UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produção do fator VII da coagulação sanguínea recombinante em
células humanas**

Tárik Reis Heluy

Ribeirão Preto

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produção do fator VII da coagulação sanguínea recombinante em
células humanas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e
Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientado: Tárík Reis Heluy

Orientadora: Profa. Dra. Kamilla Swiech
Antonietto

Ribeirão Preto

2020

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

Heluy, Tárík Reis

Produção do fator VII da coagulação sanguínea recombinante em células humanas. Ribeirão Preto, 2020.

109 f.: il.; 30cm.

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

Orientadora: Kamilla Swiech Antonietto

1. Células humanas. 2. Proteína recombinante. 3. Otimização
Ribeirão Preto.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tárik Reis Heluy

Produção do fator VII da coagulação sanguínea recombinante em células humanas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e
Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientadora: Kamilla Swiech Antonietto

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais

Danusa e Nicolau

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por todas as oportunidades e coisas boas;

Agradeço a minha família, por todo o suporte e carinho e por serem meu exemplo em muitas questões;

Agradeço a Kamilla, por ter me aceito para o grupo de pesquisa e por toda sua orientação, confiança paciência e dedicação ao longo desses dois anos e meio de mestrado;

Agradeço a Hariff por todo o carinho e paciência durante essa etapa da minha vida;

Agradeço aos amigos do LATECCEL, Robson, Marlon, Natália, Mariane, Matehus, Luciano por todo o companheirismo e ajuda;

A todos os funcionários e técnicos da FCFRP e Hemocentro de Ribeirão Preto pelo suporte e confiança;

Ao Rafael, que me ensinou muita coisa durante o mestrado;

Ao Mário, por todo suporte para os experimentos;

A Pós-Graduação do programa de Biociências e Biotecnologia;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo fomento da pesquisa e por todo o suporte Código de inanciamento 001"

RESUMO

HELUY, T. R. **Produção do fator VII da coagulação sanguínea recombinante em células humanas**. 2020. 109f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A maioria das proteínas terapêuticas recombinantes complexas são produzidas em células de mamíferos, principalmente células CHO. Apesar de apresentarem uma capacidade de expressar proteínas com modificações pós-traducionais (MPTs) similares à humana, essas células podem expressar padrões de glicosilação que são imunogênicos para seres humanos. Nesse sentido, as linhagens celulares humanas surgem como um sistema de expressão promissor, principalmente pela capacidade de produzir proteínas com glicosilação mais próxima ao organismo humano. Este trabalho tem como objetivo analisar a capacidade de quatro linhagens celulares humanas para produção de fator VII recombinante da coagulação sanguínea humana (FVIIr), proteína terapêutica utilizada no tratamento de pacientes hemofílicos que desenvolveram inibidores contra o fator IX (FIX) ou fator VIII (FVIII) da coagulação, em suspensão em meios livres de soro fetal (SFB). As linhagens celulares humanas SK-Hep-1, HKB-11, HEK293SF e Huh-7 foram cultivadas em *erlenmeyers* (150 rpm, 5% de CO₂, 37°C) para comparação do potencial de expressão de FVIIr e atividade biológica dessa proteína. Foi possível observar no sobrenadante de 48h, por meio de ELISA, uma concentração de 148,5 ng/mL, 172,5 ng/mL, 72,3 ng/mL e 32 ng/mL, respectivamente, para as células SK-Hep-1, HKB-11, Huh-7. A atividade biológica foi conferida por meio de TP, onde foram obtidos valores de 3,6 UI/mL, 3,15 UI/mL, 0,72 UI/mL e 0 UI/mL para as células SK-Hep-1, HKB-11, Huh-7 e HEK293SF, respectivamente. A célula HKB-11 foi escolhida para a etapa seguinte do trabalho, que envolveu a suplementação com vitamina K em duas diferentes concentrações, 1,0 e 2,5 µg/mL, visando o aumento tanto da expressão quanto da atividade biológica do FVIIr. Foi possível observar que o aumento da concentração de vitamina K no meio de cultura não influenciou o crescimento e metabolismo celular de maneira significativa quando comparados ao controle (sem vitamina), entretanto, os resultados obtidos para expressão e atividade biológica foram superiores para a célula cultivada em 1,0 µg/mL em relação àquela cultivada em 2,5 µg/mL. Um delineamento experimental do tipo Box-Behnken, com quatro fatores (ácido cítrico, butirato de sódio (NaBu), glutatona reduzida (GSH) e temperatura de cultivo) e 27 ensaios foi executado em tubos minibioreator (180 rpm, 5% de CO₂, 37°C) tendo como objetivo o aumento da expressão de FVIIr e da produtividade específica (q_{FVIIr}). Dois modelos matemáticos significativos foram obtidos com o delineamento experimental e a partir da função desejabilidade, foi possível determinar os valores de 2 mM de NaBu, 2,5 mM de GSH e 34°C como condições ótimas para obtenção de 1 µg/mL de FVIIr e produtividade específica de 7 ng/10⁶células/h, valores bastantes significantes quando comparados a diversos trabalhos presentes na literatura.

Palavras-chave: linhagens celulares humanas, hemofilia, fator VII da coagulação, metabolismo celular, vitamina K, otimização

ABSTRACT

HELUY, T. R. **Production of recombinant blood coagulation factor VII in human cell lines**. 2020. 109f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Most complex recombinant therapeutic proteins are produced in mammalian cells, mainly CHO cells. Despite having an ability to express complex proteins with post-translational modifications (PTMs) similar to humans, these cells can express glycosylation patterns that are immunogenic for humans. In this sense, human cell lines appear as a promising expression system, mainly due to the ability to produce proteins with glycosylation closer to the human organism. This work aims to analyze the capacity of four human cell lines to produce recombinant human blood coagulation factor VII (rFVII), a therapeutic protein used in the treatment of hemophiliac patients who have developed inhibitors against factor IX (FIX) or factor VIII (FVIII) of coagulation, in serum-free suspension culture conditions (SFM). The human cell lines SK-Hep-1, HKB-11, HEK293SF, and Huh-7 were grown in Erlenmeyer (150 rpm, 5% CO₂, 37°C) to compare the FVIIr expression potential and biological activity. It was possible to observe a concentration of 148.5 ng/mL, 172.5 ng/mL, 72.3 ng/mL and 32 ng/mL in the 48h supernatant, respectively, for SK-Hep cells -1, HKB-11, Huh-7. The biological activity was checked using TP, where values of 3.6 IU/mL, 3.15 IU/mL, 0.72 IU/mL, and 0 IU/mL were obtained for SK-Hep-1, HKB -11, Huh-7 and HEK293SF cells, respectively. The HKB-11 cell was chosen for the next step of the work, which involved supplementation with vitamin K in two different concentrations, 1.0 and 2.5 µg/mL, aiming an increasing both the expression and the biological activity of the expressed FVIIr. It was possible to observe that the increase in the concentration of vitamin K in the culture medium did not significantly influence cell growth and metabolism when compared to the control (without vitamin), however, the results obtained for expression and biological activity were superior for the cultured cell at 1.0 µg / mL compared to that grown at 2.5 µg / mL. A Box-Behnken experimental design, with four factors (citric acid, sodium butyrate (NaBu), reduced glutathione (GSH) and culture temperature) and 27 runs was performed in mini-bioreactor tubes (180 rpm, 5% CO₂, 37°C) aiming an increasing FVIIr expression and specific productivity (qFVIIr). Two significant mathematical models were obtained with the experimental design and from the desirability function, it was possible to determine the values of 2 mM NaBu, 2.5 mM GSH and 34°C as optimal conditions to obtain 1 µg/mL of FVIIr and specific productivity of 7 ng/10⁶ cells/h, very significant values when compared to several studies presents in literature.

Keywords: human cell lines, hemophilia, coagulation factor VII, cell metabolism, vitamin K, optimization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Principais sistemas de expressão para produção de glicoproteínas.....	3
Figura 1.2 Principais vias metabólicas utilizadas em células de mamífero. A glicose, glutamina e outros aminoácidos são as principais fontes de energia para o crescimento celular. Os principais metabólitos gerados a partir dessas vias são o lactato e o amônio.....	10
Figura 1.3 DCCR (a) para 3 fatores com 15 experimentos e DBB (b) para 3 fatores com 13 experimentos.....	15
Figura 1.4 Representação da estrutura do FVIIa humano da coagulação sanguínea. Os domínios dessa serina peptidase estão representados juntamente com suas respectivas modificações pós-traducionais. A cadeia leve contém os domínios Gla e EGF1/EGF2. Gla apresenta 10 resíduos de γ -Carboxilação. A cadeia leve está conectada a cadeia pesada através de uma ligação dissulfeto.....	20
Figura 1.5 Ciclo da vitamina K.....	22
Figura 3.1 Esquema da modificação gênica das células de maneira estável, realiza pelo Dr. Rafael Biaggio, utilizando vetores lentivirais: p1054-FVII contendo o transgene, pCMV Δ R 8.91 e o pMD2.VSV-G. Após dois ciclos de transdução com MOI=1 e 2, as células passaram por um processo de <i>Sorting</i> , visando a seleção de uma população GFP positiva mais homogênea.....	25
Figura 3.2. Tubo Mini Biorreator de 50 mL (Corning®) utilizado para os ensaios de otimização.....	32
Figura 4.1 Avaliação do crescimento e viabilidade das células SK-Hep-1 (a), HKB-11 (b), 293SF (c) e Huh-7 (d) durante 72h de cultivo em meios livres de SFB na ausência de vitamina K e com diferentes concentrações de vitamina K (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 μ g/mL), em placas de 6 poços sob agitação orbital de 150rpm, 37°C e 5% CO ₂ (n=3)	37
Figura 4.2 Análise da influência de diferentes concentrações de vitamina K (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 μ g/mL) sobre a ICV das células SK-Hep-1 (a), HKB-11 (b), 293SF (c) e Huh-7 (d). A barra contendo o símbolo * indica diferença significativa entre as médias ($p < 0.005$). Ausência de barra ou ns (não-significativo), indica que não há diferença estatística significativa ($p > 0.005$).	41
Figura 4.3 Quantificação de FVIIr por ELISA e FVIIr ativo (FVIIra) por PT para os sobrenadantes das células SK-Hep-1, Huh-7, HKB-11 e 2893SF em 48h de cultivo (n=3). Barra contendo o símbolo * indica que houve diferença significativa entre as médias e ns (não-significativa) indica que estatisticamente não houve diferença (ANOVA ONE-WAY com teste <i>post-hoc</i> de Tukey).....	43

Figura 4.4 Perfis de crescimento e metabolismo da célula HKB-11 cultivada em meio CDM4CHO em três condições distintas: sem vitamina K (a), contendo 1,0 µg/mL (b) e 2,5 µg/mL de vitamina K (c). Curvas de crescimento e viabilidade, consumo de glicose e produção de lactato, concentração de glutamina e produção de amônio (n=3)	48
Figura 4.5 Lactato oxidado para piruvato, catalisado pela enzima Lactato Desidrogenase (LDH), levando a redução de NAD ⁺ em NADH. Reação totalmente reversível.....	49
Figura 4.6 Comparação da produção de FVIIr total e FVIIr ativo pela célula HKB-11 cultivada em meio CDM4CHO na concentração de 1,0 µg/mL de vitamina K (a) e 2,5 µg/mL de vitamina K (b). Asterisco indica diferença significativa entre as médias (p<0,05) e ns indica que não houve diferença significativa (n=3)	56
Figura 4.7 Representação gráfica dos resultados obtidos para cada ensaio do DBB e para os ensaios controles, representados pela letra C. Os gráficos estão divididos para cada temperatura e variável resposta: concentração de FVIIr (ng/mL) a 31°C (a), 34°C (b) e 37°C (c), q _{FVIIr} (ng/10 ⁶ cel/h) a 31°C (d), 34°C (e) e 37°C (f)	61
Figura 4.8 Avaliação do crescimento e viabilidade para os ensaios do DBB pelo método de exclusão de azul de tripan. O primeiro gráfico (a) representa a concentração de células viáveis durante o cultivo e o segundo representa a viabilidade (b) para cada ensaio (n=1)	63
Figura 4.9 Avaliação da influência da temperatura de cultivo no crescimento e viabilidade para os controles do DBB (n=3)	64
Figura 4.10 Avaliação da atividade específica dos ensaios com alta produção de FVIIr do DBB por meio de TP. C31, C34 e C37 representam os controles realizados a 31°C, 34°C e 37°C, respectivamente (n=1)	66
Figura 4.11 Valores experimentais <i>versus</i> valores preditos para as variáveis respostas q _{FVIIr} (a) e FVIIr (b)	71
Figura 4.12 Diagrama de Pareto para as respostas q _{FVIIr} (a) e FVIIr (b).....	72
Figura 4.13 Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta q _{FVIIr} (ng/10 ⁶ cel/h) em função da concentração de ácido cítrico e NaBu (a,d), da concentração de ácido cítrico e temperatura (b, e) e da concentração de NaBu e temperatura (c, f).....	74
Figura 4.14 Perfis de predição e função desejabilidade para as respostas q _{FVIIr} e FVIIr.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Resumo das principais características dos sistemas de expressão utilizados para produção de proteínas terapêuticas recombinantes.....	2
Tabela 1.2 Fatores da Coagulação Sanguínea Humana e suas principais Modificações Pós-Traducionais.....	18
Tabela 3.1 Matriz para o DBB contendo quatro variáveis independentes.....	29
Tabela 3.2 Valores utilizados no DBB para as quatro variáveis estudadas....	30
Tabela 4.1 Produção de FVIIr em células de mamífero.....	44
Tabela 4.2 Parâmetros de crescimento e metabólicos das células HKB-11 cultivadas em meio CDM4CHO com diferentes concentrações de vitamina K.....	51
Tabela 4.3 Matriz com os valores obtidos para as respostas FVIIr e q_{FVIIr} em cada ensaio realizado do delineamento experimental Box-Behnken.....	60
Tabela 4.4 Coeficientes de Regressão para a resposta q_{FVIIr}	68
Tabela 4.5 Coeficientes de Regressão para a resposta FVIIr (ng/mL)	69
Tabela 4.6 Análise de Variância para a concentração de FVIIr e produtividade específica.....	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ	velocidade específica de crescimento
$\mu_{\max}$	Velocidade específica máxima de crescimento
Am	Amônio
$Am_{\max}$	Concentração máxima de amônio
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosine trifosfato
BHK	Células de Hamster Bebê, do inglês “Baby Hamster Kidney”
CAP	CEVEC’s Amniocyte Production
CD293	Meio de Cultura CD 293-AGT
CDM4CHO	Meio de cultura CDM4CHO
CIRP	Cold inducible RNA-binding proten
CO ₂	Dióxido de Carbono
DCCR	Dlineamento compost central rotacional
DDB	Delineamento Box-Behnken
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPB	Delineamento Plackett-Burman
ELISA”	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês “Enzyme Linked Immune Sorbent Assay”
EMA	Agência de Medicamentos Europeus, do inglês “European Medicins Agency”

EPO	Eritropoietina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Órgão Controlador de Medicamentos e Gêneros Alimentícios, do inglês “Food and Drug Administration”
FII	Protrombina
FIXa	Fator IX da coagulação ativo
FIXr	Fator IX recombinante da coagulação sanguínea
FT	Fator Tecidual
FV	Fator V da coagulação
FVa	Fator V da coagulação ativo
FVIIIr	Fator VIII recombinante da coagulação sanguínea
FVIIra	Fator VII recombinante ativo
FVIIrh	Fator VII recombinante da coagulação sanguínea humana
FVW	Fator de Von-Wildebrant
FX	Fator X da coagulação
FXa	Fator X da coagulação ativo
FXI	FXI da coagulação
GCCX	Glutamil-carboxilase
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GL	Graus de liberdade
Gla	Ácido gama-carboxiglutâmico
glc	Glicose
GlcNAc N-	N-acetilglucosamina

Glu	Ácido glutâmico
GSH	Glutathione reduzida
GSR	Glutathione-dissulfeto reductase
GSS	Glutathione sintetase
GSSG	Glutathione na forma oxidada
HEK	Human embryonic kidney
HeLa	Adenocarcinoma de cervix retirado da paciente Henrietta Lacks
HepG2	Human Hepatocellular carcinoma
HT-1080	Célula derivada de fibrosarcoma humano
k_d	Taxa específica de morte
lac	Lactato
LACmax	Concentração máxima de lactato
MOI	Multiplicity of infection
NaBu	Butirato de sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OGM	Organismo geneticamente modificado
pcd	Pmol/cel/dia
PEI	Polietilenimina
PER.C6	Human Embryonic Retinoblast Cells
PYC-2	Piruvato-carboxilase citosólica de levedura
q_{FVII}	Produtividade específica de FVII
QM	Quadrado médio
RNA	Ácido ribonucleico

SFB	Soro fetal bovino
SQ	Soma dos quadrados
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TP	Tempo de Protrombina
VKOR	Vitamina K epóxido redutase
X _{max}	Máxima concentração de células viáveis
Y _{lac/glc}	Fator de conversão glicose lactate
α -Gal	Epítopo Galα1-3Galβ1-(3)4glcnac

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistemas de expressão para proteínas recombinantes terapêuticas	1
1.2. Linhagens celulares humanas	5
1.3. Condições de cultivo para células humanas	8
1.4. Metabolismo de células animais	9
1.5. Otimização da produção de proteínas recombinantes	13
1.6. Hemofilias e fatores da Coagulação	16
1.6.1 Fator VII da coagulação sanguínea humana: estrutura e função	19
1.6.2 Gama-carboxilação e ciclo da Vitamina K	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Linhagens celulares humanas	24
3.2. Meios de Cultura livres de SFB	25
3.3. Criopreservação e descongelamento de células	26
3.4. Condições de cultivo	26
3.5. Avaliação da citotoxicidade da vitamina K nas linhagens celulares humanas	27
3.6. Avaliação do potencial de expressão de FVIIr pelas linhagens celulares humanas	27
3.7. Adaptação da célula HKB-11 para crescimento em meio CDM4CHO contendo 2,5 µg/mL vitamina K	27
3.8. Cinéticas de crescimento da célula HKB-11 em diferentes condições para avaliação do metabolismo	28
3.9. Otimização da expressão de FVIIr utilizando um delineamento experimental do tipo Box-Behnken	28
3.9.1 Preparo das Soluções para otimização	30
3.9.2 Ensaios de Otimização da expressão de FVIIr em tubos Mini Biorreator	31
3.10. Métodos Analíticos	32
3.10.1 Análise da concentração e viabilidade celular	32
3.10.2 Determinação da atividade biológica por Tempo de Protrombina (TP)	32
3.10.3 Determinação da produção de FVIIr através de ELISA	33
3.10.4 Determinação das concentrações de glicose, glutamina, lactato e amônio nos sobrenadantes dos cultivos da célula HKB-11	33
3.11. Análise dos Resultados	34
3.11.1 Cálculo da velocidade específica máxima de crescimento e tempo de duplicação	34

3.11.2	<i>Cálculo da Integral de Células Viáveis</i>	34
3.11.3	<i>Cálculos das velocidades específicas de consumo e produção pela célula HKB-11 em meio CDM4CHO</i>	35
3.11.4	<i>Cálculos dos Fatores de Conversão</i>	35
3.11.5	<i>Análise estatística</i>	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1.	Citotoxicidade da Vitamina K.....	37
4.2.	Avaliação da expressão e atividade biológica do FVIIr pelas células em cultivos com suplementação de vitamina K.....	42
4.3.	Adaptação e cultivo das células HKB-11 em diferentes concentrações de vitamina K para expressão de FVIIr.....	46
4.3.1	<i>Análise da influência do aumento de vitamina K no meio de cultura sobre o crescimento e metabolismo da célula HKB-11</i>	46
4.3.2	<i>Influência da suplementação de vitamina K no cultivo sobre a expressão e atividade específica do FVIIr</i>	55
4.4.	Otimização da expressão de FVIIr pela célula HKB-11 por meio de delineamento experimental.....	58
4.5.	Análise estatística dos modelos gerados para as respostas q_{FVIIr} e FVIIr pelo software <i>STATISTICA 12</i>	67
4.6.	Análise de variância dos modelos ajustados e avaliação das curvas de superfície	73
5.	CONCLUSÃO	78
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistemas de expressão para proteínas recombinantes terapêuticas

A utilização de proteínas para o tratamento ou prevenção de doenças humanas teve seu início em meados dos anos 1890, com a utilização de soro proveniente de coelhos e cavalos imunizados para o tratamento de difteria e tétano por Emily von Behring. O próximo avanço na utilização de proteínas para fins terapêuticos ocorreu algumas décadas depois, em 1920, quando insulina purificada e isolada de porcos ou vacas foi utilizada para o tratamento de diabetes do tipo I por Banting e Best (OOSTING, 2019). Mais tarde, graças aos avanços científicos e o início da biotecnologia moderna (surgimento da tecnologia do DNA recombinante e hibridoma), as proteínas terapêuticas deixaram de ser, em sua maioria, derivadas de animais e passaram a ser produzidas em organismos vivos geneticamente modificados, sendo a insulina recombinante, gerada na bactéria *Escherichia coli* (Humulina, Eli Lilly, 1982), a primeira proteína recombinante aprovada para uso humano pelo Órgão Controlador de Medicamentos e Gêneros Alimentícios dos EUA (*Food and Drug Administration*, FDA) (GUPTA; SHUKLA, 2018).

As proteínas recombinantes terapêuticas são proteínas exógenas produzidas em laboratório com aplicação na área da saúde, podendo ser utilizadas na prevenção ou tratamento de doenças cuja complexidade é alta, por exemplo, artrite reumatoide, alguns tipos de câncer, doença de Crohn, hemofilia dentre outras (BURNETT; BURNETT, 2020; QARAWI et al. 2017). Podem ser agrupadas tendo como base sua atividade farmacológica: reposição de uma proteína deficiente ou anormal; aumentando uma via metabólica; levando a uma função promissora ou atividade nova; interferindo numa molécula ou organismo; liberando outras proteínas ou compostos. Existe uma outra classificação baseada no tipo molecular: anticorpos, anticoagulantes, fatores de coagulação, proteínas da morfogênese de ossos, proteínas que atuam como *scaffolds*, enzimas, proteínas fusionadas, fatores de crescimento, hormônios, interferons, interleucinas e agentes trombolíticos (DIMITROV, 2012).

Há diferentes sistemas de expressão, tanto procarióticos (bactérias) quanto eucarióticos (células de inseto, mamíferos, leveduras e organismos transgênicos),

capazes de gerar proteínas terapêuticas de forma recombinante (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2018). Suas principais características estão descritas na Tabela abaixo.

Tabela 1.1 - Resumo das principais características dos sistemas de expressão utilizados para produção de proteínas terapêuticas recombinantes

	Bactérias	Leveduras	Células de Plantas	Células de Insetos	Células de Mamíferos	
					Murinas	Humanas
Crescimento celular	Alto	Alto	Moderado	Moderado	Lento	Moderado
Custo do processo	Baixo	Moderado	Moderado	Moderado	Alto	Alto
MPT	Ausente	Alto teor de manose	Sem sialilação	Sem sialilação	Glicosilação correta Epítomos Imunogênicos	Glicosilação correta Similar a humana
Rendimento	Alto	Alto	Moderado	Moderado	Alto	Moderado
Escalabilidade	Fácil	Fácil	Média	Fácil	Difícil	Difícil
Acúmulo do produto	Intracelular (corpos de inclusão)	Extracelular	Maioria Intracelular	Maioria Extracelular	Maioria Extracelular	Maioria Extracelular
Enovelamento da proteína	Re-enovelamento necessário	Re-enovelamento necessário	Adequado	Adequado	Adequado	Adequado
Risco de Contaminação	Alto (endotoxinas)	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Alto (vírus, príons, oncogenes)

Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em Amann et al. 2018; Burnett; Burnett, 2020;

A escolha do melhor sistema depende de vários fatores, a começar pelo tamanho e complexidade da proteína de interesse, custo e complexidade do processo, enovelamento e solubilidade da proteína, taxa de crescimento celular e produtividade e aspectos de segurança (AMANN et al., 2019; BURNETT; BURNETT, 2020; LUITJENS, CORVEN, 2019). Os sistemas de expressão baseados em microrganismos, principalmente bactérias, dominaram o início da produção de proteínas recombinantes até o fim dos anos 90, principalmente devido à grande

capacidade de crescimento dessas células, baixo custo dos meios de cultura e dos processos de cultivo, além da alta produtividade (DINGERMAN, 2007, WURM, 2002). No entanto, tais sistemas não são capazes de gerar proteínas glicosiladas, pois não apresentam a maquinaria necessária, pois tanto o retículo endoplasmático como o aparelho de Golgi estão ausentes (PADLER-KARAVANI et al., 2008; GHADERI et al., 2012), para realizar modificações pós-traducionais (MPT) mais complexas como glicosilação, carboxilação, hidroxilação, dentre outras, que são necessárias para uma correta atividade biológica de algumas proteínas (SWIECH et al., 2012). Dessa forma, houve a necessidade do desenvolvimento de novos sistemas de expressão para proteínas glicosiladas (Figura 1.1), como as células de mamíferos. O alto custo dos processos de cultivo e o baixo rendimento na geração do produto limitou inicialmente o uso dessas células como sistema de expressão. Entretanto, no início dos anos 2000 esse cenário mudou e graças aos avanços nas tecnologias de cultivos celulares houve um aumento na produtividade de proteínas recombinantes no sistema de células de mamíferos (LINDSKOG et al., 2018; WURM, 2002). O que comprova isso, é o número de biofármacos aprovados para uso, no período de julho de 2015 até 2018, onde 79 % dos produtos aprovados foram produzidos em células de mamífero contra 29% aprovado em células de não-mamíferos (WALSH, 2018).

Figura 1.1 - Principais sistemas de expressão para produção de glicoproteínas

Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em Lalonde; Durocher, 2017.

A primeira proteína terapêutica recombinante produzida em células de mamífero e aprovada pelo FDA foi o ativador do plasminogênio tecidual (Activase®), em 1987.

Essa proteína foi expressa em células de ovário de hamster chinês (CHO) e acabou gerando uma procura maior por cultura de células de mamífero (HA; LEE: LEE, 2020). Esses produtos derivados de fontes biológicas pertencem a classe dos biofármacos, cuja síntese é realizada em organismos vivos ou parte deles, muito mais complexa do que a síntese química de moléculas pequenas, necessitando de diversos estudos e de um bioprocessamento que garanta sua segurança, eficácia e qualidade (DIMITROV, 2012; KESIK-BRODACKA, 2017).

As células de mamíferos necessitam de meios de cultura complexos e de alto custo para a manutenção de seu crescimento e consequente expressão da proteína (WALSH; JEFFERIS, 2006). Portanto, para se ter um processo de produção em larga escala viável economicamente nesses sistemas, algumas condições devem ser atendidas: (1) a manipulação genética da célula deve resultar em uma eficiente expressão da proteína; (2) o meio de cultura selecionado deve ser capaz de suportar o crescimento da célula e a produção da proteína em altos níveis com o menor custo possível ; e (3) as etapas de *upstream* e *downstream* devem ser desenvolvidas de maneira a se obter altos rendimentos do produto com custo reduzido (PICANÇO-CASTRO et al., 2013). Neste cenário, as células murinas tem sido bastante utilizadas pela indústria farmacêutica para produção de biofármacos. No entanto, as linhagens de células humanas têm ganhado destaque, pois produzem proteínas recombinantes com modificações pós-traducionais mais similares às proteínas humanas nativas (SWIECH; PICANÇO-CASTRO; COVAS, 2017). Dessa forma, as proteínas produzidas adquirem as modificações pós-traducionais e o enovelamento correto das proteínas humanas nativas, gerando uma molécula com características semelhantes às aquelas presentes no nosso organismo (DUMONT et al., 2016)

A glicosilação é um processo altamente regulado, encontrado na maioria das proteínas naturais ou biofármacos, sendo considerada um fator determinante nas propriedades farmacológicas do fármaco, tais como tempo de meia-vida, estabilidade, solubilidade, farmacocinética e imunogenicidade (YEHUDA; PADLER-KARAVANI, 2020). Aproximadamente 50% das proteínas humanas são glicosiladas (WALSH; JEFFERIS, 2006). Apesar da segurança e eficiência das proteínas recombinantes produzidas em células murinas, células não-humanas não possuem glicosidases específicas tais como: glicosiltransferases, doadores de açúcar e outras enzimas capazes de inserir outras subunidades, cofatores, pontes dissulfeto à proteína e

promover sua correta glicosilação. Além disso, outras moléculas ligam-se às proteínas, como o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e terminações Gal (1à3) Galβ1-(3)4GlcNAc, podendo ser altamente imunogênicas, uma vez que não são utilizados na glicosilação humana, e/ou ser rapidamente eliminadas da circulação, diminuindo o tempo de meia vida do produto. Estudos demonstraram que o corpo humano apresenta anticorpos circulantes principalmente contra Neu5Gc, de forma que a combinação desse epítipo com a presença desses anticorpos pode acarretar numa resposta inflamatória crônica, que está ligada a doenças como câncer, doenças cardíacas ou autoimune (YEHUDA; PADLER-KARAVANI, 2020; PADLER-KARAVANI, 2008).

Apesar dessas células serem muito utilizadas em pesquisas acadêmicas, o cultivo de linhagens humanas em condições ideais para o cultivo em escala comercial, isto é, em suspensão e em meios de cultura livre de soro fetal bovino (SFB) ainda não foi totalmente consolidado, como no caso das células murinas (BIAGGIO et al., 2015). Dentre as linhagens humanas, apenas a HEK293[tem sido frequentemente cultivada desta maneira (LINDSKOG, 2018). Recentemente, dois estudos provaram o grande potencial de células humanas na produção de proteínas recombinantes, no caso, eritropoietina (EPO) e o fator VII da coagulação sanguínea humana (FVII) (CHIN et al. 2020; COSTA E SILVA et al. 2020; FREITAS et al. 2020; PONGJANTARASATIAN et al. 2019). Portanto, o estabelecimento de culturas em suspensão e meios livres de SFB para outras linhagens humanas visando a produção de proteínas recombinantes são de extrema importância para a obtenção de produtos com qualidade terapêutica e sem a presença de epítopos potencialmente imunogênicos.

1.2. Linhagens celulares humanas

Com intuito de se obter proteínas terapêuticas com maior similaridade as proteínas humanas, diversas companhias farmacêuticas têm utilizado várias linhagens celulares humanas como HEK293, HT-1080, AGE1.HN, CAP, HKB-11 e PER.C6 para produção de glicoproteínas (DUMONT et al. 2016; FLIEDL; GRILLARI; GRILLARI-VOGLAUER, 2015). Uma das linhagens humanas mais bem estabelecidas, a linhagem HEK293, derivada de rim de embrião humano foi estabelecida em 1973 por Frank Graham no experimento de número 293 usando

fragmentos de adenovírus 5 (GRAHAM et al., 1977). Devido à sua facilidade de adaptação em meios livres de soro fetal bovino (SFB), além da rápida replicação, essas células vêm sendo muito utilizadas em estudos de produção de proteínas recombinantes por transfecção transiente e partículas lentivirais (LAVADO-GARCIA; CERVERA; GÓDIA et al. 2020; CERVERA et al. 2013). HEK293-H (BERKNER, 1993) e HEK293-F (VINK et al., 2014) são linhagens derivadas de clones isolados de HEK293 que apresentaram características interessantes como rápido crescimento em meios livres de SFB, alta eficiência na transfecção e também na produção de proteínas recombinantes (GIBCO, 2014). Outras células modificadas de HEK293 são HEK293-T e HEK293-EBNA1. A primeira é conhecida pela alta expressão de vetores virais para uso na terapia celular (YAMAGUCHI et al., 2003), enquanto a segunda expressa o gene EBNA-1 do vírus Epstein-Barr (SCHLAEGER; CHRISTENSEN, 1999).

Recentemente, cinco agentes terapêuticos produzidos em HEK293 foram aprovados pelo FDA ou pela Agência de Medicamentos Europeus (EMA) para uso terapêutico, sendo eles: proteína de fusão recombinante do fator IX (FIXFrc; Biogen, Cambridge, MA), proteína de fusão recombinante do fator VIII (FVIIIrFc; Biogen, Cambridge, MA), fator VIII recombinante (human-cl rhFVIII; NUWIQ; Octapharma, Lachen, Switzerland) e dulaglutida (TRULICITY; Eli Lilly, Indianápolis, IN) (DUMONT et al., 2016). Além disso, um trabalho recente verificou o potencial dessas células em expressar altas concentrações de eritropoietina, com alta produtividade específica (CHIN et al. 2019).

SK-Hep-1 é uma linhagem celular humana de origem endotelial, derivada do fluido ascítico de um paciente com adenocarcinoma de fígado (TURNER, 1980). SK-Hep-1 provou ser uma promissora linhagem para obtenção de altos níveis de expressão de FVIII sem a necessidade de amplificação do gene, inclusive com níveis de expressão maiores que aqueles obtidos em células de ovário de hamster chinês (CHO) (HERLITSCHKA et al., 1998). Além disso, demonstrou eficiência na produção de FIXr e também na produção de FVIIIr, ambas em cultivo estático com presença de SFB (BOMFIM et al., 2016; FREITAS et al., 2017).

A linhagem celular HKB-11 foi criada pela fusão entre HEK293-S e uma linhagem de células B humana (células modificadas de linfoma de Burkitt) usando polietilenoglicol (PEG) (CHO et al., 2003; DUROCHER; BUTLER, 2009; PICANCO-

CASTRO et al., 2013). A principal vantagem dessa linhagem celular é o alto nível de produção de proteínas recombinantes sem a formação de agregados, bastante comum em células HEK293. Já foi demonstrado que HKB-11 produziu uma maior quantidade de FVIII humano quando comparado com HEK293 e BHK21 (MEI et al., 2013). Assim como em outras linhagens celulares humanas, foi comprovado que essa linhagem apresenta padrões de glicosilação mais similares ao humano, incluindo ligações alfa (2,3) e alfa (2,6) de ácido siálico (PICANCO-CASTRO et al., 2013). HKB-11 também já foi utilizada para produção de FVII, FVIII e fator tecidual (FREITAS et al., 2017; CHO et al., 2003).

Outra linhagem celular humana desenvolvida mais recentemente é a HuH-7, que tem como origem um carcinoma hepatocelular humano (ENJOLRAS et al., 2012). Estudos demonstraram que HuH-7-CD4 é capaz de produzir fator de coagulação IX com perfil de glicosilação humano, ou seja, as modificações pós-traducionais (glicosilação, sialilação, fosforilação e sulfatação) foram similares entre o fator IX recombinante (FIXr) e o derivado do plasma. Além disso, a produção do FIXr foi melhor do que em células CHO (ENJOLRAS et al., 2012). Perot e colaboradores (2015), utilizaram a linhagem HuH-7 na produção de formas mutantes de FIXr, demonstrando aumento da afinidade de ligação ao FVIII ativado e atividade coagulante em camundongos. Recentemente, foi verificado o potencial dessa célula em expressar EPOr, com alta produtividade específica (COSTA E SILVA et al. 2020).

Outras linhagens celulares humanas com destaque na produção de glicoproteínas são CAP-T, HT-1080 e PER.C6. CAP-T é composta por células derivadas do fluído amniótico humano e imortalizadas por meio do gene de tipo 5 E1 de adenovírus (SWIECH et al. 2012). É conhecida por apresentar alta produtividade (SCHIEDNER et al.2008). HT-1080 juntamente com HEK293 é a linhagem celular humana que apresenta maior número de proteínas terapêuticas recombinantes aprovadas para uso pelo FDA e EMA (CHIN et al. 2019). Trata-se de uma linhagem derivada de um fibrocarcinoma (RASHEED et al. 1974), que já teve quatro produtos aprovados para uso (DUMONT et al. 2016). Já PER.C6 é uma linhagem derivada de células embrionárias de retina, utilizada inicialmente para produção de vetores adenovirais, posteriormente vacinas e proteínas recombinantes (FLIEDL; GRILLARI; GRILLARI-VOGLAUER, 2015). Sua grande capacidade de atingir altas concentrações celulares e um alto rendimento de proteína produzida (8g/L), demonstra seu potencial

como sistema de expressão para proteínas recombinantes (KUCXEWSKI et al. 2011). Além disso, a análise do perfil de glicosilação dos produtos gerados nessa proteína demonstrou ausência de perfis não-humanos de glicosilação (DIAZ et al. 2009).

Além do sistema de expressão, a condição de cultivo é bastante importante no que tange ao bioprocesso envolvendo a produção de proteínas recombinantes terapêuticas.

1.3. Condições de cultivo para células humanas

O custo dos bioprocessos envolvendo células de mamíferos, em especial, células humanas é alto quando comparado a cultivos envolvendo outros sistemas de expressão, principalmente bactérias e leveduras, principalmente devido ao custo dos meios de cultura utilizados e do menor crescimento e produtividade (AMAN et al. 2019). Dessa maneira, a escolha das melhores condições de cultivo, incluindo o meio de cultura, cultivo em monocamada ou suspensão e parâmetros ambientais deve ser realizada cuidadosamente. As linhagens celulares humanas geralmente crescem em condições bem definidas, a 37°C e 5% de CO₂. Para se obter uma reprodutibilidade experimental, a composição do meio de cultura é fundamental (VAN DER VALK et al. 2010). Para a manutenção do crescimento das células por um período de tempo prolongado, é necessário o uso de suplementação (GSTRAUNTAHLER, 2003; BRUNNER et al. 2009). O soro fetal bovino (SFB) foi por muito tempo considerado o padrão ouro dos suplementos utilizados no cultivo de células de mamíferos (PLIETZ et al. 2018).

SFB é uma mistura extremamente complexa, cujos os principais constituintes são hormônios, como insulina e glucagon, fatores de crescimento, carboidratos, vitaminas e elementos traço, lipídios e vários tipos de proteínas (BRUNNER et al. 2009). Apesar de ser um suplemento que permite o crescimento celular, sendo possível utilizar em vários tipos diferentes de células, hoje em dia, a utilização de SFB para produção de proteínas recombinantes terapêuticas não é a mais indicada, devido a diversos problemas envolvendo esses fatores, tais como variabilidade lote a lote, questões éticas envolvendo o uso de animais, riscos de contaminação e alto custo (RITACCO et al. 2018; VAN DER VALK; 2018). Além disso, diversos grupos de pesquisa, por meio de estudos das células e composição do soro, identificaram os

componentes essenciais para o crescimento das mesmas, levando ao desenvolvimento de diferentes meios livres de SFB e quimicamente definidos (RITACCO et al. 2018). Hoje em dia, as condições de cultivo ideais, pensando tanto num processo escalonável quanto seguro e passível de regulação, envolvem o cultivo em suspensão, principalmente em biorreatores de tanque agitado, utilizando meios de cultura livres de SFB (CHU; ROBINSON, 2001; MERTEN, 2006; RITACCO et al. 2018).

Como dito anteriormente, o desenvolvimento de meios livres de SFB ocorreu também devido a diversos estudos dos seus componentes e a influência destes sobre o metabolismo de células de mamíferos.

1.4. Metabolismo de células animais

O metabolismo *in vitro* de células animais é altamente desregulado e complexo (ALTAMIRANO et al. 2008), sendo que pode variar de acordo com o sistema de cultivo, a célula e fatores físico-químicos, tais como oxigênio dissolvido, pH, temperatura de cultivo, concentração inicial de substratos ou acúmulo de metabólitos (GOEY; BELL; KONTORAVDI, 2019; ALTAMIRANO et al. 2000; LAO; TOTH, 1997). O estudo mais aprofundado do fluxo metabólico das células cultivadas é de vital importância para a melhora da produtividade como também da qualidade do produto de interesse (OKAHASHI et al. 2015). Estão envolvidos no metabolismo celular, moléculas como glicose e glutamina, principais fontes de energia utilizadas pelas células para obtenção de adenosina trifosfato (ATP), mas há outras moléculas como lipídios e aminoácidos que são essenciais para o crescimento celular. De maneira simplificada, as principais vias metabólicas utilizadas pelas células para obtenção de energia são a glicólise, glutaminólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), via das pentoses fosfato e o metabolismo de outros aminoácidos (PORTNER, 2009). Essas principais vias metabólicas estão representadas, simplificadamente, na Figura 1.2.

moléculas importantes no redirecionamento do fluxo metabólico intracelular. O piruvato participa de várias reações como intermediário no metabolismo de alguns aminoácidos, receptor de grupo amônio e, principalmente, como o composto de ligação entre a glicólise e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Durante a fase exponencial de crescimento de células altamente proliferativas, é comum ocorrer o efeito *Warburg* ou glicólise aeróbica, onde mesmo na presença de oxigênio, a célula apresenta um alto consumo de glicose e produção de lactato, na proporção de 2 mol de lactato para cada mol de glicose, devido a oxidação apenas parcial da molécula de glicose (DAI et al. 2016; BUCHSTEINER et al. 2018; PORTNER, 2009). O lactato gerado é um dos principais metabólitos tóxicos relativo ao metabolismo do carbono central da célula. Em linhagens de células de mamíferos utilizadas industrialmente, 60 a 80% da glicose e 16 a 25% de glutamina são convertidos em lactato durante a fase exponencial de crescimento (YOUNG, 2013; TORRES; ALTAMIRANO; DICKSON, 2018). Diversos estudos já relacionaram o acúmulo desse metabólito com o aumento do processo de apoptose e redução do crescimento celular, diminuição da produtividade específica de proteínas terapêuticas, principalmente devido às mudanças no pH e osmolaridade do meio de cultura (CRUZ et al. 2000). O piruvato, como dito anteriormente, conecta a glicólise com o TCA, sendo possível ainda, converter lactato novamente em piruvato por meio da enzima lactato desidrogenase (LDH). Ele pode ser oxidado para formar acetil-CoA até ser transformado em água e CO₂ por meio do TCA e da fosforilação oxidativa, que são realizadas na mitocôndria, gerando aproximadamente 36 moles de ATP por mol de glicose (AHN; ANTONIEWICZ, 2012; AMABLE; BUTLER, 2008).

A glutamina, assim como a glicose, é uma importante fonte de energia para as células, além de ser uma fonte de nitrogênio para biossíntese (ALTAMIRANO et al. 2000; GAO et al. 2009). Esse aminoácido é encontrado na faixa de 2 mM a 8 mM nos meios de cultura (RAJENDRA et al. 2012; SATHYAMURTHY; LEE; PARK, 2012), sendo transportada até o citosol por meio de diferentes transportadores de aminoácidos (GÓDIA; CAIRO, 2006). De maneira similar a glicólise, o metabolismo da glutamina começa com a glutaminólise. Nesse processo, a glutamina é convertida em glutamato, reação catalisada pela enzima glutaminase, gerando a liberação de amônia. Depois, glutamato é convertido em alfa-ceto-glutarato, por meio da enzima glutamato desidrogenase, levando também a formação de amônio (AMABLE;

BUTLER, 2008). Alfa-ceto glutarato desempenha um papel chave na ligação entre o metabolismo da glutamina e o TCA. A glutamina ainda participa da síntese de purinas, pirimidinas, amino açúcares e asparagina (PORTNER, 2009). A amônia é gerada tanto pelo metabolismo da glutamina, quanto pela decomposição desse aminoácido, devido à instabilidade deste em soluções aquosas (HÁ; LEE, 2015). O íon amônio gerado no meio de cultura tem um impacto pior do que o lactato sobre o crescimento celular, pois concentrações de 2 mM a 5 mM podem inibir o crescimento e impactar a produtividade (ALTAMIRANO, 2013). Ainda, esse íon pode impactar na glicosilação e afetar a sialilação das proteínas produzidas (YANG; BUTLER, 2004; GAWLITZEK et al. 2000). O efeito negativo sobre o crescimento das células ocorre pela indução de apoptose (SUZUKI et al. 2002).

O crescimento celular em altas concentrações durante os cultivos, leva a formação de espécies reativas do oxigênio (EROs), principalmente devido ao estresse gerado no retículo endoplasmático durante o enovelamento proteico e na respiração mitocondrial (LIU et al. 2012), nesse contexto a glutathione apresenta um importante papel na redução desse estresse metabólico.

Glutathione é uma pequena molécula antioxidante do tipo tiol não-proteico mais abundante dentro da célula, que pode ser encontrada na forma reduzida (GSH) ou na forma oxidada (GSSG). A forma GSSG está intimamente ligada ao estresse oxidativo. É sintetizada a partir de três aminoácidos encontrados nas células eucarióticas (LI; WEI, 2004). Além disso, GSH atua como mediador em diferentes processos celulares tais como metabolismo xenobiótico, regulação gênica, regulação do processo apoptótico, sinalização intracelular, enovelamento da proteína (GHIBELLI et al. 1998; HUAN et al. 2017; ORELLANA et al. 2015). Sua biossíntese e ciclo ocorrem no citosol, tendo como precursores, o glutamato, cisteína e glicina (PEREIRA et al. 2018).

De maneira geral, a síntese de glutathione ocorre no citosol, catalisada pela enzima glutamato-cisteína-ligase (GCL). A atividade dessa enzima está ligada a concentração de GSH presente na célula. A segunda etapa na biossíntese dessa molécula envolve a adição de glicina, por meio da enzima glutathione sintetase (GSS). EROs interagem com GSH levando a formação da glutathione dissulfídeo (GSSG), cujo acúmulo no meio de cultura está diretamente relacionado com ativação da caspase e, portanto, do processo de apoptose (REHBERG et al. 2013). Por fim, ocorre a redução GSSG para GSH, reação catalisada pela enzima glutathione-dissulfeto redutase (GSR).

O estudo do metabolismo é uma importante ferramenta que está ligada diretamente à produção e qualidade da proteína terapêutica de interesse, sendo possível elaborar estratégias para aumentar a produtividade da célula.

1.5. Otimização da produção de proteínas recombinantes

Um dos problemas envolvendo células de mamíferos é a baixa produtividade quando comparada a outros sistemas. Diversas proteínas terapêuticas são difíceis de expressar e apresentam baixa atividade biológica, como por exemplo alguns fatores da coagulação (AMANN et al. 2019; VATANDOOST; PAKDAMAN, 2016). Portanto, muitas vezes são aplicadas metodologias para aumentar o nível da expressão da proteína recombinante, de maneira que fique próxima aos valores desejados. Diversas estratégias podem ser empregadas para o aumento da produtividade específica (RADHAKRISHNAN; WELLS; ROBINSON, 2018). Algumas, mais simples e bastante estudadas, envolvem a adição de compostos ao meio de cultura, para o controle da proliferação celular, mantendo as células na fase G1 do ciclo celular (SUNLEY; BUTLER, 2010). O ciclo celular nas células de mamífero, pode se pode ser dividido em duas fases, interfase e mitose. Dentro da interfase, há uma fase S (síntese), onde o material genético da célula é replicado para a divisão celular. Antes da fase S, existe a fase G1 ('gap'), onde a célula se prepara para a replicação do material e depois a fase G2, preparação para a duplicação celular. A manutenção da célula na fase G1/G0 está associada com o aumento da expressão de proteínas recombinantes (SUNLEY; BUTLER, 2010). Um dos compostos mais utilizados com esse objetivo é o butirato de sódio (NaBu) (GOULART et al 2010). Outras substâncias similares como o ácido valproico (WULHFARD et al. 2010; BLACKLIWAL et al. 2008), ácido valérico (CORONEL et al. 2016), ácido pentanoico (LIU; CHU; HWANG, 2000) desempenham papel parecido na manutenção das células na fase G1 do ciclo celular.

Diminuição da temperatura de cultivo para valores abaixo de 37°C é outra estratégia bastante estudada no aumento da expressão de proteínas recombinantes (SUNLEY; BUTLER, 2010). Diversos estudos verificaram um aumento na produtividade específica na faixa de temperatura entre 28°C e 34°C para células CHO (BECERRA et al. 2012), sendo que em alguns trabalhos foi verificado um aumento bastante significativo na produtividade da célula cultivada em menor temperatura

(YOON; SONG; LEE, 2003; KOU et al. 2011; MOORE et al. 1997). Os mecanismos envolvendo o aumento da produtividade por meio da temperatura de cultivo ainda não são totalmente elucidados, no entanto há indícios de estar relacionado a manutenção da fase S/G1 da célula por meio da proteína ligante do RNA induzida pelo frio, do inglês “cold inducible RNA-binding protein” (CIRP) (SUNLEY; BUTLER, 2010).

Outras estratégias bastante utilizadas para otimização da produção de proteínas recombinantes envolvem o aumento da eficiência do fluxo metabólico celular. O acúmulo de metabólitos tóxicos gerado pelo rápido consumo de glicose e glutamina, acarreta em diminuição da produtividade. Com o uso de ferramentas como proteômica e metabolômica, marcadores isótopos ligados a glicose e glutamina, foi possível analisar mais detalhadamente o fluxo metabólico, principalmente em células CHO (DICKSON, 2014). A modificação genética para um eficiente metabolismo central da célula é um fator chave nos processos celulares como glicosilação, regulação do ciclo celular, apoptose, via secretória, que estão diretamente ligadas com a qualidade da proteína gerada (RICHELLE; LEWIS, 2017).

Grande parte dos métodos utilizados na otimização da produção de proteínas recombinantes utiliza o método de um fator por vez, onde cada fator é avaliado separadamente. Esse método, possui desvantagens, principalmente por não analisar a interação de diferentes fatores, além de ser mais laborioso, pois requer um maior número de ensaios (RITACCO et al. 2018; PAPANEOPHYTOU, 2019). Uma metodologia bastante útil na análise de múltiplos fatores, por meio de um número reduzido de experimentos, é o delineamento experimental (RODRIGUES; IEMMA, 2014; PAPANEOPHYTOU, 2019). Basicamente, um delineamento experimental utiliza métodos e varia os fatores que afetam o processo simultaneamente, dentro da faixa estudada. Utilizando um modelo matemático, cada fator é analisado individualmente assim como sua interação com outros fatores.

Existem diferentes tipos de delineamento experimentais como Plackett-Burman (DPB), Composto Central Rotacional (DCCR) e Box-Behnken (DDB). A escolha da melhor estratégia depende do número de fatores (variáveis independentes) e do conhecimento acerca do processo em questão (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Uma estratégia comumente utilizada quando há vários fatores e pouco conhecimento do processo, é a identificação dos fatores mais importantes. Esse “screening” inicial pode ser feito por meio de um DPB, utilizado principalmente quando há quatro ou mais

fatores com efeitos pouco conhecidos sobre a variável dependente. A partir da seleção dos fatores relevantes, uma otimização pode ser efetuada por meio da metodologia da superfície de resposta (MSR), especialmente se há chance de uma curvatura na superfície da resposta (GUJRAL; KAPOOR; JAIMINI, 2018).

As duas principais MSR são o DCCR e DBB (Figura 3), já citados anteriormente. Essas duas metodologias são tipicamente modelos polinomiais de segunda ordem, que contém informação suficiente para testar a falta de ajuste do modelo, utilizando um número reduzido de experimentos. Por apresentar menos pontos (ensaios) do que o DCCR, o DBB apresenta um menor custo de análise mesmo com o mesmo número de fatores, pois DCCR apresenta pontos axiais fora do cubo. Por não conter esses pontos axiais, o DBB garante que os pontos do delineamento estão dentro da faixa estudada (GUJRAL; KAPOOR; JAIMINI, 2018).

Figura 1.3 - DCCR (a) para 3 fatores com 15 experimentos e DBB (b) para 3 fatores com 13 experimentos

Fonte: Retirado de Ritacco et al. 2018

Utilizando algumas das estratégias de planejamento experimental citadas acima, Cervera et al. (2015) conseguiram aumentar a transfecção transiente em HEK293 em 3,8 vezes. Também em HEK293, um trabalho utilizando delineamento experimental conseguiu otimizar um protocolo de produção de partículas virais (LAVADO-GARCIA; CERVERA; GÓDIA, 2020). Coronel et al. (2016) conseguiram aumentar em quatro vezes a produtividade celular específica, por meio de um DBB com três fatores.

As estratégias de otimização podem ser uma interessante ferramenta na produção de proteínas complexas e de difícil expressão, por exemplo, os fatores da coagulação sanguínea.

1.6. Hemofilias e fatores da Coagulação

A coagulação sanguínea é um processo dinâmico, que faz parte do sistema de homeostase, sendo resultante de complexas interações entre plaquetas, paredes dos vasos e proteínas de adesão que levam a formação do trombo, que por sua vez, compreende as plaquetas ativas e a rede de fibrinas (PALTA; SAROA; PALTA, 2014). Antigamente dividida em via extrínseca e via intrínseca, hoje em dia, a cascata da coagulação pode ser dividida em três fases: iniciação/amplificação, propagação e terminação (PETERS; HARRIS, 2018). Quando há uma injúria vascular, o processo coagulação impede que o sangramento se espalhe, enquanto a fibrinólise previne a obstrução do fluxo sanguíneo pelos trombos formados (MERTENS; MEIJERS, 2019). Um desequilíbrio no balanço desse sistema, pode acarretar hemorragia ou trombose. A fase de iniciação ocorre quando há exposição do fator tecidual (FT) no vaso sanguíneo, devido a algum tipo de injúria. Esse FT exposto se liga e ativa o FVII inativo que circula no sangue, dando origem ao complexo FT/FVIIa. Esse complexo é capaz de ativar os fatores IX (FIX) e X (FX). O FXa ativo (FXa) se liga ao fator II (FII), também conhecido como Protrombina para formar trombina (FIIa). Essa formação de trombina resultante do FT/FVIIa não é robusta e pode ser rapidamente desfeita pela via de inibição do FT. Na fase seguinte, de amplificação, a trombina ativa o fator V (FV), fator XI (FXI) e o fator VIII (FVIII), que serve como um cofator para aceleração da ativação de FII pelo FX e FXa pelo FIXa. A partir daí, ocorre uma grande geração de trombina por meio dos complexos FIXa/FVIIIa e FXa/FVa. A fase de terminação ocorre quando a trombina gerada nas fases anteriores ativa os reguladores negativos da cascata, depois da ligação com o receptor endotelial conhecido como trombomodulina e ao receptor endotelial da proteína C, que quando ativada inativa os cofatores FVa e FVIIIa, levando a desregulação da formação de trombina (PETER; HARRIS, 2018; MERTENS; MEIJER, 2019).

As desordens sanguíneas são comumente causadas devido a um defeito ou deficiência em algum dos constituintes da coagulação. É o caso da hemofilia,

desordem sanguínea congênita causada pela deficiência de FVIII (hemofilia A) e FIX (hemofilia B), que leva a ineficiente coagulação associada com graves consequências como sangramento articular e inchaço, podendo resultar em dor, hemorragia cerebral e danos a vários órgãos em casos mais graves. Sem o tratamento correto, a expectativa de vida de pacientes com hemofilia grave é de 16 anos em média (HEDNER; BRUNN, 2007).

O tratamento envolvendo a reposição de FVIII e FIX foi introduzido há várias décadas (HEDNER, 2015). As duas formas mais utilizadas de reposição desses fatores envolvem os concentrados de fatores de coagulação produzidos pelo fracionamento do plasma humano e concentrados recombinantes, produzidos por tecnologia da recombinação gênica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). O uso dessas proteínas plasmáticas pode acarretar na formação de inibidores contra os fatores de coagulação, cuja incidência é de 3 a 4% em pacientes com hemofilia B e aproximadamente um terço para hemofilia A (CAO; LODUCA; HERZOG, 2009). Neste caso, as sequelas para os pacientes são semelhantes aquelas desenvolvidas por pacientes que não receberam profilaxia, que seriam danos nas juntas e graves episódios de sangramento (PETER; HARRIS, 2018). Antigamente, os tratamentos utilizados para pacientes que desenvolveram inibidores contra os fatores de coagulação VIII e IX eram complexos de protrombina concentrados derivados do plasma (aPCCs) ou complexos de trombinas concentrados (PCCs) (INTASAI, 2017), entretanto, devido a baixa eficácia (50-65%) e o risco de efeitos tromboembólicos (SJAMSOEDIN et al., 1981; LUSHER, 1991), o fator VII da coagulação sanguínea recombinante (FVIIr) tornou-se a principal escolha terapêutica (FREITAS et al., 2017). Uma vez que o FVII apresenta efeitos tromboembólicos menores quando comparado a outros fatores de coagulação (HEDNER, 2015), também passou a ser utilizado como tratamento para hemorragias, traumas e trombastenia de Glanzmann em pacientes sem coagulopatias (NEUFELD et al., 2015; GEORGE; CAEN; NURDEN, 1990). Os fatores de coagulação (FVII, FVIII, FIX) são proteínas complexas com diferentes MPTs (Tabela 2) necessárias à sua atividade biológica que precisam ser produzidas em células de mamíferos (BOMFIM et al., 2016).

Tabela 1.2- Fatores da Coagulação Sanguínea Humana e suas principais Modificações Pós-Traducionais

	Protrombina	Fator VII	Fator IX	Fator X	Proteína C	Fator VIII	FVW
Peptídeo Sinal	x	x	x	x	x	x	x
Ponte Dissulfeto	x	x	x	x	x	x	x
N-Glicosilação	x	x	x	x	x	x	x
O-Glicosilação		x	x	x		x	x
γ- Carboxilação	x	x	x	x	x		
Sulfatação			x			x	
β- Hidroxilação		x	x	x	x		
Fosforilação	x		x			x	

Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em Kumar et al. 2015.

A incidência mundial de hemofilia é estimada entre 200 mil a 400 mil casos, com uma média de dois casos a cada 10 mil habitantes, no caso da hemofilia A. O mercado global de produtos dos fatores de coagulação atingiu a marca de 8,5 bilhões de dólares no ano de 2017, sendo que o custo do tratamento pode variar de 30 mil dólares até centenas de milhares de dólares, dependendo da gravidade da doença ou o desenvolvimento de inibidores contra os fatores de coagulação (WALSH, 2018). A maioria dos produtos disponíveis no mercado são relacionados ao FVIIIr e FIXr da coagulação e em menor quantidade, do FVIIr (MERTENS; MEIJER, 2019). Recentemente, houve um aumento de produtos de fatores da coagulação aprovados, dez para o FVIII e seis para FIX (WALSH, 2018).

A concentração de FVII no plasma humana é de 0,5 µg/mL, o que é insuficiente para geração de uma quantidade significativa de FVIIa, tornando essa proteína terapêutica um interessante alvo para a tecnologia recombinante (MERTENS; MEIJER, 2019). Comercialmente, o Fator VII recombinante ativado (FVIIra, eptacog alfa, NovoSeven®, Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Denmark) é produzido em células murinas BHK ('Baby hamster kidney') em condições livres de SFB (HEDNER, 2006) e foi aprovada para uso primeiramente na Europa em 1996, seguido pelos Estados

Unidos em 1999 e Japão em 2000 (INSTASAI, 2017). Um biossimilar foi desenvolvido pela Baxter (BAX 817) e outro (AryoSeven) pela AryoGenBiopharma. Enquanto o primeiro foi descontinuado, o segundo foi licenciado apenas no Irã (MERTENS; MEIJER, 2019). Um FVIIa engenheirado (Vatreptacog alfa) foi desenvolvido, mas acabou sendo finalizado devido a problemas com imunogenicidade causados pelas substituições de aminoácidos no cultivo com intuito de aumentar a atividade biológica (MAHLANGU et al. 2015). Por ser produzida em células de mamíferos, essa proteína contém baixo grau de sialilação e γ -carboxilação quando comparado ao FVII derivado do plasma sanguíneo (FREITAS et al., 2017).

1.6.1 Fator VII da coagulação sanguínea humana: estrutura e função

O Fator VII da coagulação sanguínea humana, também chamado de proconvertina ou proteína do soro aceleradora da conversão, é uma serina peptidase dependente de vitamina K com massa molecular de 55 kDa; o gene responsável por codificar o FVII está localizado no cromossomo 13 (13q34) e contém 9 exons e 8 íntrons, abrangendo aproximadamente 14 kb. A síntese desse fator é realizada no fígado e o mesmo circula no sangue na forma inativa chamada de zimogênio (MILLAR et al., 2000; O'HARA et al., 1987; MIRZAAHMADI et al., 2011).

O FVII que circula no sangue é um polipeptídeo de cadeia simples contendo 406 aminoácidos, formado por uma região N-terminal seguida por dois domínios contendo fatores de crescimento epidérmicos (EGF1 e EGF2) e uma região C-terminal contendo o domínio catalítico (peptidase), que enquanto o FVIIa é formado por uma cadeia leve de 20 kDa (152 aminoácidos), com ácido gama-carboxiglutâmico residual, ligada através de uma única ligação dissulfeto (entre Cisteína (Cys) 135 e Cys 262) a uma cadeia pesada de 30 kDa (252 aminoácidos), que possui o domínio catalítico (HAGENS et al., 1986; PYKE et al., 1999; VADIVEL; BAJAJ, 2012) conforme mostrado na Figura 1.4. Tal ativação envolve a clivagem da ligação peptídica entre Arginina (Arg) 152 e Isoleucina (Ile) 153, através do FVIIa ou FXa. Esse fator de coagulação apresenta complexas modificações pós-traducionais, tais como 10 resíduos de ácido γ -carboxilados na porção N-terminal da proteína, duas asparaginas (Asn) N-glicosiladas e dois resíduos de serina (Ser) O-glicosilados, além de um resíduo de ácido aspártico β -hidroxilado (KAUFMAN, 1998; MIRZAAHMADI et al., 2011). Essas modificações são essenciais para a secreção de FVII na corrente sanguínea,

interação FT e interação na superfície da plaqueta entre FVIIa/FT e seu substrato, o FX (BOLT; STEENSTRUP; KRISTENSEN, 2007; IINO; FOSTER; KISIEL, 1998; KAO et al., 1999).

Figura 1.4 - Representação da estrutura do FVIIa humano da coagulação sanguínea. Os domínios dessa serina peptidase estão representados juntamente com suas respectivas modificações pós-traducionais. A cadeia leve contém os domínios Gla e EGF1/EGF2. Gla apresenta 10 resíduos de γ -Carboxilação. A cadeia leve está conectada a cadeia pesada através de uma ligação dissulfeto.

Fonte: Adaptado de Mirzaahmadi et al., 2011.

O FVIIa purificado foi utilizado pela primeira vez no começo dos anos 80 para o tratamento de pacientes com hemofilia A que desenvolveram inibidores. Naquela época, o intuito era aumentar a atividade do FT, para gerar uma formação mínima de trombina (HOFFMAN, 2018). Daquela época até os dias atuais, estudos provaram que a utilização de altas doses de FVIIa poderia ativar o FX, suprimindo a necessidade do complexo FIXa/FVIIIa, de maneira independente do FT, gerando uma quantidade de trombina de maneira rápida (HOFFMAN, 2018; METERS; MEIJER, 2018), tornando o FVIIa uma alternativa terapêutica interessante para pacientes hemofílicos que desenvolveram inibidores contra FIX e FVIII.

1.6.2 Gama-carboxilação e ciclo da Vitamina K

A vitamina K desempenha um papel essencial na atividade biológica dos fatores de coagulação, tal qual o FVII da coagulação sanguínea. Essa vitamina é um cofator no processo de gama-carboxilação, que é responsável pela ativação de algumas proteínas responsáveis pela coagulação (FURIE; FURIE, 1990).

A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel, que ocorre naturalmente em duas formas: vitamina K1, conhecida com filoquinona, derivada de vegetais com folhas verdes; e a vitamina K2, conhecida como menaquinona, sintetizada por bactérias do trato gastrointestinal (KAMALI et al., 2001). O termo K da vitamina K, vem do alemão “Koagulation”, devido ao importante papel desempenhado por essa vitamina na coagulação sanguínea, estudado por Dam, em 1930 (GRÖBER et al., 2014).

A carboxilação dependente de vitamina K é uma MPT, cuja função é converter os resíduos de ácido glutâmico (Glu) em ácido gama-carboxiglutâmico (Gla), catalisada pela enzima gama glutamil-carboxilase (GGCX), sendo essencial para a função biológica dos fatores de coagulação e proteínas regulatórias dependentes de vitamina K (VKD), que são o fator II (protrombina), fator VII, fator IX, fator X, proteína C e proteína S, que circulam pelo sangue. Para que essa modificação ocorra, necessita-se de alguns cofatores, como a forma reduzida de vitamina K (hidroquinona ou KH_2), CO_2 , e oxigênio (O_2). Ao mesmo tempo em que a modificação Glu ocorre, KH_2 é oxidada, resultando na vitamina 2,3-epóxido (KO), que pode ser rapidamente reutilizada e reconvertida em KH_2 . Esse processo ocorre em uma redução de duas etapas pela enzima vitamina K epóxido redutase (VKOR) e pela vitamina K redutase (VKR). O resíduo Gla gerado ao final permite a efetiva ligação e formação da VKD a íons de cálcio, gerando uma mudança conformacional da proteína, que permite a sua correta função fisiológica (TIE; STAFFORD, 2017; FURIE; FURIE, 1990; GRÖBER et al., 2014).

Essa transformação cíclica também é chamada de ciclo da vitamina K (Figura 1.5) e devido ao caráter hidrofóbico da molécula de vitamina K, todas as enzimas do ciclo são proteínas de membrana localizadas no retículo endoplasmático (TIE; STAFFORD, 2017).

Figura 1.5 - Ciclo da vitamina K

Fonte: Adaptado de Tie; Stafford, 2016

A célula que vai expressar a VKD de interesse pode limitar a gama-glutamil carboxilação, resultando numa menor atividade do fator de coagulação. Nas últimas décadas, foi feito um grande esforço para contornar essa limitação, principalmente através de estudos que investigaram as enzimas envolvidas no ciclo da vitamina K, como a GCCX e VKOR (KUMAR, 2015). A expressão de VKDs já foi demonstrada em diversos linhagens celulares (BERKNER, 1993; KAUFMAN et al., 1986; KUMAR, 2015). Qualquer célula de um eucarioto superior é capaz de realizar o processo de gama-carboxilação, entretanto, há diferença na capacidade intrínseca de cada célula em relação a essa MPT, até mesmo entre as linhagens mais utilizadas na produção de proteínas terapêuticas, como CHO, BHK e HEK. A célula de mamífero CHO possui uma capacidade moderada de gama-carboxilação, apesar de sua alta capacidade de sintetizar e secretar proteínas; já a célula humana HEK apresenta uma alta capacidade essa MPT, como já foi relatado para algumas VKD, inclusive foi a única célula capaz de produzir proteína C totalmente ativa em escala comercial, dentre diversas outras células (GRINNELL; YAN; MACIAS, 2006). Em relação a célula de mamífero BHK, que expressa o FVIIr comercializado pela NovoNordisk, há uma moderada capacidade de realizar gama-carboxilação, inclusive a mesma empresa, passou a produzir FVIIa em célula CHO para a segunda geração desse produto (KUMAR, 2015; MATSUSHITA et al., 2014).

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi primeiramente avaliar o potencial de produção do fator VII da coagulação sanguínea humana recombinante (FVIIr) nas linhagens de células humanas HKB-11, SK-Hep-1, Huh-7 e HEK 293 em condições de cultivo em suspensão em meios livres de SFB para escolher a mais adequada para então otimizar esta produção.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1 Avaliação da susceptibilidade das células a diferentes concentrações de vitamina K em condições de cultivo em suspensão livres de SFB;

2.1.2 Avaliação da expressão de FVIIr pelas linhagens nas concentrações de vitamina K definidas anteriormente;

2.1.3 Escolha da linhagem mais adequada para a expressão de FVIIr;

2.1.4 Estabelecimento das condições de cultivo para otimizar a expressão de FVIIr na linhagem escolhida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A primeira etapa deste trabalho envolveu a escolha da célula mais promissora em relação à produção de FVIIIr. Na segunda etapa, a célula escolhida foi utilizada para os experimentos de otimização envolvendo o uso de suplementos para o meio de cultura e variação na temperatura de cultivo. Os materiais e metodologias que foram utilizados para execução de cada uma das etapas desta pesquisa, estão descritos a seguir e foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), e no Laboratório de Cultura Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.1. Linhagens celulares humanas

As linhagens celulares humanas HKB-11 e SK-Hep-1 (HTB-52TM e CRL-12568TM, respectivamente) utilizadas foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e adaptadas ao crescimento em suspensão em meios de cultura livres de SFB (Biaggio et al., 2015). A linhagem Huh-7 (JCRB0403) foi cedida pelo Dr. Carlos Augusto Pereira do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, São Paulo. A linhagem HEK293SF-3F6 foi doado pelo Dr. Amine Kamen, do *National Research Council* Canada, Montreal, Canadá. As quatro linhagens celulares citadas acima foram geneticamente modificadas (Figura 3.1) para expressar o gene do FVIIIr e também a proteína fluorescente GFP como marcador, através de dois ciclos de transdução, utilizando vetores lentivirais, com Multiplicidade de Infecção (MOI) de 1 para o primeiro ciclo de transdução e MOI de 2 para o segundo ciclo (BIAGGIO, 2018). Uma população celular homogênea expressando GFP foi selecionada através de dois *Cell Sorting* no citômetro de fluxo BD FACSAria III (BD Biosciences).

Figura 3.1 - Esquema da modificação gênica das células de maneira estável, realiza pelo Dr. Rafael Biaggio, utilizando vetores lentivirais: p1054-FVII contendo o transgene, pCMVΔR 8.91 e o pMD2.VSV-G. Após dois ciclos de transdução com MOI=1 e 2, as células passaram por um processo de *Sorting*, visando a seleção de uma população GFP positiva mais homogênea.

Fonte: Autoria própria

3.2. Meios de Cultura livres de SFB

O meio de cultura CDM4CHO (SH30556.01, HyClone™, Utah, EUA) foi utilizado para o cultivo das células SK-Hep-1, HKB-11 e HEK293SF. O preparo ocorreu de acordo com instruções do fabricante, utilizando suplementação de 6mM de Glutamax® (35050-061, Gibco, NY, EUA), 0,1% de 10% Pluronic® F-68 (2404-32, Gibco, NY, EUA) e 2,2g de NaHCO₃ (S5761-500G, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). O pH final do meio foi ajustado para a faixa de 7,2-7,4.

Em relação à célula Huh-7, o meio escolhido foi o CD293 AGT™ (1846979, HyClone™, NY, EUA), suplementado com 4mM de Glutamax® 100X (35050-061, Gibco, NY, EUA). O pH foi ajustado na faixa de 7,2-7,4. Ambos os meios de cultura citados acima foram selecionados após estudos prévios realizados por Biaggio e colaboradores (2015, 2018), que determinaram esses como os melhores meios para crescimento das células.

3.3. Criopreservação e descongelamento de células

A criopreservação das células foi realizada em uma solução de congelamento livre de SFB - HyCrio (Sigma-Aldrich) na concentração de 5×10^6 células/mL. Os criotubos contendo a suspensão celular (proveniente de uma cultura em fase de crescimento exponencial) foram levados ao sistema de resfriamento Mr. Frosty™ (Nalgene) e mantidos em freezer a -80°C por pelo menos 24 horas. Após esse período foram armazenados em nitrogênio líquido a -194°C .

O descongelamento das células foi realizado de maneira rápida, por meio do aquecimento dos criotubos por dois minutos, sem que houvesse o descongelamento total das células, em banho maria a 37°C . O conteúdo celular foi então ressuspendido com 10mL de meio de cultura. O crescimento e viabilidade celular foram acompanhados para avaliação da estabilidade da criopreservação. No caso de células adaptadas com vitamina K (Kanakion®, Roche, RJ, Brasil), o descongelamento foi realizado em meio sem essa vitamina, pois isso aumentava a eficácia do processo de descongelamento, visto que o efeito citotóxico da vitamina K somado ao estresse do descongelamento acarretava numa grande diminuição da viabilidade das células.

3.4. Condições de cultivo

A expansão inicial e manutenção celular foi realizada em um ambiente umidificado com 5% de CO_2 a 37°C tanto em garrafas estáticas T75 cm^2 não tratadas quanto em frascos *erlenmeyer*. Nas garradas T75 cm^2 as células foram cultivadas a partir da concentração inicial de 3×10^5 células/mL em 10 mL de meio de cultura. Os cultivos em suspensão em frascos *erlenmeyer* (polycarboneto, Corning®) de 125mL foram realizados partindo de concentração inicial de $0,3-0,5 \times 10^6$ células/mL com um volume de trabalho entre 15-20 mL em incubadora (CH-4103, InforsHT, Bottmingen, Suíça) com ambiente umidificado de 5% CO_2 a 37°C , sob agitação orbital de 150 rpm. A cada 48h-72h eram realizados novos subcultivos, com objetivo de manter uma ótima viabilidade e crescimento das células.

3.5. Avaliação da citotoxicidade da vitamina K nas linhagens celulares humanas

Para avaliar a citotoxicidade da vitamina K nas células SK-HEP-1, Huh-7, HKB-11 e HEK293 SF cultivadas em suspensão em meios livres de SFB, foram realizados ensaios em placas de seis poços não-tratadas (Costar[®]), sob agitação orbital de 150 rpm. Cada poço foi preenchido com volume de 3 mL de meio e concentração celular inicial de 1×10^6 células/mL. As concentrações de vitamina K testadas foram 0 µg/mL (controle); 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,6 µg/mL; 0,8 µg/mL e 1,0 µg/mL. A placa foi deixada num ambiente umidificado com 5% CO₂ a 37°C. O crescimento e viabilidade celular foram verificados por um período de três dias. Para isto, uma alíquota de 50 µL foi retirada de cada poço a cada 24h.

3.6. Avaliação do potencial de expressão de FVIIr pelas linhagens celulares humanas

As células SK-Hep-1, HKB-11 e HEK293 SF foram cultivadas em meio contendo 1,0 µg/mL de vitamina K, enquanto Huh-7 foi cultivada em meio com 0,2 µg/mL de vitamina K. Assim, para verificação da capacidade de produção de cada uma dessas células, um cultivo de 5 dias (120h) foi realizado em frascos *erlenmeyers* de 125 mL contendo 20 mL de volume e concentração inicial de 1×10^6 células/mL, sob agitação de 150 rpm. A quantidade de proteína produzida foi determinada por meio do *Factor VII Human ELISA Kit* (ab108829, Abcam, Reino Unido). A cada 24h, uma alíquota de 2 mL foi retirada e 1,5 mL foi centrifugada (Universal 320R, Hettich, Tübingen, Alemanha) a $122 \times g$ por 5 minutos a 20°C e o restante foi utilizado para contagem de células e viabilidade em câmara de Neubauer (K5-0111, OLEN, Reino Unido). As amostras de sobrenadante ficaram armazenadas em tubos *eppendorf* a -20°C até o dia da análise.

3.7. Adaptação da célula HKB-11 para crescimento em meio CDM4CHO contendo 2,5 µg/mL vitamina K

Uma vez que a atividade biológica do FVII é dependente de vitamina K e um aumento da concentração dessa vitamina no meio poderia aumentar a expressão do FVIIr ativo (FVIIra), avaliamos o cultivo em maiores concentrações de vitamina K. Para isso um protocolo de adaptação foi realizado, com subcultivos em concentrações

crecentes de vitamina K. A cada 2-3 passagens, se não houvesse diminuição da viabilidade celular e crescimento, uma concentração maior de vitamina era acrescentada ao meio. Após alcançar a concentração de vitamina de interesse, 5-6 passagens eram realizadas, de maneira que se a célula mantivesse o crescimento normal e a viabilidade alta, seria considerada adaptada e o banco de trabalho seria preparado. A suplementação do meio com 10% Cell Boost™ 5 (CN-F) (SH30865.01, GE Healthcare, Upssala, Suécia) foi necessária quando a célula apresentou maior suscetibilidade a toxicidade da vitamina K. Nesses casos, em cada subcultivo, adicionava-se o suplemento e, após descongelamento da célula adaptada, esse suplemento não era mais utilizado.

3.8. Cinéticas de crescimento da célula HKB-11 em diferentes condições para avaliação do metabolismo

A célula HKB-11 foi cultivada por 10 dias (240h) em frascos *erlenmeyers* de 125 mL, com volume de trabalho de 20 mL, sob agitação orbital de 150 rpm, em ambiente umidificado com 5% de CO₂, a 37°C, em três diferentes condições: com suplementação de 1,0 µg/mL de vitamina K, suplementação de 2,5 µg/mL de vitamina K e sem suplementação, para análise posterior do crescimento e metabolismo celular. A concentração celular inicial foi de 3x10⁵ células/mL. A cada 24 horas, uma alíquota de 2 mL era retirada do meio, desse total, 500 µL eram utilizados para contagem em câmara de Neubauer para verificação da concentração e viabilidade celular pelo método de exclusão de azul de trypan. O restante (1,5 mL) era centrifugado a 122 x g por 10 minutos, a 20 °C. O sobrenadante era armazenado em tubos *eppendorff* com volume de 1,5 mL e armazenados em freezer a -20°C até a análise do metabolismo. O meio volume retirado do cultivo era repostado, de forma a manter o volume de trabalho constante.

3.9. Otimização da expressão de FVIIr utilizando um delineamento experimental do tipo Box-Behnken

Visando o aumento da expressão de FVIIr pela linhagem celular HKB-11, foi realizada uma otimização utilizando delineamento experimental fatorial do tipo Box-Behnken (DBB) com quatro variáveis independentes (4:3:27), três níveis diferentes (-

1, 0, 1), três blocos, 3 pontos centrais e 27 ensaios no total. A Tabela abaixo representa todos os ensaios do delineamento experimental, assim como os níveis de cada variável analisada.

O potencial de três aditivos: Butirato de Sódio (NaBu) (303410-100G, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), L-Glutationa Reduzida (GSH) (G4251-25G, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), Ácido Cítrico (A1026.01.AG, Synth, SP, Brasil) além da temperatura de cultivo, foram analisados. Além dos ensaios definidos pelo delineamento, outros ensaios controle foram realizados em duplicata em cada temperatura (31°C, 34°C, 37°C) sem a presença de aditivos com intuito de comparar apenas o efeito da temperatura, além da influência dos aditivos no crescimento e viabilidade das células durante o cultivo.

Tabela 3.1 - Matriz para o DBB contendo quatro variáveis independentes.

Ensaio	Ácido Cítrico	Butirato de Sódio	L-Glutationa	Temperatura
1	-1,00	-1,00	0,00	0,00
2	1,00	-1,00	0,00	0,00
3	-1,00	1,00	0,00	0,00
4	1,00	1,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	-1,00	-1,00
6	0,00	0,00	1,00	-1,00
7	0,00	0,00	-1,00	1,00
8	0,00	0,00	1,00	1,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	-1,00	0,00	0,00	-1,00
11	1,00	0,00	0,00	-1,00
12	-1,00	0,00	0,00	1,00
13	1,00	0,00	0,00	1,00
14	0,00	-1,00	-1,00	0,00
15	0,00	1,00	-1,00	0,00
16	0,00	-1,00	1,00	0,00
17	0,00	1,00	1,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00
19	-1,00	0,00	-1,00	0,00
20	1,00	0,00	-1,00	0,00
21	-1,00	0,00	1,00	0,00
22	1,00	0,00	1,00	0,00
23	0,00	-1,00	0,00	-1,00
24	0,00	1,00	0,00	-1,00
25	0,00	-1,00	0,00	1,00
26	0,00	1,00	0,00	1,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00

Os valores codificados das variáveis estudadas para aumento da expressão do FVIIr são apresentados na Tabela 3.2. O menor nível representa ausência do aditivo e a menor temperatura, de 31°C. Assim, foi possível analisar ensaios que continham apenas um dos aditivos, o que permite analisar a influência de cada um deles separadamente.

Tabela 3.2 - Valores utilizados no DBB para as quatro variáveis estudadas.

Fatores	Código	-1	0	1
Ácido Cítrico (mM)	X ₁	0	1	2
Butirato de Sódio (mM)	X ₂	0	1	2
L-Glutationa Reduzida (mM)	X ₃	0	2,5	5
Temperatura (°C)	X ₄	31	34	37

Os valores utilizados no planejamento experimental foram baseados em estudos prévios que analisaram o potencial dessas substâncias no aumento da expressão de FVIIr e outros proteínas recombinantes (PARK, 2016; TUDRYN et al. 2016; GOULART et al. 2010).

3.9.1 Preparo das Soluções para otimização

As soluções de NaBu, Ácido Cítrico e GSH utilizadas na suplementação do meio CDM4CHO durante a otimização foram preparadas utilizando-se água ultra-pura (Milli-Q Synthesis, Millipore) como solvente. As soluções de NaBu, GSH e ácido cítrico foram preparadas em balões volumétricos de 20mL nas concentrações finais de 400 mM, 250 mM e 500 mM, respectivamente. Todas as soluções foram ajustadas para um pH similar ao meio de cultura (7,2-7,4), utilizando KOH (1M) e pHmetro de bancada (HI2221, HANNA Instruments, Singapura) e depois do preparo, foram filtradas em membranas de 0,22 µm (Milipore, Billerica, EUA). Durante o preparo de GSH foi necessário aquecimento da água em banho-maria a 37°C devido a solubilidade baixa desse composto em água (50mg/mL), além disso GSH é um composto altamente oxidável quando em contato com ar, sendo assim, após seu preparo e ajuste do pH

para 7,4 foi imediatamente alicotado e armazenado em freezer a -20°C . Tanto Nabu quanto Ácido Cítrico foram armazenados a temperatura de $2-8^{\circ}\text{C}$.

3.9.2 Ensaios de Otimização da expressão de FVIIIr em tubos Mini Biorreator

Os ensaios de otimização ocorreram durante 96 horas em tubos Mini Biorreator de 50 mL (Corning®), representado na Figura 3.2, com volume de trabalho de 5mL, concentração celular inicial de 1×10^6 células/mL e sob agitação orbital de 180 rpm. Uma agitação superior foi utilizada neste caso pois a agitação utilizada nos cultivos anteriores (150rpm) levou à formação de pellets e grumos. A escolha de tal sistema se deu pelo menor volume de trabalho necessário, quando comparado a outros sistemas como *erlenmeyers*, além desse sistema apresentar boa reprodutibilidade e ser bastante promissor para análise de diversas condições de processos de maneira rápida (DE JESUS et al., 2004; VILLIGER-OBERBEK et al. 2015; GOMEZ et al. 2017).

Os três aditivos estudados foram adicionados no primeiro dia de cultivo (0h) e a cada 24 horas uma pequena alíquota (50 μL) foi retirada do tubo minibiorreator para análise da concentração e viabilidade celular pelo método de exclusão de azul de trypan (FRESHNEY, 2010). No último dia, todo o conteúdo do tubo foi centrifugado a $122 \times g$ por 5 minutos, a 20°C . Os sobrenadantes foram armazenados em alíquotas de 1 mL em freezer a -20°C até a quantificação de FVIIIr e atividade biológica por *ELISA* e TP, respectivamente.

Figura 3.2 - Tubo Mini Biorreator de 50 mL (Corning®) utilizado para os ensaios de otimização

Fonte: Retirado de <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/US/en/Bioprocess-and-Scale-up/Erlenmeyer-Flasks/Erlenmeyer-Flasks-Plastic/Corning%C2%AE-50-mL-Mini-Bioreactor/p/431720>.

3.10. Métodos Analíticos

3.10.1 *Análise da concentração e viabilidade celular*

A concentração de células foi determinada através de contagem em hemocitômetro utilizando o método de exclusão por Azul de Trypan. Amostras do cultivo, aproximadamente 500µL, foram coletadas e 10µL dessa amostra foi adicionada a solução de Azul de Trypan 0,4% (T8154-100ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e levadas para o hemocitômetro. As células mortas cuja membrana perdeu a capacidade seletiva, ficam coradas em azul. A quantidade de células viáveis foi subtraída da quantidade de células mortas. A viabilidade celular foi determinada por meio da razão entre o número de células mortas e as células totais.

3.10.2 *Determinação da atividade biológica por Tempo de Protrombina (TP)*

Para análise de atividade do FVIlr expresso foi utilizado o método de Tempo de Protrombina (TP), que consiste na avaliação do tempo de formação de um coágulo de fibrina num plasma deficiente de plaquetas, estimulado por altas doses de fator tecidual e fosfolípido aniônico sob uma concentração ótima de cálcio. Pelo fato de analisar a comumente chamada via extrínseca da coagulação, o TP é empregado na quantificação da atividade biológica dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K (ROSHALL, 2013; NG, 2009).

Os sobrenadantes dos cultivos foram descongelados e centrifugados a 3000 x g por 10 minutos a 4°C. As diluições das amostras foram feitas com diluente (Hemosil) nas proporções de 1:2 e 1:3, além da amostra pura. Essas amostras foram levadas para o aparelho ACL 7000 (ACL 7000 Bioanalyzer, Instrumentation Laboratory, MA, EUA). A curva de calibração foi preparada de acordo com as instruções do fabricante e o tempo de formação de Protrombina foi expresso em segundos e convertidos para UI (Unidades Internacionais), de acordo com a convenção de que 1 UI equivale a 100%.

3.10.3 Determinação da produção de FVIIr através de ELISA

As amostras dos sobrenadantes dos cultivos, descritos no item 3.8 foram descongeladas e centrifugadas a 3000 x g por 10 min a 4°C em centrífuga de bancada (Eppendorf AG 22331, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para retirada de debris celulares. A seguir, o FVIIr de cada amostra foi quantificado utilizando o *Factor VII Human ELISA Kit* (ab108829, Abcam, Reino Unido), seguindo instruções do fabricante. Para tanto, todas as soluções, tais como *Wash Buffer*, Diluente N, foram preparadas com água ultrapura. Para o preparo da curva padrão, utilizou-se o fator VII liofilizado (*Factor Seven Standard*) proveniente do kit diluído nas seguintes concentrações: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 0 ng/mL. Todas as amostras e suas respectivas diluições, além da curva padrão, foram preparadas em duplicata e ao final do processo, a placa foi levada ao leitor de microplacas multimodal de luminescência (SpectraMax5, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), para a leitura em um comprimento de onda de 450nm. A capacidade mínima de detecção do kit é de 6 ng/mL, conforme descrito pelo fabricante.

3.10.4 Determinação das concentrações de glicose, glutamina, lactato e amônio nos sobrenadantes dos cultivos da célula HKB-11

Conforme descrito no item 3.7, os sobrenadantes dos ensaios de crescimento e metabolismo da célula HKB-11 no meio CDM4CHO na presença de 1,0 µg/mL ou 2,5 µg/mL, assim como na ausência foram congelados para análise dos substratos e subprodutos do metabolismo. Essa análise foi realizada no analisador bioquímico YSI 2700 Select (YSI analyzer, Yellow Springs Instruments, OH, EUA), que utiliza enzimas imobilizadas numa membrana com intuito de catalisar uma reação que produz peróxido de hidrogênio (H₂O₂), conforme a reação mostrada abaixo. O H₂O₂ gerado é oxidado no anodo de platina de uma sonda eletroquímica, produzindo uma corrente como sinal proporcional a concentração da espécie analisada.

Para determinação da concentração de NH₄ nos sobrenadantes dos cultivos, foi utilizado o phmetro de bancada Orion 710Aplus (Orion710Aplusm Thermo

Scientific, MA, EUA). Aproximadamente 500µL de cada sobrenadante era adicionado a uma solução contendo 19mL de água ultra-pura e 400µL de “*Ammonia Ionic Strength Adjustor*” (ISA), sob agitação magnética. O resultado era apresentado em mg/mL e depois convertido para mM.

3.11 Análise dos Resultados

3.11.1 Cálculo da velocidade específica máxima de crescimento e tempo de duplicação

O crescimento celular foi avaliado por dois parâmetros principais, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e o tempo de duplicação (T_d), que é o tempo necessário para dobrar o número de células durante o cultivo, estimados conforme equações abaixo.

$$\mu_{\max} = \ln(X - X_0) / (t - t_0) \quad (1)$$

$$T_d = \ln 2 / \mu_{\max} \quad (2)$$

Onde X=densidade celular (células/mL) em determinado tempo, t= tempo de cultivo em horas.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando diferentes softwares: Excel® (versão 2016) e Origin® (versão 8.5, OriginLab Corporation).

3.11.2 Cálculo da Integral de Células Viáveis

A integral de células viáveis (ICV) foi calculada utilizando o software Origin 8.5, através do comando “integrate” que calcula a área sob a curva de células viáveis por tempo, por meio da equação a seguir, que representa a soma dos trapézios.

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

A ICV é um parâmetro útil para comparação do crescimento em diferentes

condições ou entre diferentes células num mesmo sistema, além de ser utilizado para o cálculo de outros parâmetros importantes do metabolismo celular, conforme explicado no item seguinte.

3.11.3 Cálculos das velocidades específicas de consumo e produção pela célula HKB-11 em meio CDM4CHO

As taxas específicas de consumo e produção para a célula HKB-11, durante os cultivos em batelada, foram determinadas a partir da inclinação da reta gerada pelos valores obtidos para as concentrações de substratos ou produtos em função da ICV, durante a fase exponencial de crescimento. Dessa maneira, as taxas de consumo de glicose (q_{Glc}) e de glutamina (q_{Glu}), além das taxas de produção de lactato (q_{Lac}) e amônio (q_{Am}) foram calculadas para a célula HKB-11 e comparadas para identificar o efeito do aumento da vitamina K suplementado no meio de cultivo sobre o metabolismo da célula.

3.11.4 Cálculos dos Fatores de Conversão

Os fatores de conversão, também conhecidos como rendimento, medem a conversão de substratos (glicose/glutamina) em células, produtos ou energia (ATP). São consideradas excelentes variáveis para a caracterização do sistema, pois levam a um melhor entendimento das mudanças metabólicas durante o cultivo (AUGUSTO; BARRAL; PICCOLI, 2008).

Os valores dos fatores de conversão foram obtidos a partir da inclinação da reta Concentração de lactato vs. Concentração de glicose, no intervalo correspondente a fase exponencial de crescimento para cada experimento.

3.11.5 Análise estatística

Os parâmetros de crescimento e metabolismo foram avaliados através de “*One-way Analysis of Variance*” ANOVA, considerando-se um nível de confiança $\alpha=5\%$. Quando houve diferença estatística entre os dados analisados, um teste “*post-hoc*” de Tukey foi executado para determinar quais níveis ou tratamentos estavam diferentes

entre si. Tanto esses testes estatísticos quanto o cálculo das médias e desvios padrões foram efetuados no software Origin® (OriginLab, versão 8.5, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Citotoxicidade da Vitamina K

Neste trabalho, avaliou-se o potencial de quatro linhagens celulares humanas, SK-Hep-1, HKB-11, Huh-7 e HEK293SF, adaptadas ao cultivo em suspensão em meios livres de SFB para expressão de FVIIr (BIAGGIO, 2018; BIAGGIO et al., 2015). O FVIIr da coagulação sanguínea é dependente da vitamina K para sua correta atividade biológica e por isso foi necessária a suplementação do meio com tal vitamina. Entretanto, logo nos primeiros cultivos, verificou-se que a adição de 5,0 µg/mL de vitamina K, concentração comumente encontrada na literatura para cultivos utilizando células aderentes e meios suplementados com SFB (BERKNER, 1993), levou a uma grande queda na viabilidade e concentração de células viáveis. Foi necessário então avaliar a citotoxicidade da vitamina K para cada uma das células, tendo em vista sua influência negativa no crescimento e viabilidade das mesmas.

Os experimentos foram realizados em placas de 6 poços em suspensão, num ambiente umidificado, sob agitação orbital de 150 rpm a 37°C e 5%CO₂ (n=3). As concentrações de vitamina K analisadas foram: 0 (controle), 0,2; 0,4, 0,6; 0,8 e 1,0 µg/mL. Tais concentrações foram determinadas de acordo com a concentração comumente utilizada em cultivos em suspensão em condições livres de SFB, que varia de 50 ng/mL até 1,0 µg/mL de vitamina K (BERKNER, 1993). Os resultados obtidos para as curvas de crescimento e viabilidade são apresentados na Figura 4.1.

Dentre as células estudadas, a que apresentou uma maior sensibilidade a adição de vitamina K ao meio foi a célula Huh-7. Por ser uma linhagem derivada de hepatocarcinoma humano (HCC), a queda acentuada tanto na viabilidade quanto no crescimento dessa célula, já nas primeiras 24 horas, corrobora alguns estudos que verificaram o efeito inibitório da vitamina K nesse tipo de célula. Num desses estudos, três linhagens celulares de hepatocarcinomas foram estudadas, além da Huh-7, HepG2 e Hep3B. Verificou-se que a metatretenona, derivada da Vitamina K₂, foi capaz de inibir o crescimento dessas células, de maneira dose dependente em 48 horas, através da supressão na expressão de Ciclina D1 devido a inibição do fator de transcrição conhecido como Fator Nuclear kB, responsável pela regulação de Ciclina

D1 e inibição da expressão de outros genes responsáveis pelo crescimento celular, apoptose e metástase (OZAKI et al., 2007).

A concentração de 0,2 µg/mL de vitamina K foi a máxima concentração que permitiu um crescimento celular para a célula Huh-7, sem decréscimo da viabilidade durante as 72 horas de cultivo, similar ao resultado encontrado no cultivo com ausência dessa vitamina (controle). Para todas as outras concentrações, houve uma inibição do crescimento logo no primeiro dia, juntamente com uma queda na viabilidade das células. Assim, ao final dos três dias, praticamente não havia células vivas nas concentrações de vitamina K de 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 µg/mL, enquanto que para o controle e concentração de 0,2 µg/mL, verificou-se uma concentração média de $3,45 \times 10^6 \pm 0,82$ células/mL e $2,98 \times 10^6 \pm 0,66$ células/mL no último dia, respectivamente.

Em relação as demais células, não houve influência da vitamina K no crescimento e na viabilidade nas concentrações analisadas. As curvas de crescimento apresentaram comportamentos similares, algumas vezes com concentrações celulares mais altas quando em maiores concentrações de vitamina K. Para SK-Hep-1, a concentração celular atingida no último dia (72h) foi de $2,94 \times 10^6 \pm 0,94$ células/mL para a condição controle (sem vitamina K), muito semelhante as demais concentrações: 0,2 µg/mL: $2,55 \times 10^6 \pm 0,4$ células/mL; 0,4 µg/mL: $2,88 \times 10^6 \pm 0,55$ células/mL; 0,6 µg/mL: $3,09 \times 10^6 \pm 0,69$ células/mL; 0,8 µg/mL: $2,78 \times 10^6 \pm 0,38$ células/mL; 1,0 µg/mL: $2,98 \times 10^6 \pm 0,49$ células/mL. A viabilidade foi mantida entre 80% e 95% durante os três dias de cultivo para SK-Hep-1 em todas as concentrações de vitamina K. Em 2009, Yamamoto e colaboradores avaliaram a influência de VK2 no crescimento de células HCC *in vitro*, incluindo SK-Hep-1 e Huh-7, e verificaram que a partir de uma concentração de 10 µM de VK2, ocorreu inibição do crescimento para todas as células e esta aumentou de maneira dose dependente. No ensaio de Citotoxicidade, a concentração máxima de vitamina K1 foi de 1,0 µg/mL, o que representa uma concentração de aproximadamente 2,2 µM, abaixo da utilizada no estudo citado.

Para as células HKB-11, a concentração máxima de células foi observada em 48h, exceto para a concentração de vitamina K de 0,2 µg/mL. A viabilidade variou bastante durante o cultivo (60%-90%), sendo que para a célula no meio sem vitamina K, chegou a $62 \pm 8\%$, abaixo das outras concentrações.

Dentre todas as células, a 293SF foi a que atingiu a maior concentração celular durante o ensaio de citotoxicidade, $4,62 \times 10^6 \pm 0,71$ células/mL em 72h, sob ausência de vitamina K. Em todas as concentrações de vitamina K, as células atingiram concentração de células viáveis acima de 3×10^6 /mL e mantiveram uma viabilidade na faixa de 70 a 92% durante as 72h do ensaio. Em 2011, Tie e colaboradores fizeram um estudo funcional de vitamina K em células de mamíferos, utilizando HEK293 em meio contendo 10% SFB e uma concentração de VK1 de 11 μ M (5 μ g/mL) para expressar uma proteína repórter FIXgla-PC e verificaram a influência da vitamina K na carboxilação, de maneira que mesmo na ausência de Warfarina, após uma concentração de vitamina K na faixa de 5 μ M, não havia influência na quantidade de FIX gama-carboxilado.

Apesar da susceptibilidade de algumas HCC, em relação a vitamina K, alguns estudos demonstraram a capacidade dessas células na expressão de fatores da coagulação dependentes de vitamina K. Por exemplo, Enjolras e colaboradores (2012) produziram fator IX recombinante (FIXr) em Huh-7, utilizando uma concentração de 5,0 μ g/mL de VK1. No entanto, o cultivo foi realizado com 10% de SFB, cuja composição contém diversos fatores de crescimento, hormônios, proteínas, lipídeos e outros componentes, que promovem um crescimento celular, proliferação e ajudam no metabolismo (BRUNNER et al., 2010). Utilizando suplementação do meio de cultura com 10% de SFB, uma pesquisa observou a produção de bons níveis do FVIIIr da coagulação tanto em HepG2 quanto em SK-Hep-1, utilizando uma concentração de 5,0 μ g/mL de vitamina K (FREITAS et al., 2017).

Figura 4.1 - Avaliação do crescimento e viabilidade das células SK-Hep-1 (a), HKB-11 (b), 293SF (c) e Huh-7 (d) durante 72h de cultivo em meios livres de SFB na ausência de vitamina K e com diferentes concentrações de vitamina K (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$), em placas de 6 poços sob agitação orbital de 150rpm, 37°C e 5% CO_2 (n=3).

Fonte: Dados do estudo

Com intuito de analisar de maneira estatística o efeito citotóxico da vitamina K nas concentrações estudadas, realizou-se o cálculo da Integral de células viáveis (ICV) acumuladas durante o cultivo para cada uma das células em cada concentração de vitamina, conforme mostrado na Figura 4.2. A existência de diferença estatística foi verificada por meio da Análise de Variância (Anova) *ONE-WAY* seguido de um teste *post-hoc* de *Tukey*.

Figura 4.2 - Análise da influência de diferentes concentrações de vitamina K (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) sobre a ICV das células SK-Hep-1 (a), HKB-11 (b), 293SF (c) e Huh-7 (d). A barra contendo o símbolo * indica diferença significativa entre as médias ($p < 0.005$). Ausência de barra ou ns (não-significativo), indica que não há diferença estatística significativa ($p > 0.005$)

Fonte: Dados do estudo

A única célula que apresentou diferença significativa entre as médias de ICV nas diferentes concentrações de vitamina K estudadas, foi Huh-7, corroborando o que foi observado nos gráficos de curva de crescimento e viabilidade da Figura 4.1. Não houve diferença entre a ICV do controle em relação a concentração de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de

vitamina K, considerando-se um alfa de 5%, conforme demonstrado na Figura 4.2. Na comparação do cultivo controle e com 0,2 µg/mL de vitamina, houve uma diferença significativa da ICV para os demais cultivos, sendo que a média total de células acumuladas para o controle, 258 (10^6 células*h/mL), e na concentração de 0,2 µg/mL, 245 (10^6 células*h/mL), foi duas vezes maior do que a média das outras concentrações, que foi de 117 (10^6 células*h/mL). Em relação às demais células não houve diferença significativa entre as concentrações testadas e o controle. A ICV variou de 313 até $360 \cdot 10^6$ células*h/mL para a HEK293SF, variação muito próxima daquela encontrada para célula SK-Hep-1, que foi de 200 até aproximadamente $350 \cdot 10^6$ células*h/mL, valores esses um pouco acima daqueles encontrados para a célula HKB-11, que foi de 95 até $140 \cdot 10^6$ células*h/mL.

4.2. Avaliação da expressão e atividade biológica do FVIIr pelas células em cultivos com suplementação de vitamina K

Após os ensaios de citotoxicidade de vitamina K, foi demonstrado que as células SK-Hep-1, HKB-11 e 293SF poderiam ser cultivadas em meio (CDM4CHO) com suplementação de 1,0 µg/mL de vitamina K, sem que houvesse interferência no crescimento e viabilidade, enquanto que a célula Huh-7 poderia ser cultivada em meio (CD293) contendo uma máxima concentração de 0,2 µg/mL de vitamina K. Para os estudos de avaliação da expressão e atividade biológica do FVIIr produzidos nas células, as mesmas foram então cultivadas em frascos *erlenmeyers*, sob agitação orbital de 150rpm, em ambiente umidificado, a 37°C e 5% CO₂, com suplementação de vitamina K nas concentrações acima indicadas. A concentração inicial de células foi de $1 \cdot 10^6$ células/mL e o sobrenadante do segundo dia de cultivo (48h) foi coletado para avaliar a produção de FVIIr por ELISA e atividade biológica por TP. Os resultados são apresentados na Figura 4.3, apresentada a seguir (n=3).

Dentre as quatro células estudadas, aquelas que apresentaram maior expressão de FVIIr total em relação as demais foram as células HKB-11 e SK-Hep-1, com uma média de 172,3 ng/mL e 148,5 ng/mL, respectivamente. Utilizando-se do teste ANOVA ONE-WAY com teste *post-hoc* de Tukey, foi possível verificar que a diferença não foi significativa entre elas, apenas em relação as células Huh-7 e 293SF. Aproximadamente 72,3 ng/mL ou 3,6 UI/mL de FVIIr encontrou-se na sua forma ativa

para SK-Hep-1, enquanto que 3,15 UI/mL de FVIIr estava na forma ativa para HKB-11, valores muito próximos. Não foi observado diferença estatística significativa na concentração de proteína ativa para essas células. No entanto, essa diferença ocorreu quando comparada as concentrações de FVIIra de 293SF e Huh-7, cuja alta capacidade de gama-carboxilar proteínas dependentes de vitamina K (ENJOLRAS et al. 2012), não ficou tão evidente neste estudo. Apenas 14,5 ng/mL ou 0,72 UI/mL de FVIIra foi expresso por Huh-7. Entretanto, mesmo expressando níveis inferiores de proteína quando comparada as células SK-Hep-1 e HKB-11, essa linhagem celular apresentou maior potencial de expressão do que a célula HEK293SF, que produziu a menor concentração de FVIIr total (32 ng/mL) e uma baixa concentração de fator ativo, aproximadamente, 1 ng/mL.

Figura 4.3 - Quantificação de FVIIr por ELISA e FVIIr ativo (FVIIra) por PT para os sobrenadantes das células SK-Hep-1, Huh-7, HKB-11 e 293SF em 48h de cultivo (n=3). Barra contendo o símbolo * indica que houve diferença significativa entre as médias e ns (não-significativa) indica que estatisticamente não houve diferença (ANOVA ONE-WAY com teste *post-hoc* de Tukey).

Fonte: Dados do estudo

Comparando a expressão de FVIIIr nas quatro linhagens estudadas com alguns valores da literatura, apresentados na Tabela 4.1, percebe-se que os nossos valores estão abaixo dos obtidos por outros estudos, todavia, a maioria desses utilizou soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura, o que pode gerar dificuldades para a escalabilidade da produção e purificação do produto, além de acarretar no aumento da heterogeneidade da proteína gerada. Além disso, alguns desses trabalhos realizaram diversas otimizações (meio de cultura, vetor, peptídeo sinal) para aumentar a expressão de proteína recombinante.

Tabela 4.1 - Produção de FVIIIr em células de mamífero.

Célula	Sistema de Cultivo	SFB	FVIIIr (ng/mL)	Atividade Biológica (UI/mL)	Otimização	Referência
CHO	Estático	Sim	505	-	Não	Halabian et al., 2009
HEK293	Estático	Sim	228	4.67	Sim	Wajih et al., 2008
CHO K1	Estático	Sim	300	0.54	Não	Xiao et al., 2013
CHO K1	Biorreator	Não	20000	Ausente	Sim	Peng et al., 2016
HEK 293	Estático	Sim	315	-	Sim	Abbasi-Malati et al., 2019
SK-Hep-1	Estático	Sim	702	2.22	Não	Freitas et al., 2017
HKB-11	Estático	Sim	585	0.17	Não	Freitas et al., 2017
BHK	Estático	Sim	222	0.16	Não	Freitas et al., 2017
CHO K1	Estático	Sim	143	7.1	Não	Mashayekhi et al., 2018
imHC	Estático	Sim	22	0.11	Não	Pongjantarasatian et al., 2019

Fonte: Elaborado pelo autor

Em 2017, Freitas e colaboradores produziram FVIIr em três linhagens celulares humanas diferentes: SK-Hep-1, HepG2 e HKB-11 e uma linhagem de célula de mamífero não-humano, BHK. Foram realizados cultivos em sistema estático em meio contendo SFB e agitado com microcarregadores, sendo que as concentrações atingidas no primeiro sistema, em 48h de cultivo, foram de 1176 ng/mL, 702 ng/mL, 585 ng/mL e 222 ng/mL, para HepG2, SK-Hep-1, HKB-11 e BHK, respectivamente. Em relação a célula SK-Hep-1, a concentração foi 4,7 vezes maior do que o observado no presente estudo para a mesma célula. Já para a célula HKB-11, a concentração de FVIIr foi 3,4 vezes superior. Diversos fatores poderiam explicar essa diferença, principalmente a utilização de meio contendo SFB, que contém diversos fatores de crescimento, lipídeos e proteínas que poderiam acarretar no aumento da expressão; a maior concentração de vitamina K adicionada ao cultivo (cinco vezes superior à concentração utilizada no presente estudo), além do próprio sistema de cultivo.

A concentração de FVIIra observada para as células HKB-11 e SK-Hep-1 foram superiores àquelas verificadas nos trabalhos apresentados na Tabela 3, exceto pelo realizado por Wajih e colaboradores (2008) que encontrou uma atividade de 4,67 UI/mL (93 ng/mL) para a proteína expressa em CHO e o estudo de Mashayekhi e colaboradores (2018), que apresentou 7,1 UI/mL (142 ng/mL) para a proteína expressa. A atividade biológica apresentada por SK-Hep-1 neste trabalho foi 1,6 vezes maior do que aquela verificada na mesma célula cultivada em sistema estático, essa diferença foi ainda maior para a célula HKB-11, que expressou 20 vezes mais proteína com atividade biológica do que HKB-11 em sistema estático (Freitas et al., 2017).

Ainda nesse estudo de Freitas e colaboradores (2017), houve uma queda na produção, quando em cultivo sob agitação, considerando o mesmo tempo (48h): tanto para HKB-11 quanto para SK-Hep-1 esse valor ficou abaixo de 150 ng/mL, similar aos valores encontrados para o cultivo dessas mesmas células, sob agitação orbital, no presente trabalho

Alguns trabalhos verificaram a capacidade de diferentes sistemas de expressão, não baseados em células de mamíferos, de expressar FVIIr. É o caso do estudo envolvendo a leishmania do lagarto iraniano, um protozoário tirponossomatídeo, que expressou FVIIra capaz de reduzir o tempo de coagulação em 30 segundos quando comparado ao controle, verificado por meio de TP (MIRZAAHMADI et al., 2011). Células de inseto, Sf9, foram capazes de expressar 30 UI/mL (600 ng/mL de FVIIra)

no sétimo dia de cultivo em meio TNM-FH contendo 10 % de SFB, valor quase dez vezes maior do que o verificado para a célula SK-Hep-1 neste estudo (MASROORI et al., 2010).

Tendo em vista a produção de FVIIr para cada uma das células e também a concentração dessa proteína ativa, a célula escolhida para a continuidade deste trabalho foi a HKB-11. Essa escolha levou em consideração também, a capacidade de crescimento de cada uma das células em cultivo em suspensão em meios livres de SFB e a suscetibilidade à vitamina K. Segundo o estudo realizado por Biaggio em 2015, a célula HKB-11 é capaz de atingir uma concentração celular máxima de 8×10^6 células/mL e apresentar uma velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) de 0.027 h^{-1} em cultivo em suspensão em meio CDM4CHO, enquanto que SK-Hep-1, que apresentou resultados semelhantes quanto a produção e atividade do FVIIr, é capaz de alcançar uma concentração máxima de aproximadamente 2×10^6 células/mL (BIAGGIO et al., 2015). A capacidade de crescimento em altas concentrações é interessante no que tange a cultivos em biorreatores e escalabilidade da produção. Um outro fator importante que foi levado em consideração para a escolha da célula, no que diz respeito à segurança, é a tumorigenicidade da mesma. No caso de SK-Hep-1, estudos com modelo xenográfico demonstraram a capacidade de gerar tumores *in vivo*, além de uma capacidade metastática (EUN et al., 2014; TAI et al., 2018), enquanto que não há relatos de tumorigenicidade para a célula HKB-11.

4.3. Adaptação e cultivo das células HKB-11 em diferentes concentrações de vitamina K para expressão de FVIIr

4.3.1 Análise da influência do aumento de vitamina K no meio de cultura sobre o crescimento e metabolismo da célula HKB-11

Como discutido anteriormente, diversos trabalhos que utilizaram a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina K, comumente empregada em cultivos com SFB, obtiveram resultados superiores aos encontrados neste trabalho (FREITAS et al. 2017; WAJIH et al. 2008). Portanto, após a escolha da célula HKB-11 como a mais promissora para a continuação do trabalho, foi realizada uma etapa de adaptação da

mesma para crescimento em meio de cultura contendo uma concentração de vitamina K de até 5,0 µg/mL com auxílio de suplementação de 10% de Cell Boost 5™ (GE Healthcare, Upssala, Suécia). Esse suplemento contém diversos componentes, tais como vitaminas, elementos traço, lipídios, fatores de crescimento, entre outros, que permitem uma melhora significativa na qualidade do cultivo. No entanto, mesmo com essa suplementação, foi possível adaptar a célula para o crescimento em meio CDM4CHO numa concentração máxima de 2,5 µg/mL de vitamina K, devido a citotoxicidade da mesma. Dessa maneira, foram realizados cultivos de 10 dias (240 horas) em *erlenmeyers* (ambiente umidificado, sob agitação orbital de 150rpm, 5%CO₂, 37°C) da célula HKB-11 em meio CDM4CHO contendo 1,0 µg/mL e 2,5 µg/mL de vitamina K (células adaptadas) e também na ausência dessa vitamina (controle) a fim de investigar a influência da vitamina K sobre o crescimento e metabolismo dessa célula assim como na expressão e atividade biológica do FVIIr. Os resultados desses cultivos são apresentados na Figura 4.4.

Figura 4.4 - Perfis de crescimento e metabolismo da célula HKB-11 cultivada em meio CDM4CHO em três condições distintas: sem vitamina K (a), contendo 1,0 µg/mL (b) e 2,5 µg/mL de vitamina K (c). Curvas de crescimento e viabilidade, consumo de glicose e produção de lactato, concentração de glutamina e produção de amônio (n=3).

Fonte: Dados do estudo

As curvas de crescimento apresentaram perfil semelhante, começando por uma breve fase de adaptação, seguida por uma fase exponencial que para o cultivo sem vitamina K, foi de 24 até 120 horas e para os cultivos contendo vitamina K foi de 24 a 96 horas. A fase estacionária (platô) foi mais pronunciada no cultivo contendo 2,5 µg/mL de vitamina K em comparação aos demais. Todos os cultivos apresentaram uma fase de declínio do crescimento celular de 168 a 240 horas. A viabilidade manteve-se entre 90 e 100% durante quase todo os cultivos com 2,5 µg/mL e sem vitamina K, enquanto no cultivo com 1,0 µg/mL houve queda na viabilidade a partir de

168h. A concentração máxima de células foi atingida em torno das 168 horas para todos os cultivos e ficou entre 4 e 5×10^6 células/mL. As curvas de consumo de glicose e produção de lactato apresentaram perfis semelhantes, exceto pela curva de lactato do cultivo com $2,5 \mu\text{g/mL}$, onde houve um consumo desse metabólito a partir de 192h até o final do cultivo (240h). Essa característica de consumo concomitante de glicose e lactato para obtenção de energia já foi observada para a célula humana HEK293, célula utilizada no estabelecimento da linhagem HKB-11 (CHO et al. 2002), e para a célula de mamífero não-humana CHO (LISTE-CALLEJA et al. 2015; MARTINEZ-MONGE et al. 2019a; HARTLEY et al. 2018, MARTINEZ-MONGE et al. 2019b). Os mecanismos moleculares que levam a tal perfil metabólico ainda não são bem elucidados (HARTLEY et al. 2018), contudo, estudos indicam que esse consumo serve para a detoxificação do pH (H^+), pois o lactato, juntamente com prótons, pode ser transportado para o espaço citosólico e oxidado em piruvato (Figura 4.5), metabólito central que participa de diferentes vias do metabolismo, incluindo o TCA. Esse fenômeno pode ocorrer ainda quando há uma depleção de glicose no meio ou ainda na fase exponencial (ALTAMIRANO et al. 2004), onde o crescimento celular ocorre em altas taxas e por isso o lactato pode servir como uma fonte de energia. De qualquer maneira, essa co-metabolização de lactato-glicose é benéfica, pois gera um metabolismo mais balanceado e redução da concentração de lactato no meio de cultura (LISTE-CALLEJA et al. 2015; MARTINEZ-MONGE et al. 2019a,b).

Figura 4.5 - Lactato oxidado para piruvato, catalisado pela enzima Lactato Desidrogenase (LDH), levando a redução de NAD^+ em NADH . Reação totalmente reversível.

Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em Hartley et al. 2018

Foi observado aumento da concentração de glutamina ao longo do cultivo pois o meio CDM4CHO foi suplementado com GlutaMAX® (Gibco, NY, EUA), um dipeptídeo formado por L-alanil-L-glutamina, que pode ser um substituto para

glutamina, reduzindo o acúmulo de amônia (HA; LEE, 2014). Quando clivado, libera glutamina para o meio, gerando um perfil de aumento na concentração desse aminoácido durante o cultivo. Os cultivos sem vitamina K e com 1,0 µg/mL apresentaram perfis semelhantes de concentração de glutamina e produção de amônio, enquanto o cultivo com 2,5 µg/mL, no que tange a produção de amônio, apresentou uma característica de consumo desse metabólito a partir de 168 horas. Essa característica de utilizar amônia como fonte de nitrogênio já foi reportada para as células humanas HEK293 e Huh-7, quando em condições de baixa concentração de glutamina (LIE et al. 2019).

Amônio e lactato são os dois principais bioprodutos do metabolismo da glicose e glutamina, respectivamente. A concentração desses dois metabólitos durante o cultivo pode interferir tanto no crescimento e viabilidade celular quanto na produtividade e até mesmo no perfil de glicosilação da proteína, no caso do amônio (LAO; TOTH, 1997; YANG; BUTLER, 2000; GUPTA; SHUKLA, 2018). Essa faixa inibitória varia de 2 até 5 mM para o amônio e de 20 a 40 mM para o lactato, onde concentrações acima de 20 mM são suficientes para reduzir a produtividade específica e valores acima de 40mM impactam o crescimento de maneira severa (MA et al., 2009; FU et al. 2016). Em todos os cultivos, a concentração de lactato máxima (Lac_{max}) atingiu valores um pouco acima de 20 mM e coincidentemente o crescimento celular entrou em declínio após atingir essa concentração. Tal fato aconteceu entre o sexto e o sétimo dia (144 e 168 horas) para os três cultivos. O mesmo foi observado para a concentração máxima de amônio (Am_{max}), que durante os cultivos nas três condições, atingiu a faixa considerada inibitória, no quinto dia (120 horas) para os cultivos com 1,0 µg/mL de vitamina K e na ausência dessa vitamina e no sexto dia (144 horas) para o cultivo com 2,5 µg/mL de vitamina K, contudo, nenhum dos cultivos apresentou concentração de amônio acima de 5 mM, que afeta tanto o crescimento quanto a produtividade específica de maneira significativamente negativa (ALTAMIRANO et al. 2013).

A partir dos resultados gerados e representados pelos gráficos da Figura 4.4, foi possível calcular os principais parâmetros de crescimento e metabolismo nos três cultivos, conforme apresentado na Tabela a seguir. De acordo com Pörtner (2009), para caracterizar adequadamente células de mamíferos para produção de proteínas recombinantes devemos considerar os seguintes cálculos: taxa específica de

crescimento específico (μ) e a taxa de morte (k_d), taxa de consumo de substratos (q_s) e também de produção de metabólitos (q_p) além disso a taxa específica de produção da proteína de interesse (q_{FVIIr}) também é requerida, mesmo tendo em vista a complexidade do metabolismo celular e a complexa composição dos meios de cultura.

Tabela 4.2 - Parâmetros de crescimento e metabólicos das células HKB-11 cultivadas em meio CDM4CHO com diferentes concentrações de vitamina K.

	Sem vitamina K	1,0 $\mu\text{g/mL}$ vitamina K	2,5 $\mu\text{g/mL}$ vitamina K
$\mu_{\max}$ (h^{-1})	$0,019 \pm 0,003$	$0,021 \pm 0,001$	$0,022 \pm 0,005$
$X_{\max}$ (10^6 cel/mL)	$4,37 \pm 0,13$	$3,99 \pm 0,45$	$4,46 \pm 0,22$
ICV (10^6 cel*h/mL)	603 ± 11	559 ± 51	705 ± 19
Lac _{max} (mM)	$24,53 \pm 0,62$	$25,60 \pm 1,69$	$22,65 \pm 2,98$
Am _{max} (mM)	$3,93 \pm 0,31$	$3,77 \pm 0,69$	$3,05 \pm 0,70$
q_{Glc} (pmol/cel/dia)	$1,88 \pm 0,13$	$2,42 \pm 0,38$	$2,11 \pm 1,70$
q_{Lac} (pmol/cel/dia)	$1,54 \pm 0,14$	$2,36 \pm 0,6$	$1,91 \pm 0,51$
q_{Am} (pmol/cel/dia)	$0,25 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,10$
$Y_{\text{lac/glc}}$ (mol/mol)	$0,826 \pm 0,043$	$0,987 \pm 0,079$	$1,24 \pm 0,72$

Fonte: Dados do estudo

Os parâmetros metabólicos aqui analisados foram calculados durante a fase exponencial do cultivo, período geralmente estudado em cultivos em batelada. Assim, a taxa de crescimento específico máximo ($\mu_{\max}$), a ICV, a taxa de consumo de glicose (q_{glc}), a taxa de produção de amônia (q_{Am}) e lactato (q_{Lac}) e o fator de conversão lactato/glicose ($Y_{\text{Lac/Glc}}$) estão apresentados na Tabela 4.2. O intuito foi analisar a influência da adição da vitamina K sobre o crescimento, viabilidade e metabolismo celular, assim como sua influência na expressão e atividade biológica do FVIIr.

Pode-se observar na Tabela 4.2 que os valores de $\mu_{\max}$ para os três cultivos foram bastante similares não havendo diferença estatística significativa. Os valores obtidos estão dentro do intervalo usualmente observado para células de mamífero, que varia de $0,013$ até $0,05 \text{ h}^{-1}$ (tempo de duplicação de 20 a 50 horas) (PÖRTNER, 2009). O $\mu_{\max}$ encontrado foi próximo de outros dois trabalhos que utilizaram a célula

HKB-11 em meios livres de SFB em suspensão, que variaram de 0,0185 até 0,0278 h⁻¹ (COSTA E SILVA et al. 2020; BIAGGIO et al. 2015). A concentração máxima de células viáveis em todas as condições ficou entre 4 e 4,5x10⁶ células/mL. Tais valores estão um pouco abaixo do observado por Costa e Silva et al. (2020) para HKB-11, cultivada em meio livre de SFB (Freestyle) em suspensão, que foi de 5,74x10⁶ células/mL. Outro estudo obteve um valor menor de X_{max} (3,74x10⁶ células/mL) para HKB-11 cultivada também em CDM4CHO quando comparada ao valor observado neste trabalho (BIAGGIO et al. 2015). O último parâmetro analisado relativo ao crescimento celular, foi a integral de células viáveis (ICV) que representa a quantidade de células acumuladas durante o cultivo. Dessa maneira as células cultivadas na ausência de vitamina K e na presença de 2,5 µg/ml de vitamina K apresentaram valores significativamente maiores do que aquela cultivada em 1,0 µg/mL de vitamina, $p=0,009$ e $p=0,001$, respectivamente. Podemos observar por meio da Figura 4.4, que a partir do sétimo dia (168 horas) há uma queda acentuada na viabilidade celular no cultivo com 1,0 µg/mL de vitamina K em relação aos outros cultivos. Enquanto a viabilidade desse cultivo ficou em torno de 60% no último dia, para o cultivo sem a vitamina esse valor ficou próximo de 80% e para o cultivo com 2,5 µg/mL ficou próximo de 90%. Além disso, pode-se notar uma fase estacionária mais prolongada para o cultivo com 2,5 µg/mL de vitamina K, o que acarretou no maior acúmulo de células e, portanto, maior valor de ICV. Os valores encontrados para ICV nos três cultivos foram menores do que aquele observado por Costa e Silva e colaboradores (2020) para a célula HKB-11, 1129x10⁶células*h/mL), entretanto o período de cultivo foi de 13 dias (312 horas), superior ao realizado neste trabalho, 10 dias (240 horas). Analisando diversos meios de cultura para cultivo (400 horas) de células CHO, Altamirano e colaboradores (2004), encontraram um valor de ICV variando de 250 a 625 (10⁶células*h/mL), valores próximos dos apresentados neste trabalho.

Os fatores de conversão, substrato em célula ou substrato em produto, são excelentes variáveis para caracterização do sistema e das mudanças do metabolismo durante o cultivo (AUGUSTO; BARRAL; PICCOLI, 2008). Neste trabalho, o fator de conversão lactato/glicose ($Y_{lac/gli}$) foi analisado. Não foi possível calcular o valor do fator de conversão de glutamina em amônio ($Y_{Am/Glu}$), pois GlutaMAX™ foi utilizado para suplementação do meio. O $Y_{lac/gli}$ pode ser considerado inibitório quando fica próximo de 1,1 a 1,7 mol de lactato/mol de glicose (PÖRTNER, 2009). Em cultivos

com limitação de oxigênio, esse valor pode chegar a 2 mol/mol. Os fatores de conversão observados para os cultivos ficaram abaixo dessa faixa inibitória quando na ausência de vitamina K ou na concentração de 1,0 µg/mL. No cultivo com suplementação de 2,5 µg/mL, esse valor ficou dentro da faixa inibitória, apesar disso, como discutido anteriormente, a ICV não foi afetada significativamente e ainda foi superior àquela apresentada no cultivo com 1,0 µg/mL de vitamina K. Diversos trabalhos envolvendo células humanas cultivadas em suspensão com meios livres de SFB, investigaram esse fator de conversão. Um valor de 0,5 mol/mol foi encontrado no estudo com a célula HEK293SF, cultivada em batelada visando a produção de partículas virais do vírus da *Influenza*. Quando a mesma célula foi cultivada em perfusão, esse valor aumentou para 1,6 mol/mol (PETIOT et al. 2011). Com intuito de melhorar a qualidade da glicoproteína expressa, a célula HEK293 foi modificada para conter o gene da piruvato-carboxilase citosólica de levedura (PYC-2), conhecida por melhorar a eficiência do metabolismo de glicose. Dessa maneira houve uma redução de 1,4 vezes no valor do fator de conversão entre a célula não modificada quando comparada com a modificada, que apresentou um fator de 0,7 mol/mol (KARENGERA et al. 2017), muito próximo dos valores reportados para HKB-11. Outros dois trabalhos envolvendo o cultivo de linhagens celulares humanas, encontrou valores de $Y_{lac/glc}$ que variaram de 0,44 até 2,3 mol/mol (COSTA e SILVA et al. 2020; SIEGWART et al. 1999; MARTINEZ-MONGE et al. 2019a). Um desses trabalhos (COSTA e SILVA et al. 2020), observou um $Y_{lac/glc}$ de 0,444 mol/mol para a célula HKB-11 cultivada em meio de cultura Freestyle, um pouco abaixo do valor encontrado para a mesma célula nas três condições estudadas. Tal fato pode ser explicado pelo consumo de lactato durante a fase exponencial de crescimento, como discutido no trabalho citado.

Os últimos parâmetros analisados foram a taxa de consumo específico de glicose (q_{glc}) e as taxas de produção dos metabólitos lactato e amônio (q_{lac} , q_{Am}). Não foi possível calcular a taxa de consumo de glutamina, pois como já foi discutido anteriormente, a suplementação do meio com GlutaMAX™ gera uma curva de glutamina cuja característica é de aumento na concentração desse composto durante o cultivo, devido à quebra do dipeptídeo e liberação de glutamina.

Os valores de q_{glc} , q_{lac} e q_{Am} observados nas três condições de cultivo avaliadas ficaram muito próximos, não ocorrendo diferença estatística significativa. Tais valores, no entanto, ficaram abaixo daqueles reportados em outros trabalhos que envolveram

linhagens celulares humanas cultivadas em suspensão. Um q_{glc} de 2,8 pcd (pmol/cel/dia) e um q_{lac} de 3,13 pcd foi observado para a célula HEK293, num estudo que avaliou a capacidade dessa célula de consumir glicose e lactato de maneira concomitante durante o cultivo (LISTE-CALLEJA et al. 2015). Outros dois trabalhos envolvendo a célula humana HEK293 investigaram o metabolismo dessa célula quando modificada para conter o gene PYC2, citado acima. Houve uma redução significativa nos valores de consumo de glicose, que passou de 3,22 para 1,75 pcd, e na produção de lactato que foi reduzida de 3,05 para 0,53 pcd. Isso gerou um metabolismo mais eficiente da célula modificada, resultando num aumento da concentração de células e expressão da proteína de interesse (IFB α 2B), além da diminuição da concentração de lactato e amônia durante o cultivo (HENRY; DUROCHER, 2011). Esse mesmo grupo investigou o impacto causado pela melhora do metabolismo celular na glicosilação da proteína expressa e concluiu que a célula modificada com PYC2 expressou IFB α 2B com glicosilação mais intacta, mesmo ao final da batelada (KARENGERA et al. 2017). Outros trabalhos com HEK293 encontraram valores de q_{glc} variando de 3,45 a 5,28 pcd e q_{lac} variando de 8,05 a 16 pcd (SIEGWART et al. 1999; MARTINEZ-MONGE et al. 2019a).

A partir desses resultados, podemos inferir que o metabolismo envolvendo glicose e lactato foi eficiente para todos os cultivos, com taxas de consumo de glicose baixas e principalmente, taxas relativamente baixas de produção de lactato, cujo metabolismo tem demonstrado um impacto considerável na qualidade do produto obtido (TORRES; ALTAMIRANO; DICKSON, 2018).

Em relação ao q_{Am} não foram encontrados muitos estudos a respeito em células humanas. Os valores encontrados para as três condições ficaram na faixa de 0,21 a 0,25 pcd, acima daquele observado por Costa et al. (2020), que observaram um q_{Am} de 0,11 pcd para a célula HKB-11 cultivada em meio Freestyle. No mesmo estudo, observou-se um q_{Am} de 0,379 pcd para a célula humana Huh-7 e 0,245 pcd para a célula SK-Hep-1. Alguns trabalhos realizados com células CHO, obtiveram valores de q_{Am} de 0,22 até 0,43 pcd, muito próximos aos observados para HKB-11 nas três condições (NOH et al. 2017; GUPTA et al. 2017).

A análise dos parâmetros de crescimento e metabolismo é uma ferramenta bastante útil na elucidação da qualidade do cultivo e elaboração de estratégias de cultivo para melhorar a expressão da proteína de interesse, principalmente quando

cultivada em sistemas como biorreatores, que permitem controlar e monitorar o cultivo das células. Dessa maneira, mesmo utilizando métodos mais simples (cálculos estequiométricos), e não tão complexos quanto análises moleculares ou proteômica, foi possível notar que não houve influência da adição de vitamina K, com exceção da ICV, no metabolismo celular, demonstrando que as células foram bem adaptadas para o crescimento nessas condições. No entanto, a escolha da melhor condição de cultivo deve levar em consideração também a expressão de FVIIr e a sua atividade biológica, conforme apresentado a seguir.

4.3.2 Influência da suplementação de vitamina K no cultivo sobre a expressão e atividade específica do FVIIr

Após a análise do metabolismo, os sobrenadantes coletados durante o segundo (48h), terceiro (72h) e quarto (96h) dias de cultivo (período da fase exponencial de crescimento) foram analisados quanto a expressão de FVIIr, por meio de ELISA e atividade biológica, por meio de TP, conforme mostrado na Figura 4.6

Figura 4.6 - Comparação da produção de FVIIr total e FVIIr ativo pela célula HKB-11 cultivada em meio CDM4CHO na concentração de 1,0 µg/mL de vitamina K (a) e 2,5 µg/mL de vitamina K (b). Asterisco indica diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) e ns indica que não houve diferença significativa ($n=3$).

Fontes: Dados do estudo

Um dos maiores problemas envolvendo a produção de fatores da coagulação é a baixa expressão e fraca atividade biológica das proteínas produzidas. A expressão e atividade dos fatores dependentes de vitamina K (II, VII, IX, X) são afetadas diretamente por MPTs, tais como a gama-carboxilação do resíduo amino-terminal do domínio Gla, N e O-glicosilações, além da remoção do peptídeo sinal e propetídeo. A gama-carboxilação é responsável pela atividade biológica, que pode ser aumentada por meio de diferentes fatores (VANTANDOOST; PAKDAMAN, 2016), dentre eles a adição de vitamina K (TIE et al. 2011; TIE; STAFFORD, 2016; NAGAHASHI et al. 2017; WANG et al. 1995), cofator envolvido na gama-carboxilação de proteínas dependentes de vitamina K (HAMMED et al. 2013). A comparação entre a expressão de FVIIr total pela célula HKB-11 cultivada em meio com suplementação de 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$, indicou que o aumento na concentração de vitamina K não levou a um aumento na expressão e atividade biológica do FVIIr, nos tempos analisados. Houve diferença significativa em relação a expressão de FVIIr total em 48h ($p=0,0047$) e 72h ($p<0,0001$), onde a expressão média de FVIIr foi duas vezes maior para a célula cultivada com 1,0 $\mu\text{g/mL}$ em relação à cultivada com 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Não houve diferença entre a quantidade de proteína expressa no tempo de 96h ($p=0,364$). Apesar de não analisar todo o período de cultivo, esses dados demonstram que, durante os primeiros dias da fase exponencial de crescimento, o cultivo com 1,0 $\mu\text{g/mL}$ se sobressaiu em relação a expressão de FVIIr em comparação com o cultivo com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina K. No desenvolvimento de um bioprocesso para produção em massa de FVIIr em célula CHO, Tudryn et al. (2016) observaram que o aumento na adição de vitamina K no meio de cultura, gerou um aumento na concentração de FVIIr de maneira concentração-dependente, sem que houvesse efeito citotóxico. Entretanto, a faixa estudada variou de 10 $\mu\text{g/L}$ (10 ng/mL) até 1000 $\mu\text{g/L}$ (1 $\mu\text{g/mL}$), valores abaixo da concentração máxima estudada no presente trabalho.

Tratando-se da atividade específica, representada na Figura 4.6 (b), podemos observar que, assim como ocorreu para a concentração de FVIIr (a), houve uma diferença nas médias de expressão de FVIIra/ 10^6 células entre os cultivos suplementados com 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Para 72h e 96h, essa diferença foi significativa ($p=0,0007$ e $p=0,0018$, respectivamente), sendo que, em 72h, a atividade específica foi 4,5 vezes maior para o cultivo de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e em 96h foi 2,6 vezes maior também para o cultivo com 1,0 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de atividade

específica em 48h para ambos os cultivos não apresentaram diferença estatística ($p=0,1792$). Aproximadamente 30% do fator FVIIr produzido com suplementação de 1,0 µg/mL de vitamina K apresentou atividade biológica, enquanto que esse valor variou de 11 a 15% para o cultivo suplementado com 2,5 µg/mL de vitamina K.

Esses resultados relativos à expressão de FVIIr e atividade específica indicaram que o aumento na concentração de vitamina K de 1,0 para 2,5 µg/mL apresentou efeitos negativos, no período analisado (48h-96h). Tie e colaboradores (2011) verificaram a influência da suplementação dessa vitamina no cultivo de HEK293 modificada para expressar FIX-gla PC, FIX fusionado com o domínio gla da proteína C. Utilizando um meio contendo Warfarina, inibidor da enzima responsável pela redução da vitamina K (VKOR) e, portanto, inibidor do ciclo da vitamina K responsável pela gama-carboxilação, foi demonstrado que na ausência desse inibidor, a carboxilação da proteína foi máxima quando a concentração de vitamina K foi de 1µM (0,45 µg/mL), não havendo aumento em concentrações maiores de vitamina K. Diversos estudos verificaram a importância da suplementação de vitamina K para a gama-carboxilação em célula HEK293, analisando a importância da enzima VKOR (HAQUE et al. 2014; FREGIN et al. 2013; HAO et al. 2020). Utilizando células S2 de *Drosophila*, Nagahashi e colaboradores (2017) conseguiram sintetizar FVII ativo e observaram que a suplementação de vitamina K não influenciou a síntese da proteína, contudo, a detecção de atividade nos sobrenadantes só foi observada nos cultivos com suplementação vitamina K.

Além da comparação entre a concentração de FVIIr produzido e sua atividade específica, foi possível calcular, no intervalo de 48h a 96h, a taxa específica de produção de FVIIr (q_{FVIIr}) para as duas condições de cultivo. Os valores de q_{FVIIr} encontrados ficaram muito próximos: $1,06 \pm 0,48$ ng/10⁶células/h para o cultivo com 1,0 µg/mL de vitamina K e $1,03 \pm 0,52$ ng/10⁶células/h para 2,5 µg/mL. A produtividade específica é um dos parâmetros de grande importância que deve ser levado em consideração durante a produção de proteína terapêuticas recombinantes, pois impacta diretamente o custo do processo (CLARKE et al. 2011). Ao longo dos anos, diversas estratégias têm sido estudadas para melhorar esse parâmetro que está diretamente relacionado com a ICV (SUNLEY; BUTLER, 2010; DU et al. 2015).

Tendo em vista a influência exercida pela adição de uma maior concentração de vitamina K na expressão e atividade específica de FVIIr pela célula HKB-11, a

próxima etapa deste trabalho, a otimização da expressão utilizando um planejamento experimental, foi realizada em meio CDM4CHO suplementado com 1,0 µg/mL de vitamina K.

4.4. Otimização da expressão de FVIIr pela célula HKB-11 por meio de delineamento experimental

Após análise da influência da vitamina K sobre o metabolismo da célula HKB-11 e expressão de FVIIr, foi realizada uma otimização da expressão de FVIIr. Utilizando a metodologia da análise de superfície, por meio de um delineamento experimental do tipo Box-Behnken (DBB), comumente utilizado para otimização de processos (RITACCO et al. 2018; PAPANEOPHYTOU, 2020), a influência de quatro fatores (ácido cítrico, NaBu, GSH e temperatura de cultivo) sobre a concentração de FVIIr (ng/mL) e q_{FVIIr} (ng/10⁶ cel/h) foi analisada. A diminuição da temperatura de cultivo é uma estratégia bastante eficaz no aumento de expressão de proteínas recombinantes, sendo que a maioria dos estudos reporta um aumento significativo na expressão de proteínas recombinantes quando as células são cultivadas na faixa de 30 a 35°C (SUNLEY; BUTLER, 2010). As temperaturas analisadas neste trabalho foram de 31°C, 34°C e 37°C, portanto, dentro dessa faixa considerada “ótima” para aumento da expressão. Em relação aos aditivos utilizados, o mais conhecido e já estudado é o NaBu. Esse composto, capaz de inibir a histona desacetilase, já foi bastante investigado, sendo que a faixa considerada ótima em diversos trabalhos variou de 1 mM a 2 mM (MATSUSHISA; OKADA; MORI, 1989; LUI; CHU, 2001b; KAPTEIN; ROODENBURG; PRIBEN, 1991; GOULART et al. 2010), inclusive envolvendo a expressão de FVIIr (TUDRYN et al. 2016). Portanto essa foi a faixa selecionada para a otimização. Em relação aos outros dois compostos, ácido cítrico e GSH, não há muitos relatos envolvendo a expressão de proteínas recombinantes, exceto por uma patente que otimizou um meio de cultura para produção de fatores da coagulação dependentes de vitamina K e determinou uma faixa ótima de 1,5 mM a 3,75 mM para o ácido cítrico e 3,75 mM a 7,5 mM para GSH (PARK, 2016). O ácido cítrico é um dos intermediários do TCA, onde está ligado a atividade redox na mitocôndria/célula. Outro composto similar, o ácido-alfa-cetoglutarato, já provou aumentar a expressão de anticorpo monoclonal em células CHO (PEREIRA; KILDEGAARD; ANDERSEN, 2018;

NILSANG; KUMAR; RAKSHIT, 2008), já GSH atua como um protetor das células contra espécies reativas de oxigênio (EROs), servindo como um antioxidante (MEISTER; ANDERSON, 1983; SIES, 1999) e até mesmo na redução da citotoxicidade do polímero catiônico polietilenoimina (PEI) sobre células CHO (STROJAN et al. 2017). As faixas aqui investigadas foram de 1 a 2 mM para o ácido cítrico e 0 a 5 mM para GSH.

Um total de 27 ensaios foi realizado em tubos MiniBioreator, sob agitação orbital de 180 rpm, em ambiente umidificado e 5% de CO₂. A Tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos para cada ensaio do DBB.

Os resultados obtidos para a concentração de FVIIr total variaram de aproximadamente 84 ng/mL para o ensaio 23, contendo 2,5 mM de GSH e 1 mM de ácido cítrico a 31°C, até o máximo de 1027 ng/mL para o ensaio 3, contendo 2 mM de NaBu, 2,5 mM de GSH a 34 °C. Quanto a variável resposta q_{FVIIr} , o valor mínimo encontrado foi de 0,50 ng/10⁶cel/mL para o ensaio 25, com 1 mM de ácido cítrico, 1 mM de GSH a 37°C e valor máximo de 8 ng/10⁶cel/mL para o ensaio 3 (2 mM de NaBu; 2,5 mM de GSH, 34 °C). Os valores observados para os pontos centrais (ensaios 9, 18 e 27) ficaram próximos, com média de 755,6 ng/mL e desvio padrão de 1,06% para a resposta FVIIr e 4,06 ng/10⁶ cel/mL e desvio padrão de 11,61% para a resposta q_{FVIIr} , indicando uma boa precisão, principalmente em relação a variável resposta FVIIr. Esses pontos centrais são aqueles com valor codificado 0 para todos os fatores, ou seja, 1 mM de ácido cítrico, 1 mM de NaBu e 2,5 mM de GSH a 34°C.

Tabela 4.3 - Matriz com os valores obtidos para as respostas FVIIr e qFVIIr em cada ensaio realizado do delineamento experimental Box-Behnken

Ensaio	Ácido Cítrico (x ₁)	NaBu (x ₂)	GSH (x ₃)	Temperatura (x ₄)	FVIIr (ng/mL)	qFVIIr (ng/10 ⁶ cel/h)
1	-1,0	-1,0	0,0	0,0	601,0	2,36
2	1,0	-1,0	0,0	0,0	490,9	2,69
3	-1,0	1,0	0,0	0,0	1027,0	7,10
4	1,0	1,0	0,0	0,0	444,2	3,09
5	0,0	0,0	-1,0	-1,0	146,3	1,30
6	0,0	0,0	1,0	-1,0	608,9	8,00
7	0,0	0,0	-1,0	1,0	625,5	2,37
8	0,0	0,0	1,0	1,0	125,1	0,86
9	0,0	0,0	0,0	0,0	750,2	4,52
10	-1,0	0,0	0,0	-1,0	548,9	4,60
11	1,0	0,0	0,0	-1,0	131,1	1,87
12	-1,0	0,0	0,0	1,0	498,6	2,34
13	1,0	0,0	0,0	1,0	374,9	2,63
14	0,0	-1,0	-1,0	0,0	781,9	3,12
15	0,0	1,0	-1,0	0,0	962,7	4,68
16	0,0	-1,0	1,0	0,0	511,9	2,41
17	0,0	1,0	1,0	0,0	791,3	6,54
18	0,0	0,0	0,0	0,0	764,3	4,19
19	-1,0	0,0	-1,0	0,0	886,9	4,69
20	1,0	0,0	-1,0	0,0	139,6	0,71
21	-1,0	0,0	1,0	0,0	654,6	4,11
22	1,0	0,0	1,0	0,0	157,2	2,43
23	0,0	-1,0	0,0	-1,0	84,1	0,71
24	0,0	1,0	0,0	-1,0	382,7	3,07
25	0,0	-1,0	0,0	1,0	100,6	0,50
26	0,0	1,0	0,0	1,0	369,1	3,08
27	0,0	0,0	0,0	0,0	751,8	5,26

Fonte: Dados do estudo

Para uma melhor visualização dos valores obtidos em cada ensaio e melhor comparação com os controles de cada temperatura (sem aditivos), os resultados do delineamento estão apresentados na forma de gráficos de barras, conforme apresentado na Figura 4.7.

Figura 4.7 - Representação gráfica dos resultados obtidos para cada ensaio do DBB e para os ensaios controles, representados pela letra C. Os gráficos estão divididos para cada temperatura e variável resposta: concentração de FVIlr (ng/mL) a 31°C (a), 34°C (b) e 37°C (c), q_{FVIlr} (ng/10⁶cel/h) a 31°C (d), 34°C (e) e 37°C (f).

Fonte: Dados do estudo

Observando a Figura acima, podemos inferir que os ensaios com maior destaque tanto na expressão de FVIlr quanto na produtividade específica, foram realizados a 34°C, sendo que nessa temperatura vários ensaios ficaram próximos do valor de 1 µg/mL, que foi o valor máximo obtido dentre todos os ensaios. Ainda em relação aos ensaios realizados a 34°C, é possível observar que todos os ensaios, exceto os ensaios 20 (2 mM de ácido cítrico, 1 mM de NaBu) e 22 (2 mM de ácido cítrico, 1 mM de NaBu, 5 mM de GSH), foram bastante superiores ao valor obtido no ensaio controle (121 ng/mL), sem aditivos, indicando que a adição dos aditivos estudados pode ter influenciado positivamente a expressão de FVIlr. O valor obtido no ensaio 3 (1027 ng/mL), contendo 2 mM de NaBu e 2,5 mM de GSH, por exemplo, chega a ser 8,43 vezes maior do que o obtido no ensaio controle. Esse padrão é mantido para a produtividade específica a 34°C, onde apenas o ensaio 20 obteve valor próximo do controle, enquanto todos os outros foram superiores, chegando a ser 11 vezes maior

(ensaio 3) do que o valor da produtividade específica do controle. Em relação aos ensaios a 31°C, o valor encontrado para a concentração de FVIlr (106,56 ng/mL) ficou muito abaixo dos ensaios 10 (1 mM de NaBu, 2,5 mM de GSH) e 24 (1 mM de ácido cítrico, 2 mM de NaBu, 2,5 mM de GSH), com 555 e 382 ng/mL, respectivamente. Tal fato se repetiu para a produtividade específica, onde somente o ensaio 23 (1 mM de ácido cítrico e 2,5 mM de GSH) apresentou valor um pouco abaixo do controle, 0,70 ng/10⁶cel/h contra 0,80 ng/10⁶cel/h. Dos seis ensaios realizados a temperatura de 37°C, somente 3 ensaios (7, 12, 26) obtiveram resultados superiores ao ensaio controle nessa temperatura. O ensaio com maior destaque na expressão de FVIlr foi o ensaio 7 (1 mM de ácido cítrico e 1 mM de NaBu), que apresentou um valor de 625, 25 ng/mL para FVIlr, quase 4 vezes maior do que o valor obtido no controle (170 ng/mL). Em relação a produtividade específica a 37°C, foi observado padrão similar ao da expressão de FVIlr, sendo que os mesmos três ensaios (7, 12, 26) foram os que mais se destacaram na comparação com o controle. Portanto, 13 de 15 ensaios realizados a 34°C tiveram valores acima do controle, 3 de 6 ensaios realizados a 37°C e 2 ensaios de um total de 6 ensaios a 31°C se destacaram. As análises estatísticas envolvendo os modelos para cada resposta serão discutidas posteriormente, para confirmar o efeito positivo da diminuição da temperatura de cultivo a 34°C.

Para análise da expressão de FVIlr, os sobrenadantes do último dia de cultivo (96h) de cada ensaio foram coletados, além disso, a cada dia os valores da concentração de células e viabilidade eram avaliados pelo método de exclusão de azul de tripan, gerando as curvas de crescimento e viabilidade representadas na Figura 4.8.

Figura 4.8 - Avaliação do crescimento e viabilidade para os ensaios do DBB pelo método de exclusão de azul de tripan. O primeiro gráfico (a) representa a concentração de células viáveis durante o cultivo e o segundo representa a viabilidade (b) para cada ensaio (n=1).

Fonte: Dados do estudo

Os ensaios que apresentaram um maior crescimento foram o ensaio 1, realizado a 34°C e suplementado com 2,5 mM de GSH e o ensaio 7, realizado a 37°C e suplementado com 1 mM de ácido cítrico e NaBu. Ambos apresentaram $X_{\max}$ acima de 4×10^6 células/mL, valor próximo do observado para o cultivo em *erlenmeyer*. Outros ensaios atingiram um valor de $X_{\max}$ próximo a 4×10^6 células/mL, foram eles: 12 (1 mM de NaBu, 2,5 mM de GSH, 37°C), 14 (1 mM de ácido cítrico, 34°C), 16 (1 mM de ácido cítrico, 5 mM de GSH, 31°C), e 25 (1 mM de ácido cítrico, 2,5 mM de GSH, 37°C). É importante notar que todos esses ensaios citados foram executados a temperatura de 37°C (ensaios 7, 12, 25) ou 34°C (ensaios 1, 14 e 16), de maneira que todos os ensaios a 31°C apresentaram um menor crescimento, atingindo $X_{\max}$ de $2,2 \times 10^6$ células/mL no ensaio 24 (1 mM de ácido cítrico, 2 mM de NaBu, 2,5 mM de GSH, 31°C). Além da possível influência da temperatura sobre o crescimento celular, é interessante observar que, exceto pelos ensaios 7 e 12, que continham NaBu no meio de cultura, todos os demais foram realizados sem adição desse composto. Avello et al. (2017) estudaram o impacto da suplementação de NaBu e de baixas temperaturas em cultivos de células CHO e verificaram que ambos os fatores deixaram o

crescimento mais lento, aumentando o tempo de duplicação das células. A ação do butirato de sódio se dá por meio da inibição da histona desacetilase, levando a um aumento da expressão e também mantendo as células na fase G1 do crescimento, além de aumentar o número de células apoptóticas (CHEN et al. 2011; RITACCO et al. 2018; BACKLIWAL et al. 2008).

Os ensaios 6 (1 mM de ácido cítrico, 1 mM de NaBu, 5 mM de GSH, 31°C), 11 (2 mM de ácido cítrico, 1 mM e NaBu, 2,5 mM de GSH, 31°C) e 22 (2 mM de ácido cítrico, 1 mM de NaBu, 5 mM de GSH, 37°C) apresentaram crescimento abaixo dos demais, como podemos observar pelo gráfico e verificado pelo cálculo da ICV, que foi de 76×10^6 células*h/mL para o ensaio 6; 70×10^6 células*h/mL para o ensaio 11 e 65×10^6 células*h/mL para o ensaio 22, abaixo dos demais ensaios, cujos valores ficaram acima de 100×10^6 células*h/mL.

A influência da temperatura no crescimento e viabilidade da célula HKB-11 pode ser observada por meio da comparação entre os ensaios controle, realizados sem aditivos, conforme observado na Figura abaixo.

Figura 4.9 - Avaliação da influência da temperatura de cultivo no crescimento e viabilidade para os controles do DBB (n=3).

Fonte: Dados do estudo

A Figura 4.9 apresenta os perfis de crescimento para cada temperatura. O cultivo a 37°C apresentou um crescimento superior ao controle a 34°C e principalmente, a 31°C. O $X_{\max}$ observado para o controle a 37°C foi de $4,64 \times 10^6$ células/mL, enquanto a 34°C esse valor foi de 3×10^6 células/mL e $1,5 \times 10^6$ células/mL a 31°C. A ICV média calculada para 37°C foi de 276×10^6 células*h/mL, o dobro da ICV para 31°C, que foi de 133×10^6 células*h/mL. O controle a 34°C apresentou um valor intermediário entre as duas outras temperaturas: 197×10^6 células*h/mL. Uma das estratégias mais comumente empregadas na otimização da produção de proteínas recombinantes e atividade específica em células de mamífero é o cultivo em baixas temperaturas. No entanto, apesar de ser uma estratégia bastante efetiva no aumento da produtividade específica, a diminuição da temperatura de cultivo para valores abaixo de 37°C acarreta numa redução significativa da proliferação celular, devido a ativação dos inibidores das ciclinas-quinases dependentes (CDK), enzimas que desempenham um papel fundamental na replicação do DNA cromossomal e ciclo celular de células eucariotas (SUNLEY; BUTLER, 2010; BECERRA et al. 2012; ARAKI, 2010). A proliferação celular na célula HKB-11, principalmente entre as temperaturas de 31°C e 37°C, foi significativamente reduzida ($p=0,0063$), corroborando diversos trabalhos em células de mamífero, principalmente em CHO e HEK293, que verificaram esse efeito (AVELLO et al. 2017; VERGARA et al. 2018; SUNLEY; THARMALINGAM; BUTLER, 2008; CORONEL et al. 2016; GOEY et al. 2017).

Em relação a atividade biológica, foram selecionadas aquelas condições que apresentaram alta concentração de FVIIr, que foi o caso dos ensaios 3, 14, 15, 17, 19, os pontos centrais (9, 18 e 27) além de controles, com ausência de aditivos, para as 3 temperaturas estudadas (31°C, 34°C e 37°C). A Figura 4.10 mostra que a atividade específica variou de $6,09 \pm 0,8$ ng/ 10^6 células (Controle a 37°C) até $27 \pm 6,9$ ng/ 10^6 células (Ensaio 19).

Figura 4.10 - Avaliação da atividade específica dos ensaios com alta produção de FVIIr do DBB por meio de TP. C31, C34 e C37 representam os controles realizados a 31°C, 34°C e 37°C, respectivamente (n=1).

Fonte: Dados do estudo

Os ensaios 3 e 9 foram os que mais se destacaram em relação a expressão de FVIIr e, coincidentemente, ambos foram realizados na presença de NaBu e ausência de ácido cítrico sob a temperatura de 34°C. Apesar de uma alta concentração de FVIIr, os ensaios 14, 15 e 17 não se destacaram por uma alta atividade específica. Esses ensaios apresentaram em comum o cultivo a 34°C e suplementação com 1 mM de ácido cítrico. Em relação aos pontos centrais (1 mM de ácido cítrico, 1 mM de NaBu, 2,5 mM de GSH a 34°C), a atividade específica ficou em torno de 10 a 13 ng/10⁶ células. Por último, os ensaios realizados sob as temperaturas de 31, 34 e 37°C sem aditivos ao meio, indicaram um pequeno aumento na atividade específica nos cultivos com menor temperatura, que foi de $9,57 \pm 1,9$ ng/10⁶ células para 31°C; $10,59 \pm 0,01$ para 34°C e $6,09 \pm 0,8$ para 37°C. Recentemente, Coronel et al. (2020) demonstraram um aumento tanto na produtividade específica quanto na atividade biológica de FVIIIr produzido por células CHO, quando cultivadas em baixa temperatura (31°C) e com suplementação de 1 mM de ácido valérico, composto similar ao NaBu.

A seguir, encontra-se a análise estatística do DBB, realizada por meio do software *STATISTICA 12*, com intuito de avaliar as variáveis significativas, além da preditividade e significância dos modelos gerados.

4.5. Análise estatística dos modelos gerados para as respostas q_{FVIIr} e $FVIIr$ pelo software *STATISTICA 12*

O nível de significância definido para avaliação dos parâmetros foi de 10%, devido à grande variabilidade intrínseca aos bioprocessos envolvendo microrganismos e células eucariontes (RODRIGUES; IEMMA, 2014), sendo assim, os parâmetros com p-valor acima de 0,1 não foram considerados significativos. As Tabelas x e y representam os coeficientes de regressão gerados pelo software a partir da matriz codificada para as variáveis respostas q_{FVIIr} e $FVIIr$, respectivamente. Os termos lineares estão representados pela letra L e os termos quadráticos pela letra Q.

Tabela 4.4: Coeficientes de Regressão para a resposta q_{FVIIr} .

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(2)	p - valor	Estimativas por Intervalo (90%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	4,66	0,42	11,06	<0,0001	3,91	5,41
x ₁ (L)	-1,10	0,21	-5,21	0,0002	-1,47	-0,72
x ₁ (Q)	-0,51	0,32	-1,63	0,1294	-1,08	0,05
x ₂ (L)	1,31	0,21	6,24	<0,0001	0,94	1,69
x ₂ (Q)	-0,26	0,32	-0,83	0,4218	-0,83	0,30
x ₃ (L)	0,17	0,21	0,79	0,4465	-0,21	0,54
x ₃ (Q)	-0,72	0,32	-2,27	0,0426	-1,28	-0,15
x ₄ (L)	-0,31	0,21	-1,46	0,1712	-0,68	0,07
x ₄ (Q)	-2,11	0,32	-6,69	<0,0001	-2,68	-1,55
x ₁ x ₂	-1,09	0,36	-2,98	0,0115	-1,74	-0,44
x ₁ x ₃	0,58	0,36	1,58	0,1399	-0,07	1,23
x ₁ x ₄	0,43	0,36	1,19	0,2585	-0,22	1,08
x ₂ x ₃	0,64	0,36	1,76	0,1031	-0,01	1,29
x ₂ x ₄	0,05	0,36	0,15	0,8863	-0,59	0,70
x ₃ x ₄	-0,68	0,36	-1,87	0,0856	-1,33	-0,03

Fonte: Dados do estudo

Tabela 4.5: Coeficientes de Regressão para a resposta FVIlr (ng/mL).

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(2)	p - valor	Estimativas por Intervalo (90%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	755,43	4,46	169,48	<0,0001	742,42	768,45
x ₁ (L)	-223,13	2,23	-100,12	0,0001	-229,64	-216,62
x ₁ (Q)	-108,22	3,34	-32,37	0,0010	-117,98	-98,46
x ₂ (L)	117,22	2,23	52,60	0,0004	110,71	123,72
x ₂ (Q)	-11,06	3,34	-3,31	0,0805	-20,82	-1,30
x ₃ (L)	-92,64	2,23	-41,57	0,0006	-99,15	-86,13
x ₃ (Q)	-82,72	3,34	-24,75	0,0016	-92,48	-72,96
x ₄ (L)	34,26	2,23	15,37	0,0042	27,75	40,77
x ₄ (Q)	-405,33	3,34	-121,25	0,0001	-415,09	-395,57
x ₁ x ₂	-118,18	3,86	-30,61	0,0011	-129,45	-106,90
x ₁ x ₃	62,48	3,86	16,18	0,0038	51,20	73,75
x ₁ x ₄	27,34	3,86	7,08	0,0194	16,07	38,61
x ₂ x ₃	24,65	3,86	6,39	0,0237	13,38	35,92
x ₂ x ₄	-7,52	3,86	-1,95	0,1906	-18,80	3,75
x ₃ x ₄	-136,30	3,86	-35,31	0,0008	-147,57	-125,03

Fonte: Dados do estudo

O modelo escolhido para a resposta q_{FVIlr} foi o modelo relacionado a Soma dos Resíduos dos Quadrados Médios, considerando-se as interações lineares, pois o modelo sem variações apresentou um R^2 relativamente menor (78,78%). Apenas os coeficientes lineares relativos às concentrações de ácido cítrico e NaBu, além do coeficiente quadrático da temperatura de cultivo foram significativas; o modelo não ajustado está representado na Equação 4; a reparametrização do modelo foi realizada mantendo apenas os coeficientes significativos e excluindo aqueles que não foram estatisticamente significativos, tendo em vista um nível de significância de 10%, dessa

forma o modelo ajustado relativo a variável produtividade específica está apresentado na Equação 5.

$$q_{FVIIr} = 4,66 - 1,10 x_1 - 0,51 x_1^2 + 1,31 x_2 - 0,26 x_2^2 + 0,17 x_3 - 0,72 x_3^2 - 0,31 x_4 - 2,11 x_4^2 - 1,09 x_1x_2 + 0,58 x_1x_3 + 0,43 x_1x_4 + 0,64 x_2x_3 + 0,05 x_2x_4 - 0,68 x_3x_4$$

(4)

$$R^2 = 91,87\%$$

$$q_{FVIIr} = 3,86 - 1,10 x_1 + 1,31 x_2 - 1,82 x_4^2 - 1,09 x_1x_2$$

(5)

$$R^2 = 78,78\%$$

Em relação a resposta q_{FVIIr} , o R^2 obtido pelo modelo sem ajuste foi de 91,87%, indicando um bom ajuste do modelo aos dados experimentais, entretanto após a reparametrização do modelo, esse valor caiu para 78,78%, ou seja, o modelo é capaz de explicar praticamente 80% da resposta estudada. Tendo em vista os erros relativamente altos inerentes a sistemas biológicos, variando de 10 a 30% para concentração de proteínas e de 7 a 10% para concentração e viabilidade celular (AUGUSTO; BARRAL; PICCOLI, 2008), pode-se considerar esse valor de R^2 relativamente bom. Podemos observar pela equação ajustada, que o efeito linear do NaBu e quadrático da temperatura apresentaram efeitos positivos sobre a resposta, enquanto o efeito do ácido cítrico e da interação dele com NaBu foi negativo para a resposta q_{FVIIr} . Além disso, nota-se que houve uma mudança nos valores dos coeficientes de regressão para o modelo ajustado em relação ao modelo não-ajustado.

O modelo escolhido para a resposta $FVIIr$ foi o do Erro Puro, considerando-se as interações lineares, onde o R^2 determinado foi de 88,59%. Os efeitos significativos sobre a resposta, segundo a Tabela 4.5 apresentada, foram todos os efeitos lineares e quadráticos analisados. O efeito da interação entre a temperatura e a concentração de NaBu, foi o único não significativo ($p < 0,1$). Como o modelo não ajustado e ajustado foram bastantes similares, inclusive mantendo o mesmo R^2 , somente o modelo matemático da regressão ajustado está apresentado pela Equação 5.

$$\text{FVIIr: } 755,43 - 223,13 x_1 - 108,22 x_1^2 + 117,22 x_2 - 11,06 x_2^2 - 92,64 x_3 - 82,72 x_3^2 + 34,26 x_4 - 405,33 x_4^2 - 118,18 x_1 x_2 + 62,48 x_1 x_3 + 27,34 x_1 x_4 + 24,65 x_2 x_3 - 136,30 x_3 x_4 \quad (5)$$

$$R^2 = 88,59$$

O modelo ajustado para FVIIr não apresentou uma diferença entre os coeficientes quando comparado ao modelo não ajustado, o que não ocorreu para a resposta q_{FVIIr} , cujo modelo ajustado apresentou uma pequena redução do valor de R^2 .

Uma forma de se avaliar os modelos estudados é através do gráfico de valores observados *versus* os valores preditos, apresentado na Figura 4.11. Quanto mais próximos os pontos, que representam os valores experimentais de cada ensaio para cada reposta, da reta, que representa os valores preditos pelos modelos ajustados obtidos no *software*, melhor é a predição do modelo.

Figura 4.11 - Valores experimentais *versus* valores preditos para as variáveis respostas q_{FVIIr} (a) e FVIIr (b).

Fonte: Dados do estudo

Tanto para a resposta FVIIr quanto para a resposta q_{FVIIr} , os valores experimentais ficaram razoavelmente próximos dos valores preditos pelos modelos,

indicando que esses modelos ajustados são capazes de explicar de forma satisfatória a respostas estudadas.

Para uma melhor visualização dos efeitos mais significativos para as respostas estudadas, a Figura 4.12 apresenta o diagrama de Pareto para cada uma das variáveis respostas.

Figura 4.12 - Diagrama de Pareto para as respostas q_{FVIIr} (a) e $FVIIr$ (b).

Fonte: Dados do estudo

É possível notar que tanto para a resposta $FVIIr$ quanto para a resposta q_{FVIIr} , a estimativa do efeito quadrático da temperatura (x_4) foi bastante significativo, juntamente com o efeito linear do ácido (x_1) cítrico e NaBu (x_2). Interessante notar também que antes do ajuste do modelo para q_{FVIIr} , o efeito quadrático de GSH (x_3) foi significativo e após a reparametrização, esse efeito não apresentou efeito significativo sobre a resposta. Tanto a temperatura quanto a concentração de NaBu apresentaram efeitos positivos sobre ambas as respostas, enquanto que a concentração de ácido cítrico demonstrou um efeito negativo sobre as respostas estudadas.

4.6. Análise de variância dos modelos ajustados e avaliação das curvas de superfície

A seguir, está apresentada a análise de variância para os modelos gerados neste trabalho, Tabela 4.6. Foram utilizados apenas os modelos matemáticos ajustados, conforme discutido anteriormente.

Tabela 4.6 - Análise de Variância para a concentração de FVllr e produtividade específica.

Fontes de Variação	SQ		GL		QM		F _{Calc}		F _{Tab}	
	q _{FVllr}	FVllr	q _{FVllr}	FVllr	q _{FVllr}	FVllr	q _{FVllr}	FVllr	q _{FVllr}	FVllr
Regressão	61,85	2002543	13	5	15,46	154041,8	20,42	7,76	2,22	2,08
Resíduos	16,66	258027	13	21	0,76	19848,23				
Falta de Ajuste	16,05	257908	11	11	0,80	23446,18	2,65	383,03	9,40	9,40
Erro puro	0,61	119	2	2	0,30	59,5				
Total	78,51	2260570	26	26	3,02	86945				

SQ= Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade; QM =Quadrado Médio, F_{Calc}= F calculado; F_{Tab}= F tabelado.

O modelo matemático obtido para a resposta q_{FVllr} foi significativo, pois o valor de F_{Calc} (20,42) foi maior do que o de F_{Tab} (2,22). Portanto, esse modelo de regressão apresenta efeito significativo sobre a resposta estudada. Esse mesmo modelo foi também preditivo, ou seja, é capaz de prever os valores da produtividade específica a partir de qualquer valor nas concentrações de NaBu, ácido cítrico e temperatura de cultivo nas faixas estudadas, pois o valor de F_{Calc} (2,65) foi menor do que o valor de F_{Tab} (9,40) para a falta de ajuste. Sendo assim, é possível verificar as curvas de superfície geradas, tendo em vista apenas os efeitos significativos do modelo matemático ajustado.

Para o modelo matemático relativo a variável resposta FVllr, novamente o valor de F_{Cal} (7,76) da regressão foi maior do que o valor de F_{Tab} (2,08), indicando que o

modelo também é significativo. Contudo, o modelo não foi preditivo, pois o valor de F_{Cal} (383,03) foi muito maior do que o de F_{Tab} (9,40), o que significa que a falta de ajuste do modelo foi significativa. Logo, não é possível fazer previsões da concentração de FVIIr a partir do modelo matemático gerado. Tendo em vista a variabilidade intrínseca dos cultivos celulares, somado ao fato deste trabalho avaliar a expressão de proteína recombinante de uma população celular, tem-se que a significância do modelo e a obtenção de regiões ótimas para as respostas avaliadas, é mais interessante do que a preditividade do modelo. Além disso, apesar da falta de ajuste observada para o modelo de FVIIr, o gráfico de valores experimentais versus valores preditos indicou uma boa aproximação entre esses valores.

O modelo para produtividade específica de FVIIr (q_{FVIIr}), o que permite uma análise dos gráficos de superfície para os efeitos que foram significativos, conforme mostrado na Figura 4.13.

Figura 4.13 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta q_{FVIIr} (ng/10⁶cel/h) em função da concentração de ácido cítrico e NaBu (a,d), da concentração de ácido cítrico e temperatura (b, e) e da concentração de NaBu e temperatura (c, f).

Fonte: Dados do estudo

As interações aqui analisadas foram da concentração de NaBu e ácido cítrico e a interação desses fatores com a temperatura. As variáveis que não foram analisadas,

foram mantidas no valor codificado 0, conforme sugerido pelo próprio software. Os gráficos a,d representam os valores de q_{FVIIr} em função da concentração de NaBu e ácido cítrico. É possível observar que o gráfico não apresenta curvatura, pois os fatores analisados são lineares. O valor de q_{FVIIr} máximo é obtido na presença de 2 mM de NaBu, concentração máxima avaliada neste trabalho e na ausência de ácido cítrico. Esse efeito negativo do ácido pode ser inferido anteriormente por meio do diagrama de Pareto. Não há relatos na literatura sobre o efeito negativo de ácido cítrico sobre a produtividade específica de proteínas recombinantes. Na formulação de um meio de cultura visando aumentar a expressão de fatores de coagulação dependente de vitamina K, Park (2016) testaram uma faixa de concentração de 0 a 60 mM de ácido cítrico e observaram que, no sétimo dia de cultivo, a concentração de 0,94 mM a 1,88 mM aumentou a expressão de proteína biologicamente ativa. Os gráficos b,e mostram o efeito da interação entre temperatura e ácido cítrico. Mais uma vez, a concentração de ácido cítrico apresentou um efeito negativo sobre q_{FVIIr} , sendo que o valor máximo obtido foi tanto na temperatura de 31°C quanto na temperatura de 37°C, na ausência desse composto. Por fim, os gráficos c,f apresentam o efeito da interação entre NaBu e temperatura sobre q_{FVIIr} . O valor máximo da resposta é obtido na concentração máxima de NaBu, na temperatura de 31°C e também na temperatura de 37°C. Diversos trabalhos já verificaram o efeito positivo da suplementação de NaBu e também da diminuição da temperatura de cultivo sobre a produtividade específica de células de mamífero (BACKLIWAL et al. 2008; YIN et al. 2018; CHEN et al. 2011; GOULART et al. 2010). O efeito positivo da adição de NaBu e variação na temperatura de cultivo, já foi verificado para a expressão de FVIIr, onde a concentração de 2 mM de NaBu sob 33°C acarretou num aumento de duas vezes na produção desse fator (TUDRYN et al. 2016).

Por fim, utilizando a função desejabilidade do software *STATISTICA* 12, foi possível determinar os pontos ótimos para realizar a otimização dos modelos, visto que esse método matemático é bastante confiável para se obter as melhores combinações entre os fatores analisados e as respostas desejáveis (COLOMBARI, 2004). A opção de maximizar os valores para cada resposta foi selecionada. Dessa maneira, a desejabilidade foi 1 para a concentração máxima observada no delineamento (1027 ng/mL), 0,5 para a concentração intermediária (555 ng/mL) e 0 para o menor valor obtido, que foi de 84 ng/mL em relação a resposta FVIIr (ng/mL).

Da mesma forma, para a resposta q_{FVIIr} , foram determinadas as desejabilidades de 1 para o valor de 7,1 ng/10⁶cel/h, 0,5 para o valor intermediário 3,8 ng/10⁶cel/h e 0 para o menor valor encontrado, que foi de 0,5 ng/10⁶cel/h. Os fatores foram selecionados na faixa ótima. Os resultados para a desejabilidade e perfil de predição são apresentados abaixo (Figura 4.14).

Figura 4.14 - Perfis de predição e função desejabilidade para as respostas q_{FVIIr} e $FVIIr$

Fonte: Dados do estudo

A função desejabilidade é uma ferramenta amplamente utilizada para a otimização de processos envolvendo múltiplas respostas (NIST/SEMATECH, 2012). Os valores determinados pela função desejabilidade para obter o valor máximo das respostas, aproximadamente 1 µg/mL de $FVIIr$ e 7 ng/10⁶células/h de q_{FVIIr} , foram: 0 mM de ácido cítrico, 2 mM de NaBu, 2,5 mM de GSH e temperatura de 34°C. A função desejabilidade varia de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1, mais desejável é

a resposta, ou seja, os valores dos fatores fornecem um valor muito próximo aos valores máximos das respostas. Podemos notar, que o NaBu juntamente com a diminuição da temperatura de cultivo, favorecem o aumento da expressão de proteínas recombinantes, corroborando vários estudos que verificaram esse efeito positivo para expressão de proteínas recombinantes (GOULART et al. 2010; BACKLIWAL et al. 2008; SUNG et al. 2004). A adição de 2,5 mM de GSH também é necessária para obtenção da máxima expressão e produtividade específica. Orellana et al. (2017) demonstraram que a concentração de GSH produzida por célula CHO modificada para expressar o gene da subunidade catalítica da glutamato-cisteína ligase, responsável pela síntese de GSH, não está ligada diretamente com o aumento da produtividade de anticorpos monoclonais. No entanto, diferentemente deste trabalho, GSH não foi adicionado ao meio de cultura. Por último, como foi observado nos modelos, o ácido cítrico apresentou um efeito negativo significativo sobre as respostas e por esse motivo, a ausência desse composto foi determinada pela função desejabilidade. Não há muita evidência sobre os efeitos da adição dessa substância para aumento da expressão de proteína recombinante, exceto pela patente de Park (2016), que verificou um aumento na atividade biológica do FVIIr no sétimo dia de cultivo de células CHO, principalmente na faixa de 0,94 mM a 3,75 mM. Portanto, pode ser que a faixa analisada pelo delineamento experimental foi muito baixa e, portanto, não levou a resposta esperada.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível avaliar o potencial de quatro linhagens celulares humanas adaptadas ao crescimento em suspensão em meios livres de SFB, SK-Hep-1, HKB-11, Huh-7 e HEK293SF para expressão de FVIIr. As duas células com maior potencial de expressar FVIIr com atividade biológica foram SK-Hep-1 e HKB-11. No entanto, apenas a célula HKB-11 foi escolhida para a continuação do trabalho devido à sua capacidade de expressão de bons níveis de FVIIr e de atingir altas concentrações celulares.

Com intuito de aumentar a expressão de FVIIr além de sua atividade biológica, a célula HKB-11 foi adaptada para o cultivo em meio contendo 2,5 µg/mL de vitamina K. A influência da suplementação dessa, cujo papel na gama-carboxilação e atividade biológica é fundamental, foi averiguada. Inferiu-se que o aumento da concentração dessa vitamina de 1,0 µg/mL para 2,5 µg/mL influenciou negativamente a expressão e a atividade biológica de FVIIr pela célula HKB-11. Ainda, a influência da suplementação de vitamina K sobre o metabolismo e crescimento da célula foi investigado, de maneira que, não foi demonstrado diferenças significativas no cultivo sem vitamina em comparação com as duas concentrações já citadas, além disso, pode-se verificar um eficiente metabolismo envolvendo a glicose, com baixas taxas de consumo e baixas taxas de produção e de lactato e amônio, metabólitos inibitórios as células.

Por último, foi realizada uma otimização da expressão de FVIIr, por meio de um delineamento Box-Behnken com 4 fatores independentes, NaBu, ácido cítrico, GSH e temperatura de cultivo. Foi possível determinar modelos matemáticos significativos para as respostas estudadas. Utilizando a função desejabilidade, as condições determinadas para obtenção da máxima concentração de FVIIr e produtividade pela célula HKB-11 foram 2 mM de NaBu, 2,5 mM de GSH e 34°C. Nessas condições, foi possível obter a concentração de 1 µg/mL de FVIIr, valor considerado promissor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI-MALATI, Z. et al. HEK293 Cells Overexpressing Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Improve Expression of Recombinant Coagulation Factor VII. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 317–324, 2019.
- AHN, W. S.; ANTONIEWICZ, M. R. Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 1, p. 61–74, 2012.
- ALTAMIRANO, C. et al. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, 2013.
- ALTAMIRANO, C. et al. Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 1, p. 69–75, 2000.
- ALTAMIRANO, C. et al. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: Substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 2, p. 171–179, 2004.
- AMABLE, P.; BUTLER M. Cell metabolism and its control in culture. *In*: CASTILHO L. R., MORAES A. M., AUGUSTO E. F. P., BUTLER M. **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. New York: Taylor & Francis Group, 2008. p. 75-110
- AMANN, T. et al. Genetic engineering approaches to improve posttranslational modification of biopharmaceuticals in different production platforms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 10, p. 2778–2796, 2019.
- ANNE, R.; LEWIS, N. E. Improvements in protein production in mammalian cells from targeted metabolic engineering. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 6, p. 1-6, 2017.
- AUGUSTO, E. F. P.; BARRAL F.; PICCOLI, R. A. M. Mathematical models for growth and product synthesis in animal cell culture. *In*: CASTILHO L. R., MORAES A. M., AUGUSTO E. F. P., BUTLER M. **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. New York: Taylor & Francis Group, 2008. p. 181-220.
- AVELLO, V. et al. Impact of sodium butyrate and mild hypothermia on metabolic and physiological behaviour of CHO TF 70R cells. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 55–62, 2017.
- BACKLIWAL, G. et al. Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 1, p. 182–189, 2008.
- BAKER, K.; FLATMAN, S.; BIRCH J. Product characterization from gene to herapeutic product. **Medicines from animal cell culture**, p. 433–42, 2007.
- BERKNER, K. L. Expression of recombinant vitamin K-dependent proteins in mammalian cells: factors IX and VII. **Methods in Enzymology**, v. 222, p. 450–77, 1993.
- BIAGGIO, R. T. et al. Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth, and cryopreservation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1495-507, 2015.

BIAGGIO, Rafael Tajé. Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino. 2015. 117 f. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

BIAGGIO, Rafael Tajé. Avaliação do potencial de crescimento e produção de proteínas recombinantes de células humanas adaptadas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino. 2018. 178 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

BOLT, G.; STEENSTRUP, T. D.; KRISTENSEN, C. All post-translational modifications except propeptide cleavage are required for optimal secretion of coagulation factor VII. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 98, n. 5, p. 988-97, 2007.

BOMFIM, A. S. et al. Human cell lines: A promising alternative for recombinant FIX production. **Protein Expression and Purification**, v. 121, p. 149–156, 2016.

BRUNNER, D. et al. Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. **Altex**, v.27, n.10, p.53-62, 2010.

BUCHSTEINER, M. et al. Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 9, p. 2315–2327, 2018.

BURNETT, M. J. B.; BURNETT, A. C. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. **Plants, People, Planet**, v. 2, n. 2, p. 121–132, 2020.

BUTLER M. Animal cell culture and technology. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, 256 p., (ed) 2004.

CAO, O.; LODUCA, P. A.; HERZOG, R. W. Role of regulatory T cells in tolerance to coagulation factors. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p. 88-91, 2009.

CERVERA, L. et al. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 152–165, 2013.

CERVERA, L. et al. Selection and optimization of transfection enhancer additives for increased virus-like particle production in HEK293 suspension cell cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 23, p. 9935–9949, 2015.

CHEN, F. et al. The combined effect of sodium butyrate and low culture temperature on the production, sialylation, and biological activity of an antibody produced in CHO cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 6, p. 1157–1165, 2011.

CHIN, C. L. et al. A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.

CHO, M. S. et al. Versatile expression system for rapid and stable production of recombinant proteins. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 229–32, 2003.

CHU, L.; ROBINSON, D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture.

Current Opinion in Biotechnology, v. 12, n. 2, p. 180–187, 2001.

CLARKE, C. et al. Predicting cell-specific productivity from CHO gene expression. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 2, p. 159–165, 2011.

CORONEL, J. et al. Valeric acid supplementation combined to mild hypothermia increases productivity in CHO cell cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 101–109, 2016.

CORONEL, J. et al. Perfusion process combining low temperature and valeric acid for enhanced recombinant factor VIII production. **Biotechnology Progress**, v. 36, n. 1, p. 1–11, 2020.

COSTA E SILVA, L. et al. Serum-free suspension cultured human cells can produce a high-level of recombinant human erythropoietin. **Engineering Reports**, v. 2, n. 6, p. 1–16, 2020.

COSTA, A. R. et al. Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 281–299, 2014.

CRUZ, H. J. et al. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1–2, p. 43–52, 2000.

CURIE, B.; CURIE B. C. Molecular Basis of Vitamin K-Dependent γ - Carboxylation. **Blood**, v. 75, n. 9, p. 1753–1762, 1990.

DE JESUS, M. J. et al. TubeSpin satellites: A fast track approach for process development with animal cells using shaking technology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 3, p. 217–223, 2004.

DIAZ, S. L. et al. Sensitive and specific detection of the non-human sialic acid N-Glycolylneuraminic acid in human tissues and biotherapeutic products. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2009.

DIMITROV, D. S. Therapeutic proteins. *Methods in Molecular Biology*, v. 899, p. 1–26, 2012.

DINGERMAN, T. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 90–97, 2008.

DUMONT, J. et al. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1110–1122, 2016.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Current Opinion Biotechnology**, v. 20, p. 700–7, 2009.

ENJOLRAS, N. et al. Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications. **Thrombosis Research**, v. 130, p. 266–73, 2012.

EUN, J. R. et al. Hepatoma SK Hep-1 cells exhibit characteristics of oncogenic mesenchymal stem cells with highly metastatic capacity. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

FAVALORO, E. J. et al. How to Optimize Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)

Testing: Solutions to Establishing and Verifying Normal Reference Intervals and Assessing APTT Reagents for Sensitivity to Heparin, Lupus Anticoagulant, and Clotting Factors. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 45, n. 1, p. 22–35, 2019.

FLIEDL, L.; GRILLARI, J.; GRILLARI-VOGLAUER, R. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 673–679, 2015.

FREITAS, D. et al. Production of coagulation factor VII in human cell lines Sk-Hep-1 and HKB-11. **Protein Expression and Purification**, v. 137, p. 26–33, 2017.

FU, T. et al. Regulation of cell growth and apoptosis through lactate dehydrogenase C over-expression in Chinese hamster ovary cells. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, p. 5007-5016, 2016.

GAO, P. et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. **Nature**, v. 458, 762-765, 2009

GAWLITZEK, M.; VALLEY, U.; WAGNER, R. Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, p. 518–528, 1998

GEORGE, J. N.; CAEN, J. P.; NURDEN, A. T. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. **Blood**, v. 75, n.7, p. 1383-1395, 1990.

GHADERI, D. et al. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 28, p. 147-176, 2012.

GHIBELLI, L. et al. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 6, p. 479–486, 1998.

GIBCO. Gibco 293-F cells, SFM adapted. Grand Island, NY: Life Technologies [online]. Available from: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11625019> ICID¼search-product, 2014.

GÓDIA F.; CAIRÓ J. J. Cell Metabolism. *In*: OZTURK, S. S.; HU, W. S. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies. New York: Taylor & Francis, 2006.

GOEY, C. H. et al. Cascading effect in bioprocessing—The impact of mild hypothermia on CHO cell behavior and host cell protein composition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 12, p. 2771–2781, 2017.

GOEY, C. H.; BELL, D.; KONTORAVDI, C. CHO cell cultures in shake flasks and bioreactors present different host cell protein profiles in the supernatant. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, n. February, p. 185–192, 2019.

GOLDMAN, M. H. et al. Monitoring recombinant human interferon-gamma N-glycosylation during perfused fluidized-bed and stirred-tank batch culture of CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 596–607, 1998.

GOMEZ, N. et al. Analysis of Tubespins as a suitable scale-down model of bioreactors for high cell density CHO cell culture. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 2, p. 490–499, 2017.

GRAHAM, F. L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 59–67, 1977.

GRAMER, M. J; GOOCHEE C. F. Glycosidase activities in chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 366–73, 1993.

GRINNELL, B. W.; YAN, S. B.; MACIAS, W. L., Activated Protein C, in: McGrath, B. M., Walsh, G. (Eds.), *Directory of therapeutic enzymes*, CRC Press Boca Raton, p. 69–96, 2006.

GRÖBER, U et al. Vitamin K: an old vitamin in a new perspective. **Dermato-endocrinology**, v. 6, n. 1, p.1-6, 2014.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX** : Alternativen zu Tierexperimenten, v. 20, n. 4, p. 275–281, 2003.

GUJRAL, G.; KAPOOR, D.; JAIMINI, M. an Updated Review on Design of Experiment (Doe) in Pharmaceuticals. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, n. 3, p. 147–152, 2018.

GUPTA, S. K. et al. Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–23, 2017.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 24, p. 10457–10468, 2018.

HA, T. K.; LEE, G. M. Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. **Journal of Biotechnology**, v. 180, p. 23–29, 2014.

HA, T. K.; LEE, J. S.; LEE, G. M. Platform Technology for Therapeutic Protein Production. **Cell Culture Engineering**, p. 1–22, 2019.

HA, T. Y. et al. Synergistic effect of sorafenib and vitamin K on suppression of hepatocellular carcinoma cell migration and metastasis. **Anticancer Research**, v. 35, n. 4, p. 1985–1996, 2015.

HABU, D. Role of Vitamin K 2 in the Development of Hepatocellular Carcinoma in Women. **Jama**, v. 292, n. 3, p. 1–4, 2004.

HAGENS, F. S. et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n.8, p. 2412-6, 1986.

HALABIAN, R. et al. Establishment of a cell line expressing recombinant factor VII and its subsequent conversion to active form FVIIa through hepsin by genetic engineering method. **Vox Sanguinis**, v. 96, n. 4, p. 309–315, 2009.

HAMMED, A. et al. VKORC1L1, an enzyme rescuing the vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 40, p. 28733–28742, 2013.

HAQUE, J. A. et al. A cellular system for quantitation of vitamin K cycle activity: Structure-activity effects on vitamin K antagonism by warfarin metabolites. **Blood**, v. 123, n. 4, p. 582–589, 2014

HARCUM, S. W. Protein glycosylation. In: Ozturk S, Hu W-S, eds. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies*. Boca Raton (FL): CRC Press, 2006.

HARTLEY, F. et al. Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 8, p. 1890–1903, 2018.

HEDNER, U. Recombinant activated factor VII: 30 years of research and innovation. **Blood Reviews**, v. 29, p. S4–S8, 2015.

HEDNER, U.; BRUN, N. C. Recombinant factor VIIa (rFVIIa): Its potential role as a hemostatic agent. **Neuroradiology**, v. 49, n. 10, p. 789–793, 2007.

HENRY, O.; DUROCHER, Y. Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 5, p. 499–507, 2011

HERLITSCHKA, S.E. et al. High expression of a B-domain deleted factor VIII gene in a human hepatic cell line. **Journal of Biotechnology**, v. 61, p. 165–173, 1998.

HOSSLER, P.; KHATTAK, S. F.; LI, Z. J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. **Glycobiology**, v. 19, p. 936–49, 2009.

IINO, M.; FOSTER, D. C.; KISIEL, W. Functional consequences of mutations in Ser-52 and Ser-60 in human blood coagulation factor VII. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 352, n.2, p. 182–92, 1998.

INTASAI, N. Development and applications of recombinant activated factor VII. **Journal of Associated Medical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 525–532, 2017.

KAMALI, F. et al. Temporal variations in plasma vitamin K and lipid concentrations and clotting factor activity in humans. **American Journal of Hematology**, v. 68, n. 3, p. 159–163, 2001.

KAPTEIN, A.; RODENBURG, L.; PRINCEN, H. M. G. Butyrate stimulates the secretion of apolipoprotein (apo) A-I and apo B100 by the human hepatoma cell line Hep G2. Induction of apo A-I mRNA with no change of apo B100 mRNA. **Biochemical Journal**, v. 278, n. 2, p. 557–564, 1991.

KAO, Y. H. et al. The effect of O-fucosylation on the first EGF-like domain from human blood coagulation factor VII. **Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 7097–110, 1999.

KARENGERA, E. et al. Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: Impact on recombinant glycoprotein quality. **Journal of Biotechnology**, v. 242, p. 73–82, 2017.

KAUFMAN, R. J. et al Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 9622–9628, 1986.

KAUFMAN, R. J. Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 79, n. 6, p. 1068–79, 1998.

KESIK-BRODACKA, M. Progress in biopharmaceutical development. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 306–322, 2018.

KOU, T. C. et al. Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature, **Journal of Biosciences and Bioengineering**, v. 111, p. 365–369, 2011.

KUCZEWSKI, M. et al. A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody p PALTA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.*, v. 58, n. 5, p. 515-23, 2014.roduced in a PER.C6 human cell line. **Biotechnonogy Journal**, v. 6, p. 56-65, 2011

KUMAR, S. R. Industrial production of clotting factors: Challenges of expression, and choice of host cells. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 7, p. 995–1004, 2015.

KUNKEL J. P. et al. Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 462–70, 2000.

KUZUYA, T. et al. Complete response by vitamin K2 analog monotherapy in sorafenib-failure advanced hepatocellular carcinoma: A case report. **Hepatology Research**, v. 49, n. 3, p. 360–364, 2019.

LALONDE, M.; DUROCHER, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. **Journal of Biotechnology**, v. 251, p. 128–140, 2017.

LAVADO-GARCÍA, J.; CERVERA, L.; GÒDIA, F. An Alternative Perfusion Approach for the Intensification of Virus-Like Particle Production in HEK293 Cultures. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. June, p. 1–16, 2020.

LI, H.; D'ANJOU, M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 678–84, 2009.

LIE, S. et al. The ability to utilise ammonia as nitrogen source is cell type specific and intricately linked to GDH, AMPK and mTORC1. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

LINDSKOG, E. K. et al. **Host Cells**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2018.

LISTE-CALLEJA, L.; LECINA, M.; CAIRÓ, J. J. HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 4, p. 471–477, 2014.

LIU, C. H.; CHU, I. M.; HWANG, S. M. Pentanoic acid, a novel protein synthesis stimulant for Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 1, p. 71–75, 2001a.

LIU, C. H.; CHU, I. M.; HWANG, S. M. Enhanced expression of various exogenous genes in recombinant chinese hamster ovary cells in presence of dimethyl sulfoxide. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 20, p. 1641–1645, 2001b

LIU, Y. et al. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. **Advances in Cancer Research**, v. 122, n. 402, p. 69–101, 2014.

LOIGNON M. et al. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant

IFNalpha2b in HEK293 cells. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 65, 2008.

LOWE, J. B.; MARTH, J. D. A genetic approach to mammalian glycan function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, p. 643–91, 2003.

LUITJENS A., CORVEN E. Production and Purification of Recombinant Proteins. *In*: CROMMELIN D. J. A., SINDELAR R. D., MEIBOHM B. **Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Application**. Suíça: Springer, 2019. p.57-82

LUSHER, J. M. Thrombogenicity associated with factor IX complex concentrates. **Seminars in Hematology**, v. 28, n.3, p. 3-5, 1991.

MA, N. et al. A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: improved productivity and lactate metabolism. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 1353-1363, 2009.

MAHLANGU, J. N. et al. Changes in the amino acid sequence of the recombinant human factor VIIa analog, vatreptacog alfa, are associated with clinical immunogenicity. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, p. 1989–1998, 2015

MARTÍNEZ-MONGE, I. et al. Concomitant consumption of glucose and lactate: A novel batch production process for CHO cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 151, 2019a.

MARTÍNEZ-MONGE, I. et al. Metabolic flux balance analysis during lactate and glucose concomitant consumption in HEK293 cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 388–404, 2019b.

MASHAYEKHI, A. et al. In vitro expression of mutant factor VII proteins and characterization of their clinical significance. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 2, p. 2738–2742, 2018.

MASROORI, N. et al. High-level expression of functional recombinant human coagulation factor VII in insect cells. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 6, p. 803–809, 2010.

MATSUSHISA, T.; OKADA, M.; MORI, Y. Induction of blood coagulation factor VIII by sodium butyrate in Balb/c 3T3 cells. **Experimental Cell Research**, v. 180, p.1-12, 1989.

MATSUSHITA, T. et al. Recombinant factor VIIa analog in the management of hemophilia with inhibitors: Results from a multicenter, randomized, controlled trial of vatreptacog alfa. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 12, p. 1244–1253, 2014.

MEI, B. et al. Expression of human coagulation factor VIII in a human hybrid cell line, HKB11. **Molecular Biotechnology**, v. 34, n. 165–78, 2006.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p.711-760, 1983.

MERTEN, O. W. Introduction to animal cell culture technology - Past, present and future. **Cytotechnology**, v. 50, n. 1–3, p. 1–7, 2006.

MERTENS, K; MEIJER, A. B. Recombinant Coagulation Factors and Thrombolytic Agents.

Pharmaceutical Biotechnology, [s.l.], p.451-470, 2019. Springer International Publishing.

MILLAR, D. S. et al. Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency. **Human Genetics**, v. 107, n. 4, p. 327-42, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DA ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil**: 2015. 1ª Ed. – Ministério da Saúde, Brasília, 2017.

MIO-SAM LAO; DEREK TOTH. Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 5, p. 688–691, 1997.

MIRZAAHMADI, S. et al. Expression of Recombinant Human Coagulation Factor VII by the Lizard Leishmania Expression System. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

NAGAHASHI, K. et al. Successful synthesis of active human coagulation factor VII by co-expression of mammalian gamma-glutamyl carboxylase and modification of vit . K cycle in Drosophila Schneider S2 cells. **Cytotechnology**, v. 69, n. 2, p. 317–327, 2017.

NEUFELD, E. J. et al. Safety update on the use of recombinant activated factor VII in approved indications. **Blood Reviews**, v. 29, p. S34-S4, 2015.

NILSANG, S.; KUMAR, A.; RAKSHIT, S. K. Effect of α -ketoglutarate on monoclonal antibody production of hybridoma cell lines in serum-free and serum-containing medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2–3, p. 489–501, 2008

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods. Disponível em <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>. Acesso em: 20 ago. 2020.

NOH, S. M. et al. Reduction of ammonia and lactate through the coupling of glutamine synthetase selection and downregulation of lactate dehydrogenase-A in CHO cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 1035–1045, 2017.

O'HARA, P. J. et al. Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5158-62, 1987.

OKAHASHI, N. et al. Metabolic characterization of cultured mammalian cells by mass balance analysis, tracer labeling experiments and computer-aided simulations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 6, p. 725–731, 2015.

OOSTING, R. N. Molecular Biotechnology: From DNA Sequence to Therapeutic Protein. In: CROMMELIN D. J. A., SINDELAR R. D., MEIBOHM B. **Pharmaceutical Biotechnology.Fundamentals and Aplicatio**. Suíça: Springer, 2019. p.1-18

ORELLANA, C. A. et al. High-antibody-producing chinese hamster ovary cells up-regulate intracellular protein transport and glutathione synthesis. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 2, p. 609–618, 2015.

ORELLANA, C. A. et al. Overexpression of the regulatory subunit of glutamate-cysteine ligase

enhances monoclonal antibody production in CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 8, p. 1825–1836, 2017.

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

PALTA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian J Anaesth.**, v. 58, n. 5, p. 515-23, 2014.

PAPANEOPHYTOU, C. Design of Experiments As a Tool for Optimization in Recombinant Protein Biotechnology: From Constructs to Crystals. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 12, p. 873–891, 2019.

PENG, L. et al. Enhanced recombinant factor VII expression in Chinese hamster ovary cells by optimizing signal peptides and fed-batch medium. **Bioengineered**, v. 7, n. 3, p. 189–197, 2016.

PEREIRA, S.; KILDEGAARD, H. F.; ANDERSEN, M. R. Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 3, p. 1–13, 2018.

PEROT, E. et al. Expression and characterization of a novel human recombinant factor IX molecule with enhanced in vitro and in vivo clotting activity. **Thrombosis Research**, v. 135, p. 1017–24, 2015.

PETERS, R.; HARRIS, T. Advances and innovations in haemophilia treatment. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 7, p. 493–508, 2018.

PETIOT, E. et al. Metabolic and Kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK293 cell culture. **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 1–12, 2011.

PICANÇO-CASTRO, V. et al. Production of recombinant therapeutic proteins in human cells: current achievements and future perspectives. **Protein and Peptide Letters**, v. 20, p. 1373–81, 2013.

PILETZ, J. E. et al. Human Cells Grown With or Without Substitutes for Fetal Bovine Serum. **Cell Medicine**, v. 10, p. 215517901875514, 2018.

PONGJANTARASATIAN, S. et al. Coagulant activity of recombinant human factor VII produced by lentiviral human F7 gene transfer in immortalized hepatocyte-like cell line. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, p. 1–12, 2019.

PORTNER, R. Characteristics of Mammalian Cells and Requirements for Cultivation. *In: Cell and Tissue Reaction Engineering*. EIBL R., PÖRTNER R., CATAPANO G., CZEMARK P. New York: Springer, 2009. p. 13-53.

QARAWI, M. A. et al. a Review on Therapeutic Proteins: Stability Aspects and Clinical Implications. **International Research Journal Of Pharmacy**, v. 10, n. 2, p. 1–7, 2019.

RADHAKRISHNAN, D.; WELLS, E. A.; ROBINSON, A. S. Strategies to enhance productivity and modify product quality in therapeutic proteins. **Current opinion in chemical engineering**,

v. 22, p. 81-88, 2018.

REHBERG, M. et al. The regulation of glutaminolysis and citric acid cycle activity during mammalian cell cultivation. [s.l.] IFAC, 2013. v. 12

RITACCO, F. V.; WU, Y.; KHETAN, A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 6, p. 1407–1426, 2018.

RODRIGUES GOULART, H. et al. Enhancement of human prolactin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização e projetos**. 3ª. ed Campinas-SP: Cárita, 2014.

ROSHAL, M. Prothrombin Time. Second Edition ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013.

SATHYAMURTHY, M. et al. Overexpression of PACEsol improves BMP-7 processing in recombinant CHO cells. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 2, p. 336–339, 2012.

SCHLAEGER, E. J.; CHRISTENSEN, K. Transient gene expression in mammalian cells grown in serum-free suspension culture. **Cytotechnology**, v. 30, p. 71–83, 1999.

SIEGWART, P. et al. Adaptive control at low glucose concentration of HEK-293 cell serum-free cultures. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 4, p. 608–616, 1999.

SIES H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 916-921, 1999.

SJAMSOEDIN, L. J. et al. The effect of activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) on joint and muscle bleeding in patients with hemophilia A and antibodies to factor VIII. A double-blind clinical trial. **The New England Journal of Medicine**, v. 305, p. 717-21, 1981.

SPEARMAN, M. et al. Production and glycosylation of recombinant β -interferon in suspension and cytopore microcarrier cultures of CHO cells. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 1, p. 31–39, 2005.

STROJAN, K. et al. Glutathione reduces cytotoxicity of polyethyleneimine coated magnetic nanoparticles in CHO cells. **Toxicology in Vitro**, v. 41, p. 12-20, 2017.

SUNG, Y. H. et al. Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells. **Journal of Biotechnology**, v. 112, p. 323-335, 2004.

SUNLEY, K.; BUTLER, M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 385–394, 2010.

SUNLEY, K.; THARMALINGAM, T.; BUTLER, M. CHO cells adapted to hypothermic growth

produce high yields of recombinant β -interferon. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 4, p. 898–906, 2008

RAJENDRA, Y. et al. Reduced glutamine concentration improves protein production in growth-arrested CHO-DG44 and HEK-293E cells. *Biotechnology Letters*, v. 34, n. 4, p. 619–626, 2012

RASHEED, S. et al. A newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). **Cancer**, v. 33, p. 1027–1033, 1974.

SUZUKI, H., et al. Ammonia induced apoptosis is accelerated at higher pH in gastric surface mucous cells. **American Journal of Physiology Gastrointestinal, Liver Physiol**, v. 283. n. 4, p. 986–995, 2002.

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

SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V; COVAS, DT. Production of recombinant coagulation factors: Are humans the best host cells? **Bioengineered**, v. 8, n. 5, p. 462–470, 2017

TAI, Y. et al. SK-Hep1: not hepatocellular carcinoma cells but a cell model for liver sinusoidal endothelial cells. v. 11, n. 5, p. 2931–2938, 2018.

TIE et al. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. **Blood**, v. 117, n. 10, p. 2967–2974, 2011.

TIE, J. K.; STAFFORD, D. W. Functional Study of the Vitamin K Cycle Enzymes in Live Cells. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., v. 584, 2017.

TORRES, M.; ALTAMIRANO, C.; DICKSON, A. J. Process and metabolic engineering perspectives of lactate production in mammalian cell cultures. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 22, p. 184–190, 2018.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. December, 2019.

TUDRYN, G. J. et al. (12) Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2016 / 0302365A1. v. 1, n. 62, 2016.

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

VAN DEN STEEN, P. et al. Concepts and principles of O-linked glycosylation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 151–208, 1998.

VAN DER VALK, J. et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. **Altex**, v. 35, n. 1, p. 99–118, 2018.

VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 4, p. 1053–1063, 2010.

VATANDOOST, J.; PAKDAMAN, S. F. The Effects of Influencing Factors on γ -carboxylation and Expression of Recombinant Vitamin K Dependent Coagulation Factors. **Journal of Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 1–8, 2016.

VERGARA, M. et al. High glucose and low specific cell growth but not mild hypothermia improve specific r-protein productivity in chemostat culture of CHO cells. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1–22, 2018.

VILLIGER-OBERBEK, A. et al. Development and application of a high-throughput platform for perfusion-based cell culture processes. **Journal of Biotechnology**, v. 212, p. 21–29, 2015.

VINK, T. et al. (2014). A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. **Methods**, v. 65, p. 5–10, 2014.

WAJIH, N.; OWEN, J.; WALLIN, R. Enhanced functional recombinant factor VII production by HEK 293 cells stably transfected with VKORC1 where the gamma-carboxylase inhibitor calumenin is stably suppressed by shRNA transfection. p. 405–410, 2008.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 10, p.992-1000, 2014.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p.1136-1145, 2018.

WALSH, G.; JEFFERIS, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1241–1252, 2006.

WANG, Z. et al. The growth inhibitory effects of vitamins K and their actions on gene expression. **Hepatology**, v. 25, p. 876-882, 1995.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393–1398, 2004.

XIAO, W. et al. Expression and fast preparation of biologically active recombinant human coagulation factor VII in CHO-K1 cells. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6813–6824, 2013.

YAMAGUCHI, K. et al. Engineered long terminal repeats of retroviral vectors enhance transgene expression in hepatocytes in vitro and in vivo. **Molecular Therapy**, v. 8, p. 796–803, 2003.

YAMAMOTO, T. et al. Involvement of hepatoma-derived growth factor in the growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells by vitamin K2. **Journal of Gastroenterology**, v. 44, n. 3, p. 228–235, 2009.

YANG, M.; BUTLER, M. Effects of Ammonia on CHO Cell Growth, Erythropoietin Production, and Glycosylation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 4, p. 370-380, 2000.

YEHUDA, S.; PADLER-KARAVANI, V. Glycosylated Biotherapeutics: Immunological Effects of N-Glycolylneuraminic Acid. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. January, p. 1–9, 2020.

YOON, S. K. et al. Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary

cells grown in suspension at 32.5 and 37.0°C. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 3, p. 345–356, 2005.

YOUNG, J. D. Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1108–1115, 2013.