hipoxantina, *Hypoxantine* -  $C_5H_4N_4O$  (Sigma, H9636), Lote 071K12875;
- ✓ Hidrocortisona, *Hydrocortisone water soluble* (Sigma, H0396), Lote: 043K1380.

#### **4.2.4 Meios comerciais avaliados**

- ✓ GMEM-S, Catálogo nº 66996C-SOL, Lote 8G 0352 (SAFC);
- ✓ VP-SFM, GIBCO 011681, Lote: 303493 (Invitrogen);
- ✓ CNJ-SFM 2.1b, Fórmula nº 00-5110EF, Lote 1204049 (BIOGRO).

### **4.3 Meio de congelamento**

Para a criopreservação, foram utilizados dois meios de congelamento, para culturas cultivadas com soro e para culturas livres de soro.

O meio de congelamento para culturas livre de soro foi preparado a partir de uma mistura de 40% (v/v) de meio de cultivo fresco, 40% (v/v) de meio de cultivo condicionado (do próprio cultivo), 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma, D4540) e 10% (v/v) de uma solução de metilcelulose (Sigma, M7027) 1% (m/v), preparada em água ultrapura (Milli-Q). O DMSO e a solução de metilcelulose foram adicionados ao volume final de meio de cultivo novo e em seguida, filtrados utilizando-se filtros de seringa (Millipore) com tamanho de poro de 0,22 µm. O meio condicionado era centrifugado e adicionado somente no momento do congelamento.

Para culturas cultivadas com soro, o meio de congelamento foi preparado misturando-se 12,5% (v/v) de meio de cultivo novo, 80% (v/v) de soro fetal bovino e 7,5% de DMSO. A mistura foi filtrada utilizando-se filtro de seringa de 0,22 µm antes do uso.

### **4.4 Soluções para contagem celular**

#### **4.4.1 Solução de cristal violeta**

A solução, preparada com água ultrapura (Milli-Q), é constituída da mistura de cristal violeta (Sigma) 0,05% (m/v), ácido cítrico (Sigma) 2,1% (m/v) e Triton X-100 (Vetec) 0,1% (v/v). Após a dissolução dos componentes, sob agitação magnética, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm para a remoção de possíveis precipitados (PINTO, 2007).

#### **4.4.2 Solução de azul de trypan**

A solução, preparada em água destilada, é constituída da mistura de azul de trypan (Sigma) 0,5% (m/v) em solução salina 0,9% (m/v) tamponada com tampão fosfato 0,1M (PBS), pH 7,1 – 7,3. Após a dissolução dos componentes, sob agitação magnética, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm para a remoção de possíveis precipitados (PINTO, 2007).

## 4.5 Criopreservação

As células foram centrifugadas a 200 g por 3 minutos e ressuspensas de forma suave em meio de congelamento, previamente refrigerado a 4°C, na concentração de  $2-4 \times 10^7$  células/mL, para células em suspensão, e  $2-4 \times 10^6$  células/mL para células aderente. Imediatamente após a ressuspensão, as células foram distribuídas em criotubos com capacidade de 1,8 mL (Corning ou TPP). Os criotubos foram mantidos em ultra-freezer (-80°C) por 24 horas em recipiente contendo isopropanol, para se obter um resfriamento lento. Os mesmos foram estocados nestas condições por um período máximo de 1 semana, sendo em seguida transferidos para estocagem em nitrogênio líquido (-196°C).

Para o caso de células aderentes, anteriormente à centrifugação, as células foram desprendidas do frasco de cultivo utilizando-se tripsina (LGC, 0,025%).

## 4.6 Descongelamento

Os criotubos foram retirados do tanque de nitrogênio líquido e submergidos em um banho termostático pré-aquecido à temperatura de 37°C, até que não houvesse cristais de gelo visíveis, ou por no máximo 2 minutos. O conteúdo foi então ressuspendido em 20 mL de meio de cultivo pré-equilibrado à temperatura de 37°C e em seguida centrifugado a 200 g durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas e centrifugadas novamente. Após a segunda centrifugação o meio foi descartado e as células aderidas ao fundo do tubo foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo, para células em suspensão, e em 5 mL, para células aderentes.

## 4.7 Tripsinização

No cultivo de células aderentes, para que se possa inocular novos frascos de cultivo, é necessário desprender as células da superfície inferior do frasco. Para esse procedimento foi utilizado tripsina 0,025% (LGC ou Cultilab).

Para a tripsinização, o sobrenadante de cultivo foi retirado do frasco T25cm<sup>2</sup>, utilizando-se uma pipeta estéril. Em seguida, adicionou-se 5 mL de meio de cultivo fresco sem soro, sendo este descartado em seguida. Após esta retirada de meio, foi então adicionado 1 mL de tripsina, pré-aquecida a temperatura de 37°C e o frasco T foi deixado em estufa a 37°C até que fosse observado o desprendimento das células do

fundo do frasco. Após 2 minutos, para auxiliar no desprendimento das células, foram dadas pequenas batidas com a mão na lateral do frasco. Em seguida, rapidamente, foi adicionado 10 mL de meio de cultivo com soro para inativação da tripsina. A partir deste volume final de 10 mL foram realizados os inóculos em outros frascos na diluição desejada. Para os frascos T de 75 cm<sup>2</sup> e 150 cm<sup>2</sup> os volumes de lavagem e de tripsina seguiram a mesma proporção em termos de volume utilizado por área de frasco.

#### **4.8 Formação do banco mestre de células**

Com o intuito de formar um banco mestre de células BHK, um criotubo obtido da ATCC, armazenado em nitrogênio líquido, foi primeiramente descongelado em meio DMEM (Gibco) / Ham's F12 (Gibco), com soro fetal bovino (Gibco) a uma concentração de 10%. Estas células foram expandidas em dois frascos T150 em uma concentração inicial de  $8,65 \times 10^6$  células viáveis/mL. Após 3 dias de crescimento os dois frascos apresentaram confluência máxima, sendo ambos tripsinizados (tripsina LGC 0,025%) e as células congeladas em 20 criotubos, a uma concentração de  $4 \times 10^6$  células viáveis/criotubo com 90% de viabilidade, utilizando meio de congelamento com soro e DMSO 7,5%.

#### **4.9 Formação do banco de trabalho de células**

Com o intuito de formar um banco de trabalho de células BHK, um criotubo do banco mestre de células foi descongelado em meio DMEM (Gibco) / Ham's F12 (Gibco), contendo soro fetal bovino (Gibco) a uma concentração de 10%. Em seguida, este criotubo foi expandido em frascos estacionários para realização do processo de adaptação a meio livre de soro e cultivo em suspensão.

Após o processo de adaptação as células cultivadas em meio basal, suplementado com extrato de levedura e as proteínas recombinantes Albumina, EGF, IGF-I e transferrina (item 4.2.3), foram criopreservadas a uma concentração de  $3,5 \times 10^6$  células viáveis/criotubo com 99% de viabilidade, utilizando meio de congelamento sem soro, para posterior utilização nos experimentos.

#### 4.10 Cultivo aderente

Para o cultivo de células na forma aderente, foram utilizados frascos de cultivo estacionário do tipo garrafa T (TPP, Corning ou Greiner) com áreas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (T25), 75 cm<sup>2</sup> (T75) e 150 cm<sup>2</sup> (T150). Todos os cultivos foram realizados em estufa a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a uma concentração de 5%.

Após o descongelamento, as células foram inoculadas em garrafas T25, sendo o crescimento acompanhado através da visualização em microscópio óptico (Nikon, TS-100), de acordo com a adesão das células e o grau de preenchimento da área superficial inferior do frasco (confluência). Quando as células atingiam uma confluência de aproximadamente 90% da área total, o frasco era tripsinizado e as células utilizadas como inóculo para frascos subsequentes, de acordo com o procedimento de adaptação de cultivo em suspensão adotado.

#### 4.11 Cultivo em suspensão

O processo de adaptação se iniciou com as células crescendo em frascos estacionários na forma aderente (10% de SFB), nos quais foram realizadas passagens com a redução gradual da concentração de soro. A cada passagem avaliou-se o tempo de confluência apresentado pelas células.

Nos casos em que o tempo de confluência sofreu um aumento expressivo ou as células apresentaram características visuais de baixa viabilidade, se retornou ao cultivo a concentração anterior a passagem.

As reduções sucessivas foram realizadas até que se observasse a perda da capacidade de adesão das células a superfície inferior do frasco estacionário. Após se constatar esse desprendimento, as células foram totalmente tripsinizadas e inoculadas em *spinner*.

Para o início dos cultivos, foram utilizados inóculos de 2 a 4 x 10<sup>5</sup> células/mL em volumes de trabalho mínimos que variaram entre 60, 100 e 200 mL para os *spinners* de volume nominal de 150, 350 e 500 mL, respectivamente. Após a determinação da concentração celular dos *spinners* utilizados para inóculo, o volume desejado era centrifugado a 200 g por 3 minutos em centrífuga (Hettich). Em seguida as células eram resuspendidas em 10 mL do meio de interesse, sendo inoculado em *spinner* com meio já

pré-equilibrado a temperatura de 37°C. Logo após a inoculação foram retiradas amostras para determinação da concentração inicial de células.

As amostras subseqüentes dos experimentos foram retiradas, em intervalos de aproximadamente 24 horas, em fluxo laminar (Trox) em sala limpa de classificação ISO8.

## **4.12 Métodos Analíticos**

### **4.12.1 Contagem de células totais**

A quantificação de células totais nos cultivos foi realizada utilizando-se o método de contagem de núcleos corados com cristal violeta. Uma amostra de 500 µL foi retirada dos cultivos em suspensão e centrifugada a 200 g por 3 minutos. As células foram resuspendidas em 500 µL de solução de cristal violeta e agitadas em agitador de tubos do tipo *vortex*. A solução de cristal violeta provoca um choque osmótico, desintegrando a membrana plasmática e corando apenas os núcleos (CASTILHO, 2001), os quais foram contados em microscópio óptico (Nikon, TS-100), utilizando-se câmara de Neubauer.

### **4.12.2 Contagem de células não viáveis**

A quantificação de células não viáveis foi realizada utilizando-se o método de exclusão do corante vital azul de trypan.

Uma amostra de 160 µL foi retirada dos cultivos em suspensão e a mesma foram adicionados 40µL de solução de azul de trypan. A contagem das células coradas foi realizada no microscópio óptico (Nikon, TS-100), utilizando-se câmara de Neubauer,

Células não viáveis têm a capacidade seletiva da membrana plasmática comprometida e permitem o ingresso do corante azul no citoplasma tornando-se azuis, sendo assim facilmente identificadas ao microscópio, enquanto as células viáveis mantêm uma coloração clara e brilhante (PINTO, 2007).

#### **4.12.3 Determinação de células viáveis e viabilidade**

A determinação da concentração de células viáveis é dada pela diferença entre a concentração de células totais e a concentração de células mortas. A viabilidade celular é dada pela razão entre a concentração de células viáveis e a concentração de células totais, em percentual.

#### **4.12.4 Determinação da integral de células viáveis**

A determinação do valor para integral de células viáveis foi realizada através do cálculo da área sobre a curva de células viáveis por tempo. Os valores para cada tempo de cultivo corresponderam a soma dos valores acumulados dos tempos anteriores.

#### **4.12.5 Determinação do número de passagem celular**

Devido a divergências na literatura, neste trabalho, foi adotada a definição do número de passagens das células quando as mesmas são ressuspensas e re-inoculadas em meio de cultivo total ou parcialmente novo, sendo que apenas a adição de meio fresco ao mesmo frasco de cultivo não foi considerada como uma passagem. Em cada passagem, no caso de células aderentes, as mesmas foram tripsinizadas e ressuspensas em meio DMEM /Ham's F12 acrescido de SFB, e re-inoculadas em frascos de cultivo novos.

#### **4.12.6 Determinação da concentração de glicose e lactato**

As concentrações de glicose e lactato foram determinadas utilizando-se o analisador bioquímico YSI-2700 (Yellow Springs Instruments). Esta análise baseia-se em um método enzimático. Neste método as enzimas (glicose oxidase e lactato oxidase) estão imobilizadas em membranas separadas, colocadas sobre um eletrodo. A glicose e/ou o lactato da amostra se difundem através da membrana específica e reagem com as respectivas enzimas produzindo peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é oxidado eletroquimicamente no anodo de prata do eletrodo produzindo um sinal elétrico, o qual é proporcional a concentração de cada substrato.

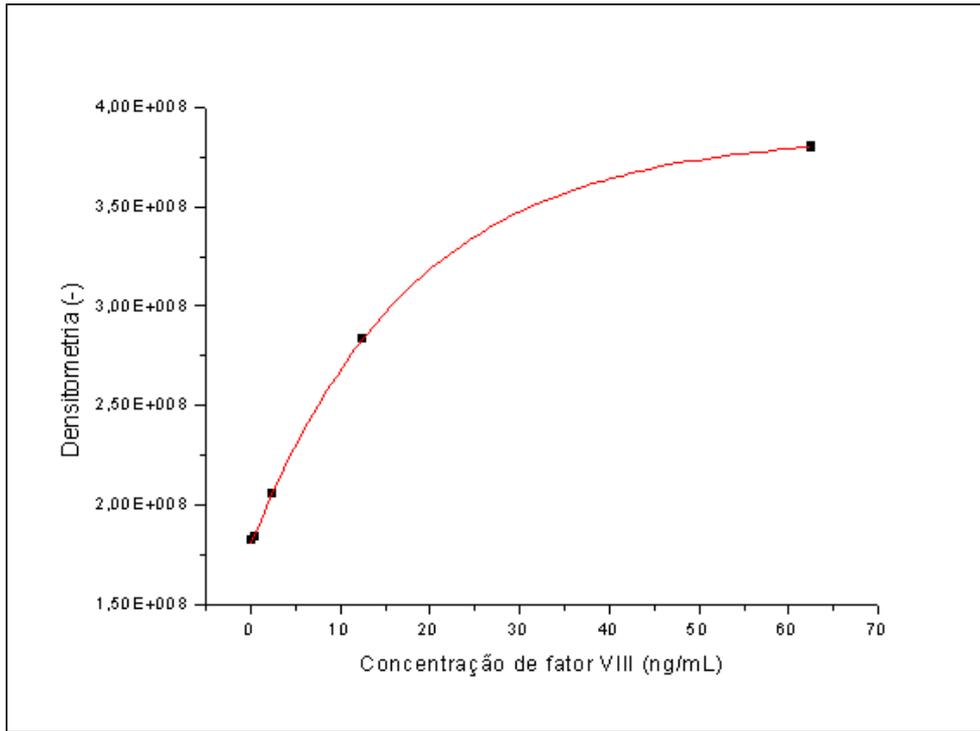
Para esta quantificação, foi utilizado o sobrenadante resultante da centrifugação para contagem de células totais.

#### **4.12.7 Determinação da concentração de Fator VIII por *Immunoblot***

A determinação da concentração de fator VIII foi realizada através do ensaio *immunoblot*. O método consiste em adsorver as proteínas presentes na amostra a um suporte sólido (membrana de nitrocelulose Ultra Bind<sup>TM</sup>, US450, Gelman Sciences), filtrando a amostra sobre vácuo, utilizando um aparelho (BIO DOT<sup>®</sup>, Bio Rad) que restringe a área de retenção a pequenos poços (*slots*). Em seguida, adiciona-se um anticorpo primário (imunoglobulina de ovelha anti-fator VIII humano – Biodesign International, Cat.#K95005S, Lote: 6G20508), que reconhece apenas a proteína de interesse. Por fim, um anticorpo secundário (imunoglobulina anti-anticorpos de ovelha produzida em camundongo – Sigma, A5187, Lote: 066K6007) conjugado com uma enzima (fosfatase alcalina) é adicionado e catalisa a reação colorimétrica para revelação da amostra.

A intensidade da cor das bandas é quantificada a partir da imagem obtida através da digitalização da membrana em *scanner*, sendo analisada através do programa computacional ImageQuant versão 5.2 1999 (Molecular Dynamics). A partir da densitometria das bandas de amostras de concentração conhecida de fator VIII é obtida uma curva padrão e através do ajuste dos pontos a uma equação de decaimento exponencial de primeira ordem, demonstrada pela Equação 1, fez-se a regressão não linear dos dados de concentração de fator VIII em função dos valores de densitometria (intensidade da cor), como exemplificado na Figura 3.

$$y = y_0 + A * e^{-\frac{x}{t}} \quad (1)$$



**Figura 3 - Regressão não linear utilizando a equação de decaimento exponencial de primeira ordem.**

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Adaptação ao cultivo em suspensão e a concentrações reduzidas de soro**

#### **5.1.1 Adaptação a meio livre de soro**

Nesta primeira etapa do trabalho, com o objetivo de adaptar as células BHK (ATCC CRL 8544) ao crescimento em suspensão, foi necessário primeiramente reduzir a concentração de soro no meio, visto que o estoque de células criopreservadas disponível continha 10% de SFB.

As células criopreservadas foram descongeladas de um criotubo para um frasco T25 contendo meio com 10% de SFB, na segunda passagem. Após 3 dias de cultivo, este frasco apresentou uma confluência de 90% sendo tripsinizado e resuspendido em dois frascos T150 com uma concentração de SFB de 5%.

Para as células provenientes do frasco 1, o procedimento de adaptação foi realizado de maneira mais lenta como demonstrado na Tabela 2, mantendo-se as células em cultivo, em uma dada concentração de soro por, no mínimo, 3 passagens.

Analisando as passagens com concentração de 5%, para células provenientes do frasco 1, vemos que na quinta passagem, utilizando uma diluição de 1:6, o tempo de confluência ficou em torno de 4 dias. Já na sexta passagem, com um inóculo 2 vezes mais diluído, ao invés do aumento do tempo de confluência ocorreu uma redução do mesmo, mostrando uma boa adaptação das células à concentração de 5%, sendo realizada a diminuição da concentração de soro para 3%.

Para concentração de 3%, na oitava passagem observou-se um bom tempo de confluência, no entanto na nona passagem as células tiveram de ser re-inoculadas no frasco sem diluição, pois as mesmas apresentaram uma característica ao microscópio de baixa viabilidade. Na décima, décima primeira e décima segunda passagens o tempo de confluência médio foi de 5 dias sendo estas células passadas a concentração de 2% de soro, quando se observou uma grande quantidade de células viáveis que perderam a capacidade de adesão.

**Tabela 2 – Procedimento adotado para adaptação a níveis baixos de soro seguindo a estratégia mais lenta (frasco 1).**

Passagem	Frasco de Origem Área (cm <sup>2</sup> )	Concentração de soro (%)	Frasco Destino Área (cm <sup>2</sup> )	Concentração de soro destino (%)	Diluição	Tempo de confluência (d)
3	-	10	25	10	1:1	2,0
4	25	10	150	5	1:12	3,2
5	150	5	25	5	1:6	4,1
6	25	5	150	5	1:12	3,7
7	150	5	150	3	1:8	4,0
8	150	3	25	3	1:16	6,1
9	25	3	25	3	1:1	7,0
10	25	3	25	3	1:10	3,1
11	25	3	25	3	1:10	6,7
12	25	3	150	2	1:10	5,2
13	150	2	-	0	-	-

Para as células provenientes do frasco 2, foi adotada uma estratégia de diminuição da concentração de soro mais rápida, os dados estão demonstrados na Tabela 3.

Nesta adaptação, na quinta passagem, mantendo-se a concentração de 5% de soro, o tempo de confluência foi de 4 dias. Já na sexta passagem, de 5% para 3% de soro, o tempo de confluência diminuiu, mesmo com o aumento da diluição, de 1:6 para 1:15, fato que pode ter sido provocado pelo resíduo de soro proveniente do inoculo de 5%, pois na sétima passagem com uma diluição menor de 1:6 o tempo de confluência foi muito próximo da sexta passagem, em torno de 3 dias.

O método se mostrou eficiente, conseguindo-se reduzir de uma concentração de 10% para uma concentração de 1,5% de soro em apenas cinco passagens. No entanto, na passagem de 1,5% para 1% o tempo de confluência aumentou em 3 vezes, sendo que a concentração de soro foi retornada para 3% por três passagens, onde obteve-se um tempo médio de confluência de 5,5 dias, similar ao obtido com as células provenientes do frasco 1, sendo assim possível uma nova redução para 2%, onde observou-se um grande número de células viáveis que perderam a capacidade de adesão a superfície inferior do frasco.

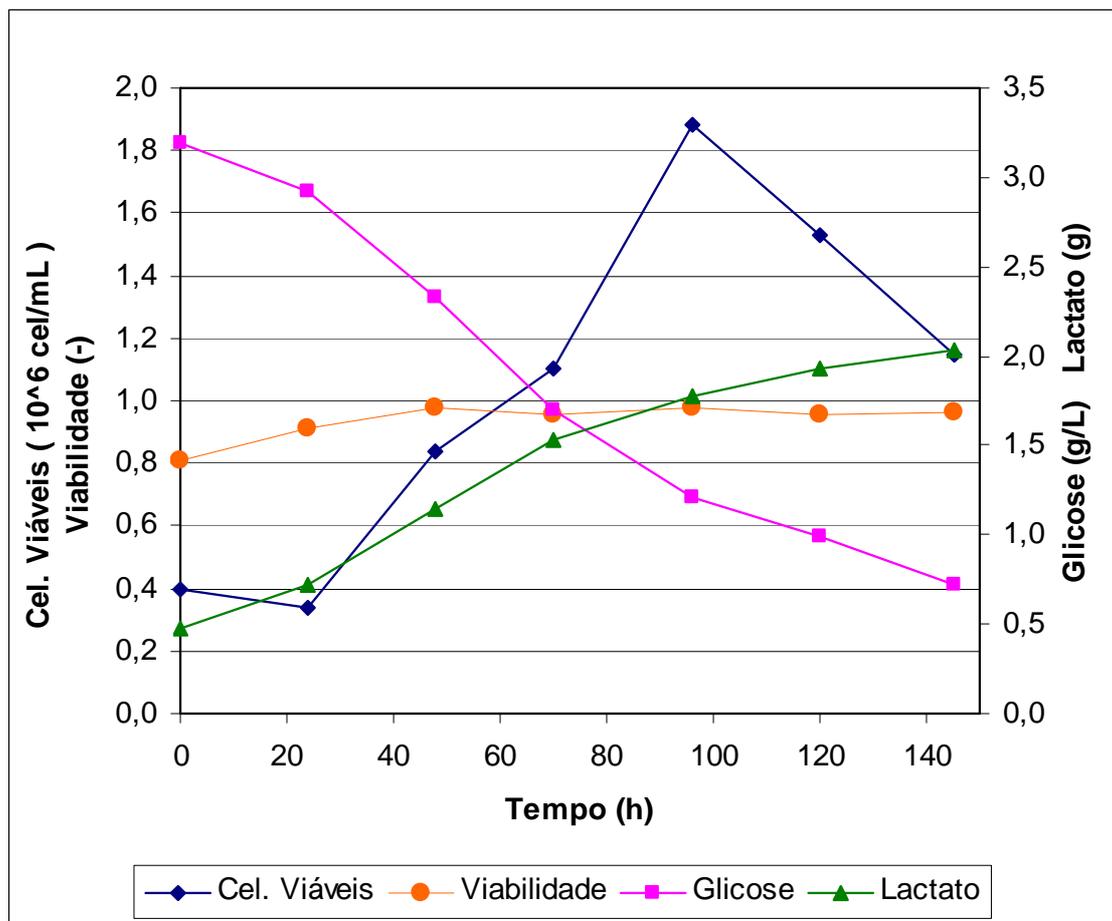
**Tabela 3 - Procedimento adotado para adaptação a níveis baixos de soro seguindo a estratégia mais rápida (frasco 2).**

Passagem	Frasco de Origem Área (cm <sup>2</sup> )	Concentração de soro (%)	Frasco Destino Área (cm <sup>2</sup> )	Concentração de soro destino (%)	Diluição	Tempo de confluência (d)
3	-	10	25	10	1:1	2,0
4	25	10	150	5	1:12	3,2
5	150	5	25	5	1:6	4,1
6	25	5	150	3	1:15	2,7
7	150	3	150	3	1:6	3,0
8	150	3	150	1,5	1:15	2,0
9	150	1,5	25	1	1:15	6,1
10	25	1	25	3	1:10	4,0
11	25	3	150	3	1:10	6,3
12	150	3	25	3	1:10	6,7
13	25	3	150	2	1:10	5,2
14	150	2	-	0	-	-

A partir de 2% de soro, devido à identificação de que um grande número de células havia perdido a capacidade de adesão, em ambos os frascos, iniciou-se o cultivo em suspensão. As células de ambas as adaptações, foram então tripsinizadas, e inoculadas em um frasco agitado tipo *spinner*, contendo meio de cultivo PFM-LECC12, acrescido de extrato de levedura, proteínas recombinantes (Albumina, EGF, IGF-I, transferrina) e Pluronic F-68.

As células foram então cultivadas por 9 dias, período no qual o meio foi apenas parcialmente trocado a cada 3 dias, para que se mantivesse a concentração de células viáveis em torno de  $1 \times 10^6$  células/mL (SINACORE, 1999). Após 9 dias de cultivo, foi efetuado o inóculo em um *spinner* novo para que fosse analisada a cinética de crescimento, demonstrada na Figura 4.

O crescimento foi satisfatório e apesar da presença de agregados de células no meio, a concentração máxima de células viáveis atingiu  $1,9 \times 10^6$  células/mL em torno de 96 horas. A taxa de crescimento obtida na fase considerada exponencial (24-96h) foi de  $0,0227 \text{ h}^{-1}$ , resultando em um tempo de duplicação de 30 horas.



**Figura 4 - Meio PFM-LECC12, suplementado com albumina (1g/L), EGF (25mg/L), IGF-I (50µg/L), transferrina (5mg/L), extrato de Levedura (1,5g/L) e Pluronic F-68 (0,1%).**

No entanto, devido ao alto custo destas proteínas optou-se por realizar um planejamento fatorial fracionário para avaliar quais destes suplementos proteicos apresentariam efeitos mais significativos para o crescimento celular e a produção de fator VIII.

As células cultivadas neste meio foram congeladas em nitrogênio líquido, sendo este o banco de trabalho utilizado em todos os experimentos subsequentes.

## 5.2 Planejamento fatorial com proteínas recombinantes e extrato de levedura

Foi realizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ , com triplicata no ponto central, para avaliação de quatro proteínas recombinantes (albumina, EGF, IGF-I, transferrina) e do suplemento extrato de levedura. Como meio basal, foi utilizado o meio PFM-LECC12, acrescido de Pluronic F-68 (0,1%). Como inóculo foram utilizadas células cultivadas no meio definido na seção 5.1.

Os níveis e as concentrações dos suplementos testados neste planejamento estão especificados na Tabela 4. O nível -1 representa a ausência da proteína, o nível 0 valores encontrados na literatura e o nível +1 o dobro dessas concentrações.

**Tabela 4 - Níveis de concentração dos suplementos utilizados para o planejamento experimental**

Suplementos	Níveis		
	-1	0	+1
Albumina (MG/L)	0	1000	2000
EGF ( $\mu\text{g/L}$ )	0	25	50
IGF-I ( $\mu\text{g/L}$ )	0	50	100
Transferrina (mg/L)	0	5	10
Extrato de Levedura (mg/L)	0	1500	3000

Como variáveis resposta, foram analisadas a integral de células viáveis (ICV), concentração de fator VIII e concentração de lactato, em 72 horas de cultivo.

Como pode ser observado na Tabela 5, os maiores valores para variável concentração de fator VIII (2,76, 2,42 e 2,82 ng/mL) foram obtidos para os experimentos 2 (Transferrina no nível +1), 8 (EGF no nível +1) e 19 (Albumina, IGF-I e Extrato de Levedura no nível +1), respectivamente. No entanto, estes três experimentos não foram os experimentos que demonstraram os maiores valores de crescimento celular, avaliados pela integral de células viáveis (ICV), sendo que os maiores valores encontrados para esta resposta foram os experimentos realizados nos pontos centrais ( $68,4$ ,  $71,4$  e  $72,0 \times 10^6$  células.h.mL<sup>-1</sup>), onde o valor de todos os suplementos está no nível intermediário, indicando que a combinação de compostos que promove o crescimento celular não é a mesma que favorece a produção de fator VIII.

LIU & CHANG (2006), utilizando células CHO produtoras de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), afirmaram que baixos crescimentos celulares estariam sempre associados a boas produtividades específicas de M-CSF em seus

experimentos. O mesmo aspecto foi observado por KIM *et al.* (2006), utilizando células CHO produtoras de anticorpos. Após um período de adaptação de 3600h a um meio de cultivo livre de soro e de proteínas, foi observada uma taxa específica de crescimento 50% menor do que a obtida em um meio comercial, e mesmo assim uma produtividade específica 3,4 vezes maior de anticorpo foi obtida.

Observando os dados para a variável concentração de lactato, pode-se observar uma correlação entre o crescimento celular e a produção de lactato. De uma forma geral, os experimentos que apresentam os maiores valores de concentração de lactato (>1,8 g/L) apresentaram expressivos valores de ICV. Segundo KURANO (1990), concentrações acima de 18mM (1,6 g/L) de lactato se tornam inibitórias para o crescimento celular. O experimento 19, apesar da alta concentração de fator VIII, apresentou elevada concentração de lactato, o que poderia vir a ser um fator limitante no desenvolvimento de processos de alta densidade celular.

**Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental  $2^{5-1}$  para avaliar os suplementos proteicos.**

Exp. #	Albumina	EGF	IGF-I	Transferrina	Extrato de Levedura	ICV ( $10^6$ células.h.mL <sup>-1</sup> )	Fator VIII (ng/mL)	Lactato (g/L)
1	1	-1	-1	-1	-1	46,7	1,06	1,06
2	-1	-1	-1	1	-1	36,5	2,76	0,97
3	0	0	0	0	0	68,4	1,33	1,98
4	1	-1	1	1	-1	51,6	1,75	1,59
5	0	0	0	0	0	71,5	1,94	1,99
6	1	1	1	-1	-1	53,2	1,95	1,83
7	1	1	-1	1	-1	51,0	2,17	1,34
8	-1	1	-1	-1	-1	52,5	2,42	1,10
9	-1	-1	1	1	1	70,9	1,15	1,92
10	-1	-1	1	-1	-1	51,9	1,59	1,58
11	1	1	-1	-1	1	55,7	1,55	1,36
12	0	0	0	0	0	72,0	1,64	1,99
13	-1	1	1	1	-1	48,5	1,31	1,81
14	1	1	1	1	1	56,0	1,42	2,07
15	-1	-1	-1	-1	1	32,1	1,54	0,89
16	-1	1	1	-1	1	50,5	1,91	1,99
17	1	-1	-1	1	1	49,4	1,25	1,52
18	-1	1	-1	1	1	40,9	1,50	1,34
19	1	-1	1	-1	1	59,0	2,82	1,77

Os efeitos de cada suplemento sobre as variáveis de resposta foram avaliados através da utilização de modelos empíricos, que indicam a significância ou não dos fatores e as possíveis interações lineares entre os mesmos.

Esta análise só foi possível através da realização do Teste F, que avalia a razão entre a variância do modelo empírico e dos pontos centrais do planejamento. Se o valor de  $F_{\text{calculado}}$  estiver dentro do intervalo tabelado, pode-se utilizar o modelo para predição de dados. Somente para os valores de concentração de lactato, o modelo empírico não atendeu aos requisitos do teste F, sendo que esta variável foi avaliada qualitativamente devido à sua correlação com o crescimento celular.

A Equação 2 expressa o modelo obtido para a variável de resposta concentração de fator VIII, contendo os termos (normalizados) dos suplementos e interações lineares estatisticamente significativas a um grau de confiança de 90%, e com um coeficiente de correlação de 0,9539. O grau de confiança de 90% foi adotado por se tratarem de experimentos biológicos que apresentam uma variabilidade considerável. A Tabela 6 mostra o teste F realizado para o modelo da Equação 2.

$$\begin{aligned}
 [fatorVIII \text{ em } 72h \text{ (ng/mL)}] = & 1,7398 - 0,096 \cdot [transferina] - 0,1165 \cdot [ext.levedura] \\
 & + 0,2605 \cdot [albumina] \cdot [IGF - I] + 0,1302 \cdot [albumina] \cdot [ext.levedura] \\
 & - 0,1095 \cdot [EGF] \cdot [IGF - I] - 0,2350 \cdot [IGF - I] \cdot [transferina] \\
 & + 0,2041 \cdot [IGF - I] \cdot [ext.levedura] - 0,2189 \cdot [transferina] \cdot [ext.levedura]
 \end{aligned} \tag{2}$$

**Tabela 6 - Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 1)**

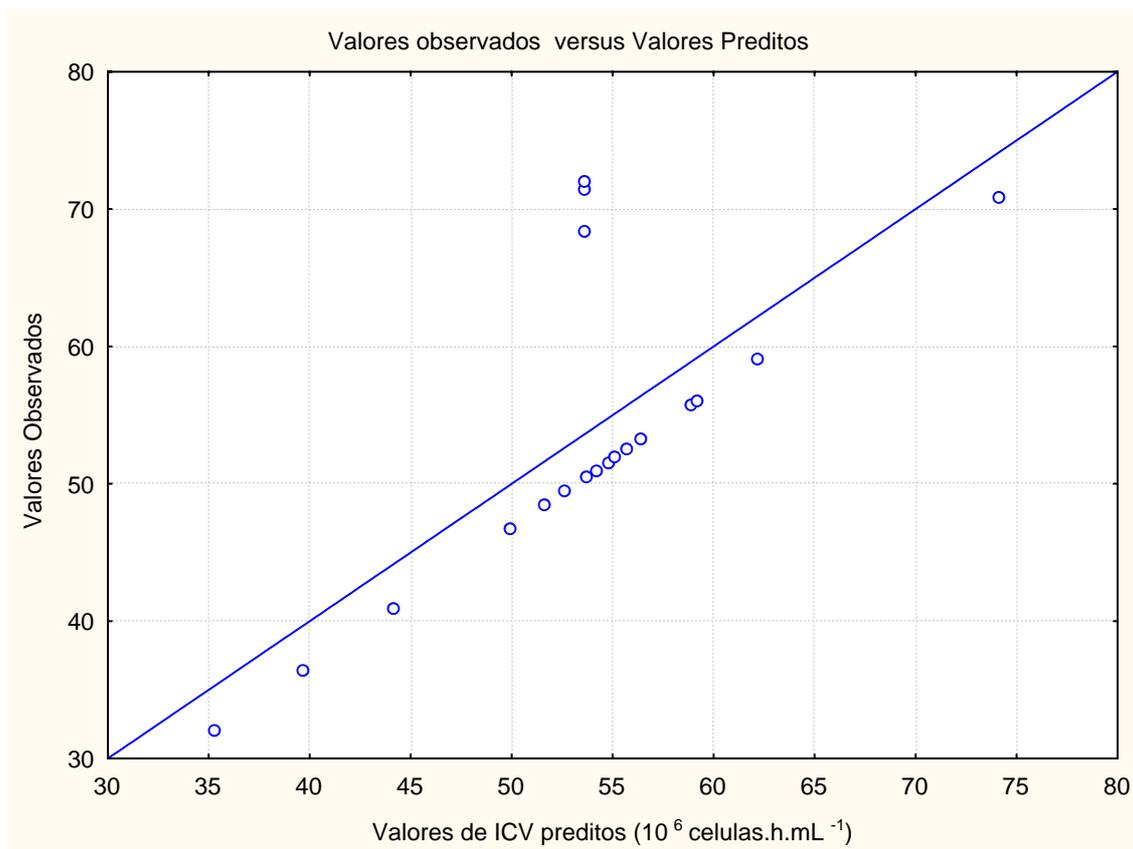
	Graus de Liberdade	Variância	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$	
				Intervalo inferior	Intervalo superior
Ponto central	2	0,0926	2,21	0,05	4,1
Modelo	10	0,0419			

Como pode ser observado na Tabela 6, o valor de  $F_{\text{calculado}}$  se encontra dentro do intervalo de confiança do teste F, validando o modelo descrito pela Equação 2, dentro das faixas de concentrações dos suplementos testados no experimento.

Para a variável de resposta ICV, apesar do desvio padrão para média dos pontos centrais ser pequeno ( $70,6 \pm 1,9$ ), a tentativa de análise através do modelo linear, o único

permitido dentro da resolução do planejamento experimental fracionário, não apontou nenhum suplemento como significativo.

Sendo assim, foi realizada uma análise do gráfico de valores de ICV observados e preditos pelo modelo, apresentado na Figura 5, para que se pudesse entender melhor o comportamento dos dados do experimento.



**Figura 5 - Valores observados versus valores preditos pelo modelo linear para variável ICV em 72 horas**

Observando-se a Figura 5, pode-se notar um desvio sistemático dos valores dos pontos centrais em relação aos valores observados para os outros 16 experimentos. Este desvio sugere uma influência quadrática causada por um ou mais dos suplementos testados. No entanto, este tipo de influência só pode ser avaliada em planejamentos do tipo completo nos quais se realiza experimentos em pontos axiais, ou seja, além dos extremos dos valores testados neste conjunto de experimentos.

No entanto, como artifício estatístico, pode-se introduzir um termo quadrático indefinido à equação linear, afim de que se possa avaliar as interações lineares do experimento.

Utilizando este artifício, obteve-se a Equação 3, que expressa o modelo obtido para variável ICV, onde podem ser observados os suplementos e interações lineares estatisticamente significativas a um grau de confiança de 90% para um coeficiente de correlação de 0,9898.

Como se pode observar, o último termo da Equação 3, que representa um termo quadrático qualquer, é o termo de maior influência do modelo.

$$\begin{aligned}
 \text{ICV em 72h}(10^6 \text{ celulas.h.mL}^{-1}) = & 70,62 + 2,42 \cdot [\text{Albumina}] + 4,79 \cdot [\text{IGF- I}] \\
 & + 1,41 \cdot [\text{Ext.Levedura}] - 2,68 \cdot [\text{Albumina}] \cdot [\text{IGF- I}] - 3,79 \cdot [\text{EGF}] \cdot [\text{IGF- I}] \\
 & - 2,13 \cdot [\text{EGF}] \cdot [\text{Transferina}] - 1,67 \cdot [\text{EGF}] \cdot [\text{Ext.Levedura}] \\
 & + 1,34 \cdot [\text{IGF- I}] \cdot [\text{Transferina}] + 2,48 \cdot [\text{IGF- I}] \cdot [\text{Ext.Levedura}] \\
 & + 2,30 \cdot [\text{Transferina}] \cdot [\text{Ext.Levedura}] - 20,23[X_{\text{qualquer}}]^2
 \end{aligned} \tag{3}$$

A Tabela 7 mostra o teste F realizado para o modelo da Equação 3.

**Tabela 7 - Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 2)**

	Graus de Liberdade	Variância	F calculado	F tabelado	
				Intervalo inferior	Intervalo superior
Ponto central	2	3,748	0,576	0,050	4,73
Modelo	7	6,502			

Devido ao grande número de interações entre os suplementos testados, tanto para o modelo da variável-resposta concentração de fator VIII quanto para o da variável-resposta ICV, tornou-se difícil uma análise qualitativa dos modelos. Sendo assim, as Equações 2 e 3, foram utilizadas para prever os valores de ICV em 72h e fator VIII em 72h para todas as 32 combinações possíveis dos cinco suplementos, apresentados na Tabela 8.

A partir da Tabela 8, observou-se que os meios que foram preditos como maiores produtores de fator VIII são os meios que não apresentariam altos valores de ICV.

Tabela 8 – Predição de valores através dos modelos das Equações 1 e 2.

Albumina	EGF	IGF-I	Transferrina	Extrato de Levedura	Fator VIII 72h (ng/mL)	ICV 72h (10 <sup>6</sup> células.h.mL <sup>-1</sup> )
-1	-1	-1	-1	-1	1,98	37,6
1	-1	-1	-1	-1	1,20	47,8
-1	1	-1	-1	-1	2,20	52,8
1	1	-1	-1	-1	1,42	63,0
-1	-1	1	-1	-1	1,74	52,5
1	-1	1	-1	-1	2,00	52,0
-1	1	1	-1	-1	1,53	52,5
1	1	1	-1	-1	1,79	52,0
<b>-1</b>	<b>-1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>2,70</b>	<b>34,6</b>
1	-1	-1	1	-1	1,92	44,8
<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>2,92</b>	<b>41,2</b>
1	1	-1	1	-1	2,14	51,5
-1	-1	1	1	-1	1,52	54,8
1	-1	1	1	-1	1,78	54,3
-1	1	1	1	-1	1,30	46,3
1	1	1	1	-1	1,56	45,8
-1	-1	-1	-1	1	1,52	34,2
1	-1	-1	-1	1	1,26	44,4
-1	1	-1	-1	1	1,74	42,7
1	1	-1	-1	1	1,48	52,9
-1	-1	1	-1	1	2,10	59,0
<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>2,88</b>	<b>58,5</b>
-1	1	1	-1	1	1,88	52,4
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>2,66</b>	<b>51,9</b>
-1	-1	-1	1	1	1,36	40,4
1	-1	-1	1	1	1,10	50,6
-1	1	-1	1	1	1,58	40,4
1	1	-1	1	1	1,32	50,6
-1	-1	1	1	1	1,00	70,6
1	-1	1	1	1	1,78	70,1
-1	1	1	1	1	0,78	55,4
1	1	1	1	1	1,56	54,9

A partir dos valores preditos pela Equação 2, os melhores meios para produção de fator VIII seriam os meios contendo apenas transferrina no nível +1 ou apenas a combinação EGF e transferrina (ambos no nível +1), com valores de 2,70 e 2,92 ng/mL, respectivamente. Voltando aos experimentos realizados, pode-se confirmar a influência positiva do EGF e da transferrina. Observando-se que no experimento 8, tem-se

somente EGF em nível +1, e a concentração de fator VIII foi uma das mais altas (2,42 ng/mL). Por outro lado, o suplemento transferrina estava presente em pelo menos dois meios de maior produção, nos experimentos 2 e 7.

O meio com albumina, IGF-I e extrato de levedura em nível +1 também apresentou um dos maiores valores para concentração de fator VIII (2,88 ng/mL). Já o meio contendo albumina, EGF, IGF-I e extrato de levedura apresentou uma concentração de 2,66 ng/mL.

Devido ao alto custo das proteínas recombinantes, do grande número de interações e da diversidade de meios que apresentaram uma boa predição de produção de fator VIII, foi necessária a adoção de critérios de seleção para que se pudessem definir os melhores meios a serem repetidos.

Pelo critério de custo elevado foi eliminado o meio contendo albumina, EGF, IGF-I e extrato de levedura.

Utilizando os valores dos efeitos da Equação 2, pode-se observar que o oitavo termo da equação é um dos termos com o maior valor de efeito (+0,2041), sendo o IGF-I um dos suplementos mais caros, definiu-se que o mesmo seria deixado no nível -1. Sendo assim, para que o oitavo termo da equação continuasse positivo, o valor de extrato de levedura também deveria estar em -1.

Com albumina, IGF-I e extrato de levedura nos níveis -1, o quarto, quinto e oitavo termos da equação assumiriam valores positivos, e sobriariam as interações lineares negativas, representadas pelo sexto, sétimo e nono termos da Equação 2. Nestes termos, estão as interações entre EGF e IGF-I, IGF-I e transferrina e transferrina e extrato de levedura. Para que os mesmos se tornem positivos, deve-se ter um componente no nível +1 e outro no nível -1. Sendo assim, EGF e transferrina foram escolhidos para estar no nível +1, maximizando o valor final da Equação 2.

A partir destas análises, dois meios se encaixavam nas definições dos níveis adotados acima, maximizando o valor de concentração de fator VIII em 72h, sendo estes o meio contendo EGF e transferrina e o meio contendo apenas transferrina no nível +1. Estes meios testados novamente em comparação com meios comerciais (Item 5.4).

### 5.3 Análise de suplementos definidos não proteicos

Devido à grande quantidade de suplementos encontrados na literatura para suplementação de meios de cultivo livres de soro e de componentes de origem animal, se fez necessária a utilização de um planejamento estatístico que permitisse agilizar o processo de análise para definição de quais dos suplementos escolhidos seriam significativos para a linhagem celular BHK (ATCC CRL 8544) produtora de fator VIII.

Para isto, foi utilizado uma matriz de delineamento Plackett-Burman que permite, com a realização de um número reduzido de experimentos, a identificação dos suplementos que causam efeitos mais significativos nas variáveis de resposta desejadas, servindo como ponto de partida para planejamentos completos abrangendo um menor número de fatores. A Tabela 9 lista os suplementos e as respectivas concentrações que foram testados neste planejamento.

**Tabela 9 - Níveis e concentrações dos suplementos não proteicos testados no planejamento Plackett-Burman**

Suplementos	Concentração ( $\mu\text{M}$ )		
	Níveis		
	-1	0	1
Ácido Ascórbico	0	71	142
Ácido Linoléico	0,15	0,3	0,6
Ácido Oxalacético	0	22	44
L-Glutamato	0	1250	2500
Selenito de Sódio	0	0,05	0,1
Sulfato de Zinco	0	1	2
Timidina	3	6	9
Ácido Oléico	0	8,85	17,7
Sulfato de Cobre	0	0,05	0,10
Hidrocortisona	0	7,5	15
Hipoxantina	15	30	45

Para este planejamento foi utilizado como meio basal o meio PFM-LECC12, acrescido de Pluronic F-68 (0,1%). Como inóculo foram utilizadas células cultivadas no meio descrito na seção 5.1, contendo extrato de levedura e as quatro proteínas recombinantes investigadas neste trabalho.

As análises de células viáveis, células não-viáveis, concentração de glicose e concentração de lactato foram realizadas imediatamente após a retirada das amostras. Para medida da concentração de fator VIII, as amostras foram centrifugadas e o

sobrenadante armazenado em freezer à temperatura de -20°C, sendo as análises realizadas posteriormente.

Para testar os 11 suplementos indicados na Tabela 10, foi utilizado um planejamento Plackett-Burman de 16 ensaios com triplicata no ponto central.

**Tabela 10 - Matriz de planejamento do tipo Plackett-Burman para 16 ensaios com triplicata no ponto central, para avaliação dos suplementos não proteicos.**

Experimento #	Ác. Ascórbico	Ác. Linoleico	Ác. Oxalacético	Glutamato	Selenito de Sódio	ZnSO <sub>4</sub>	Timidina	Ác. Oleico	CuSO <sub>4</sub>	Hipoxantina	Hidrocortisona
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
22	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
23	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
26	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
27	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
28	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
29	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
32	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
33	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
34	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
35	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
36	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1
37	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1
38	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1

Na Tabela 11, estão apresentados os resultados dos experimentos para o tempo de cultivo de 96 horas. A análise foi realizada neste tempo, pois no tempo final de 120

horas alguns meios já apresentavam uma redução na concentração de células viáveis e na viabilidade.

**Tabela 11 - Resultados obtidos para o Planejamento Plackett -Burman para 11 suplementos não proteicos.**

<b>Exp. #</b>	<b>Fator VIII 96h (ng/mL)</b>	<b>ICV 96h (10<sup>6</sup> células.h.mL<sup>1</sup>)</b>	<b>Lactato (g/L)</b>
<b>20</b>	2,23	58,1	0,931
<b>21</b>	4,91	53,1	0,846
<b>22</b>	2,89	53,6	0,858
<b>23</b>	2,55	57,1	0,859
<b>24</b>	2,12	58,6	0,851
<b>25</b>	3,31	52,3	0,805
<b>26</b>	2,17	43,7	0,850
<b>27</b>	3,61	54,8	0,809
<b>28</b>	0,95	58,7	0,918
<b>29</b>	1,85	44,9	0,867
<b>30</b>	2,11	71,6	0,888
<b>31</b>	1,86	59,0	0,773
<b>32</b>	0,91	49,9	0,765
<b>33</b>	2,13	45,5	0,720
<b>34</b>	2,04	45,0	0,759
<b>35</b>	1,12	45,8	0,732
<b>36</b>	-	-	-
<b>37</b>	1,58	49,0	0,623
<b>38</b>	2,30	55,7	0,698

\* Os dados para o experimento 36 não foram apresentados devido a uma contaminação ocorrida em 48h. A análise estatística foi feita sem os valores para este ponto.

Analisando os resultados, para a variável-resposta concentração de fator VIII, observa-se que os maiores valores foram encontrados para os meios dos experimentos 21, 25 e 27 com os valores de 4,91, 3,31 e 3,61 ng/mL, respectivamente, uma característica comum a estes experimentos é a presença de ácido oxalacético no nível +1 e de hipoxantina no nível -1. Ácido ascórbico, ácido linoléico, glutamato, selenito de sódio e ácido oléico aparecem em nível +1 em pelo menos 2 destes três meios.

Para a variável-resposta ICV, o crescimento celular em 96 horas foi bastante homogêneo, sendo que apenas o experimento 30 apresentou um valor alto (71,6x10<sup>6</sup> células.h.mL<sup>-1</sup>). No entanto, como se trata de um dos pontos centrais e os

outros dois pontos centrais apresentaram valores muito próximos ( $58,1 \times 10^6$  células.h.mL<sup>-1</sup>, e  $58,6 \times 10^6$  células.h.mL<sup>-1</sup>), este pode ser considerado um *outlier*.

As maiores concentrações de lactato foram observadas nos meios 20 e 28. O primeiro é um dos pontos centrais e o último tem o nível -1 para todas as proteínas, ou seja, trata-se do meio basal. Neste meio, a concentração de fator VIII foi a mais baixa, podendo-se assim confirmar a necessidade de suplementação do mesmo para uma maior produção de fator VIII. A Tabela 12 apresenta os resultados da análise estatística para a variável-resposta concentração de fator VIII em 96 horas, com um nível de confiança de 90%, e um coeficiente de correlação de 0,879.

**Tabela 12- Análise dos efeitos para a resposta concentração de fator VIII em 96 horas. Os fatores grifados são aqueles que apresentam significância estatística ( $p_{\text{valor}}$  inferior ou próximo a 0,1).**

	Efeito	Erro Padrão	t(6)	$p_{\text{valor}}$
<b>Média</b>	2,280	0,196	11,613	0,00002
<b>Ácido Ascórbico</b>	0,048	0,217	0,220	0,833
<b>Ácido Linoléico</b>	0,245	0,217	1,127	0,303
<b>Ácido Oxalacético</b>	<b>0,506</b>	0,217	2,327	<b>0,059</b>
<b>Glutamato</b>	0,149	0,217	0,687	0,518
<b>Selenito de Sódio</b>	-0,097	0,217	-0,448	0,670
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	-0,147	0,217	-0,677	0,523
<b>Timidina</b>	-0,120	0,217	-0,554	0,599
<b>Ácido Oléico</b>	<b>0,372</b>	0,217	1,714	<b>0,137</b>
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	0,033	0,217	0,153	0,883
<b>Hipoxantina</b>	<b>-0,466</b>	0,217	-2,147	<b>0,075</b>
<b>Hidrocortisona</b>	0,222	0,217	1,022	0,346

Observando os resultados expressos na Tabela 12, vê-se que apenas o suplemento ácido oxalacético teve um efeito positivo significativo, para o aumento da concentração e fator VIII. No entanto, podemos observar que o suplemento ácido oléico também

apresentou um  $p_{\text{valor}}$  bem próximo ao nível de 0,1 adotado sendo um suplemento a ser considerado também para análises futuras. Já o suplemento hipoxantina apresentou um efeito negativo estatisticamente significativo na produção de fator VIII, dentro da faixa de concentrações testada.

A Tabela 13 apresenta os resultados da análise estatística para a variável resposta integral de células viáveis em 96 horas, ao nível de confiança de 90% com um coeficiente de correlação de 0,820.

**Tabela 13 - Análise dos efeitos para a resposta integral de células viáveis em 96 horas. Os fatores grifados são aqueles que apresentam significância estatística ( $p_{\text{valor}}$  inferior ou próximo a 0,1).**

	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p-valor
<b>Média</b>	52,326	1,320	39,626	0,000
<b>Ácido Ascórbico</b>	-0,856	1,414	-0,606	0,567
<b>Ácido Linoléico</b>	-0,865	1,414	-0,612	0,563
<b>Ácido Oxalacético</b>	-0,321	1,414	-0,227	0,828
<b>Glutamato</b>	-1,225	1,414	-0,867	0,419
<b>Selenito de Sódio</b>	-0,323	1,414	-0,229	0,827
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	1,111	1,414	0,786	0,462
<b>Timidina</b>	<b>-2,831</b>	1,414	-2,003	<b>0,092</b>
<b>Ácido Oléico</b>	-1,519	1,414	-1,075	0,324
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	0,631	1,414	0,446	0,671
<b>Hipoxantina</b>	<b>-2,632</b>	1,414	-1,862	<b>0,112</b>
<b>Hidrocortisona</b>	0,222	0,217	1,022	0,346

Observando-se a Tabela 13, vê-se que os suplementos timidina e hipoxantina apresentaram efeitos negativos estatisticamente significativos para o crescimento celular dentro da faixa de concentração observada.

A Tabela 14 apresenta os resultados da análise estatística para a variável resposta concentração de lactato em 96 horas, ao nível de confiança de 90% com um coeficiente de correlação de 0,832

**Tabela 14 - Análise dos efeitos para a resposta concentração de lactato em 96 horas. Os fatores grifados são aqueles que apresentam significância estatística ( $p_{\text{valor}}$  inferior ou próximo a 0,1).**

	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(6)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Média</b>	0,811	0,019	42,351	0,000
<b>Ácido Ascórbico</b>	0,015	0,021	0,724	0,496
<b>Ácido Linoléico</b>	-0,023	0,021	-1,068	0,327
<b>Ácido Oxalacético</b>	0,018	0,021	0,856	0,425
<b>Glutamato</b>	-0,004	0,021	-0,194	0,852
<b>Selenito de Sódio</b>	<b>-0,045</b>	0,021	-2,144	<b>0,076</b>
<b>ZnSO4</b>	-0,015	0,021	-0,702	0,509
<b>Timidina</b>	-0,010	0,021	-0,454	0,666
<b>Ácido Oléico</b>	-0,005	0,021	-0,220	0,833
<b>CuSO4</b>	0,013	0,021	0,606	0,567
<b>Hipoxantina</b>	<b>-0,036</b>	0,021	-1,694	<b>0,141</b>
<b>Hidrocortisona</b>	-0,006	0,021	-0,291	0,781

Os suplementos que se mostraram estatisticamente significativos para a resposta concentração de lactato foram os suplementos selenito de sódio e hipoxantina sendo que ambos contribuem para redução na formação de lactato.

### **5.3.1 Análise final do conjunto de experimentos Plackett-Burman**

Analisando as informações obtidas através da análise das respostas concentração de fator VIII, ICV e concentração de lactato, chegou-se à conclusão que a presença dos suplementos hipoxantina e timidina afetou negativamente o cultivo, causando efeitos negativos no crescimento celular e na produção de fator VIII, sendo os mesmos eliminados dos próximos experimentos.

Decidiu-se manter os suplementos ácido oxalacético, ácido oléico e selenito de sódio em níveis mais altos nos experimentos seguintes, para que se confirmasse a influencia dos mesmos na produção de fator VIII (ácido oxalacético e oléico) e na redução da produção de lactato (selenito de sódio).

Para os suplementos ácido ascórbico, ácido linoléico, glutamato, sulfato de zinco, sulfato de cobre e hidrocortisona, de acordo com a análise estatística, não se pode afirmar nada dentro do intervalo de concentrações testado.

Um novo experimento com meio de cultivo contendo os suplementos ácido oxalacético, ácido oléico e selenito de sódio no nível +1, e o restante (ácido ascórbico, ácido linoléico, glutamato, sulfato de zinco, sulfato de cobre e hidrocortisona) no nível 0, foi realizado para comparação com meios comerciais.

### 5.3.2 Demais experimentos com suplementos não proteicos

Ao longo do presente trabalho, outros experimentos foram realizados, os quais, em função de problemas operacionais, não puderam ser analisados por completo. Em alguns casos, houve problema no inóculo de parte dos experimentos de um dado delineamento; em outros, houve contaminação de pequena parte dos ensaios, porém inviabilizando a análise global do delineamento; e em outro caso, de experimentos realizados no início do trabalho, a técnica analítica então usada para quantificar o fator VIII não estava funcionando corretamente, o que só foi verificado “a posteriori”.

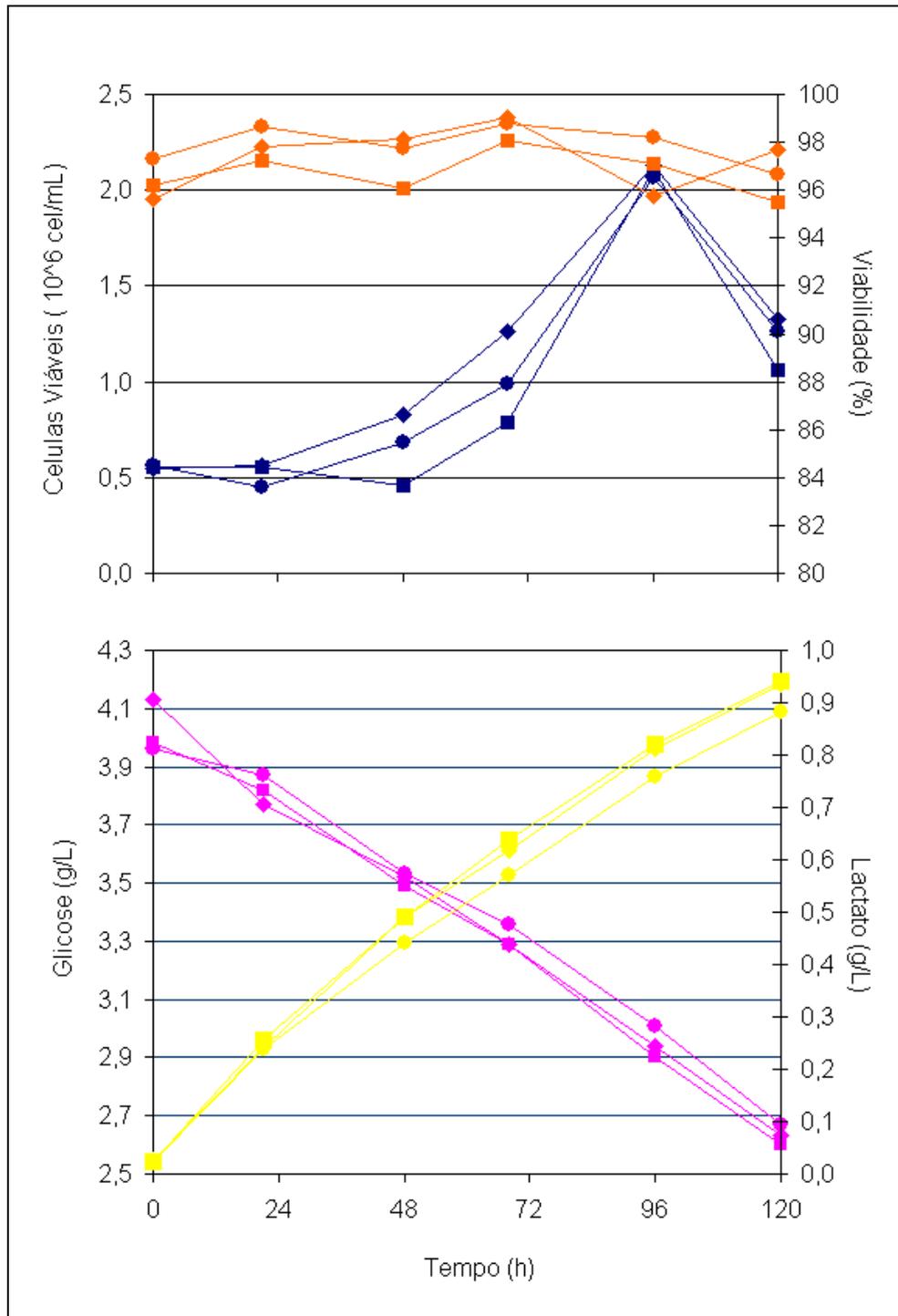
Entretanto, deste extenso conjunto de dados não mostrados, três experimentos, expostos na Tabela 15, se destacaram por terem apresentado valores elevados de ICV e 96 horas, maiores do que os valores apresentados no planejamento Plackett-Burman.

**Tabela 15 - ICV máximo obtido em experimentos adicionais**

<b>Experimento #</b>	<b>Suplementos utilizados</b>	<b>ICV 96horas</b>
<b>39</b>	ác. ascórbico (213 µM), ác. Oxalacético (66 µM)	98,75
<b>40</b>	ác. linoleico (0,825 µM), ác. Oxalacético (66 µM)	78,63
<b>41</b>	ác ascórbico (213 µM), glutamato (3750 µM)	85,60

Mesmo que os dados dos últimos planejamentos tenham apontado uma maior produção de fator VIII para os meios que apresentaram um crescimento relativamente baixo, é importante se obter um meio que possa fazer com que o cultivo atinja altas concentrações celulares. Para que, no caso de cultivos em larga escala, a relação célula por volume seja alta, otimizando o consumo de nutrientes na fase inicial do processo, para uma posterior retroalimentação com meio que mantenha as células estáveis por longos períodos.

A Figura 6 apresenta as curvas de crescimento, viabilidade, geração de lactato e consumo de glicose para estes três meios.



**Figura 6 - Células viáveis (-), viabilidade (-), concentração de glicose (-) e concentração de lactato (-) em função do tempo para os experimentos 39 (◆), 40 (■) e 41(●).**

## 5.4 Comparação com meios comerciais

Para que fosse feita uma análise comparativa, novos experimentos foram feitos para os melhores meios obtidos no planejamento com proteínas, no planejamento Plackett-Burman e nos experimentos adicionais. Estas curvas foram comparadas com três meios comerciais: GMEM-S, VP-SFM e CNJ-SFM 2.1b.

O meio GMEM-S é um meio desenvolvido especificamente para o cultivo de células BHK, sendo que sua composição não pode ser revelada devido a um acordo de sigilo com a empresa. O que se pode afirmar é que se trata de um meio livre de soro, sendo suplementado com uma mistura de TBP (*tryptose phosphate broth*). O TPB trata-se de uma mistura de peptonas, que auxiliam como fonte de carbono e nitrogênio, e sais de sódio, que ajudam a manter o balanço osmótico do meio. A este meio, foram acrescentados NaHCO<sub>3</sub> e glutamina, nas mesmas concentrações encontradas na mistura DMEM/Ham's F12 (1:1) (2,45g/L e 365mg/L, respectivamente), pois o mesmo não apresentava estes componentes. O pH foi corrigido para 7,2.

O meio VP-SFM é um meio livre de soro, com a presença da proteína recombinante EGF na concentração de 10 ng/mL. Este meio foi desenvolvido para produção de vírus em células VERO, sendo recomendado também para o crescimento de células COS-7, MDCK, BHK-21 em suspensão e HEp2 (INVITROGEN, 2009). A este meio foram acrescentados 365 mg/L de glutamina, pois o mesmo não continha este componente. O pH foi corrigido para 7,2.

O meio CNJ-SFM 2.1b é um meio livre de soro, que é suplementado por uma mistura substituinte de soro. No prospecto deste meio, é indicada a utilização de insulina animal, na concentração de 10 mg/L, ou alternativamente IGF-I, na concentração de 20 µg/L. Para o cultivo com este meio foi utilizada a opção da proteína recombinante IGF-I, para que o meio fosse livre de proteínas de origem animal.

Os meios escolhidos a partir das análises dos planejamentos e seus componentes, bem como os meios comerciais testados, estão indicados na Tabela 16.

**Tabela 16 - Análise comparativa entre os melhores meios desenvolvidos ao presente trabalho e meios comerciais.**

<b>Experimento #</b>	<b>Composição do meio</b>
<b>42</b>	Meio Basal
<b>43</b>	Meio Basal + transferrina (10 mg/L), EGF (50 µg/L)
<b>44</b>	Meio Basal + transferrina (10 mg/L)
<b>45</b>	Meio Basal + ác. ascórbico (71 µM), ác. linoleico (0,3 µM), ác. oxalacético (44 µM), glutamato (1250 µM), selenito de sódio (0,1 µM), ZnSO <sub>4</sub> (1 µM), ác. oleico (17,7 µM) , CuSO <sub>4</sub> (0,05 µM), hidrocortisona (7,5 µM)
<b>46</b>	Meio Basal + ác ascórbico (213 µM), ác. oxalacético (66 µM)
<b>47</b>	Meio Basal + ác. linoleico (0,825 µM), ác. oxalacético (66 µM)
<b>48</b>	Meio Basal + ác. ascórbico (213 µM), glutamato (3750 µM)
<b>49</b>	GMEM-S
<b>50</b>	VP-SFM
<b>51</b>	CNJ-SFM 2.1b + IGF-I (20ng/mL)

Para estes experimentos, foram utilizadas células provenientes de um novo inóculo formado a partir de células adaptadas ao meio DMEM/Ham's F12 puro e que permaneceram em cultivo, por uma semana, no meio PFM-LECC12, suplementado com Pluronic F-68 (0,1%), extrato de levedura e as proteínas recombinantes definidas na seção 5.1.

#### 5.4.1 Análise de concentração de células viáveis

Os resultados para a concentração de células viáveis obtidos nos experimentos estão expressos na Figura 7.

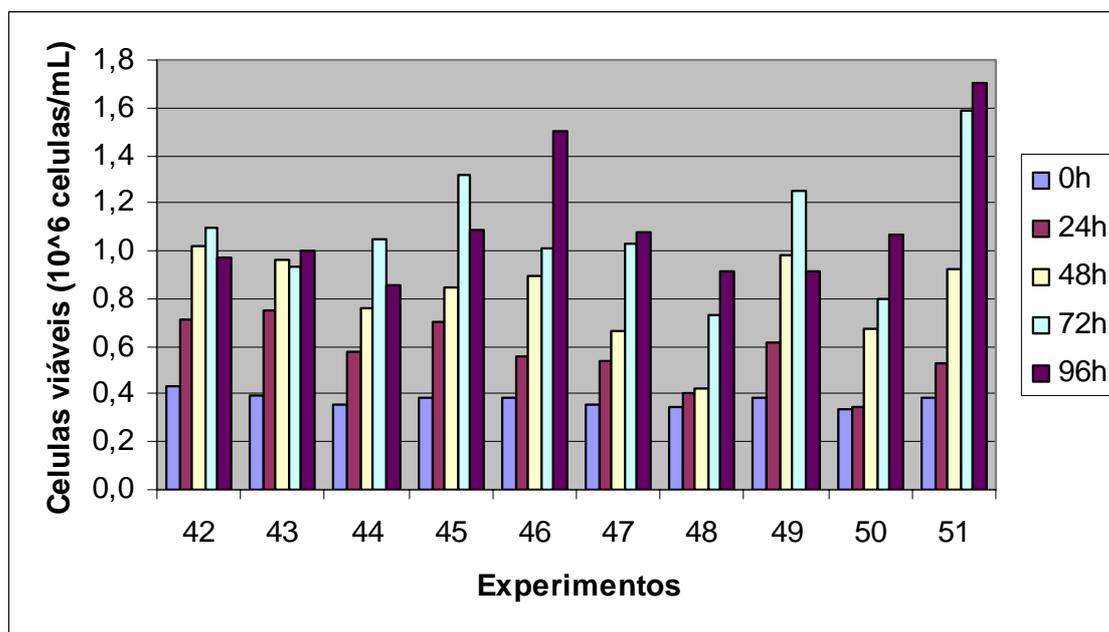


Figura 7 - Comparação de meios selecionados com meios comerciais

Dentre os meios comerciais, o meio de cultivo CNJ-SFM 2.1b (exp.#51) foi o que apresentou o maior crescimento celular, em células viáveis, em 72 e 96 horas ( $1,59$  e  $1,71 \times 10^6$  células/mL), sendo seguido pelo meio GMEM com  $1,24 \times 10^6$  células/mL em 72 horas.

Dentre os melhores meios dos planejamentos, os experimentos 46 (ácido ascórbico e ácido oxalacético) e 45 (Plackett-Burman), apresentaram os melhores resultados para crescimento celular. ( $1,51$  e  $1,32 \times 10^6$  células/mL, respectivamente).

O meio dos experimentos 43, 44, 47 e 48 apresentou crescimento similar ao meio basal (exp.#42). O bom crescimento das células no meio basal atribui-se ao fato de as

mesmas terem sido, em paralelo à condução do trabalho, adaptadas ao crescimento em meio DMEM/Ham's F12.

Na comparação entre os meios que possuem proteínas recombinantes vê-se que o meio contendo transferrina e EGF (exp.#43), proporcionou a manutenção do crescimento por um período maior que o meio contendo apenas transferrina (exp.#44), embora este último tenha proporcionado um maior nível de crescimento celular no tempo de 72 horas.

#### 5.4.2 Análise de geração de lactato

Os resultados obtidos para concentração de lactato em função do tempo estão expressos na Figura 8.

Todos os cultivos apresentaram uma geração de lactato similar, atingindo concentrações consideradas inibitórias entre 72 horas e 96 horas. Apenas o meio CNJ-SFM 2.1b apresentou uma grande geração de lactato. (3,06 g/L em 72 horas).

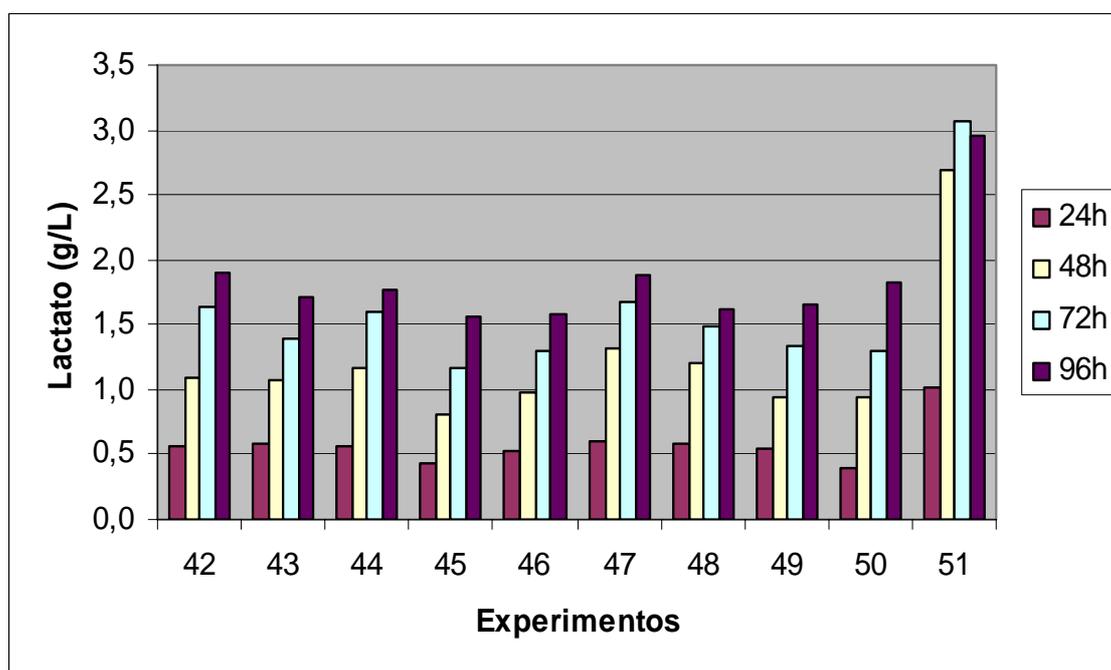


Figura 8- Comparação de meios selecionados com meios comerciais.

Nos meios contendo proteínas recombinantes, pode-se observar uma leve redução da geração de lactato em relação ao meio basal. Esta redução foi mais expressiva para os meios dos experimentos 45 e 46, contendo apenas suplementos não proteicos. Uma

possível razão para tal é que ambos estes meios contêm a presença de ácido oxalacético, o qual, supõe-se neste trabalho, auxiliar na regulação do metabolismo celular.

Determinou-se a taxa específica de geração de lactato utilizando-se o coeficiente angular do gráfico obtido entre produção acumulada de lactato em nmoles e ICV (ALTAMIRANO, 2000).

**Tabela 17 - Taxa específica de geração de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ )**

<b>Experimento #</b>	<b><math>q_{\text{lactato}}</math> (nmol/10<sup>6</sup>célula.h)</b>
<b>42</b>	340
<b>43</b>	339
<b>44</b>	465
<b>45</b>	276
<b>46</b>	360
<b>47</b>	571
<b>48</b>	694
<b>49</b>	323
<b>50</b>	509
<b>51</b>	1041

A partir da análise da Tabela 17, vê-se que os meios 47 (ácido linoléico e ácido Oxalacético) e 48 (ácido ascórbico e glutamato) apresentaram elevadas taxas específicas de geração de lactato, fato este que pode ter se refletido em um crescimento não similar ao observado nos experimentos adicionais.

O meio do experimento 51 (CNJ-SFM 2.1b) que contém IGF-I, apresentou a maior taxa de geração de lactato, explicada pelo expressivo crescimento celular apresentado pelas células neste meio.

A menor concentração de lactato gerada foi observada para o meio do experimento 45, com 1,56 g/L em 96 h, confirmada pela menor taxa específica de produção de lactato, demonstrando a necessidade do uso de combinações de suplementos para uma melhor regulação do metabolismo celular.

A utilização da proteína recombinante transferrina isoladamente (exp.#44) resultou em um aumento na geração de lactato, em relação ao meio basal (exp.#42), o que não ocorreu quando a mesma foi usada em conjunto com EGF (exp.# 43).

### 5.4.3 Análise de consumo de glicose

Os resultados para o consumo de glicose em função do tempo estão expressos na Figura 9.

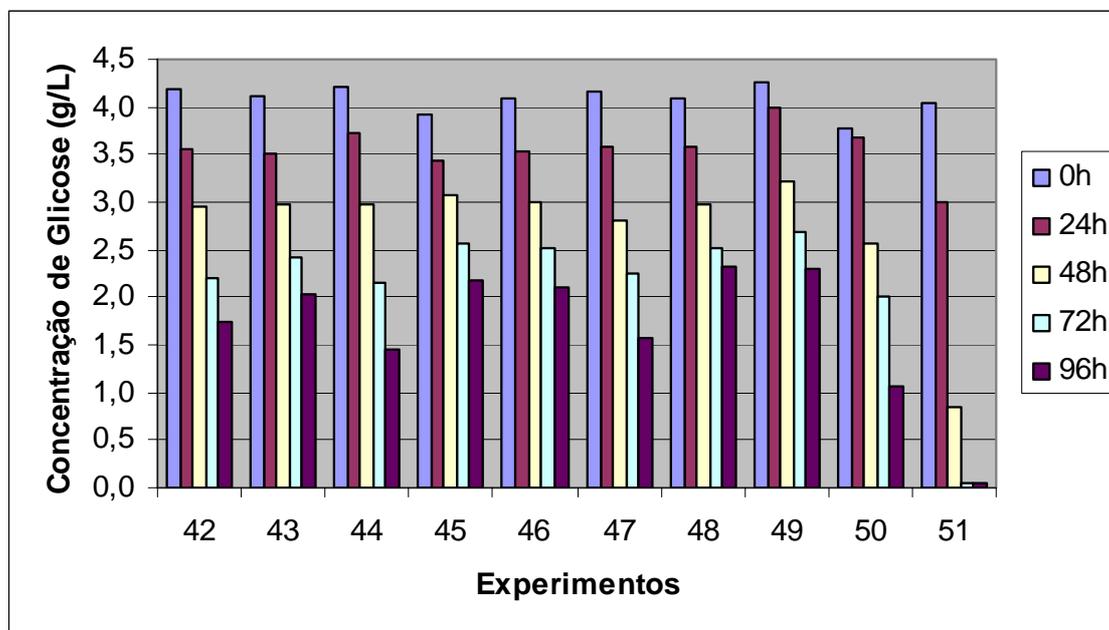


Figura 9 - Comparação de meios selecionados com meios comerciais.

A glicose do meio CNJ-SFM 2.1b foi consumida totalmente em 72 horas, sendo que as células passaram a consumir lactato como fonte de carbono, como pode ser observado no gráfico da Figura 8.

Pode ser observada uma maior regulação do metabolismo, com menor consumo de glicose, para o meio dos experimentos 45 (Plackett- Burman), 46 (ác. ascórbico e ác. oxalacético) e 43 (transferrina e EGF). Os meios 45 e 46, mesmo com um alto crescimento celular, apresentaram uma concentração de glicose residual em torno de 2 g/L.

Calculou-se a taxa específica de consumo de glicose, a partir do coeficiente angular da região linear do gráfico de consumo acumulado de glicose versus ICV (ALTAMIRANO, 2000).

Analisando as taxas específicas mostradas na Tabela 18, observa-se a relação direta com a geração de lactato. Os meios que apresentaram maior consumo de glicose são os meios que possuem as maiores taxas específicas de geração de lactato.

Tabela 18 - Taxa específica de consumo de glicose ( $q_{\text{glicose}}$ )

Experimento #	$q_{\text{glicose}}$ (nmol/10 <sup>6</sup> células.h)	$Y_{\text{lac/glic}}$ (mol/mol)
42	195,6	1,74
43	183,3	1,85
44	248,3	1,87
45	148,9	1,85
46	202,8	1,77
47	299,4	1,91
48	328,9	2,11
49	187,2	1,72
50	341,7	1,49
51	632,8	1,64

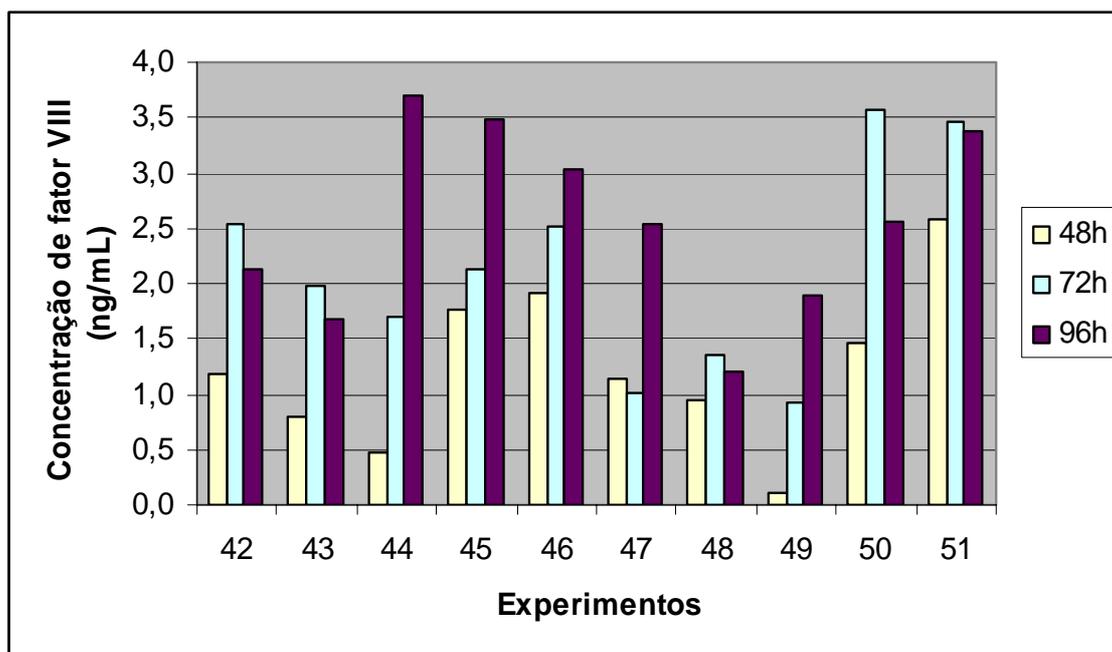
A análise da Tabela 18 confirma a baixa taxa específica de consumo de glicose para o meio do experimento 45 (Plackett-Burman).

O rendimento de glicose em lactato para o experimento 48 foi o maior observado 2,11 mol/mol. Todos os valores foram maiores do que os observados por CRUZ *et al.* (1999), que se situaram em torno de 1,5 mol/mol, para células BHK-21 em crescimento aderente. Isto demonstra que ainda ocorre um consumo excessivo de glicose direcionado para a formação de lactato. Este comportamento poderia estar relacionado com o fato de que, neste trabalho, as células foram adaptadas à suspensão, em meios livres de soro, e os experimentos foram conduzidos sob condições agitadas e maior estresse mecânica. NERMANN & WAGNER (1996), observaram maiores quocientes de rendimento de lactato a partir de glicose, para células BHK cultivadas em meio livre de soro, do que na presença de soro.

#### 5.4.4 Análise de concentração de fator VIII

Para a resposta produção de fator VIII, os resultados estão expressos na Figura 10.

Como pode ser observado na Figura 10, resultados promissores foram obtidos para a produção de fator VIII em relação aos meios comerciais, sendo os maiores valores observados para os meios 44, 45 e 46, com concentrações de 3,69, 3,48 e 3,04 ng/mL, respectivamente. Valores comparáveis foram obtidos para os meios comerciais CNJ-SFM 2.1b (exp.#51), e VP-SFM (exp.#50) (3,46 e 3,58 ng/mL, respectivamente).



**Figura 10 - Concentração de fator VIII para os tempos de 48, 72 e 96h.**

O meio CNJ-SFM 2.1b (exp.#51), devido ao rápido crescimento celular, apresentou um consumo rápido de glicose e geração elevada de lactato, porém também elevada produção de fator VIII. Dentre os meios comerciais os melhores resultados foram obtidos em 72 horas para os meios VP-SFM e CNJ-SFM 2.1b. O meio GMEM-S não se mostrou um bom meio para a produção de Fator VIII.

O meio 44, contendo apenas transferrina, proporcionou um aumento na produção e fator VIII de 72% em relação ao meio basal.

Analisando a razão de fator VIII em função do número de células viáveis, Figura 11, observa-se que as maiores valores foram obtidos para os experimentos 44 (transferrina) e 50 (VP-SFM) (4,33 e 4,46 ng/10<sup>6</sup> células).

O experimento 45 também apresentou uma razão de fator VIII alta em 72 horas, somando-se isto a boa regulação do metabolismo observada anteriormente para este meio.

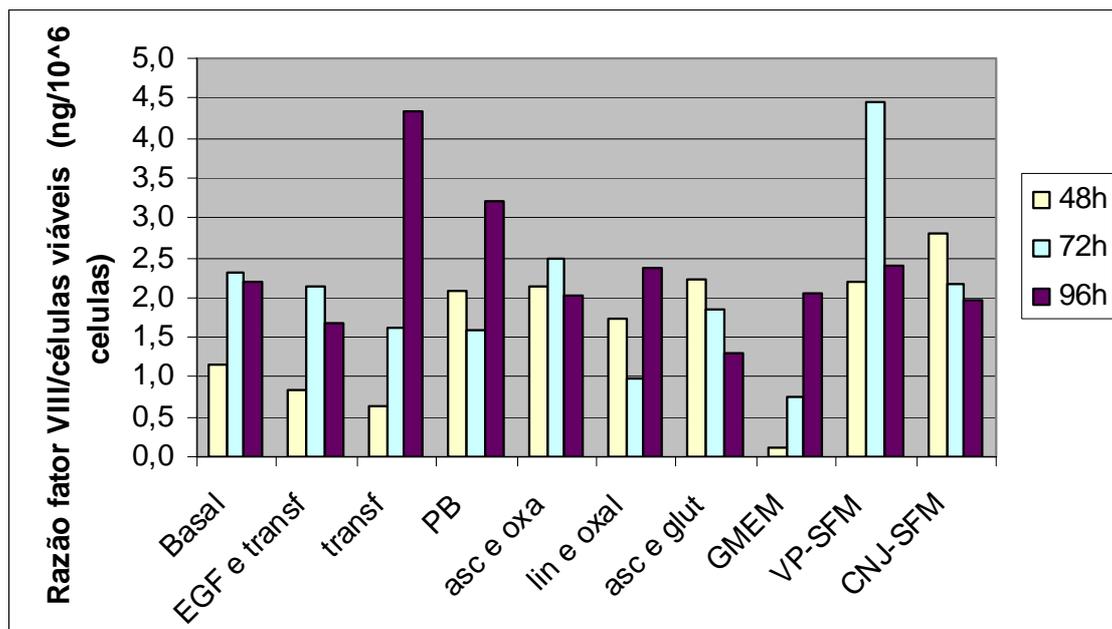


Figura 11 – Razão de fator VIII em função do número de células viáveis para os tempos de 48, 72 e 96 horas

O meio CNJ-SFM2.1b apresentou uma maior razão de fator VIII em 48 horas, em 72 e 96 horas uma produtividade foi comparável ao meio basal PFM-LECC12, demonstrando mais uma vez que o crescimento estável das células pode favorecer a produção de fator VIII.

Para o meio do experimento 44, contendo transferrina, observa-se uma desassociação da produção de fator VIII com o crescimento celular, enquanto nos meios dos experimentos 45 e 46, observa-se o contrário, o aumento da concentração de fator VIII simultaneamente ao aumento da concentração celular.

## 5.5 Considerações finais

Em função dos resultados obtidos, os melhores meios quimicamente definidos para a produção de fator VIII encontrados neste trabalho foram:

### *Meios contendo proteínas recombinantes*

- ✓ Experimento 44, PFM-LECC12 + transferrina (10 mg/L). Este meio foi escolhido, pois apesar da grande geração de lactato, foi o meio que apresentou a maior produtividade específica de fator VIII.

### *Meios livre de proteínas recombinantes*

- ✓ Experimento 45, PFM-LECC12 + ácido ascórbico (71  $\mu\text{M}$ ), ácido linoleico (0,3  $\mu\text{M}$ ), ácido Oxalacético (44 $\mu\text{M}$ ), glutamato (1250  $\mu\text{M}$ ), selenito de sódio (0,1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnSO}_4$  (1 $\mu\text{M}$ ), ácido oleico (17,7  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( 0,5  $\mu\text{M}$ ), hidrocortisona (30  $\mu\text{M}$ ), devido a baixa taxa específica de geração de lactato, a alta concentração celular alcançada, a alta produtividade de fator VIII, e a melhor regulação do metabolismo de consumo de glicose.
- ✓ Experimento 46, PFM-LECC12 + ácido ascórbico (213  $\mu\text{M}$ ), ácido oxalacético (66  $\mu\text{M}$ ), também devido à baixa taxa específica de geração de lactato, a alta concentração celular alcançada e a alta produtividade de fator VIII;

### 5.5.1 Avaliação de custo

Foi realizada uma avaliação de custo adicional, por litro de meio de cultivo, para os três melhores meios definidos neste trabalho, esta avaliação esta apresentada na Tabela 19.

Tabela 19 - Custo adicional por litro dos suplementos para os experimentos 44, 45 e 46.

	Custo R\$/L		
	44	45	46
Ácido Ascórbico	-	0,01	0,03
Ácido Linoleico	-	0,76	-
Ácido Oxalacético	-	0,19	0,29
Glutamato	-	0,05	-
Selenito de Na	-	0,00006	-
ZnSO <sub>4</sub>	-	0,00013	-
Acido Oleico	-	122,99	-
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	-	0,000004	-
Hidrocortisona	-	0,00875	-
Tranferrina	18,90	-	-
<b>Custo suplementos (R\$/L)</b>	<b>18,90</b>	<b>124,02</b>	<b>0,32</b>
<b>Suplementos PFM-LECC12</b>	<b>0,51</b>	<b>0,51</b>	<b>0,51</b>
<b>Pluronic F68</b>	<b>0,63</b>	<b>0,63</b>	<b>0,63</b>
<b>Custo adicional (R\$/L)</b>	<b>20,04</b>	<b>125,16</b>	<b>1,46</b>

A transferrina por se tratar de uma proteína recombinante apresenta um custo elevado contribuindo com 94% do custo adicional do meio 44.

No meio do experimento 45, o valor do custo adicional por litro de meio ficou concentrado quase totalmente no custo do suplemento ácido oléico, sendo que este contribui com 98% do custo final dos suplementos. Já o meio do experimento 46, apresentou um baixo custo adicional por litro, fato este decorrente da utilização de apenas dois suplementos.

## 6. CONCLUSÕES e SUGESTÕES

A busca por novos componentes para a suplementação de meios para o cultivo de células animais é um trabalho laborioso. A complexidade dos meios está relacionada ao grande número de suplementos que os compõem, sendo que inúmeras interações podem ocorrer entre os mesmos.

Para as células BHK (ATCC CRL 8544) produtoras de fator VIII utilizadas neste trabalho, foi possível identificar alguns componentes que fazem parte de três meios de cultivo que se mostraram promissores para o uso na produção desta proteína.

São estes, o meio 44, contendo transferrina (10mg/L); o meio 45, contendo a combinação de ácido ascórbico (71  $\mu$ M), ácido linoleico (0,3  $\mu$ M), ácido oxalacético (44  $\mu$ M), glutamato (1250  $\mu$ M), selenito de sódio (0,1  $\mu$ M), sulfato de zinco (1  $\mu$ M), ácido oleico (17,7  $\mu$ M), sulfato de cobre (0,05  $\mu$ M) e hidrocortisona (7,5  $\mu$ M); e o meio 46, contendo ácido ascórbico (213  $\mu$ M) e ácido oxalacético (66  $\mu$ M).

É importante salientar que estes resultados não são definitivos. A adaptação de células ao crescimento em meios quimicamente definidos é contínua, o que pode proporcionar um aumento ainda maior na formação de produto. Sendo assim, para que se tenha um resultado final, é importante que estas células continuem sendo cultivadas nestes meios para que se avalie a estabilidade do cultivo.

A combinação destes meios em novos planejamentos pode ser testada para se verificar outras interações entre os suplementos.

Para os experimentos que se seguirem, se faz importante um maior estudo em relação ao metabolismo específico das fontes de carbono e também das fontes de nitrogênio, que não foram avaliadas neste trabalho.

Outros metabólitos tóxicos também podem causar inibição do crescimento, como o acúmulo de amônia e certos aminoácidos, por isso é importante a avaliação do consumo e produção destes componentes no meio.

A análise de glicosilação da proteína final pós-produção também deve ser um parâmetro de controle a ser avaliado em experimentos futuros.

Não foi possível comparar a produção de fator VIII com outros trabalhos pela falta de referências na literatura. Devido ao número reduzido de empresas que produzem fator VIII estes dados são sigilosos. Os dados encontrados são referentes à atividade de fator VIII, outra variável de resposta que deve ser avaliada, pois além do aumento na produção, é necessário também que a proteína esteja sendo produzida em sua forma

ativa. Entretanto, para que a atividade possa ser medida, é importante a definição de um método analítico reprodutível e robusto.

Outro passo interessante para continuidade das pesquisas seria a utilização destes meios para cultivos em biorreator. Sugere-se a utilização de meios que promovem um bom crescimento (meio 46) para a fase inicial do crescimento, sendo que, a partir do momento que as células alcancem o final da fase exponencial, seja utilizado meios que proporcionaram uma maior produção de fator VIII (meio 44, por exemplo).

A utilização de planejamentos fatoriais, para a escolha de suplementos significativos para as variáveis de resposta desejadas, é uma ferramenta importante na racionalização da quantidade de experimentos, reduzindo o tempo de bancada. No entanto, é uma ferramenta que deve ser utilizada com cuidado. Antes de se iniciar o trabalho de planejamento, é necessário que se determine todas as fontes de erro que podem estar envolvidas nas etapas do processo, que neste caso vão desde o preparo do banco de trabalho de células, crioconservação, descongelamento, preparação do inóculo, preparo dos meios, contagem celular e métodos analíticos utilizados para análise dos resultados.

Este passo é importante, pois mapeia e restringe todas as possibilidades de erro que podem influenciar no processo e nas respostas das análises, podendo interferir nos resultados dos planejamentos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTAMIRANO, C., 2000, “*Análisis del Metabolismo de Celulas CHO recombinantes y desarrollo de estrategias de cultivo en medios definidos*”, Tese de doutorado apresentada ao Departament d'Enginyeria Química, da Escola Técnica Superior d'Enginyeria, da Universitat Autònoma de Barcelona.
- ALTAMIRANO, C., PAREDES, C., CAIRO, J. J., GÒDIA, F., 2000, “Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose e glutamine”, *Biotechnology Progress*, v.16, pp.69-75.
- ALTAMIRANO, C., GÒDIA, F., CAIRÓ, J. J., 2008, “Metabolismo de células de mamíferos cultivadas *in vitro*”. In: Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R. (eds), *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*, 1 ed., capítulo 4, São Paulo: Editora Roca.
- BERNTORP, E., 2004, “Viral safety measures of recombinant factor VIII products”, *Journal of Hematology*, v. 89, pp. 3-7.
- BHATTACHARYYA, M. S., SINGH, J., SONI, P., BANERJEE, U.C., 2003, “*Recombinant Factor VIII for Haemophilia - An Overview of Production Technologies*”, National Institute of Pharmaceutical Education and Research, CRIPS 4, nº 3, pp.2-8.
- BOEDEKER, B.G.D., 1992, “The Manufacturing of the Recombinant Factor VIII – Kogenate”, *Transfusion Medicine Reviews*, v. 4, nº 4, pp. 256-260.
- BURGENER, A., BUTLER, M., 2006, “Medium Development”. In: In: Ozturk, S.S., Hu, W., (Eds) *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and cell-based Therapies*, capítulo 3, New York Taylor e Francis.
- BUTLER, M., HUZEL, N., BARNABÉ, N., 1997, “Unsaturad fatty acids enhance cell yields and perturb the energy metabolism of antibody-secreting hybridoma”, *Journal of Biochemistry*, v. 322, pp. 615-623.

- BUTLER, M., HUZEL, N., BARNABÉ, N., GRAY, T. BAJNO, L., 1999, “Linoleic acid improves the robustness of cells in agitated cultures”, *Cytotechnology*, v.30, pp. 27-36.
- BUTLER, M., 2004, “The glycosilation of proteins in cell culture”. In: Butler, M., *Animal Cell Culture e Technology*, 1 ed., capítulo 7, Londres e Nova York: Editora Taylor e Francis, 2004.
- BUTLER, M., 2008, “Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes”. In: Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R. (eds), *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*, 1 ed., capítulo 6, São Paulo: Editora Roca.
- CASTILHO, L.R., 2001, “*Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells*”. Ph.D. thesis, Fortschritt-Berichte VDI, Düsseldorf: VDI Verlag, Alemanha.
- CASTILHO, L. R., CAVALCANTI, J. M., OLIVEIRA, A. M., PACHECO, G. J., FREIRE, D. M. G., 2006, “Formulações de meios de cultivo isentos de soro animal quimicamente definidos e de meios de cultivo isentos de proteínas e de componentes de origem animal”, Pedido de Patente ao INPI: Privilégio e Inovação nº PI 06016553.
- CGEE, 2006, “*Hemoderivados*”. In: Relatório: Centro de Gestão de Estudos Estratégicos, Rio de Janeiro.
- CHAN, S.Y., HARRIS, K., 2001 “Preparation of recombinant factor VIII in a protein free medium”, Patente norte Americana nº US 6171825B1.
- CRUZ H. J., FERREIRA A. S., FREITAS C.M., MOREIRA J. L., CARRONDO M. J., 1999, “Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 51: pp. 579 – 585.

- DOYLE, A., GRIFFITHS, J.B., 1998, "The cell: selection and standardization". In: Doyle, A., Griffiths, J.B. (eds), *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*, capítulo 3: Cultured Environment, New York, John Wiley & Sons.
- EAGLE, H., 1955, "Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture", *Science* v.122, pp. 501-504.
- FBH, 2009, "Federação Brasileira de Hemofilia, O que é Hemofilia?". Disponível em: <http://www.hemofiliabrasil.org.br/index.php?pg=hemofilia>, Acessado em 20/01/2009.
- FRANCO, R., F., 2001, "Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise". *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 34, pp. 229-237.
- GARBER, K., 2000, "r-Factor VIII deficit questioned", *Nature Biotechnology*, v. 18, pp. 1133.
- GENZEL, Y., RITTER, J. B., KÖNIG, S., ALT, R., REICHL, U., 2005, "Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells", *Biotechnology Progress*, v.21, pp.58-69.
- HAM, R. G., 1964, "Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium", *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 53(2), pp. 288-293.
- HEMOFILIA BRASIL, 2007, "O que é Hemofilia?", Disponível em: <http://hemofilia.sites.uol.com.br/hemo.htm>. Acessado em 01/10/2007.
- HOYER, L.W., 1994, "Hemophilia A", *New England Journal of Medicine*; v. 330, pp. 38-47.
- HU, W. S., AUNINS, J. G., 1997, "Large-scale mammalian cell culture", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 8, pp. 148-153.

INVITROGEN, 2009, “VP-SFM”, Disponível em:

<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3918%20VP%20SFM.pdf>,

Acessado em 20/02/2009.

KIM, D. Y., LEE, J. C., CHANG, H.N., OH, D. J., 2006, “Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody”, *Enzyme and microbial technology*, v. 39, pp. 426-433.

KURANO, N., LEIST, C., MESSI, F., KURANO, S., FIECHTER, A., 1990, “Growth behavior of chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor”, *Journal of Biotechnology*, v.15, pp. 113-128.

LEE, G.M., KIM, E.J., KIM, N.S., YOON, S.Y., AHN, Y.H., SONG, J.Y., 1999, “Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design”. *Journal of Biotechnology*, v.69: pp. 85-93.

LIU, C. H., CHANG T. A., 2006, “Rational development of serum-free medium for chinese hamster ovary cells”, *Process Biochemistry*, v. 41, pp. 2314-2319.

LUBINIECKI, A.S., 1998. “Historical reflections on cell culture engineering”, *Cytotechnology*, v. 28, pp. 139-145.

MANNUCCI, P. M., 2003, “Hemophilia: treatment options in the twenty-first century”, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.1, pp. 1349–1355

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008, “*Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2007*”, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada – Brasília: Editora do Ministério da Saúde.

MORAES, A. M., MENDONÇA, R. Z., SUAZO, C. A. T., 2008, “Meios de Cultura para Células Animais”. In: Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R. (eds),

*Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*, 1 ed., capítulo 5, São Paulo: Editora Roca.

NEERMAN, J., WAGNER, R., “Comparative analyses of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells”, *Journal of cellular physiology*, v.166, pp.152-169.

NELSON, L.D., COX, M.M., 2000, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ªed., New York, New York.

NILSSON, H. B., BOORK, S., 1999, “Cell cultivation method and medium”, Patente norte americana nº 5888815A.

NOVOZYMES, 2009, Recombinant human transferrin. Disponível em:

<http://www.novozymes.com/en/MainStructure/Biopharma/Products/Recombinant+products/Transferrin/>. Acessado em 20/01/2009.

NUNES, C., “Hemofilia”, Disponível em: <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/hemofilia.htm>. Acessado em 20/01/2009.

OZTURK S.S., 2006, “Cell Culture Technology- An Overview”, In: Ozturk, S.S., Hu, W., *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and cell-based Therapies*, capítulo 1, New York: Taylor & Francis.

PARAMPALI, A., ESKRIDGE, K., SMITH, L., *et al.*, 2007, “Development of serum-free media in CHO-DG44 cells using a central composite statistical design”, *Cytotechnology*, v. 54, pp.57-68.

PINTO, R. C. V., 2007, “*Separação de células CHO utilizando Hidrociclones*”, Tese Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, Brasil.

- RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F., 2005, “*Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos*”, 1ed., Campinas, São Paulo, Editora Casa do Pão.
- ROSENTHAL, M. D., 1987, “Fatty acids metabolism of isolated mammalian cells”, *Progress in Lipid Research*, 26: pp. 87-124.
- REITERS, M., MUNDT, W., DORNER, F., 2005, “Recombinant cell clones having increased stability and methods of making and using de same”, Patente US6936441B2.
- SCHRÖDER, M., MATISCHAK, K., FRIEDL, P., 2004, “Serum- and protein free media formulations for the chinese hamster ovary cell line DUKXB11”, *Journal of Biotechnology* v.108, pp. 279-292.
- SHIBUYA, K., ATSUMI, M., TSUNAKAWA, S., *et al.*, 2002, “Serum-free medium for culturing animal cells”, Patente norte americana US 6406909B1.
- SINACORE, M. S., DRAPEAU, D., ADAMSON, S. R., 1999, “Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media”, In: Jenkins, N. (eds), *Animal Cell Biotechnology – Methods and Protocols*, 1 ed., capítulo 2, New Jersey: Humana Press.
- STACEY, G., 2000, “Animal cell types, cell lines used in manufacture of biological products”. In: Spier, R. E. (eds), *Encyclopedia of cell technology*, John Wiley & Sons, New York.
- TSAO, Y. S., GOULD, S. L., ROBINSON, D. K., 2000, “Animal cell culture media”, In: Spier, R. E. (eds), *Encyclopedia of Cell Technology*, John Wiley & Sons, New York.
- WURM, F. M., 2004, “Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells”, *Nature Biotechnology*, v. 22, n 11, pp. 1393-1398.