

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MARTINO REINHARDT TAGLIANI

**Efeitos da expressão heteróloga estável ou adição exógena dos fatores de crescimento  
TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB sobre a cinética de crescimento de células CHO e HEK**

SÃO PAULO  
2023

MARTINO REINHARDT TAGLIANI

**Efeitos da expressão heteróloga estável ou adição exógena dos fatores de crescimento  
TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB sobre a cinética de crescimento de células CHO e HEK**

**Versão Corrigida**

Dissertação apresentada à Escola Politécnica  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia  
Oliveira Carreira Nishiyama

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meioconvencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.


São Paulo, 18 de abril de 2023

Assinatura do autor: \_\_\_\_\_

Assinatura do orientador: \_\_\_\_\_

**Martino**

Digitally signed by Martino  
DN: cn=Martino, o=Labware,  
ou=RP&C,  
email=mtagliani@labware.com,  
c=BR,  
Date: 2023.04.18 20:40:54  
+03'00'



### Catálogo-na-publicação

Tagliani, Martino  
Efeitos da expressão heteróloga estável ou adição exógena dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB sobre a cinética de crescimento de células CHO e HEK / M. Tagliani -- versão corr. -- São Paulo, 2023.  
126 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Biotecnologia 2.Cultivo celular 3.Proteínas recombinantes 4.Fatores de crescimento I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

MARTINO REINHARDT TAGLIANI

**Efeitos da expressão heteróloga estável ou adição exógena dos fatores de crescimento  
TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB sobre a cinética de crescimento de células CHO e HEK**

**Versão Corrigida**

Dissertação apresentada à Escola Politécnica  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2023

**TAGLIANI, M. R. Efeitos da expressão heteróloga estável ou adição exógena dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB sobre a cinética de crescimento de células CHO e HEK. 2023. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2023.**

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_



## RESUMO

Tecnologias de manipulação genética e cultivo de células animais são amplamente utilizadas para obtenção de proteínas contendo modificações pós-traducionais incompatíveis com sistemas de expressão microbianos, como o caso da maioria dos fatores peptídicos de crescimento (FC). Estas proteínas multifuncionais possuem uma diversa gama de aplicações clínicas e de pesquisa, notadamente em medicina regenerativa e engenharia de tecidos. A maioria dos FC recombinantes disponíveis comercialmente são obtidos a partir do cultivo de células de mamífero, sendo estas suscetíveis à sinalização e regulação por essas mesmas moléculas, as quais, inclusive, são componentes comuns de meios de cultura, onde desempenham funções mitogênicas cruciais. Contudo, há poucos relatos sobre impactos da expressão heteróloga de FC sobre a performance de crescimento de células de mamífero hospedeiras, apesar dos indícios de que estas proteínas poderiam estimular a proliferação celular e reduzir a dependência por soro animal em processos de cultivo. No presente estudo, linhagens celulares contínuas CHO-DG44 e HEK293T foram cultivadas em paralelo a sublinhagens apresentando expressão estável de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB, em meio basal Alpha-MEM e DMEM, respectivamente. As curvas de crescimento e parâmetros cinéticos de cultivos aderidos em placas de 24 poços foram determinados e comparados entre células produtoras de FC e parentais cultivadas com três concentrações de soro fetal bovino (SFB), que naturalmente contém FC, e com três condições de aplicação exógena de FC. Nenhum efeito estimulador foi observado com as células HEK, mas a expressão heteróloga de TGF- $\beta$ 1 pelas células CHO elevou a velocidade máxima específica de crescimento de forma inversamente proporcional à concentração de SFB no meio, e levou a concentrações máximas de célula 2-5 vezes maiores. O efeito observado aqui indica um boa direção de pesquisa para o desenvolvimento de fórmulas de meio de cultura livre de soro animal e estratégias de otimização de bioprocessos.

Palavras-chave: cultivo celular, cinética de crescimento, fatores de crescimento, expressão heteróloga, proteínas recombinantes, CHO, HEK, PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1.

## ABSTRACT

Animal cell genetic manipulation and cultivation technologies are widely employed for the obtention of recombinant proteins that feature post-translational modifications incompatible with microbial expression systems, as the case of most peptide growth factors. These multifunctional proteins have a wide array of clinical and research applications, notably in regenerative medicine and tissue engineering. The mammalian cell lines utilized to produce most commercially available recombinant growth factors are known to be susceptible to signaling and regulation by these molecules, which are, in fact, common components of cell culture media, providing crucial mitogenic stimuli. However, there are few reports on the effects of heterologous GF expression on the growth performance of mammalian host cells, despite evidence that these proteins hold the potential to leverage cell proliferation and decrease animal serum dependence in cultivation processes. In the present study, continuous cell lines CHO-DG44 and HEK293 were cultivated along with sublineages featuring the stable expression of TGF- $\beta$ 1 and PDGF-BB, in Alpha-MEM and DMEM basal media, respectively. The growth curves and kinetic parameters of 24-well plate adherent cultures were assessed and compared between GF producing and parental cells cultivated with three different concentrations of fetal bovine serum (FBS), which naturally contain GF, and with three conditions of exogenous GF application. No stimulatory effect was observed with HEK cells, but the heterologous expression of TGF- $\beta$ 1 by CHO cells led to maximum specific growth rate increases in an inversely proportional relation to FBS concentration in media, and 2-5 times higher maximum cell concentrations. The effect observed here indicates a good direction of research for the development of serum-free media formulas and bioprocess optimization strategies.

Keywords: cell culture, growth kinetics, growth factors, heterologous expression, recombinant proteins, CHO, HEK, PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva padrão de crescimento celular dividida em cinco fases distintas .....	23
Figura 2 - Representação simplificada do metabolismo da glicose e da glutamina em células animais .....	26
Figura 3 - Agregados de células CHO parentais em meio 50% MLS .....	51
Figura 4 - Células CHO parentais em meio 75% MLS com formação moderada de agregados celulares .....	52
Figura 5 - Células CHO parentais em meio 75% MLS sem formação de agregados celulares .....	53
Figura 6 - Agregados de células HEK parentais em frascos T25 com meio 75% MLS....	54
Figura 7 - Agregados de células HEK parentais em frascos T25 com meio 75% MLS em maior magnitude .....	54
Figura 8 - Células HEK parentais em frascos T25 com meio 75% MLS após homogeneização com pipetador.....	55
Figura 9 - Concentração de células HEK 4 dias após inoculação em meio com 1% SFB e adição exógena de FC .....	58
Figura 10 - Concentração de células CHO 3 dias após inoculação em meio com 1,4% SFB e adição exógena de FC .....	58
Figura 11 - Concentração de células CHO 3 dias após inoculação em meio com 3,5% SFB e adição exógena de TGF- $\beta$ 1 .....	59
Figura 12 - Crescimento de células CHO parentais em 3 concentrações de SFB .....	60
Figura 13 - Crescimento de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3 concentrações de SFB .....	61
Figura 14 - $\ln(X)$ de células CHO parentais em 3 concentrações de SFB .....	62
Figura 15 - $\ln(X)$ de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3 concentrações de SFB....	62
Figura 16 - Curvas de concentração de glicose em cultivos da CHO parental em 3 concentrações de SFB .....	64
Figura 17 - Curvas de concentração de glicose em cultivos da CHO produtora em 3 concentrações de SFB .....	64
Figura 18 - Curvas de concentração de TGF- $\beta$ 1 em cultivos da CHO produtora em 3 concentrações de SFB .....	66
Figura 19 - $\mu X_{MÁX}$ de células CHO em função da concentração de SFB .....	67
Figura 20 - Diferença de $\mu X_{MÁX}$ entre CHO produtora de TGF- $\beta$ 1 e parental, em função da concentração de SFB.....	68
Figura 21 - $X_{MÁX}$ de células CHO em função da concentração de SFB.....	69
Figura 22 - Diferença de $X_{MÁX}$ entre CHO produtora de TGF- $\beta$ 1 e parental, em função da concentração de SFB.....	69
Figura 23 - $Y_{X/GLC}$ de células CHO em função da concentração de SFB .....	71
Figura 24 - $\mu S$ de células CHO em função da concentração de SFB.....	71
Figura 25 - Crescimento de células CHO parentais em 3,5% SFB com e sem adição de FC .....	72
Figura 26 - Crescimento de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3,5% SFB com e sem adição de FC .....	73
Figura 27 - $\ln(X)$ de células CHO parentais em 3,5% SFB com e sem adição de FC.....	74
Figura 28 - $\ln(X)$ de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3,5% SFB e sem com adição de FC.....	74
Figura 29 - Curvas de concentração de glicose em cultivos da CHO parental em 3,5% SFB com a adição de FC.....	75

Figura 30 - Curvas de concentração de glicose em cultivos da CHO produtora em 3,5% SFB com a adição de FC.....	76
Figura 31 - Curvas de concentração de TGF- $\beta$ 1 no cultivo da CHO parental em meio com 3,5% SFB e adição exógena de TGF- $\beta$ 1 .....	77
Figura 32 - Curvas de concentração de TGF- $\beta$ 1 no cultivo da CHO produtora em meio com 3,5% SFB e adição exógena de TGF- $\beta$ 1 .....	77
Figura 33 - $\mu_{X_{MÁX}}$ da célula CHO parental em meio 3,5% SFB e 3 condições de adição exógena de FC.....	78
Figura 34 - $\mu_{X_{MÁX}}$ da célula CHO produtora em meio 3,5% SFB e 3 condições de adição exógena de FC.....	79
Figura 35 - $X_{MÁX}$ da célula CHO produtora em meio 3,5% SFB e 3 condições de adição exógena de FC com relação ao controle .....	80
Figura 36 - Crescimento de células HEK parentais em 3 concentrações de SFB.....	81
Figura 37 - Crescimento de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 concentrações de SFB .....	81
Figura 38 - $\ln(X)$ de células HEK parentais em 3 concentrações de SFB .....	83
Figura 39 - $\ln(X)$ de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 concentrações de SFB .....	83
Figura 40 - Curvas de concentração de PDGF-BB em cultivos da HEK produtora em 3 concentrações de SFB .....	85
Figura 41 - $P_{MÁX}$ da célula HEK produtora de PDGF-BB em função da concentração de SFB .....	86
Figura 42 - Teor de PDGF-BB na célula HEK produtora em função das concentrações de SFB ao quinto e sétimo dia de cultivo .....	86
Figura 43 - $\mu_{X_{MÁX}}$ de células HEK em função da concentração de SFB.....	87
Figura 44 - $X_{MÁX}$ de células HEK em função da concentração de SFB .....	88
Figura 45 - Crescimento de células HEK parentais em 2% SFB com e sem adição de FC .....	89
Figura 46 - Crescimento de células HEK produtoras de PDGF-BB em 2% SFB com e sem adição de FC .....	89
Figura 47 - $\ln(X)$ de células HEK parentais em 2% SFB com e sem adição de FC .....	90
Figura 48 - $\ln(X)$ de células HEK produtoras de PDGF-BB em 2% SFB com e sem adição de FC.....	91
Figura 49 - Curvas de concentração de PDGF-BB no cultivo da HEK parental em meio com 2% SFB com adição exógena de PDGF-BB .....	92
Figura 50 - $\mu_{X_{MÁX}}$ da célula HEK produtora em meio 2% SFB e 3 condições de adição exógena de FC.....	93
Figura 51 - $X_{MÁX}$ da célula HEK produtora em meio 2% SFB e 3 condições de adição exógena de FC.....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos principais aspectos da produção de proteínas recombinantes com diferentes tipos celulares .....	19
Tabela 2 - Componentes típicos do soro e suas funções no cultivo de células animais in vitro .....	29
Tabela 3 - Aplicações comerciais atuais de fator de crescimento humanos recombinantes .....	34
Tabela 4 - Teor e $P_{MÁX}$ em cultivos em monocamada de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 .....	35
Tabela 5 - $P_{MÁX}$ de PDGF recombinante em diferentes sistemas de expressão .....	35
Tabela 6 - Aumento percentual de $\mu X_{MÁX}$ e $X_{VMÁX}$ em diferentes linhagens de mamífero em função da expressão heteróloga de cdk13 e cox15 .....	39
Tabela 7 - Níveis de concentração de FC adotados para curvas dose-resposta .....	44
Tabela 8 - Faixa de concentração de utilização de PDGF-BB e TGF- $\beta$ 1 em cultivos celulares .....	56
Tabela 9 - Concentração de PDGF e TGF- $\beta$ 1 em soro de origem humana e bovina .....	57
Tabela 10 - Valores de $\mu X_{MÁX}$ e $X_{MÁX}$ levantados na literatura para células CHO e HEK .....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\mu_P$  – Velocidade específica de formação de produto
- $\mu_S$  – Velocidade específica de consumo de substrato
- $\mu_{X_{MÁX}}$  – Velocidade máxima específica de crescimento
- CHO – *Chinese Hamster Ovary cell*
- CV – Coeficiente de variação
- DHFR – Dihidrofolato redutase
- EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*
- FC – Fator de crescimento
- GRP – Genes de resposta primária
- HEK – *Human embryonic kidney cell*
- HEPES - *Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*
- MCS – Meio com soro
- MLS – Meio livre de soro
- PBS – *Phosphate buffered saline*
- PDGF-BB – Fator de crescimento derivado de plaquetas BB
- $P_{MÁX}$  – Concentração máxima de produto
- PRF – Proteínas recombinantes farmacêuticas
- SFB – Soro fetal bovino
- $S_{GLC}$  – Concentração do substrato glicose
- TGF- $\beta$ 1 – Fator de crescimento transformante beta 1
- TGF- $\beta$ 1 CM – TGF- $\beta$ 1 reagente comercial
- TGF- $\beta$ 1 MC – TGF- $\beta$ 1 proveniente de meio condicionado (MC)
- X – Concentração celular
- Xf – Concentração celular final
- $X_{MÁX}$  – Concentração máxima de células
- $Y_{X/GLC}$  – Fator de conversão de glicose a célula

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 BIOPROCESSOS COM CÉLULAS ANIMAIS.....	17
3.1.1 Contexto histórico .....	17
3.1.2 A célula animal como sistema de expressão .....	17
3.1.3 Linhagens de produção .....	21
3.1.4 O cultivo e seu estudo .....	22
3.2 METABOLISMO DE CÉLULAS ANIMAIS.....	25
3.3 MEIO DE CULTURA PARA CÉLULAS ANIMAIS .....	27
3.4 FATORES DE CRESCIMENTO .....	30
3.4.1 Biologia celular .....	30
3.4.2 Aplicações biotecnológicas dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB.....	31
3.4.3 Produção de fatores de crescimento.....	33
3.5 ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR MEDIANTE ESTIMULAÇÃO PROLIFERATIVA.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 CÉLULAS .....	40
4.2 MEIOS DE CULTURA E SISTEMA DE CULTIVO .....	40
4.3 BANCO CELULAR.....	41
4.4 CONTAGEM CELULAR .....	41
4.4.1 Contagem manual.....	41
4.4.2 Contagem automática.....	42
4.5 ADAPTAÇÃO CELULAR PARA CULTIVO EM SUSPENSÃO COM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE SORO.....	42
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
4.7 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE.....	43
4.8 CURVAS DOSE-RESPOSTA DE ADIÇÃO EXÓGENA DE FATOR DE CRESCIMENTO .....	44
4.8.1 Análise estatística dos dados de $X_F$ .....	45
4.9 ATIVAÇÃO DE TGF- $\beta$ 1 RECOMBINANTE .....	45
4.10 ESTUDO CINÉTICO .....	45
4.10.1 Análise estatística dos dados de $\mu_{X_{MÁX}}$ e $X_{MÁX}$ .....	47
4.11 QUANTIFICAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO.....	48
4.11.1 Protocolo geral do ELISA.....	48
4.11.2 ELISA com amostras de células CHO .....	49
4.11.3 ELISA com amostras de células HEK .....	49
5 RESULTADOS .....	51
5.1 ADAPTAÇÃO CELULAR PARA CULTIVO EM SUSPENSÃO COM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE SORO.....	51
5.2 CURVAS DOSE-RESPOSTA DE ADIÇÃO EXÓGENA DE FATOR DE CRESCIMENTO .....	56
5.3 CULTIVO DE CÉLULAS CHO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO.....	60
5.3.1 Curvas de crescimento .....	60
5.3.2 Curvas de consumo de substrato .....	63
5.3.3 Curvas de formação de produto .....	65

5.3.4	Análise de parâmetros .....	66
5.4	CULTIVO DE CÉLULAS CHO COM ADIÇÃO EXÓGENA DE FATOR DE CRESCIMENTO .....	72
5.4.1	Curvas de crescimento .....	72
5.4.2	Curvas de consumo de substrato .....	75
5.4.3	Curvas de concentração de TGF- $\beta$ 1 .....	76
5.4.4	Análise de parâmetros cinéticos .....	78
5.5	CULTIVO DE CÉLULAS HEK EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO .....	80
5.5.1	Curvas de crescimento .....	80
5.5.2	Curvas de formação de produto .....	84
5.5.3	Análise de parâmetros cinéticos .....	87
5.6	CULTIVO DE CÉLULAS HEK COM ADIÇÃO EXÓGENA DE FATOR DE CRESCIMENTO .....	88
5.6.1	Curvas de crescimento .....	88
5.6.2	Curvas de concentração de PDGF-BB .....	91
5.6.3	Análise de parâmetros cinéticos .....	92
5.7	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS CHO E HEK ADERENTES .....	94
6	DISCUSSÃO .....	95
6.1	PARÂMETROS DE CRESCIMENTO EM CONDIÇÕES PADRÃO DE CULTIVO .....	95
6.2	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TGF- $\beta$ 1 E PDGF-BB EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	95
6.3	EFEITOS DA PRIVAÇÃO DE SFB, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ADIÇÃO EXÓGENA DE FC SOBRE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO .....	96
6.3.1	Célula HEK .....	96
6.3.2	Célula CHO .....	97
7	CONCLUSÃO .....	100
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101
	APÊNDICE A – Replicatas biológicas das curvas de crescimento em diferentes concentrações de soro com a linhagem CHO parental .....	112
	APÊNDICE B – Replicatas biológicas das curvas de crescimento em diferentes concentrações de soro com a linhagem CHO produtora de TGF- $\beta$ 1 .....	115
	APÊNDICE C – Replicatas biológicas das curvas de crescimento em diferentes concentrações de soro e adição exógena de FC com a linhagem HEK parental .....	118
	APÊNDICE D – Replicatas biológicas das curvas de crescimento em diferentes concentrações de soro com a linhagem HEK produtora de PDGF-BB .....	124



## 1 INTRODUÇÃO

Fatores peptídicos de crescimento (FC) são um grupo amplo de proteínas estruturalmente diversas que atuam como reguladores multifuncionais da proliferação, diferenciação, e sobrevivência de células animais, podendo levar a respostas diferentes e até opostas, dependendo do tipo e contexto celular sobre o qual atuam (ARMELIN, 1990). Através de mecanismo parácrino ou autócrino, estes fatores, sintetizados e secretados por diversos tipos celulares, se ligam ao domínio extracelular de receptores transmembranares específicos. A alteração conformacional do domínio intracelular destes receptores provoca então uma atividade catalítica de tirosina quinase, que dá início a cascata de transdução de sinal que leva ultimamente à expressão gênica (SORKIN; WATERS, 1993).

O acúmulo de conhecimento sobre FC e seus efeitos sobre células animais levou a um aprofundamento da compreensão de processos regenerativos e oncogênicos *in vivo*, assim como processos de cultivo celular *in vitro*. A ampla disponibilidade de FC como insumos de pesquisa representou um elemento crítico para o progresso científico e médico, e foi possível graças a tecnologias de DNA recombinante que permitiram a obtenção massiva destas proteínas de forma biologicamente ativa a partir de expressão heteróloga em bioprocessos de escala industrial (AYYAR, 2011).

Sob aspectos de produção, microrganismos são em geral os mais atrativos como sistema de expressão heterólogo pois apresentam maior velocidade específica de crescimento, maior resistência ao cisalhamento, exigências nutricionais menos complexas e atingem alta densidade celular em cultivo em suspensão (LEE, 1996; RIESENBERG; GUTHKE, 1999; SHILOACH; FASS, 2005). Contudo, para obtenção de proteínas recombinantes de estrutura complexa em conformação adequada, estável e biologicamente ativa, as células animais são os hospedeiros mais adequados, devido à disposição natural de maquinário enzimático para modificações pós-traducionais, contando ainda com vias naturais de excreção (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

Apesar de muitos FC serem reconhecidos agentes mitogênicos estimuladores da proliferação e do crescimento celular, o estudo direto dos efeitos destas propriedades bioativas sob células animais com potencial de utilização comercial não é muito frequente na literatura. De forma indireta, este estudo se dá pela manipulação da concentração de soro animal como o soro fetal bovino (SFB) em meios de cultura, uma vez que o soro é repleto de fatores de crescimento, sendo esta uma prática corriqueira em cultivo celular para otimização do crescimento e até da produção de proteínas recombinantes. Contudo, devido



a constituição indefinida e variável do soro animal, e ao fenômeno de comunicação cruzada entre vias de sinalização de FC, se faz desejável a investigação dos efeitos de FC específicos sobre diferentes linhagens celulares – principalmente as de maior relevância industrial, como a de ovário de hamster chinês (CHO), que é a célula de mamífero mais utilizada pela biotecnologia farmacêutica (WALSH, 2018), e a de rim de embrião humano (HEK), uma das linhagens de origem humana mais adotada para produção de biofármacos (DUMONT *et al.*, 2016).

As linhagens celulares de mamífero produtoras da maioria dos FC recombinantes disponíveis comercialmente são suscetíveis à sinalização e regulação por estas mesmas moléculas, as quais, inclusive, são componentes comuns de meios de cultura celular, onde desempenham funções mitogênicas cruciais. Ainda assim, há poucos relatos sobre impactos da expressão heteróloga de FC sobre a performance de crescimento das células hospedeiras, e há evidências de que estas modificações genéticas detêm potencial de estímulo à proliferação celular e de redução da dependência por soro animal em processos de cultivo. A verificação de tais efeitos poderia sugerir a utilização de genes codificadores de FC em estratégias de desenvolvimento e otimização de linhagens celulares animais para bioprocessos industriais.

O grupo NUCEL da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (COLIN; DEMASI, 2008; NUCEL, 2022) tem desenvolvido uma série de linhagens celulares produtoras de diferentes FC. Em um trabalho recente, amostras de cDNA total de próstata, rim e fígado humanos foram utilizados para a amplificação da sequência codificadora do gene do fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) e, através do vetor de expressão construído pelo mesmo grupo e patenteado, o pNU1, foi obtido um clone celular de ovário de hamster chinês (CHO) DG44 com expressão estável de TGF- $\beta$ 1 recombinante (DE PAULA, 2018). Amostras de cDNA total de pulmão humano também foram utilizadas para amplificação da sequência codificadora do gene do fator de crescimento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), que foi depois clonada em diversos vetores entre eles o pNU1, e então possibilitaram a obtenção de um clone celular de rim de embrião humano (HEK) 293T com expressão heteróloga estável (dados não publicados).

Nestes trabalhos anteriores, ambos plasmídeos pNU1 com a região codificadora de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB tiveram sua integridade confirmadas por sequenciamento e levaram à expressão de proteínas com atividade biológica confirmadas em modelos *in vitro* e *in vivo*. O alto potencial terapêutico destes FC para tratamento de injúrias em tecidos moles vem sendo explorado a partir de modelos murinos no NUCEL (KOGA, 2020), tendo sido

observado que as linhagens produtoras destes FC parecem crescer a velocidades maiores que as linhagens parentais originais.

No presente trabalho a hipótese de que os fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB podem melhorar a performance de crescimento de células de mamífero em cultura aderente foi investigada. Para isto, células parentais CHO-DG44 e HEK293T foram cultivadas em paralelo às sublinhagens produtoras de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB mencionadas acima, e condições de adição exógena destes FC também foram investigadas.

A composição complexa do SFB utilizado em meio de cultura inclui uma gama de moléculas essenciais para o cultivo celular, dentre elas fatores de crescimento que fornecem estímulo proliferativo. Dessa forma, quaisquer possíveis vantagens de crescimento oferecidas pelo TGF- $\beta$ 1 ou PDGF-BB poderiam apenas ser verificadas em situações de carência de estímulo proliferativo, como em cultivos com baixas concentrações de SFB – isto devido à saturação dos receptores transmembranares específicos. Dessa forma, a adição exógena destes FC foi realizada em condições de baixa concentração de SFB, e o desenho experimental dos processos de cultivo permitiu a investigação de efeitos de interação entre os fatores sublinhagem (parental ou produtora de FC) e concentração de SFB (20%, 50% ou 100% da concentração padrão) na determinação dos parâmetros de crescimento analisados.

De modo a obter maior conhecimento sobre os processos celulares por trás do crescimento das células, a concentração de glicose em diferentes pontos do processo foi determinada, assim como a concentração de TGF- $\beta$ 1 ou PDGF-BB, a partir de amostras de meio condicionado. Considerando a maior facilidade de amostragem - e logo, de caracterização cinética - em sistemas de cultivo em suspensão, e que células em meios de livre de soro poderiam responder de forma diferente à estimulação por FC, houve também tentativas de adaptação celular ao cultivo em suspensão e meio livre de soro.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é definir quantitativamente os efeitos dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e do PDGF-BB sobre a cinética de crescimento de células CHO-DG44 e HEK293.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Estabelecer protocolos para o estudo cinético de cultivos aderentes com diferentes concentrações de SFB, e construção de banco celular;
- II. Realizar ensaios para obtenção de curvas dose-resposta de adição exógena de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB com células HEK e CHO parentais;
- III. Caracterizar a cinética do crescimento de células HEK parentais em cultura aderente com três concentrações de SFB e três condições de adição exógena de TGF- $\beta$ 1 e/ou PDGF-BB;
- IV. Caracterizar a cinética do crescimento de células HEK produtoras de PDGF-BB em cultura aderente com três concentrações de SFB e três condições de adição exógena de TGF- $\beta$ 1 e/ou PDGF-BB;
- V. Caracterizar a cinética do crescimento de células CHO parentais em cultura aderente com três concentrações de SFB e 3 três condições de adição exógena de TGF- $\beta$ 1 e/ou PDGF-BB;
- VI. Caracterizar a cinética do crescimento de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em cultura aderente com três concentrações de SFB e três condições de adição exógena de TGF- $\beta$ 1 e/ou PDGF-BB;
- VII. Quantificar a concentração de FC recombinante em amostras de meio condicionado dos ensaios de caracterização cinética;
- VIII. Quantificar a concentração de glicose em amostras de meio condicionado dos ensaios de caracterização cinética;
- IX. Adaptar as células para cultivo em suspensão e meio livre de soro.

### 3 REVISÃO BIBLIGRÁFICA

#### 3.1 BIOPROCESSOS COM CÉLULAS ANIMAIS

##### 3.1.1 Contexto histórico

O começo da pesquisa biomédica moderna tem como marco a primeira vacina desenvolvida com sucesso, a da varíola, introduzida por Edward Jenner em 1796 (SMITH, 2011), e o primeiro antibiótico, a arsfenamina (Salvarsan), descoberto em 1908 por Paul Ehrlich (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Na década de 1930 tecnologias de fermentação submersa (*deep-tank*) de fungos *Penicillium* permitiram a obtenção em massa do antibiótico penicilina, um dos avanços mais significativos da ciência e tecnologia durante a segunda guerra mundial (NEUSHUL, 1993).

Em 1951 George Gey cultivou células de tecido tumoral humano estabelecendo a linhagem tumoral HeLa, primeira linhagem celular humana imortalizada – isto é, de crescimento indefinido em cultura (FAROQUE, 2011), e em 1954 o cultivo de células animais para fins terapêuticos teve início com a produção da vacina para poliomielite (BAICUS, 2012). Ao longo do século XX, a química orgânica sintética, a química combinatória e computacional e a biotecnologia revolucionaram a descoberta e manufatura de medicamentos (LIU; LI; LAM, 2017; LIN; LI; LIN, 2020; JOZALA *et al.*, 2016).

O advento da tecnologia de DNA recombinante tornou possível a obtenção de uma grande variedade de proteínas recombinantes farmacêuticas (PRFs) a partir de cultivo celular, mais de 170 em 2017 (PHAM, 2017). O primeiro destes produtos foi a insulina humana produzida em bactérias, desenvolvida pela Genentech (San Francisco, CA, USA) em 1982, e o primeiro a ser obtido a partir de células de mamífero recombinantes foi o ativador do plasminogênio tecidual (tPA), também pela Genentech, em 1986. Avanços no desenho de sistemas de expressão, meio de cultura e bioprocessos foram os principais responsáveis por um aumento de cerca de 20 vezes no rendimento volumétrico de PRFs desde a produção do tPA (JESUS; WURM, 2011), sendo atingido rotineiramente rendimentos de mais de 5 g/L (SHUKLA *et al.*, 2017).

##### 3.1.2 A célula animal como sistema de expressão

Na Tabela 1 são comparadas as características mais relevantes da produção de proteínas recombinantes a partir de diferentes tipos celulares. Vale constar que avanços

mais recentes em tecnologias específicas de cultivo e a aplicação de estratégias de otimização de linhagens podem levar à casos divergentes do cenário generalista apresentado na Tabela 1. Além dos sistemas de expressão tradicionais comparados aqui, biofármacos têm sido obtidos mais recentemente também a partir de animais e plantas modificadas geneticamente – processo conhecido como ‘*pharming*’ (*Encyclopedia Britannica*) –, apresentando como principal vantagem os baixos custos associados à criação animal e plantio, mas ainda enfrentando preocupações a respeito de biossegurança, qualidade e rendimento dos produtos gerados (LIÉNARD *et al.*, 2007; OBEMBE *et al.*, 2011).

Sob aspectos de produção, microrganismos são em geral mais atrativos como sistema de expressão heterólogo pois apresentam maior velocidade específica de crescimento, maior resistência ao cisalhamento, exigências nutricionais menos complexas e atingem alta densidade celular em cultivo em suspensão (LEE, 1996; RIESENBERG; GUTHKE, 1999; SHILOACH; FASS, 2005). Contudo, para obtenção de proteínas recombinantes de estrutura complexa em conformação adequada, estável e biologicamente ativa, células animais são hospedeiros mais adequados, devido à disposição natural de maquinário enzimático para modificações pós-traducionais, contando ainda com vias naturais de excreção (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008). Isto torna as células animais hospedeiras especialmente relevantes para produção de proteínas recombinantes terapêuticas (ou, biofármacos), pois a maioria são de origem humana e dependem de extensas modificações pós-traducionais. Sendo assim, de 2015 a julho de 2018, 79% dos novos biofármacos aprovados no mundo foram produzidos com base em linhagens celulares de mamífero (WALSH, 2018).

	Bactéria	Levedura	Inseto	Mamífero
Velocidade específica de crescimento	Muito rápida	Rápida	Lenta	Lenta
Rendimento de expressão	Alto	Alto	Muito Alto	Muito Baixo
Produtividade	Muito alta	Alta	Alta	Baixa
Custo de meio	Muito baixo	Baixo	Alto	Muito alto
Técnicas de cultivo	Muito fácil	Fácil	Difícil	Muito difícil
Enovelamento proteico	Razoável	Bom	Muito bom	Muito bom
Custo de produção	Muito baixa	Baixo	Alto	Muito alto
Glicosilação simples	Não	Sim	Sim	Sim
Glicosilação complexa	Não	Não	Sim	Sim
Secreção do produto	Ruim	Muito boa	Muito boa	Muito boa
Funcionalidade de proteínas eucarióticas expressas	Ruim	Boa	Muito boa	Muito boa
Disponibilidade de aparatos genéticos	Muito boa	Boa	Baixa	Baixa
Problemas de pirogênese	Possível	Não	Não	Não

Tabela 1 - Comparação dos principais aspectos da produção de proteínas recombinantes com diferentes tipos celulares

Fonte: adaptada de CHA *et al.*, 2005.

Células animais cultivadas *in vitro* são geralmente classificadas como linhagens primárias, quando diretamente isoladas a partir de tecido biológico, ou linhagens contínuas, após passarem por processo de imortalização (mutação induzida) e adquirirem a capacidade de se dividir e proliferar indefinitivamente em cultura (MAQSOOD *et al.*, 2013). Estas transformações por vezes também se refletem em características cromossômicas, alterando o genótipo das células (BROWNE; AL-RUBEAI, 2007).

Além do estabelecimento de linhagens celulares contínuas, outro avanço na área de bioprocessos com células animais foi possibilitado pelo desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, que é a denominação dada às moléculas de DNA de duas espécies diferentes inseridas em uma célula hospedeira (*Encyclopedia Britannica*) – tecnologia também conhecida como clonagem gênica. Num procedimento típico de clonagem de

DNA, o gene ou outro fragmento de DNA de interesse é inserido numa peça circular de DNA (plasmídeo), através de enzimas de restrição e de ligação. A inserção produz uma molécula de DNA recombinante, ou seja, DNA montado a partir de fragmentos de outras fontes (BROWN, 2010).

Vetores específicos são necessários para a expressão de proteínas heterólogas em células de mamífero, e uma variedade de métodos para introdução destes vetores nas células foi desenvolvida, procedimento denominado transfecção (CHISHOLM, 1995). A seleção de um determinado vetor e suas características dependerá se a estratégia de expressão é baseada em sistemas transientes ou estáveis.

### *3.1.2.1 Sistemas de expressão transiente*

Nos sistemas de expressão transiente o DNA é introduzido na célula e mantido/replicado como uma unidade extracromossomal. A eficiência da transfecção, que reflete a porcentagem de células que receberam o DNA, é o fator mais importante na determinação do nível de expressão, além da força do promotor que dirige a expressão do gene do produto. A vida média de produção do sistema de expressão transitória geralmente é limitada pela toxicidade do DNA que se multiplica rapidamente ou pela perda de DNA da população de células durante a divisão. Em uma revisão de 2014 foi relatado um rendimento comum de 10 a 100mg/L de proteína recombinante por meio de cultura a partir destes sistema de produção, sendo possível a obtenção de gramas de produto em dias ou semanas graças a facilidade de escalonamento deste tipo de bioprocessos (CHIOU *et al.*, 2014).

### *3.1.2.2 Sistemas de expressão estável*

Em sistemas de expressão estável, o DNA que contém o gene de interesse é integrado ao genoma da célula hospedeira. Além da força do promotor, a frequência da integração do DNA no cromossomo (número de cópias) e a posição de integração são os fatores mais importantes na determinação de níveis de expressão. Não há diferenças nos métodos de transfecção transiente e estável, o que difere é a necessidade de identificar e selecionar células que integram o plasmídeo no genoma. Para produção de proteínas recombinantes em escala industrial, sistemas de expressão estável costumam ser mais vantajosos do que os de expressão transiente (OZTURK; HU, 2006).

### 3.1.3 Linhagens de produção

#### 3.1.3.1 CHO

A linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO) (URLAUB; CHASIN, 1980; URLAUB *et al.*, 1983) é a linhagem de células de mamífero mais empregada pela biotecnologia farmacêutica (WALSH, 2018). Esta preferência pode ser explicada por estas células apresentarem capacidade de adaptação para crescimento em suspensão e para meio livre de soro, menor risco de propagação de vírus humanos, padrões de glicosilação similares ao humano e por haver grande disponibilidade de ferramentas biotecnológicas compatíveis para geração de clones superprodutores (LAI; YANG; NG, 2013). Além disso, há registros completos sobre a procedência e histórico de diferentes cepas CHO, e essa rastreabilidade também é essencial para desenvolvimento de processos produtivos.

Uma das variantes das células CHO mais empregadas é a CHO-DG44, que é deficiente para expressão da enzima diidrofolato redutase (DHFR) (URLAUB; CHASIN, 1980). Esta enzima catalisa a redução de diidrofolato a tetraidrofolato e, em níveis menos significativos, de ácido fólico a diidrofolato. Estes subprodutos são vitais para as células, participando de diferentes vias biossintéticas, incluindo a síntese de purinas (CARIO *et al.*, 2011). Assim, por meio de um sistema de complementação gênica, a inserção da sequência codificadora de DHFR em plasmídeos de expressão permite a seleção de clones produtores, pois na ausência dessa enzima, essas células não são capazes de sobreviver quando mantidas em meios sem nucleosídeos, como aquele utilizado para a manutenção das populações recém-transfectadas (WURM, 2013).

#### 3.1.3.2 HEK

Apesar do amplo emprego da linhagem CHO pela indústria farmacêutica, observa-se uma guinada recente em direção ao uso linhagens celulares humanas para produção de biofármacos, e estas apresentam como principal vantagem a capacidade de conferir padrões de modificação pós-traducional completamente humanos. As linhagens celulares humanas mais empregadas incluem a de fibrossarcoma humano (HT-1080) (DUMONT *et al.*, 2016) e a derivadas da linhagem 293 (HEK293) de rim de embrião humano. A linhagem HEK293T (DUBRIDGE *et al.*, 1987), derivada da HEK293, cresce facilmente em cultivo em suspensão livre de soro, se reproduz rapidamente, é permissível a vetores adenovirais e



altamente eficiente na produção de proteínas (SWIECH; PICANCO-CASTRO; COVAS, 2012; THOMAS; SMART, 2005).

### 3.1.3.3 *Desenvolvimento de linhagens produtoras*

A partir de linhagens celulares contínuas, os primeiros passos para o desenvolvimento de linhagens celulares produtoras consistem em manipulações genéticas e técnicas de cultivo aplicadas ao organismo hospedeiro para obtenção de um clone celular estável com altos níveis de expressão da proteína recombinante de interesse (WURM, 2004). Após a construção de um vetor de expressão apropriado contendo o gene de interesse, elementos regulatórios de transcrição e um gene para garantir vantagem seletiva, a célula hospedeira é transfectada e depois cultivada de modo a se selecionar aqueles indivíduos que tiveram o vetor integrado com sucesso ao seu genoma (WURM, 2004). Finalmente, clones celulares são isolados a partir da população mista de células transfectadas, de modo que se possa avaliar em pequena escala a performance de crescimento e produtividade de cada clone, para aí então se selecionar o melhor candidato, e construir um banco de células adequado a partir dele.

### 3.1.4 **O cultivo e seu estudo**

Para manter a viabilidade, crescimento e produtividade de células de animais *in vitro*, além de meio de cultura, se faz necessário sistemas de cultivo, ou, biorreatores, que garantam a assepsia e condições físico-químicas (como pH, temperatura e oxigênio dissolvido) adequadas. As escolhas por um tipo de biorreator, sua escala e modo de operação são centrais para o desenho de um bioprocesso, não havendo um único sistema de cultivo adequado para todas as aplicações. Estudos de comparação de diferentes sistemas de biorreatores ou modos de operação para determinada aplicação são, geralmente, longos e custosos (PORTNER, 2015).

O desenvolvimento de qualquer bioprocesso tem como ponto de partida cultivos em pequena escala, o que possibilita uma economia de recursos para investigação e estudo de múltiplas condições experimentais. Em escala de laboratório, células aderentes – que necessitam de uma superfície adequada para fixação – são principalmente cultivadas em plástico do tipo frascos T e placas multipoços com superfícies tratadas para permitir a adesão celular, e células em suspensão são cultivadas em plásticos do mesmo tipo, mas com superfícies não tratadas e sob plataformas de agitação (GIRARD *et al.*, 2001; CHEN

*et al.*, 2009), em frascos tipo *spinner*, frascos agitados ou biorreatores tipo tanque agitado (PORTNER, 2015). Microcarregadores podem ser utilizados para cultivo de células aderentes em frascos *spinner* e outros sistemas de cultivo típicos de células não aderentes (PORTNER, 2015).

Biorreatores do tipo tanque agitado são os mais empregados para cultivos em suspensão devido a sua simplicidade e à eficiência do transporte de movimento, massa e calor nestes sistemas, sendo também facilmente escalonáveis (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008). O aumento de escala de sistemas produtivos com células aderentes, que costumava ser uma grande desvantagem destes sistemas com relação aos com células em suspensão, foi facilitado pelo advento de tecnologias como frascos multicamada, garrafas giratórias, sistemas com uso de microcarregadores – frasco *spinner* e tanque agitado, por exemplo – ou outras superfícies de imobilização – como fibra oca e leito fixo (BELLANI *et al.*, 2020).

Células animais e de plantas em cultivo em suspensão possuem um perfil de crescimento muito similar ao de organismos unicelulares (GRIFFITHS, 1986), também tomando a forma de uma curva sigmoideal (Figura 1). Curvas como estas são boas formas de representar processos de cultivo pois facilitam a visualização de diferentes fases de crescimento celular.

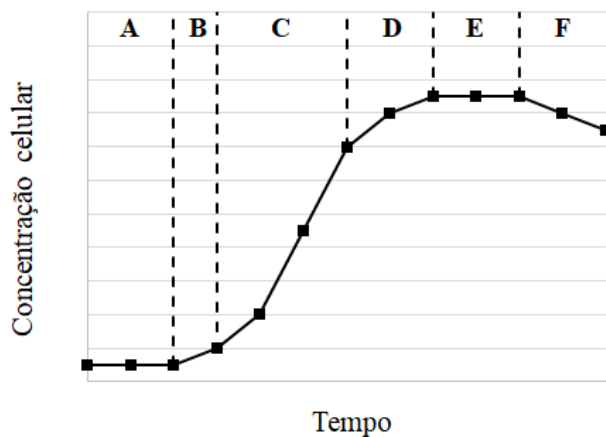


Figura 1 - Curva padrão de crescimento celular dividida em cinco fases distintas

Fases de crescimento: A – lag, B – aceleração, C – exponencial, D – desaceleração, E – estacionária, F – declínio. Fonte: Autor (figura meramente ilustrativa, não representa dados reais).

Normalmente, o crescimento celular em um processo de cultivo é dividido em seis fases: A- fase lag, período de adaptação celular ao ambiente de cultivo, onde não há crescimento celular; B- fase de aceleração, onde a concentração celular aumenta com o

tempo; C- fase logarítmica ou exponencial, período de máxima atividade metabólica e proliferação celular; D- fase de desaceleração, onde a concentração celular continua aumentando, porém em uma velocidade específica menor que na fase exponencial; E- fase estacionária, onde há equivalência entre a morte celular e a geração de novas células; e F- fase de declínio, onde o número de células mortas excede o de células novas (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

A caracterização quantitativa do crescimento celular é uma das etapas iniciais do desenvolvimento, otimização e controle de qualquer processo de cultivo. O monitoramento e análise de variáveis como concentração de células, produto, substratos e subprodutos, permitem a definição de grandezas cinéticas e estequiométricas importantes como a velocidade máxima específica de crescimento das células ( $\mu X_{MÁX}$ ), que possui influência direta nos níveis de produtividade volumétrica de bioprocessos (SCHIMIDELL *et al.*, 2001).

Ao sair da fase lag de crescimento, a velocidade específica de crescimento das células aumenta gradativamente até atingir, na fase exponencial de crescimento, um valor constante máximo, o  $\mu X_{MÁX}$ . Durante a fase de crescimento exponencial os nutrientes no meio de cultivo estão em excesso, e as células apresentam condições fisiológicas e de produção ideais (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995). A fórmula para velocidade específica de crescimento ( $\mu X$ ) é definida pela Equação 1, onde X é a concentração celular e t o tempo. Quando o logaritmo natural da concentração celular é plotado sobre o tempo, observa-se um comportamento linear no período correspondente a fase exponencial de crescimento, e ao ajustar uma reta por estes pontos, o valor do parâmetro de  $\mu X_{MÁX}$  é facilmente determinado como o coeficiente angular.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \cdot X \quad (1)$$

O  $\mu X_{MÁX}$  é um dos parâmetros mais importantes em qualquer estudo de crescimento celular. Por sofrer influência de diversos fatores genéticos e do processo de cultivo, a comparação deste dado entre diferentes trabalhos deve considerar fatores como subtipos específicos das linhagens celulares, concentração de soro no meio, sistemas de cultivo, nível de expressão de proteína recombinante e possíveis modificações genéticas e epigenéticas decorrentes do subcultivo sucessivo.

### 3.2 METABOLISMO DE CÉLULAS ANIMAIS

O metabolismo é uma atividade celular altamente coordenada em que sistemas multienzimáticos cooperam para obter energia química, sintetizar/degradar biomoléculas e polimerizar precursores monoméricos em macromoléculas. Os organismos vivos podem ser divididos em dois grupos de acordo com a forma química pela qual obtêm carbono do meio ambiente, autotróficos e heterotróficos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014). As células animais são organismos heterotróficos e, como representado pela Figura 2, obtêm carbono na forma de moléculas orgânicas complexas como a glicose e a glutamina (GÒDIA; CAIRÓ, 2002). Quando *in vivo*, as células animais recebem os nutrientes por meio da circulação sanguínea e, para sua proliferação *in vitro*, essas células requerem uma combinação complexa de nutrientes, muitas vezes apresentando composição química indefinida.

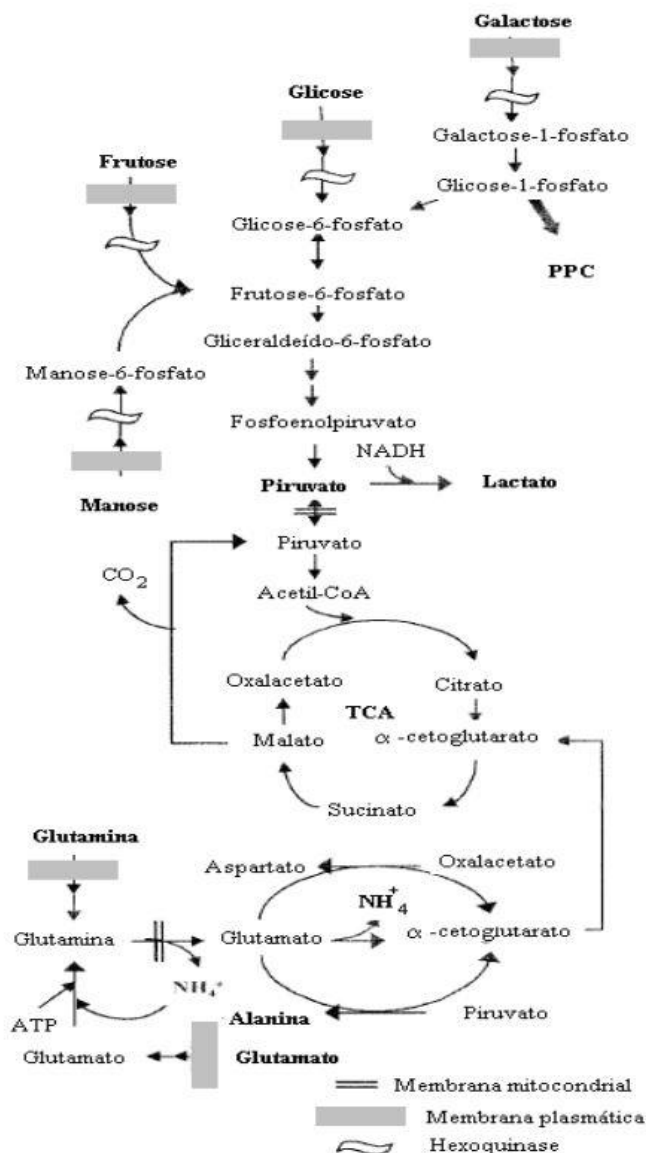


Figura 2 - Representação simplificada do metabolismo da glicose e da glutamina em células animais

Fonte: Adaptado de ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2008.

Para maioria das células de mamíferos, a glicose é um dos principais nutrientes que limitam o crescimento celular em cultivos *in vitro*. Um mol de glicose pode ser assimilado pelo metabolismo celular por fosforilação oxidativa, gerando 30-38 mols de ATP, ou pela glicólise anaeróbia, gerando 2 mols de ATP e 2 mols de lactato. A glutamina é o segundo componente principal dos meios de cultura empregados para o cultivo de células de mamíferos. O catabolismo eficiente da glutamina resulta em 27 mols de ATP e 2 mols de  $\text{NH}_3$ , e o catabolismo ineficiente produz 1 mol de  $\text{NH}_3$  e 9 mols de ATP, ou 1 mol de alanina, 1 mol  $\text{NH}_3$  e 9 mols de ATP (SCHOP *et al.*, 2008).

O sucessivo cultivo *in vitro* e o processo de imortalização provocam alterações nos padrões metabólicos de linhagens celulares de produção, distanciando-os dos encontrados nas células no seu ambiente homeostático original, isto é, em tecidos do organismo de origem (*in vivo*). Em decorrência disto, linhagens celulares apresentam metabolismo altamente desregulado, caracterizado por um consumo alto e ineficiente das principais fontes de energia carbono e nitrogênio, a glicose e a glutamina, o que leva à geração de grandes quantidades dos principais subprodutos inibitórios em cultivos celulares, lactato e amônio (OZTURK; HU, 2006). Assim, o crescimento e a viabilidade celular são prejudicados pelo progressivo esgotamento dos nutrientes e pelo efeito negativo (inibitório ou tóxico) do acúmulo desses subprodutos (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2008).

Estudos para determinação minuciosa das demandas metabólicas específicas de uma dada linhagem ou clone celular são extremamente custosos, por isso, há meios basais clássicos de formulação aberta, desenvolvidos e adotados de forma ampla para cultivo de diferentes tipos celulares. A partir destes meios, pesquisadores costumam explorar possibilidades de otimização subsequentes envolvendo, por exemplo, diferentes regimes de alimentação de suplementos e a adição independente de fontes de carbono e energia (LI *et al.*, 2010).

### 3.3 MEIO DE CULTURA PARA CÉLULAS ANIMAIS

O meio de cultura é um dos fatores mais importantes no cultivo de células animais que, além proporcionar condições de pH e osmolalidade apropriados, fornecem todas as substâncias químicas que as células não são capazes de sintetizar. Além de glicose e de aminoácidos como principais fornecedores de energia e precursores para vias anabólicas, outros componentes indispensáveis em meios de cultura para células animais incluem sais, vitaminas e elementos traço. Apesar de não serem consumidos como substrato, os elementos traço são nutrientes essenciais que desempenham diversas funções, entre elas a de cofatores enzimáticos (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2001).

Meios de cultura não enriquecidos, compostos por apenas componentes de baixa massa molecular, são conhecidos como meios basais. Alguns meios basais de destaque no cultivo de linhagens contínuas de células de mamíferos são, entre outros, o meio de Eagle modificado por Dulbecco, denominado DMEM (DULBECCO; FREEMAN, 1959), e o meio F12 de Ham (HAM, 1984). Porém, estes meios geralmente não proporcionam altas velocidades de crescimento, ou qualquer crescimento sequer, fazendo-se necessária a

suplementação com aditivos quimicamente indefinidos como o soro sanguíneo (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2001).

Por muitas décadas, fluidos biológicos complexos, especialmente o soro fetal bovino (SFB), foram utilizados como componentes essenciais de meio de cultura, por conterem um largo espectro indefinido de nutrientes e outras moléculas como fatores de aderência, elementos protetivos, hormônios e fatores de crescimento, conforme indicado na Tabela 2 (FRESHNEY, 2005).

O SFB apresenta elevada concentração de fatores de crescimento e sua utilização permite que um mesmo meio de cultura seja empregado para o cultivo de diferentes linhagens celulares. O número de fetos bovinos necessários para a obtenção de 1 litro de SFB varia de 2 a 7, sendo o sangue do animal coletado por punção cardíaca (JOCHEMS *et al.*, 2002).

Contudo, desvantagens como variabilidade de composição e de disponibilidade, custo e potencial de contaminação, além de questões éticas, estimularam o desenvolvimento de alternativas ao uso de soro (AL-RUBEAI, 2015). Ademais, sua utilização em meios de cultura pode aumentar significativamente a complexidade e o custo do processo de recuperação e purificação de bioprodutos em razão da presença de diversos componentes não definidos e possíveis contaminantes (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2001).

A composição complexa do soro conta com moléculas que podem ser essenciais para determinadas linhagens celulares, mas para outras não. A identificação e substituição destes componentes levaram a uma grande variedade de formulações de meio sem soro disponíveis, sendo que o desenvolvimento de um meio universal livre de soro parece ser inatingível (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2001). Algumas destas formulações foram publicadas, mas muitas são proprietárias, sendo vendidas sem uma lista dos componentes presentes. Em alguns casos, meios livres de soro impactam negativamente a performance do crescimento celular, podendo ser necessária a adaptação das células através de subcultivo sucessivo (AL-RUBEAI, 2015).

Componente	Função provável
<i>Proteínas diversas</i>	
Albumina	Controle osmótico, tamponamento, transporte de lipídeos, hormônios e minerais, proteção mecânica
Fetúina	Adesão celular
Fibronectina	Adesão celular
$\alpha_2$ – macroglubulina	Inibidor de tripsina
Transferina	Ligação de ferro
$\alpha_1$ - antitripsina	Inibidor de tripsina
<i>Fatores de crescimento</i>	
Fator de crescimento endotelial	Mitogênico
Fator de crescimento epidérmico	Mitogênico
Fator de crescimento de fibroblastos	Mitogênico
Fatores de crescimento semelhantes à insulina	Mitogênico
Fator de crescimento derivado de plaquetas	Mitogênico
Interleucina-1	Indutor da liberação de interleucina-2
Interleucina-6	Promove diferenciação
<i>Hormônios</i>	
Hidrocortisona	Adesão e proliferação
Insulina	Absorção de glicose e de aminoácidos
Hormônios de crescimento	Mitogênico
<i>Metabolitos e nutrientes</i>	
Aminoácidos	Proliferação celular
Glicose	Proliferação celular
Cetoácidos	Proliferação celular
Lipídeos	Síntese de membrana
<i>Minerais</i>	
Ferro, cobre, zinco, selênio	Cofatores enzimáticos
<i>Inibidores</i>	
$\gamma$ -globulina	
Toxinas bacterianas de contaminantes	
Chalconas	

Tabela 2 - Componentes típicos do soro e suas funções no cultivo de células animais in vitro

Fonte: adaptado de FRESHNEY, 2005.

Uma das abordagens para a substituição do soro é a utilização de hidrolisados proteicos (complexos de oligopeptídeos, peptídeos e aminoácidos) obtidos pela hidrólise de caseína, albumina, plantas, tecidos animais ou de levedura (DONALDSON; SHULER,



1998; IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). Além do fornecimento de nutrientes, esses hidrolisados podem ter papel no fornecimento de fatores de crescimento (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003), componentes indispensáveis para formulação de meios livre de soro (AL-RUBEAI, 2015).

### 3.4 FATORES DE CRESCIMENTO

Fatores de crescimento são um grupo amplo de proteínas estruturalmente diversas que atuam como reguladores multifuncionais do crescimento, diferenciação e sobrevivência de células animais, podendo levar a respostas diferentes e até opostas, dependendo do tipo e contexto celular sobre o qual atuam (ARMELIN, 1990).

#### 3.4.1 Biologia celular

Através de mecanismo parácrino ou autócrino, estes fatores, sintetizados e secretados por diversos tipos celulares, se ligam ao domínio extracelular de receptores transmembranares específicos. A alteração conformacional do domínio intracelular destes receptores provoca, então, uma atividade catalítica de tirosina quinase que dá início a cascata de transdução de sinal que leva por fim à expressão gênica (SORKIN; WATERS, 1993). Em oposição aos chamados *housekeeping* genes, cuja expressão é constitutiva, muitos genes de controle do ciclo celular e da diferenciação dependem de sinalização para indução, e fatores de crescimento desempenham esse papel fundamental (WEAKE; WORKMAN, 2010). A expressão gênica induzida por fator de crescimento se dá em ondas. Primeiramente, há a indução dos genes de resposta primária (GRP) mediada por fatores de transcrição preexistentes, não sendo necessária, portanto, a síntese proteica *de novo* (HERSCHMAN, 1991). A maioria dos GRP caracterizados são induzidos em no máximo 30 minutos de estímulo e possuem uma função regulatória, pois é a tradução de seus mRNAs em fatores de transcrição que induz a expressão de genes de resposta secundária (GRS), que por sua vez detém as funções efetoras (TULLAI *et al.*, 2007).

Após a ligação dos fatores de crescimento a seus receptores específicos, estes complexos são removidos da superfície celular e internalizados no compartimento endossomal por endocitose mediada por receptor, processo que envolve estruturas especializadas da membrana plasmática chamadas *clathrin-coated pits* (poços revestidos por clatrina). Uma vez internalizados, os complexos podem ser reciclados para a superfície celular, mas uma porção significativa é direcionada a via de degradação

lisossomal, o que diminui drasticamente o número de receptores na superfície celular, fenômeno denominado regulação negativa de receptores (receptor down-regulation) (SORKIN; WATERS, 1993).

Mutações de genes codificadores de receptores podem resultar em receptores truncados que ativam as vias de sinalização de modo independente de ligante, e a superexpressão de fatores de crescimento, quando seus genes são amplificados ou passam a ser expressos constitutivamente, pode resultar em imortalização celular ou transformação maligna *in vivo*. Neste sentido, vários genes codificadores de fatores de crescimento e seus receptores são classificados como proto-oncogenes (SINKOVICS, 1988). Os vírus de transformação aguda são uma categoria de retrovírus oncogênicos que induzem neoplasia rapidamente, e que possuem informação genética implicada no processo oncogênico derivada de genomas hospedeiros, sendo um exemplo o gene *c-sis*, que codifica a cadeia-beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) humano (CHIU, 1989). Por estas razões, fatores de crescimento e seus receptores são alvos terapêuticos centrais na pesquisa oncológica.

### **3.4.2 Aplicações biotecnológicas dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB**

O fator de crescimento PDGF consiste em duas cadeias estruturalmente similares de polipeptídios (A e B) que se combinam para formar homo e heterodímeros, sendo a estrutura tridimensional do PDGF-BB similar à do TGF- $\beta$  (OZTURK; HU, 2006). O PDGF-BB é secretado naturalmente por células endoteliais e de placenta, por várias linhagens como a BHK e 3T3, e é o principal fator de crescimento no soro, apresentando potente efeito mitogênico e uma ação sinérgica com os fatores de crescimento EGF e IGF-1 (MORAES, MENDONÇA; SUAZO, 2001). Em contexto biológico este fator de crescimento está envolvido na mediação de vários processos necessários para reparação tecidual incluindo quimiotaxia (de monócitos, neutrófilos e fibroblastos), proliferação (em fibroblastos, células de músculo liso e células endoteliais de capilarização de feridas), indução de matriz extracelular (produção de fibronectina e ácido hialurônico) e prevenção da apoptose (PIERCE; MUSTOE, 1995; OZTURK; HU, 2006).

Os promissores efeitos terapêuticos do PDGF já foram demonstrados em uma variedade de modelos pré-clínicos, prevendo-se aplicações maxilofaciais, para coluna vertebral, esqueleto apendicular e tecidos moles (HOLLINGER *et al.*, 2008).

O gel Becaplermin (Regranex®; Smith & Nephew, Inc., Londres, Reino Unido), à base de PDGF-BB recombinante humana produzida em *Saccharomyces cerevisiae*, é uma droga com fatores de crescimento aprovada para tratamento de úlceras neuropáticas diabéticas de extremidade inferior (PAPANAS; MALTEZOS, 2010). Diferentemente dos padrões de glicosilação de mamíferos, leveduras apresentam hipermanosilação nos N-glicanos e padrões de O-glicosilação ainda pouco conhecidos, mas que resultam em heterogeneidade de expressão (DAI *et al.*, 2015). Ou seja, a proteína recombinante utilizada no Becaplermin tem padrões de glicosilação diferentes da forma endógena em humanos, apesar de isto não ter impedido o sucesso clínico do medicamento para este tratamento específico. De fato, foi demonstrado que o grupo glicosil do PDGF-BB não desempenha papel importante na ligação a receptores (SAUER; HANNINK; DONOGHUE, 1986), então, modificações pós-traducionais não seriam obrigatórias para atividade terapêutica.

O fator de crescimento transformante beta tipo 1 (TGF- $\beta$ 1) é uma proteína homodimérica secretada por vários tipos celulares que pode ter efeitos tanto estimuladores quanto inibitórios sobre a proliferação, apresentando um amplo espectro de atividade regulatória dependendo do tipo celular, condições de crescimento e presença de outros FC. Em combinação com TGF-A ou EGF, este FC estimula o crescimento de fibroblastos, mas sozinho inibe o crescimento de diversas linhagens em cultura monocamada incluindo células epiteliais, endoteliais, células tronco e linfócitos (GENTRY *et al.*, 1987; OZTURK; HU, 2006). Já o efeito da exposição de células de tecido conectivo à TGF- $\beta$  apresenta uma dose-resposta bifásica, com baixas concentrações estimulando e altas concentrações inibindo ou tendo nenhum efeito sob o crescimento (SEIFERT *et al.*, 1994).

Três isoformas de TGF- $\beta$  (1, 2 e 3) existem nos mamíferos e são secretados pela maioria dos tipos celulares, geralmente na forma latente, associadas não covalentemente ao peptídeo associado à latência (LAP), e necessitando de ativação para poder exercer atividade biológica. Contudo, linfócitos T produzem naturalmente TGF- $\beta$ 1 completamente processado, sendo o mecanismo de ativação do FC ainda desconhecido (MIYAZONO; ICHIJO; HELDIN, 1993; OIDA; WEINER, 2010).

Em contexto biológico, o TGF- $\beta$ 1 desempenha um papel importante nos processos de regeneração tecidual pela quimiotaxia de macrófagos e fibroblastos, estímulo da angiogênese, e com ação sobre a imunossupressão e formação de matriz extracelular (DEVESCOVI *et al.*, 2008). A sinalização de TGF- $\beta$  em feridas agudas, de cicatrização complexa, também está sendo estudada, destacando-se seu promissor potencial terapêutico

regenerativo (RAMIREZ; PATEL; PASTAR, 2014). Das três isoformas existentes, o TGF- $\beta$ 1 tem papel predominante no reparo de injúrias cutâneas (BARRIENTOS, 2008) e é a mais bem caracterizada. Proteínas ativas de TGF- $\beta$ 1 podem ser obtidas de forma recombinante apenas a partir da utilização de células de mamíferos como sistemas de expressão (ZOU; SUN, 2004), sendo que tais produtos se encontram disponíveis apenas no mercado estrangeiro, e que ainda não existe nenhuma droga aprovada baseadas TGF- $\beta$ 1 recombinante.

### 3.4.3 Produção de fatores de crescimento

O acúmulo de conhecimento sobre FC e seus efeitos sobre células animais levou a um aprofundamento da compreensão de processos regenerativos e oncogênicos *in vivo*, assim como de processos de cultivo celular *in vitro*. Anteriormente, FC eram obtidos de fontes naturais como extratos ósseos ou soro animal, mas no último caso, os processos de purificação envolvidos são pouco eficientes devido à baixa concentração de FC no soro, e da complexidade de sua composição (GOSPODAROWICZ; MORAN, 1976). A ampla disponibilidade de FC como insumos de pesquisa representa um elemento crítico para o progresso científico em diversas áreas, e é possível graças a tecnologias de DNA recombinante e de cultivo de células, que permitem a obtenção massiva destas proteínas de forma biologicamente ativa a partir de expressão heteróloga e bioprocessos em escala industrial.

Foi feito um levantamento na literatura e em websites de diferentes fornecedores de produtos à base de diferentes isoformas humanas de alguns FC, as empresas que os disponibilizam comercialmente, o sistema de expressão adotado para produção e a indicação de uso (Tabela 3). Mesmo mediante obtenção por expressão heteróloga, fatores de crescimento recombinantes costumam ser bioprodutos caros, devido aos altos custos associados ao bioprocessos com células animais, que apresentam exigências nutricionais complexas e níveis de produtividade relativamente baixos. O preço médio para o TGF- $\beta$ 1 recombinante produzido a partir de células CHO para uso em pesquisa, calculado a partir dos fornecedores citados na Tabela 3, é de US\$45,00/ $\mu$ g.

Proteína	Isoforma	Hospedeiro	Empresa	Aplicação
<i>Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)</i>	AA	<i>E. coli</i>	Peptotech	material ancilar <sup>1</sup>
	AA	Levedura	Akron Biotech	material ancilar
	BB	Levedura	Lynch Biologics	GEM21S <sup>®2</sup>
	BB	Levedura	SmithNephew	REGRANEX <sup>®3</sup>
	BB	Levedura	Akron Biotech	material ancilar
	várias	<i>E. coli</i> , Levedura	Prospec	pesquisa
	várias	<i>E. coli</i> , HEK293	Sigma-Aldrich	pesquisa
<i>Fator de crescimento transformante (TGF)</i>	beta 3		Renovo	JUVISTA <sup>®4</sup>
	beta 1	HEK293, CHO		
	beta 2	NSO	Sigma-Aldrich	pesquisa
	beta 3	<i>E. coli</i> , BEVS		
	beta 1	HEK293	InvivoGen	pesquisa
	beta 1	CHO	BioLegend	pesquisa
	beta 1	CHO	Sinus Biological	pesquisa
	beta 1	<i>E. coli</i>	Novus Biologicals	pesquisa
	beta 1	<i>E.coli</i> , HEK293, CHO	Abcam	pesquisa
	alfa	<i>E. coli</i>		
	beta 1	CHO	GeneScript	pesquisa
	beta 3	Célula humana		
	beta 1	HEK293	R&D Systems	pesquisa
	beta 1	CHO	BIORAD	pesquisa
<i>Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)</i>		<i>E. coli</i>	Blau Farmacêutica	LEUCOCITIM <sup>®5</sup>
		<i>E. coli</i>	ROCHE	GRANULOKINE <sup>®6</sup>
		Levedura	Partner Therapeutics	LEUKINE <sup>®6</sup>
		<i>E. coli</i> , HEK293, CHO	Prospec	pesquisa
		<i>E. coli</i> , CHO	GeneScript	pesquisa
		<i>E. coli</i>	Biorad	pesquisa
		<i>E. coli</i>	Abcam	pesquisa
<i>Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)</i>		<i>E. coli</i>	Peptotech	material ancilar
		HEK	Merck	pesquisa
		Levedura, CHO, HEK	GeneScript	pesquisa
		<i>E. coli</i> , CHO	Akron Biotech	material ancilar

Tabela 3 - Aplicações comerciais atuais de fator de crescimento humanos recombinantes

1. Material que entra em contato com um produto celular ou tecidual durante processo de manufatura, mas que não é destinado para o produto final (SOLOMON *et al.*, 2015); 2. Droga indicada para regeneração periodontal (SINGH; SURESH, 2012); 3. Droga indicada para tratamento de úlceras do pé diabético

(WIEMAN; SMIELL; SU, 1998); 4. Droga indicada para melhoramento da cicatrização – descontinuada em ensaios clínicos fase III (FINNISON *et al.*, 2013); 5. Droga indicada para reversão ou prevenção de leucopenias de origem distinta (SCHWANKE, 2008); 6. Droga indicada para reversão ou prevenção de neutropenias de origem distintas (FERREIRA *et al.*, 2011; DILLMAN, 2020).

A Tabela 4 abaixo traz dados levantados na literatura de teor e concentração máxima de produto ( $P_{MÁX}$ ) atingidos em cultivos aderentes em monocamada de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 recombinante, e a Tabela 5 apresenta dados de  $P_{MÁX}$  para diferentes sistemas de expressão de PDGF recombinante. Tomando o  $P_{MÁX}$  atingido em Zou e Sun (2004) como referência, e considerando o preço médio de US\$45,00/ $\mu$ g para o TGF- $\beta$ 1 recombinante, em 1 mL de meio no final do cultivo chega-se a US\$1.350,00 em valor equivalente de TGF- $\beta$ 1.

Sublinhagem	Teor ( $\mu$ g/ $10^6$ cel)	Tempo (dia)	$P_{MÁX}$ (mg/L)	Referência
CHO-DG44	3	1	5,6	GENTRY <i>et al.</i> , 1987
-	2	1	1,0	RAMANI; KONDAIAH, 1998
CHO- lec3.2.8.1	10	3-4	30	ZOU; SUN, 2004

Tabela 4 - Teor e  $P_{MÁX}$  em cultivos em monocamada de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1

Célula	Isoforma	$P_{MÁX}$ (mg/L)	Referência
BHK-21 (mamífero)	PDGF-AA	0,2	EICHNER <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> (bactéria)	PDGF-BB	10-12	KARUMURI <i>et al.</i> , 2007
<i>S. cerevisiae</i> (levedura)	PDGF-BB	32	WANG <i>et al.</i> , 2009
<i>P. pink</i> (levedura)	PDGF-BB	30	BABAVALIAN <i>et al.</i> , 2016

Tabela 5 -  $P_{MÁX}$  de PDGF recombinante em diferentes sistemas de expressão

1. Rendimento de PDGF-AA após purificação

De acordo com Brindley e colaboradores (2012), dada a extensiva utilização de SFB em meio de cultura para manufatura da maioria das terapias celulares atuais, sem um

aumento na produção global de SFB ou um aumento significativo no desenvolvimento e implementação de estratégias de cultivo livre-de-soro, o crescimento e sustentabilidade da indústria da terapia celular será severamente restrita. Segundo os autores, os estoques globais e taxas produtivas de soro da época poderiam ser suficientes para produção de apenas uma terapia celular comercialmente bem-sucedida, sendo o principal fator onerante no custo das terapias e um obstáculo para o sucesso da indústria como um todo.

O Grupo NUCEL da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (NUCEL/FMUSP) (COLIN; DEMASI, 2008) tem desenvolvido uma série de linhagens celulares produtoras de diferentes fatores de crescimento. Em um trabalho recente, amostras de cDNA total de próstata, rim e fígado humanos foram utilizadas para a amplificação da sequência codificadora do gene do TGF- $\beta$ 1, e através do vetor de expressão patenteado pNU1, um clone celular CHO-DG44 com expressão estável de TGF- $\beta$ 1 recombinante foi obtido (DE PAULA, 2018). Amostras de cDNA total de pulmão humano também foram utilizadas para amplificação da sequência codificadora do gene PDGF-BB, que fora depois clonada a diversos vetores entre eles o pNU1, que então possibilitaram a obtenção de um clone HEK293T com expressão heteróloga estável (dados não publicados).

Nestes trabalhos anteriores, ambos plasmídeos pNU1 com os genes TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB tiveram sua integridade confirmadas por sequenciamento e levaram à expressão de proteínas com atividade biológica confirmadas em modelos *in vitro* e *in vivo*. O alto potencial terapêutico destes fatores de crescimento, utilizados em conjunto, para tratamento de injúrias em tecidos moles vem sendo explorado a partir de modelos murinos no NUCEL.

### 3.5 ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR MEDIANTE ESTIMULAÇÃO PROLIFERATIVA

Apesar de muitos FC serem reconhecidos agentes mitógenos estimuladores da proliferação e do crescimento celular, o estudo direto do efeito destas propriedades bioativas sob parâmetros cinéticos em bioprocessos com células animais não é muito recorrente na literatura. De forma indireta, este estudo se dá pela manipulação da concentração de soro animal em meios de cultura, uma vez que o soro é repleto de fatores de crescimento, sendo esta uma prática corriqueira em cultivo celular para otimização do crescimento e até da produção de proteínas recombinantes.

Tomando como exemplo células CHO-K1 aderentes, valores reportados de  $\mu X_{MÁX}$  vão de 0,41 d<sup>-1</sup> em meio DMEM/F12 com 5% SFB (KUYSTERMANS; AL-RUBEAI,

2009) a  $0,81 \text{ d}^{-1}$  em meio F-12K com 10% SFB (JALURIA *et al.*, 2007). Em cultivo em suspensão no meio livre de soro EX-CELL™ 302, foi verificado um  $\mu X_{MÁX}$  de  $0,34 \text{ d}^{-1}$  para células CHO-DXB11, e ao adicionar-se 5% SFB este parâmetro subiu para  $0,50 \text{ d}^{-1}$  (MIKI; TAKAGI, 2014). Para células HEK293 aderentes em meio DMEM 10% SFB, um  $\mu X_{MÁX}$  de  $0,73 \text{ d}^{-1}$  foi reportado (JALURIA *et al.*, 2007), enquanto para cultivo em suspensão em meio livre do soro SFM4HEK293, relatou-se  $\mu X_{MÁX}$  de  $0,59 \text{ d}^{-1}$  – que sobe para  $0,67 \text{ d}^{-1}$  quando adicionado de 5% SFB (LISTE-CALLEJA; LECINA; CAIRÓ, 2013).

Contudo, devido à constituição indefinida do soro animal e ao fenômeno de comunicação cruzada entre vias de sinalização de fatores de crescimento, se faz desejável a investigação dos efeitos individualizados de fatores específicos sobre diferentes linhagens celulares – principalmente as de maior relevância industrial, em meios de cultura livre de soro. Ademais, quando células de mamífero são empregadas para expressão heteróloga de fatores de crescimento, por possuírem os receptores específicos que respondem a estímulos providos pelos produtos recombinantes, é muito provável a interferências destes sobre parâmetros relevantes de bioprocessos, como velocidade específica de crescimento, viabilidade celular e concentração celular máxima.

Em um estudo por Ustach e colaboradores (2004), a atividade mitótica autócrina de PDGF-D sobre células LNCaP (linhagem de adenocarcinoma de próstata humano) expressando este fator de crescimento foi examinada, e as células exibiram aproximadamente o dobro da contagem celular após 48h de cultivo em relação às células parentais. Em outro estudo, células CHO-K1 expressando de forma heteróloga transferrina e fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1) cresceram em meio livre de proteínas sem a adição exógena de fatores de crescimento (PAK *et al.*, 1996), demonstrando a capacidade destes fatores de crescimento recombinantes exercerem estímulo proliferativo sobre a linhagem celular canônica de produção CHO.

A ligação de FC à receptores específicos no exterior da membrana celular fornece o sinal necessário para indução de genes envolvidos no controle/regulação do ciclo celular, estes de fato responsáveis pelas propriedades estimuladoras do crescimento oferecidas por FC (WEAKE; WORKMAN, 2010) – motivo pelo qual a superexpressão destes genes tem sido foco de estratégias de engenharia genética para otimização do crescimento celular. O *c-myc* é um gene de resposta primária (GRP) induzível por fatores de crescimento, como o próprio PDGF-BB, que além de estar associado à progressão pelo ciclo celular, têm funções relacionadas ao bloqueio da diferenciação, indução de apoptose e contribuição à gênese tumoral, sendo considerado um proto-oncogene (OSTER *et al.*, 2000).



Em um trabalho por Kuystermans e Al-Rubeai (2009), o gene *c-myc* foi superexpresso em uma linhagem CHO-K1 aderente resultando num aumento de 38% no  $\mu X_{MÁX}$ , de  $0,40 \text{ d}^{-1}$  para  $0,55 \text{ d}^{-1}$ , e um aumento de 72% na densidade celular máxima, sendo o efeito estimulador do crescimento atribuído ao encurtamento da duração da fase G1 do ciclo celular. Vale notar que o aumento drástico da densidade celular máxima, sem um fornecimento adicional de nutrientes, foi acompanhado de uma redução de 14% no tamanho das células e uma diminuição significativa das velocidades de consumo de glicose e amino ácidos (KUYSTERMANS; AL-RUBEAI, 2009). Em outro trabalho, células HEK293 engenheiradas para superexpressão da subunidade i do fator de iniciação eucariótico (eIF3i) apresentaram maiores velocidades de crescimento associadas ao aumento dos níveis de expressão de *c-myc* (ROOBOL *et al.*, 2020).

Em um trabalho por Jaluria e colaboradores (2007), microarranjos de DNA foram utilizados para comparar a base genética do crescimento de células HeLa aderentes de crescimento lento, com uma sublinhagem de crescimento rápido e adaptada ao cultivo em suspensão, esta última apresentando um  $\mu X_{MÁX}$  40% maior e uma densidade máxima de células viáveis ( $X_{VMÁX}$ ) duas vezes maior. Como resultado, foram identificados dois genes suprarregulados na linhagem de crescimento mais rápido, a quinase dependente de ciclina 3 (*cdkl3*) e subunidade citocromo c oxidase (*cox15*). O *cdkl3* é homólogo ao *cdk3*, gene envolvido na transição G1/S e que apresenta níveis de expressão elevados em linhagens celulares humanas cancerosas (ZHENG *et al.*, 2008), e o *cox15* tem papel na fosforização oxidativa e na remoção de radicais de oxigênio indutores da apoptose.

Em seguida, linhagens HeLa, CHO e HEK293 aderentes foram engenheiradas para superexpressão estável dos genes *cdkl3* e *cox15* em um sistema de cultivo com microcarregadores em frascos *spinner* e 10% de SFB no meio de cultura, resultando em aumentos no  $\mu X_{MÁX}$  e  $X_{VMÁX}$  (Tabela 6). A superexpressão do gene *cox15* em células HEK293 aumentou o  $\mu X_{MÁX}$  em 15% e  $X_{VMÁX}$  em 8,6%, enquanto em células CHO, a superexpressão de *cdkl3* levou a aumentos de 9% e 5%, respectivamente (JALURIA *et al.*, 2007). Neste conjunto de ensaios, o maior valor de  $\mu X_{MÁX}$  atingido pelas células HEK293 foi  $0,84 \text{ d}^{-1}$ , e a maior  $X_{VMÁX}$  foi  $2,15 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$ .

HEK293		
Transgene	$\mu X_{MÁX}$ (%)	$X_{VMÁX}$ (%)
<i>cdk13</i>	19	0
<i>cox15</i>	15	8,6
CHO		
Transgene	$\mu X_{MÁX}$ (%)	$X_{VMÁX}$ (%)
<i>cdk13</i>	9	5
<i>cox15</i>	5	7
HeLa		
Transgene	$\mu X_{MÁX}$ (%)	$X_{VMÁX}$ (%)
<i>cdk13</i>	20	0
<i>cox15</i>	15	11

Tabela 6 - Aumento percentual de  $\mu X_{MÁX}$  e  $X_{VMÁX}$  em diferentes linhagens de mamífero em função da expressão heteróloga de *cdk13* e *cox15*

Fonte: adaptado de JALURIA *et al.*, 2007

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CÉLULAS

Foram utilizados um clone celular CHO DG44 produtor de TGF- $\beta$ 1 humano e um clone HEK 293T produtor de PDGF-BB humano, ambas linhagens geradas em trabalhos anteriores pelo grupo NUCEL (DE PAULA, 2018). De modo a avaliar o impacto da expressão heteróloga dos FC sobre as linhagens celulares, ao invés de utilizar células transfectadas com vetores vazios como controle, o crescimento de clones produtores foi comparado ao das linhagens parentais que lhes deram origem (ALEKSEI; HENRY, 2017), são estes a CHO-DG44 da Gibco (Thermo Fisher Scientific) e a HEK293T da ATCC.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA E SISTEMA DE CULTIVO

Células HEK foram cultivadas em meio basal DMEM (Gibco), enquanto células CHO em meio Alpha-MEM (Gibco), ambos com alta concentração de glicose e contendo os antibióticos estreptomicina e ampicilina nas concentrações de 100 e 25 mg/mL, respectivamente. A condição padrão de cultivo das células HEK contou com 10% SFB (Vitrocell), e a das células CHO, com 7% SFB, sendo que estoques de meio basal e SFB foram esterilizados através de filtros 0,2  $\mu$ m da Corning e lotes de meio com SFB foram armazenados por até 2 meses sob refrigeração (entre 2 e 5 °C). Para adaptação ao cultivo em suspensão das células CHO, o meio CD DG44 da (Gibco) foi utilizado, e para as células HEK, o meio HyClone SFM4HEK293 da GE Healthcare, sendo ambas formulações quimicamente definidas, livres de proteínas e de componentes de origem animal.

Cultivos aderidos foram realizados em frascos-T para procedimentos de descongelamento e passagens, e em placas de 24 poços de fundo plano para estudo das curvas de crescimento com volume total de 1 mL por poço – ambos materiais plásticos da Corning. Cultivos de adaptação para suspensão foram realizados em placas de 24 poços não tratadas de fundo plano Corning (modelo CLS3738), com volume total de 1mL, sob plataforma de um agitador digital de microtitulação (IKA modelo MTS 2/4) com agitação orbital de 220 a 270 rpm e 3mm de diâmetro. Frascos, placas e agitadores foram todos incubados à 37°C em atmosfera umidificada 5% CO<sub>2</sub> em uma incubadora (Thermo Fisher Scientific).

### 4.3 BANCO CELULAR

A partir de um banco celular em nitrogênio líquido, as células foram recuperadas e expandidas para construção de um banco de trabalho em ultrafreezer (Thermo Fisher Scientific)  $-80^{\circ}\text{C}$ . Uma garrafa T25 da segunda passagem após descongelamento das células com 70-80% de confluência teve o seu meio aspirado, sendo então lavada com 2,5 mL tampão fosfato salino sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,42 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e subcultivadas com 0,5 mL de solução 0,1% m/v de tripsina (PBS 1mM EDTA) da Gibco; em seguida, foi adicionado 2,5 mL de meio basal com SFB (concentração padrão), a suspensão celular foi centrifugada a 400 rpm por 5 min em uma centrífuga clínica FANEM (modelo 206-BL) o sobrenadante foi descartado, e adicionou-se 2 mL de meio com SFB (concentração padrão) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich); por fim, 500  $\mu\text{L}$  da suspensão foram distribuídos em criotubos, estes foram deixados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 horas e então armazenados em ultrafreezer. Para descongelamento, os criotubos foram esquentados em banho maria à  $37^{\circ}\text{C}$ , e para cada garrafa T25 com 5 mL de meio, foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  de inóculo. Após 5 horas de incubação, o suficiente para aderência das células na garrafa, o meio foi trocado.

### 4.4 CONTAGEM CELULAR

Para medidas rotineiras de concentração celular o método manual de contagem em hemocitômetro foi empregado, enquanto para medida de séries de amostras dos ensaios para obtenção das curvas dose-resposta de adição exógena de FC (capítulo 4.8) e de estudo cinético (capítulo 4.10), o método automático em citômetro de fluxo foi utilizado. Como em FEOKTISTOVA, GESERICK, LEVERKUS (2016), as medidas de concentração total de células foram consideradas medidas estimadas de concentração de células viáveis, pois células mortas têm sua aderência comprometida, e são descartas junto do meio condicionado durante a etapa de subcultivo (vide capítulo 4.10).

#### 4.4.1 Contagem manual

Para contagem manual, foram utilizados hemocitômetro (câmara de Neubauer) e microscópio óptico. Ajustando a diluição de amostras para contar-se de 30 a 100 células por quadrante de  $1\text{mm}^2$ , a média entre o número de células contadas nos 8 quadrantes (4 da câmara superior e 4 da câmara inferior) é multiplicada por  $10^4$  e pelo fator de diluição,

chegando-se assim à concentração celular expressa em cel/mL. Para medida de viabilidade celular, uma solução estoque Tripán Blue 0,4% v/v (em PBS) é misturada em proporção 1:1 com amostras celulares e após 3 min a contagem é realizada em câmara de Neubauer, fazendo-se a correção da diluição extra.

#### 4.4.2 Contagem automática

Foi utilizado o citômetro de fluxo Accuri C6, da BD Biosciences, e o software de análise de dados que o acompanha. De modo a garantir a qualidade da leitura das amostras, estas apresentaram uma contagem total mínima  $10^4$  eventos, e foram diluídas quando necessário para não ultrapassar um fluxo de 1000 eventos/segundos. Com o fluxo do sistema mantido em velocidade média, foram analisados 30-50  $\mu\text{L}$  por amostra.

Durante a corrida das amostras, detectores de espalhamento lateral e frontal de luz forneceram dados de tamanho e granulosidade de partículas que, após plotagem e análise em histograma bivariado, deram base para exclusão de eventos relativos a detritos celulares dos portais de contagem – que aparecem como pontos no canto esquerdo inferior do histograma. Os dados das contagens absolutas foram em seguida exportados para o software Excel (Microsoft) para montagem de tabelas, determinação da concentração celular em cel/mL e construção das curvas de crescimento.

#### 4.5 ADAPTAÇÃO CELULAR PARA CULTIVO EM SUSPENSÃO COM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE SORO

A adaptação das células para crescimento em suspensão e meio livre de soro seguiu estratégias direta e sequencial. As células foram inoculadas inicialmente em meio de cultura 100, 50 ou 25% meio livre de soro (MLS), sendo investigado também o uso de meio com soro (MCS) fresco, condicionado ou misto (meio a meio). Frascos T25 não tratados também foram utilizados de modo a se avaliar o efeito da ausência de agitação (cultivo estático) sobre o processo de adaptação.

Os cultivos foram inoculados a  $0,2-0,5 \times 10^6$  cel/mL, e foi utilizado reagente *anticlumping* (Thermo Fisher Scientific) em concentrações de 1:250 a 1:100. As células foram passadas para uma nova condição de meio - com concentração de SFB 2x menor - se a viabilidade celular era maior que 70% após o 4º dia de cultivo, ou depois de atingirem

$1-2.10^6$  cel/mL. A adaptação celular é dada como concluída após 3-5 passagens com viabilidade acima de 90% em meio com no máximo 0,05% SFB.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância de Levene foram realizados com os dados experimentais e, assumindo que as variáveis independentes não dependem uma da outra e que as variáveis dependentes representam observações únicas, todas as premissas para realização de testes paramétricos de diferença foram atingidas.

A depender das particularidades de cada conjunto de dados experimentais foram realizados testes ANOVA fator único ou fator duplo, este último permitindo a avaliação de efeitos de interação entre as variáveis independentes sobre a variável dependente (vide subcapítulos de análise de dados nos próximos capítulos desta seção). A hipótese nula, de que as médias comparadas em cada conjunto são iguais, foi descartada em cada caso para valores de p menores que 0,5, representando uma chance menor que 5% de que a diferença observada seja aleatória.

Nos casos de descarte da hipótese nula, foram realizados testes Tukey HSD de comparações múltiplas para verificar entre quais observações houve diferenças significativas. Para testes ANOVA fator duplo, sendo verificado efeito de interação o parâmetro 'k', que é o número de tratamentos, é corrigido, e são realizadas apenas comparações múltiplas inequívocas (*unconfounded*) para verificação da hipótese nula de cada par de médias é igual.

#### 4.7 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

Para a determinação da concentração de glicose em amostras de sobrenadante de culturas aderentes, foi utilizado um glicosímetro marca OKmeter modelo Match II (OK Biotech, Taiwan). A medida é obtida a partir de reações enzimáticas e eletroquímicas realizadas num sistema imobilizado em tiras descartáveis. A reação enzimática de glicose a ácido glucônico é mediada pela enzima glicose-desidrogenase e a reação eletroquímica pela redução de ferricianeto de potássio a ferrocianeto de potássio.

Os resultados de concentração de glicose apresentados neste trabalho são os valores medidos pelo glicosímetro, sem correções além da conversão de unidades (apresentadas no

aparelho em mg/dL). Medidas de amostras de meios de cultura indicaram valores próximos ao esperado, com desvio padrão menor que 20%.

#### 4.8 CURVAS DOSE-RESPOSTA DE ADIÇÃO EXÓGENA DE FATOR DE CRESCIMENTO

De modo a definir as concentrações de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB para adição exógena no estudo cinético, foi avaliado o impacto da adição de diferentes concentrações destes FC sobre a concentração celular final ( $X_F$ ) de culturas de células HEK e CHO, 3 a 4 dias após a inoculação. Foi utilizada uma placa de 24 poços com 1 mL de meio por poço, cada condição experimental foi realizada duplicata (replicata de cultivo), e uma coleta única das amostras celulares foi realizada.

As faixas de concentração de FC adotadas foram definidas a partir de levantamento bibliográfico (cap. 5.2), e são apresentadas na Tabela 7. Para este ensaio, assim como para os demais cultivos com adição exógena de FC, utilizou-se PDGF-BB recombinante purificado da Thermo Fisher Scientific (código do produto: ab73233), diluído em meio basal de cultura, e TGF- $\beta$ 1 recombinante não purificado, originalmente a 500 ng/mL em meio condicionado sem soro - material obtido anteriormente pelo próprio laboratório a partir do cultivo da célula CHO produtora. O meio condicionado com TGF- $\beta$ 1 foi tratado logo antes do uso conforme o capítulo 4.9 a seguir, e diluído em meio basal de cultura. Foram incluídas 2 condições de controle no ensaio, uma sem adição de FC, e outra com 25 ng/mL TGF- $\beta$ 1, porém a partir de material que não passou por tratamento de ativação.

	Concentração (ng/mL)				
PDFG-BB	2	10	25	50	100
TGF- $\beta$ 1	1	2,5	5	10	25
Nível	1	2	3	4	5

Tabela 7 - Níveis de concentração de FC adotados para curvas dose-resposta

A composição complexa do SFB inclui uma gama de fatores de crescimento e seu uso em altas concentrações dificultaria a identificação de estímulo proliferativo por parte dos FC adicionados de forma exógena. Desse modo, foram determinadas concentrações menores de SFB para o cultivo das células CHO e HEK. Em primeiro conjunto de ensaios, células HEK parentais foram cultivadas em meio 1% SFB, e células CHO em meio 1,4%

SFB, foi utilizado um inóculo de  $4.10^4$  cel/mL, e o meio condicionado contendo TGF- $\beta$ 1 para adição exógena não foi filtrado antes do uso.

Em um segundo ensaio, apenas com a linhagem CHO parental, utilizou-se um inóculo a  $2.10^4$  cel/mL, meio de cultura com 3,5% SFB, e foram obtidas duas curvas, uma com TGF- $\beta$ 1 em meio condicionado (chamado aqui de TGF – MC) e outra com TGF- $\beta$ 1 comercial, purificado, fornecido pela Sigma Aldrich (chamado aqui de TGF – CM, de comercial).

#### **4.8.1 Análise estatística dos dados de $X_F$**

Para cada linhagem celular e fator de crescimento foram realizados testes ANOVA fator único com repetição (duplicata de cultivo) de modo a avaliar o efeito dos diferentes níveis de adição sobre a  $X_F$  dos cultivos.

#### **4.9 ATIVAÇÃO DE TGF- $\beta$ 1 RECOMBINANTE**

O TGF- $\beta$ 1 recombinante é secretado pelas células em uma forma latente, e um tratamento a partir da redução do pH foi empregado para ativação do FC imediatamente antes de sua aplicação em cultura. Para cada 100  $\mu$ L de meio condicionado foram adicionados 20  $\mu$ L de solução 1 N HCl, e após incubação por 10 min, adicionou-se 20  $\mu$ L de uma solução de neutralização 1,2 N NaOH e 0,5 M HEPES. A solução foi por fim filtrada em filtros 0,2  $\mu$ m da Corning.

#### **4.10 ESTUDO CINÉTICO**

Cada linhagem celular foi cultivada em 3 condições de SFB – com 20, 50 e 100% da concentração padrão (item 4.2) - e 3 condições de suplementação por FC - com 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1, 25 ng/mL PDGF-BB, e com ambos (item 4.7). Todas as condições experimentais foram avaliadas a partir de cultivos em triplicatas exceto a adição exógena de FC na linhagem HEK produtora e em ambas linhagens CHO, que foi estudada em apenas uma replicata de cultivo.

As replicatas de cultivo das células HEK foram obtidas de seguinte forma: a partir do descongelamento de 1 tubo de criopreservação, as células foram cultivadas em condições padrão e repicadas; após a segunda passagem atingir 70-80% de confluência, a cultura foi utilizada como inóculo para o primeiro ensaio cinético, e repicada de modo a



atingir novamente 70-80% de confluência em 2 dias; as células desta terceira passagem serviram então de inóculo para o segundo ensaio, e uma quarta passagem foi realizada para inocular a triplicata do estudo cinético; foram utilizados os mesmos lotes de meio em todos os cultivos, e a adição exógena de FC em culturas da linhagem produtora foi avaliada apenas na última passagem. Já para a triplicata biológica das curvas de células CHO, utilizou-se sempre como inóculo culturas de uma segunda passagem após descongelamento, tendo sido usados no total 3 tubos de criopreservação de um mesmo banco celular. A suplementação por FC, assim como a coleta de meio condicionado foram realizadas apenas na última replicata de cultivo das células CHO.

Os meios com diferentes concentrações de SFB foram inoculados a  $0,2 \cdot 10^5$  cel/mL em tubos canônicos de 50 mL ou garrafas de 250 mL, sendo então distribuídos em placas de 24 poços de forma ordenada, adicionando FC quando necessário, e deixando-se uma condição experimental alternada da outra a cada 2 poços. Cada condição experimental foi plaqueada num total de 14 poços, sendo as curvas de crescimento construídas a partir da amostragem destrutiva diária de 2 poços para determinação total de 7 pontos experimentais em duplicata. A densidade celular determinada para inoculação foi apresentada nas curvas como o ponto  $t = 0$ , não representando uma medida experimental.

Amostras de meio de cultura condicionado foram coletadas nos dias 2, 4, 5, 6 e 7, e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  em placas de 48 poços, sendo coletadas também amostras de meio fresco para controle. Para subcultivo das células, após aspiração de meio gasto, os poços foram lavados com 300  $\mu\text{L}$  de PBS, e adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de solução 0,1% m/v tripsina. Após aproximadamente 2 min 350  $\mu\text{L}$  de meio de cultura com SFB (condições padrão) foram adicionados para inativação da tripsina, as suspensões foram homogeneizadas e então transferidas para microtubos de 2 mL. As células foram coletadas das placas seis poços por vez, sendo, então, processadas rapidamente por citometria de fluxo para determinação da concentração celular. Devido à baixa densidade celular no início dos cultivos, todas os pontos  $t = 1$  foram coletadas utilizando a metade do volume das soluções citadas acima.

Em seguida os dados foram transferidos para o software Excel onde as curvas de concentração celular ( $X$ ) e  $\ln(X)$  pelo tempo foram geradas. A duração da fase exponencial de crescimento e o parâmetro de  $\mu X_{MÁX}$  foram determinados individualmente para curvas de cada replicata biológica, sendo o valor do  $\mu X_{MÁX}$  o coeficiente angular da linha de tendência ajustada entre os pontos correspondentes a fase exponencial de crescimento no gráfico de  $\ln(X)$  pelo tempo.

O fator aparente de conversão de glicose à célula ( $Y_{X/GLC}$ ) foi determinado para a fase exponencial de crescimento a partir de gráficos de concentração celular por concentração de glicose e regressão linear, sendo igual ao oposto do coeficiente angular da reta ajustada ao período correspondente a fase exponencial. Já o valor da velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu$ S), por sua vez, foi obtido pela divisão o valor do  $\mu X_{MÁX}$  pelo  $Y_{X/GLC}$  (HISS, 2001).

#### **4.10.1 Análise estatística dos dados de $\mu X_{MÁX}$ e $X_{MÁX}$**

##### *4.10.1.1 Cultivos em diferentes concentrações de soro*

A variação dos parâmetros de  $\mu X_{MÁX}$  e concentração celular máxima ( $X_{MÁX}$ ), determinados para as linhagens CHO e HEK em função da sublinhagem (parental ou produtora de FC) e da concentração de SFB no meio (20, 50 e 100% da concentração padrão), foi analisada por meio de testes ANOVA fator duplo (2x3) com replicação (triplicada biológica), sendo possível avaliar a existência de efeitos de interação entre as variáveis independentes, isto é, se o efeito da sublinhagem sobre  $\mu X_{MÁX}$  e  $X_{MÁX}$  depende da concentração de SFB e vice-versa.

##### *4.10.1.2 Cultivos com adição exógena de fator de crescimento*

Para células CHO, cujo diferentes condições de adição exógena foram estudadas em apenas uma replicata biológica, valores de  $\mu X_{MÁX}$  determinados nestes casos foram apenas comparados ao  $\mu X_{MÁX}$  médio da condição sem adição exógena (determinado a partir da triplicata biológica), enquanto para análise dos dados de  $X_{MÁX}$  foram realizados testes ANOVA fator único com replicação (duplicata de cultivo) para cada sublinhagem.

Com as células HEK parentais, a variação dos parâmetros de  $\mu X_{MÁX}$  e  $X_{MÁX}$  em função das diferentes condições de adição exógena foi analisada a partir de testes ANOVA fator único com replicação (triplicada biológica), enquanto para sublinhagem produtora valores de  $\mu X_{MÁX}$  foram apenas comparados ao  $\mu X_{MÁX}$  médio da condição sem adição exógena (determinado a partir da triplicata biológica), e dados de  $X_{MÁX}$  foram analisados mediante um teste ANOVA fator único com replicação (duplicata de cultivo).

## 4.11 QUANTIFICAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO

### 4.11.1 Protocolo geral do ELISA

Para quantificação de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB foram utilizados kits comerciais de ELISA (Human TGF-beta 1 e Human PDGF-BB DuoSet ELISA Kit, R&D Systems). O protocolo fornecido pelo fabricante foi seguido para condução dos ensaios, mas com redução dos volumes pela metade, em placas de 96 poços de 0,16 cm<sup>2</sup> por poço (Greiner Bio-One). Foram utilizados reagentes padrões de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB recombinantes fornecidos pelos kits para preparo das amostras das curvas padrão, que foram construídas por regressão logística de quatro parâmetros a partir da aplicação GainData® da Arigo Biolaboratories – disponível em [arigobio.com/elisa-analysis](http://arigobio.com/elisa-analysis).

Valores de absorbância foram determinados a 450 nm em um espectrofotômetro de placa SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Microplate Reader da *Molecular Devices*, sendo desconsiderados valores negativos. A absorbância média do branco – medida em duplicata – foi incluída como ponto zero da curva padrão, e o ponto zero das curvas amostrais é relativo a medidas de meio fresco, servindo como controle. A diluição das amostras do padrão foi computada diretamente pela aplicação GainData®, sendo os resultados posteriormente exportados para o software Excel para tratamento dos dados, montagem das tabelas e construção das curvas. Em seguida foram determinados os parâmetros de concentração máxima de produto ( $P_{MÁX}$ ) e teor (concentração de produto no meio normalizada pelo número de células).

Primeiramente as placas de 48 poços com amostra de meio condicionado (capítulo 4.10) foram descongeladas em temperatura ambiente, centrifugadas numa centrífuga Eppendorf 5810R a 200 RCF por 10 min, e 200uL a 300uL de sobrenadante foram transferidos para placas de 96 poços (placas mãe). Destas placas mãe retirou-se alíquotas para preparo de placas P96 espelho (vide capítulos 4.11.2 e 4.11.3), sendo estas então utilizadas para preparo das placas de ELISA. As placas mãe foram congeladas para futura análise de metabólitos e, durante o preparo das placas espelho, estas repousaram sobre bolsas de gelo, e a distribuição das amostras foi auxiliada por modelos desenhados em Excel com o mapeamento das condições experimentais.

Para cultivos com células CHO e HEK produtoras em três concentrações de SFB foram obtidas curvas de concentração de FC de 4 pontos ( $t = 2, 4, 5$  e  $7$ ), englobando assim toda a fase exponencial de crescimento e o ponto final do cultivo. Para cultivos com adição

exógena e cultivos com as células parentais foram escolhidos os pontos  $t = 2, 4$  e  $6$  para medida da concentração de FC.

#### **4.11.2 ELISA com amostras de células CHO**

Apenas a terceira replicata biológica dos cultivos com as células CHO tiveram amostras de meio condicionado armazenadas para quantificação de FC. Destas, foram dosadas amostras provenientes do cultivo da célula produtora em 3 concentrações de SFB, do cultivo da célula parental apenas na condição padrão de SFB, e de ambas células na condição de adição exógena de  $5 \text{ ng/mL TGF-}\beta 1$ .

Os fatores de diluição escolhidos para todas amostras foram  $1,4, 9,8$  e  $98x$ , exceto para amostras da linhagem produtora no ponto  $t=2$  e da linhagem parental, que foram diluídas apenas  $1,4x$ , e amostra da linhagem parental com adição exógena de TGF- $\beta 1$ , que foram diluídas  $1,4$  e  $9,8x$ . As diluições foram realizadas diretamente nas placas espelho, assim como a ativação das amostras de acordo com o protocolo descrito no capítulo 4.9.

A duração total do processo desde o descongelamento das placas de 48 poços ao começo do ensaio de ELISA foi  $4,5h$ . Apenas amostras diluídas  $1,4x$  não levaram a valores de absorbância duas casas após a vírgula, logo apenas os dados das amostras neste fator de diluição foram considerados.

##### *4.11.2.1 Análise estatística dos dados de $P_{TGF-\beta 1}$*

Para avaliar os efeitos da concentração de SFB e do tempo de cultivo sobre a concentração de TGF- $\beta 1$  em culturas de células CHO produtoras foi realizado um teste ANOVA fator duplo ( $3 \times 5$ ) com replicação (duplicata de cultivo exceto controle, para o qual se utilizou dados da duplicata de ELISA). Para célula parental cultivada na concentração padrão de SFB, assim como para ambas linhagens parental e produtora cultivadas com a adição exógena de  $5 \text{ ng/mL TGF-}\beta 1$ , os resultados foram analisados por testes ANOVA fator único com replicação (duplicata de cultivo exceto controles, para os quais se utilizou dados da duplicata de ELISA).

#### **4.11.3 ELISA com amostras de células HEK**

Foram armazenadas amostras de meio condicionado das 3 replicatas biológicas dos cultivos com a célula HEK produtora, e da terceira replicata biológica com a HEK parental.

Destas, foram dosadas amostras provenientes do cultivo da célula produtora em 3 concentrações de SFB, do cultivo das células parental na condição padrão de SFB e de adição exógena de 25 ng/mL PDGF-BB.

O ensaio foi realizado inicialmente com uma placa teste com condições experimentais reduzidas e em diluições de 1:10 e 1:100 de modo avaliar quais as diluições mais apropriadas para o estudo. Para evitar o descongelamento de amostras que não fossem imediatamente utilizadas na placa teste, a escolha das condições experimentais para este ensaio inicial adequou-se a disposição original das mostras nas placas de 48 poços, que seguiu a ordem de coleta durante o cultivo celular.

Para análise dos resultados da placa teste foram aproveitados os dados relativos ao fator de diluição 10x, que apresentaram maior consistência. A partir desses resultados foi determinada para os próximos ensaios a não diluição das amostras de controle, células parentais e produtoras no ponto  $t = 2$ , e fatores de diluição de 20x para célula parental com adição exógena de PDGF-BB, 2x para amostras de células produtoras no ponto  $t = 4$  e 100x para demais pontos.

#### *4.11.3.1 Análise estatística dos dados de $P_{PDGF-BB}$*

Os dados de concentração de PDGF-BB dos cultivos em diferentes concentrações de SFB com a célula HEK produtora foram analisados por um teste ANOVA fator duplo (3x5) com replicação (triplicata biológica), entretanto, como a terceira replicata biológica não contou com o ponto  $t = 7$  da condição 5% SFB, neste caso foi utilizado o valor médio das duas outras replicatas, e os dados do controle (meio fresco) – obtidos a partir de medida de ELISA em duplicata – foram repetidos 3 vezes.

Para célula parental na condição 10% SFB, assim como para ambas linhagens parental e produtora em meio 2% SFB e 3 condições de adição exógena de FC, a variância da concentração de PDGF-BB foi analisada por testes ANOVA fator único com replicação (duplicata de cultivo exceto controles, para os quais utilizou-se dados da duplicata de ELISA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ADAPTAÇÃO CELULAR PARA CULTIVO EM SUSPENSÃO COM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE SORO

Num primeiro conjunto de experimentos realizado com agitação a 220 rpm e reagente *anticlumping* a 1:250, as condições de adaptação sequencial – contendo SFB – levaram à formação acentuada de grumos celulares, e a condição de adaptação direta não promoveu crescimento celular algum. A observação visual das placas em agitação pareceu indicar que a frequência de agitação utilizada não foi suficiente para mistura eficiente das suspensões celulares - apesar de que em testes com água e meio de cultura esta agitação pareceu ter sido suficiente para homogeneização total do líquido nos poços. Fotografias de placas sob microscópio óptico com células CHO parentais em 50% e 75% meio livre de soro (MLS) são apresentadas respectivamente nas Figuras 3 e 4.

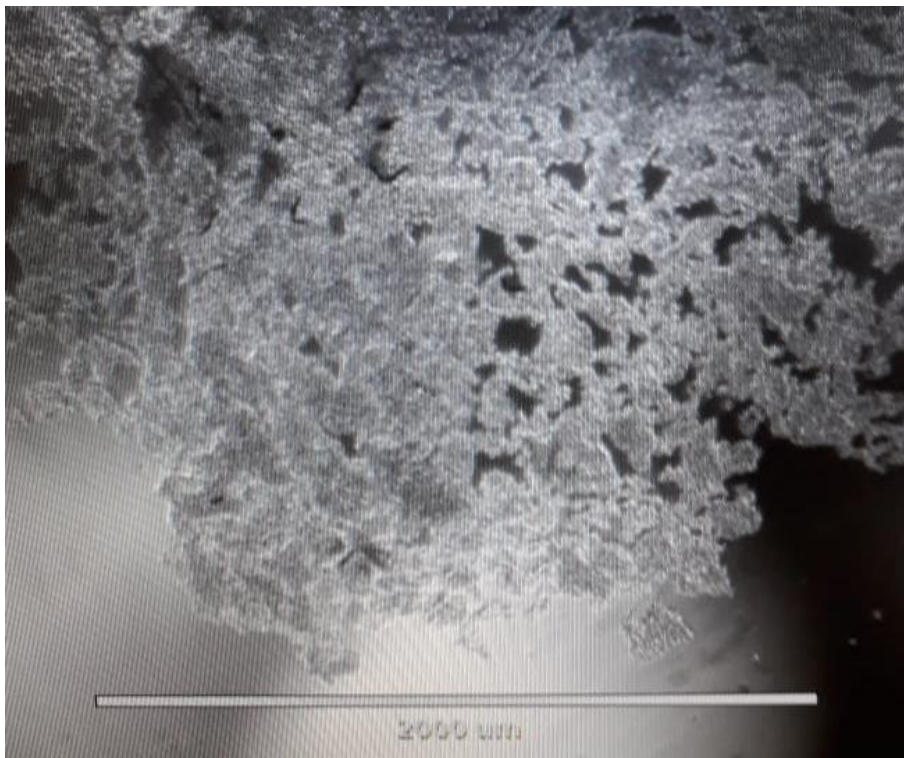


Figura 3 - Agregados de células CHO parentais em meio 50% MLS

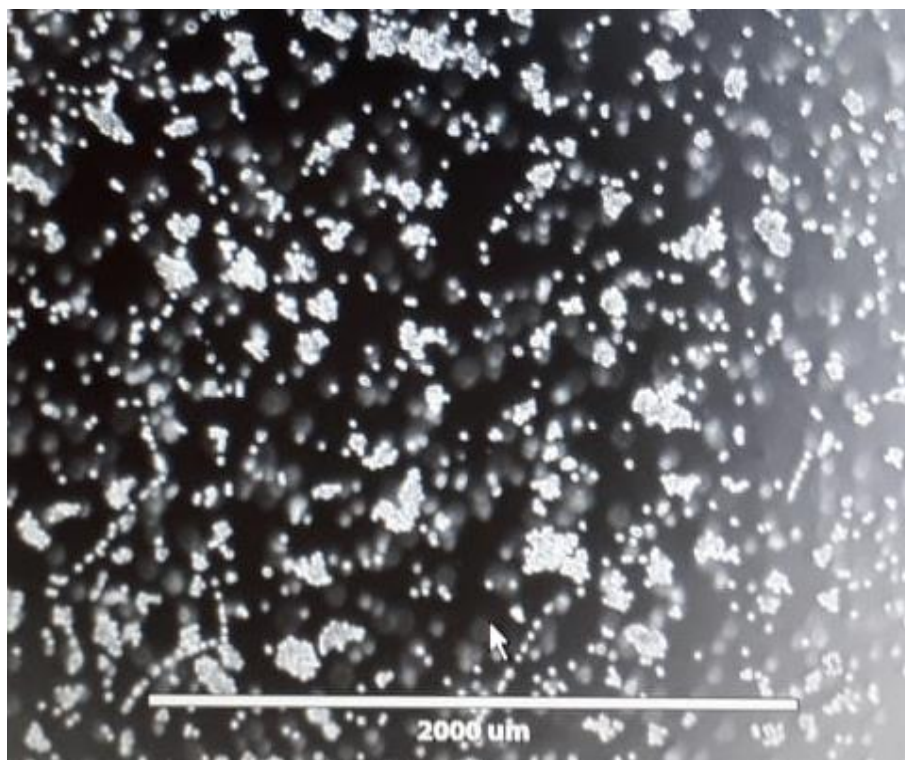


Figura 4 - Células CHO parentais em meio 75% MLS com formação moderada de agregados celulares

Em uma segunda tentativa, empregou-se agitação a 270 rpm e se fez uso de reagente *anticlumping* à 1:100. Com estas alterações a formação de grumos foi praticamente eliminada nos cultivos em placa agitada, ocorrendo apenas na primeira passagem (que contém maior concentração de SFB), e em cultivos estáticos em frascos T houve uma formação branda de grumos em todas condições de cultivo. A Figura 5 mostra células CHO parentais crescendo em meio 75% MLS, desta vez sem grumos celulares.



Figura 5 - Células CHO parentais em meio 75% MLS sem formação de agregados celulares

Imagens das células HEK parentais cultivadas em garrafas não tratadas em meio 75% MLS são apresentadas nas Figuras 6 e 7 abaixo, sendo possível verificar uma formação considerável de grumos. Para tirar a medida de concentração celular de culturas com grumos como esta, ponteiros descartáveis de 5mL foram utilizadas para sucção e despejo da suspensão celular contra o fundo da garrafa repetidas vezes. Após o procedimento os agregados celulares são desmanchados com sucesso, conforme Figura 8.



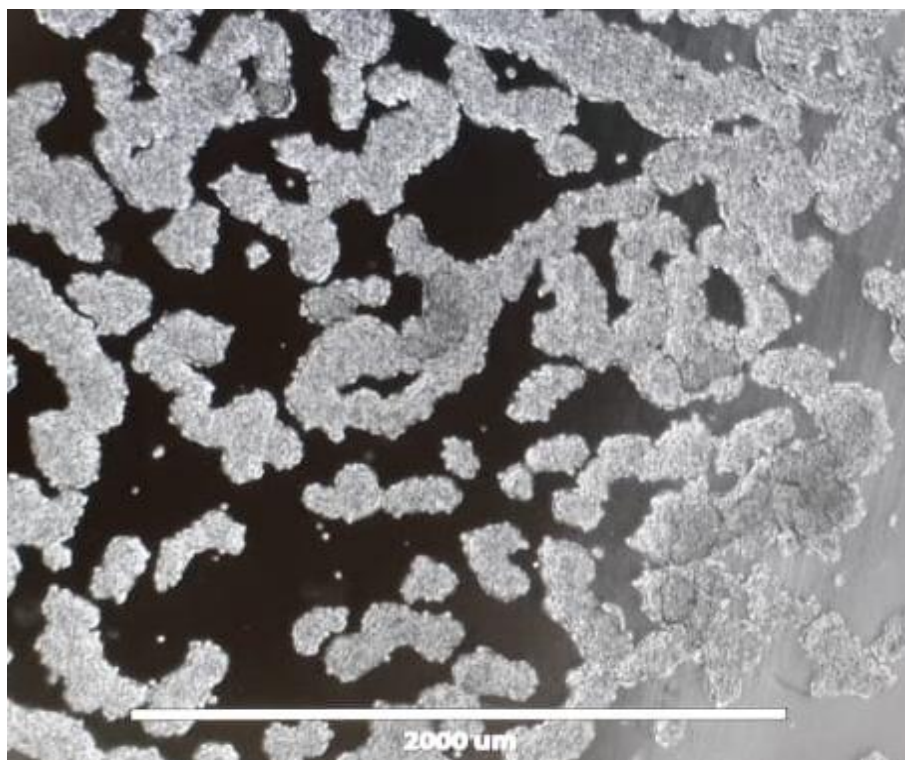


Figura 6 - Agregados de células HEK parentais em frascos T25 com meio 75% MLS

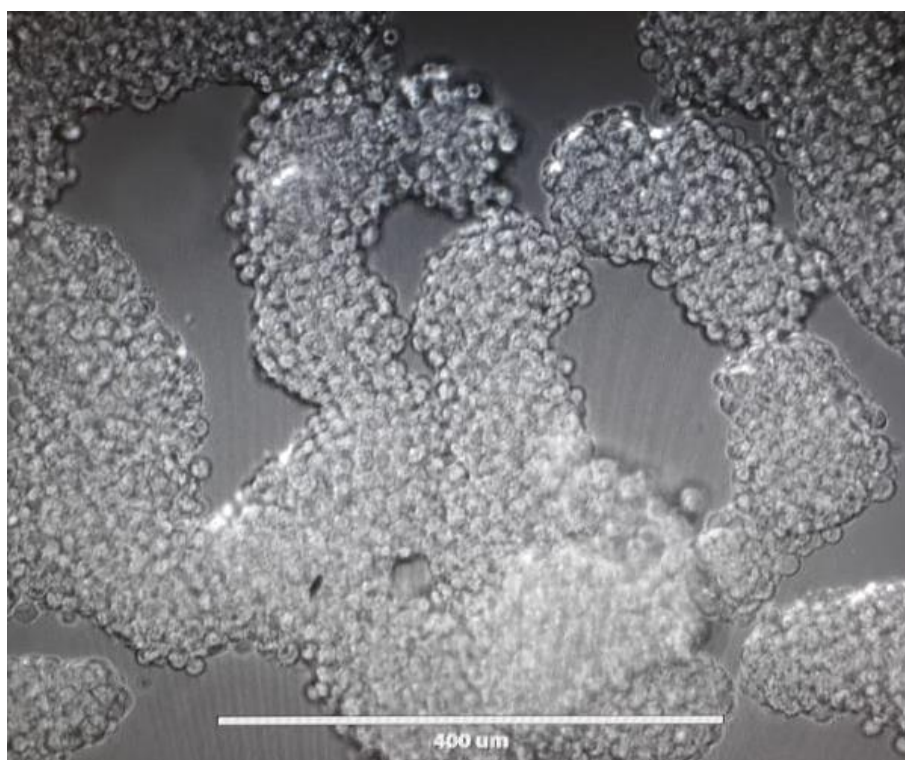


Figura 7 - Agregados de células HEK parentais em frascos T25 com meio 75% MLS em maior magnitude

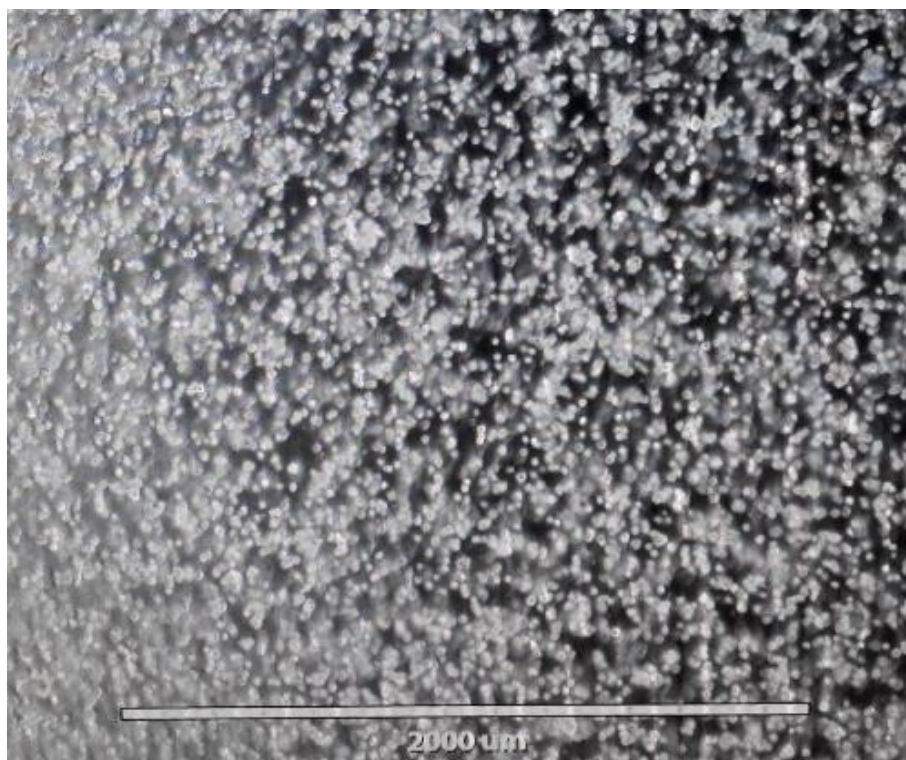


Figura 8 - Células HEK parentais em frascos T25 com meio 75% MLS após homogeneização com pipetador

Quando células CHO – parentais e produtoras – foram cultivadas em 75% MLS, após 4 dias a concentração celular aumentou apenas 50%, e em condição 87,5% MLS nenhum crescimento foi detectado em até 14 dias de cultivo. Ambas células HEK parental e produtora apresentaram maior facilidade de crescimento do que células CHO durante as etapas iniciais de adaptação. Contudo, ao atingirem a terceira passagem – em meio 93,72% MLS, ambas linhagens HEK tiveram o crescimento interrompido, e as células cultivadas em placa morreram rapidamente.

O agitador de placas utilizado para adaptação das células em placas de 24 poços tem uma órbita de 3mm de diâmetro, sendo consideravelmente menor do que se verificou em outros trabalhos levantados na revisão bibliográfica envolvendo cultivo em microplaca sob agitação orbital (GIRARD *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2008). Talvez aqui a velocidade de agitação necessária para misturar de forma eficiente a suspensão celular provoque estresse demais às células, o que pode ter dificultado o processo de adaptação.

A condição de cultivo estático em frasco T25 também não parece a condição ideal para processos de adaptação celular, apesar de já ter sido empregado antes com sucesso pelo grupo NUCEL. Apesar da ausência de agitação, a aderência celular à superfície do frasco e a formação de grumos pode ser reduzida quase por completo, exceto em condições

iniciais de adaptação sequencial, onde se tem maiores concentrações de SFB. Novos experimentos foram planejados para testar protocolos alternativos de adaptação utilizando meio condicionado de passagens anteriores e concentrações maiores de inóculo, estes foram iniciados, porém não tiveram continuidade.

## 5.2 CURVAS DOSE-RESPOSTA DE ADIÇÃO EXÓGENA DE FATOR DE CRESCIMENTO

A partir de revisão bibliográfica em diversos repositórios científicos levantou-se dados de concentração na qual os fatores PDGF-BB e TGF- $\beta$ 1 são aplicados em estudos envolvendo cultivo de células de mamífero (Tabela 8), assim como dados das concentrações destes fatores detectadas em soros de origem bovina e humana (Tabela 9), e então foram determinados 5 níveis de concentração de cada FC para obtenção das curvas dose-resposta (conforme capítulo 4.8).

Fator de crescimento	Concentração (ng/mL)	Origem celular	Referência
PDGF-BB	0,6-6	ligamento periodontal	PICHE; CARNES; GRAVES, 1989
	10	hMSC	ALBRO <i>et al.</i> , 2016
	100	MSC	WADA; GERBAUDO; SPECTOR, 2013
	10	MSC	GHARIBI; HUGHES, 2012
	10	carcinoma	HERLYN <i>et al.</i> , 1990
	2-20	hMSC	JUNG <i>et al.</i> , 2010
	10	NRK	RIZZINO; RUFF; RIZZINO, 1986
	10	câncer de mama	BURG <i>et al.</i> , 1988
	2500	BALB/c-3T3	WHARTON <i>et al.</i> , 1982
	0,5-20	BALB/c-3T3	COOK; WANG; CHEN, 1993
	20	glioma	POLLACK <i>et al.</i> , 1990
	10-100	hADSC	KWON <i>et al.</i> , 2016
TGF- $\beta$ 1	1	hMSC	ALBRO <i>et al.</i> , 2016
	10	carcinoma	HERLYN <i>et al.</i> , 1990
	10	MSC	JUNG <i>et al.</i> , 2010
	0,1-1	epitélio de rato	ILIO; SENSIBAR; LEE, 1995
	0,25	NKR	RIZZINO; RUFF; RIZZINO, 1986
	0,4	NKR	RIZZINO, 1984
	1	câncer de mama	BURG <i>et al.</i> , 1988
1	fibroblasto humano	WILLIAMS <i>et al.</i> , 2006	

Tabela 8 - Faixa de concentração de utilização de PDGF-BB e TGF- $\beta$ 1 em cultivos celulares

Fator de crescimento	Concentração (ng/mL)	Origem	Referência
PDGF-BB	2,5	humana	WITZENEDER <i>et al.</i> , 2013
TGF- $\beta$ 1	5		
PDGF-BB	1,5-2,5	humana	JOSH <i>et al.</i> , 2013
TGF- $\beta$ 1	15-25		
PDGF	40-60	bovina	MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2001
TGF- $\beta$ 1	10-20	bovina	OIDA; WEINER, 2010
TGF- $\beta$ 1	12,6	bovina	CYTIVA, 2020

Tabela 9 - Concentração de PDGF e TGF- $\beta$ 1 em soro de origem humana e bovina

Com base nesses estudos, realizou-se cultivos das células HEK com 5 níveis de adição exógena de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB. A variação da concentração final ( $X_F$ ) de células HEK parentais após 4 dias de cultivo em função de 5 níveis de adição exógena de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB é apresentada na Figura 9. Com a adição de TGF- $\beta$ 1 não foi verificada nenhuma variação significativa da  $X_F$  em relação aos controles (consultar capítulo 4.8.1 para tratamento estatístico), mas curiosamente, a condição do controle com TGF- $\beta$ 1 inativo resultou na maior  $X_F$  detectada. A etapa de ativação do TGF- $\beta$ 1 em pH ácido é uma forma de também desnaturar e inativar outras proteínas presentes no meio condicionado, logo, ao omitir esta etapa, é provável que as células possam ter sido expostas a outras moléculas desconhecidas com funções estimuladoras. A adição de PDGF-BB exógeno nos cultivos com a célula HEK resultou em diferenças estatisticamente significativas, ainda que modestas, do  $X_F$  em relação ao controle ( $F(5,6)=11,29$ ,  $p=0,005$ ), sendo estas entre o controle e os níveis 3, 4 e 5 de adição.

Com a célula CHO, a adição de PDGF-BB não surtiu qualquer efeito significativo, apenas a adição de TGF- $\beta$ 1 ( $F(6, 7)=8,06$ ,  $p=0,007$ ), sendo o  $X_F$  verificado em todos os 5 níveis de adição, e também no controle de TGF- $\beta$ 1 inativo, significativamente menor que o do controle sem adição (Figura 10).

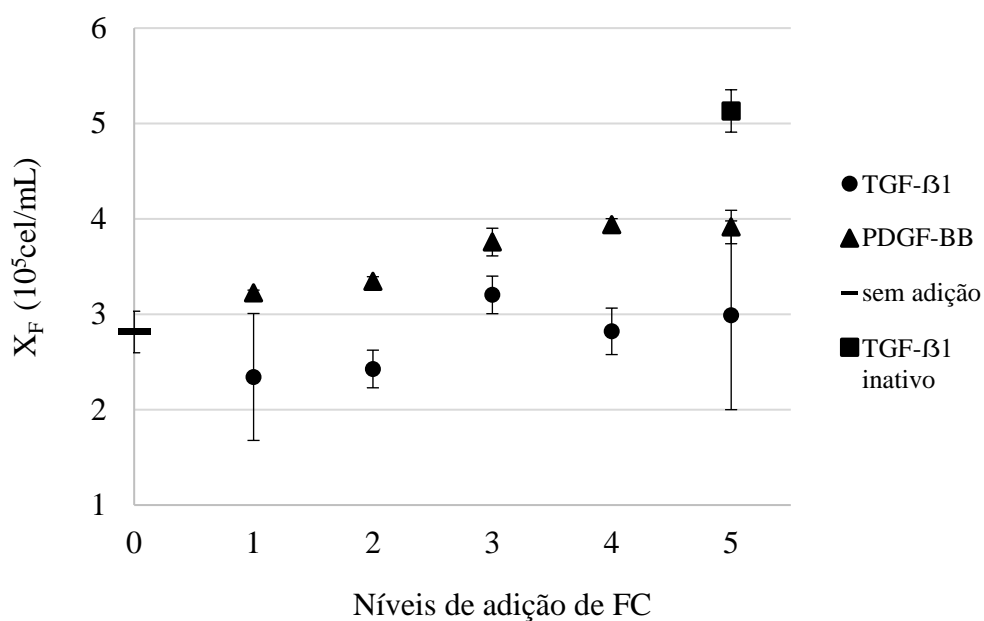


Figura 9 - Concentração de células HEK 4 dias após inoculação em meio com 1% SFB e adição exógena de FC

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo)

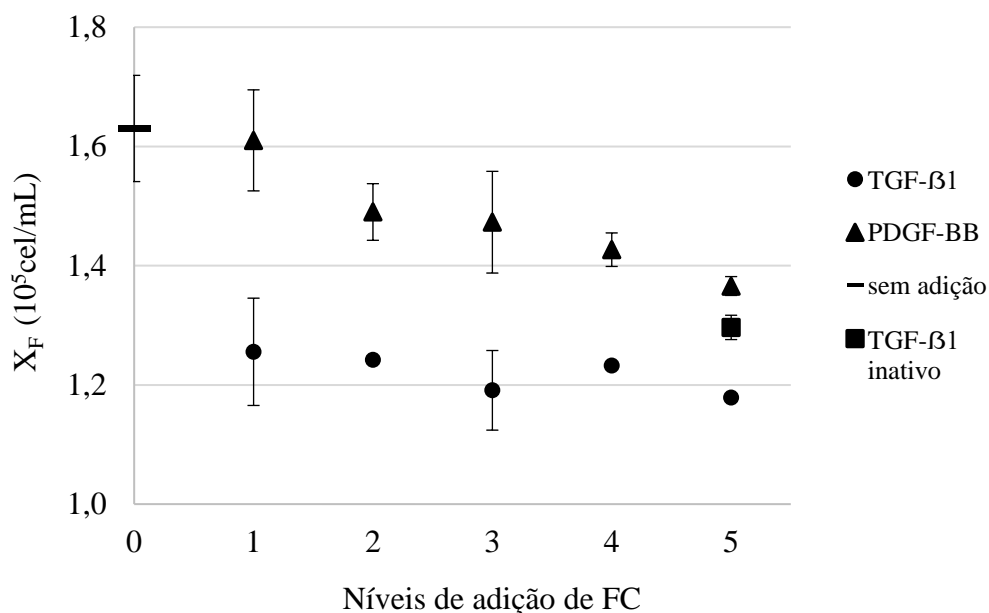


Figura 10 - Concentração de células CHO 3 dias após inoculação em meio com 1,4% SFB e adição exógena de FC

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo)

O impacto negativo do tratamento com TGF-β1 sobre a concentração de células CHO não era esperado e motivou a realização de um novo ensaio com maior concentração de

SFB, com a filtragem do meio condicionado antes da etapa de ativação (TGF- $\beta$ 1 MC), e avaliando-se também a adição exógena de TGF- $\beta$ 1 a partir de reagente comercial (TGF- $\beta$ 1 CM) (Figura 11).

A adição de TGF- $\beta$ 1 MC surtiu efeito significativo sobre o  $X_F$  ( $F(6, 7)=11,86$ ,  $p=0,002$ ), sendo apenas o resultado para o nível 3 (5 ng/mL) diferente dos controles, enquanto com a adição de TGF- $\beta$ 1 CM, que também surtiu efeito significativo ( $F(5, 6)=10,74$ ,  $p=0,006$ ), os níveis 3 e 4 se diferenciaram do controle, indicando um efeito de inibição do crescimento.

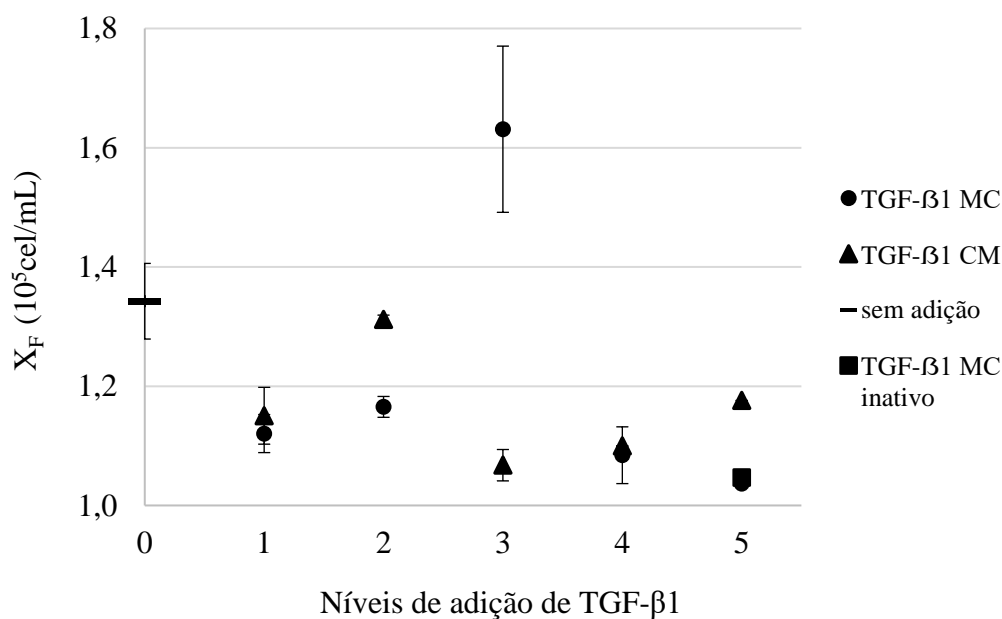


Figura 11 - Concentração de células CHO 3 dias após inoculação em meio com 3,5% SFB e adição exógena de TGF- $\beta$ 1

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo)

A partir dos resultados destes ensaios determinou-se as concentrações de 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 e 25 ng/mL PDGF-BB para realização dos estudos cinéticos com adição exógena de FC.

### 5.3 CULTIVO DE CÉLULAS CHO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO

#### 5.3.1 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento obtidas com as células CHO parental e produtora de TGF- $\beta$ 1 em 3 concentrações de SFB são apresentadas nas Figuras 12 e 13. Aqui são apresentadas as curvas médias obtidas a partir de cultivos em triplicata, enquanto as curvas de crescimento de replicatas biológicas individuais são apresentadas nos apêndices A e B. Em todas as condições houve uma fase lag de crescimento de 1 dia e a concentração celular máxima ( $X_{MAX}$ ) foi atingida por volta do 6º dia de cultivo.

Com a célula parental verificou-se uma limitação notável do crescimento nas condições 1,4% e 3,5% SFB, o que já era esperado devido a dependência da proliferação celular por moléculas presentes no soro como fatores de crescimento. Contudo, tal limitação não foi observada tão claramente para a célula produtora.

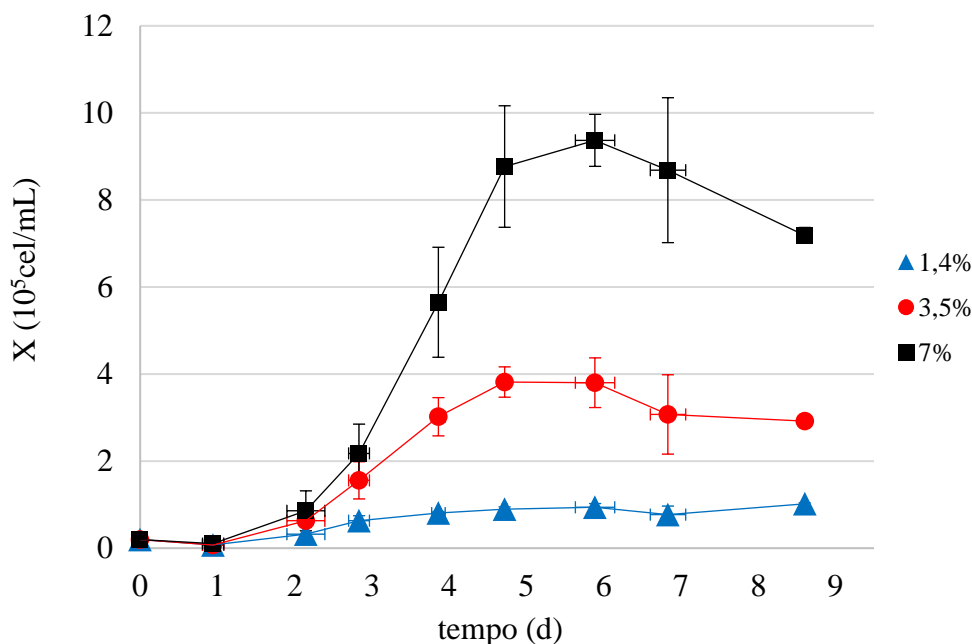


Figura 12 - Crescimento de células CHO parentais em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica) exceto pontos  $t=5$  e  $t=7$  não possuem dados da 1ª replicata biológica, e o ponto  $t=9$  é relativo à apenas esta.

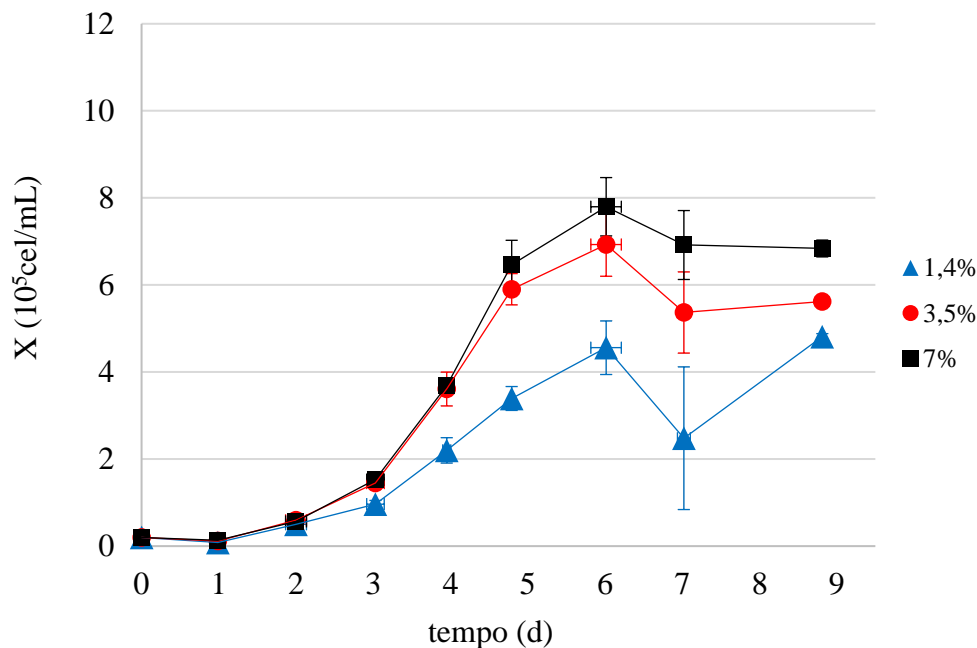


Figura 13 - Crescimento de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica) exceto pontos  $t=5$  e  $t=7$  não possuem dados da 1ª replicata biológica, e o ponto  $t=9$  é relativo à apenas esta.

As Figuras 14 e 15 apresentam as curvas  $\ln(X)$  para as células CHO parentais e produtoras nas diferentes concentrações de SFB estudadas, com linhas de tendência ajustadas entre os pontos considerados dentro da fase exponencial de crescimento. Estas curvas não foram, contudo, utilizadas para determinação do  $\mu X_{MÁX}$ , que teve seu valor médio determinado a partir das curvas individuais de cada replicata biológica.

Para ambas linhagens celulares foi verificada em todas concentrações de soro uma fase exponencial de crescimento entre o segundo e quarto dia de cultivo, apesar de que tratando individualmente as curvas da terceira replicata biológica da célula parental os dados do segundo ponto ( $t=1,6$ ) não foram considerado parte das tendências lineares (Apêndice A Figura 6). Curiosamente, a diminuição da concentração de SFB não afetou a duração da fase exponencial de crescimento.



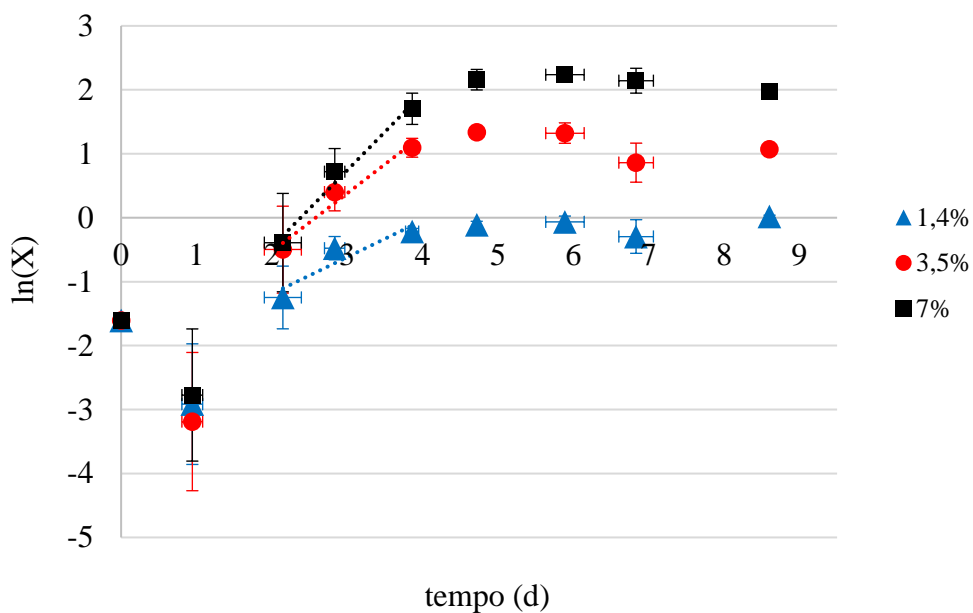


Figura 14 -  $\ln(X)$  de células CHO parentais em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica) exceto pontos  $t=5$  e  $t=7$  não possuem dados da 1ª replicata biológica, e o ponto  $t=9$  é relativo à apenas esta.

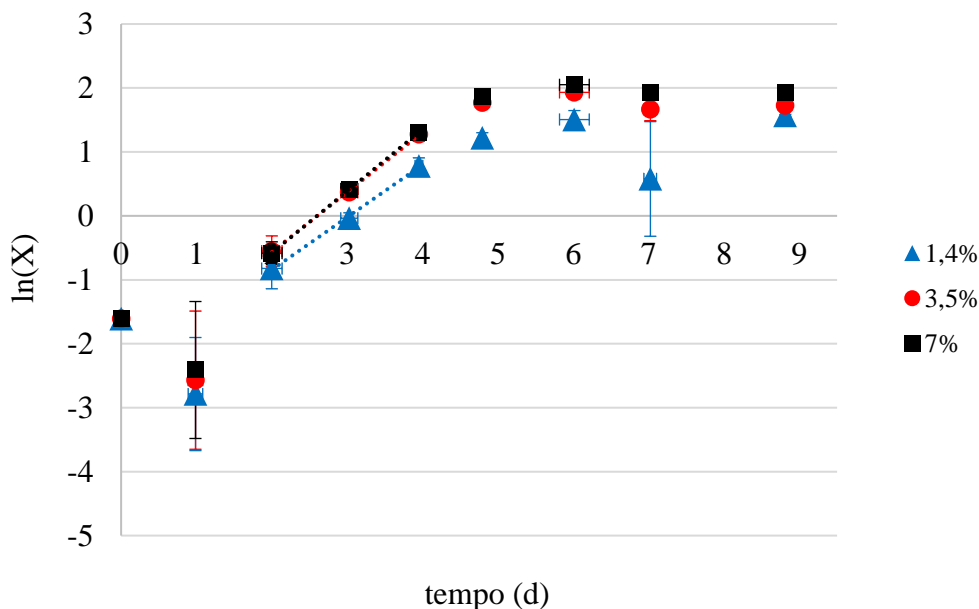


Figura 15 -  $\ln(X)$  de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica) exceto pontos  $t=5$  e  $t=7$  não possuem dados da 1ª replicata biológica, e o ponto  $t=9$  é relativo à apenas esta.

### 5.3.2 Curvas de consumo de substrato

Curvas de concentração de glicose pelo tempo foram obtidas para a terceira replicata biológica dos cultivos com a célula CHO parental e produtora (Figuras 16 e 17). Com os cultivos da célula parental nas concentrações de 3,5% e 7% SFB, o esgotamento da glicose no meio de cultura em torno de  $t = 5$  e  $t = 6$  coincide com o período no qual foram registrados os parâmetros de  $X_{MÁX}$ , sendo que a fase exponencial de crescimento em todas condições de SFB teve seu término antes, em  $t = 4$ , quando a concentração de glicose era cerca de 0,6 g/L. Com o cultivo da célula parental com 1,4% SFB, até o término da fase exponencial a glicose no meio de cultura parece ter sido consumida de forma similar ao verificado com as outras duas concentrações de SFB, mas a partir de então a concentração do substrato diminuiu de forma mais tênue, até 0,15 g/L, sendo que a concentração celular manteve-se praticamente constante nesse período. O consumo significativo de glicose verificado para célula parental na condição 1,4% SFB, sem estar acompanhado de um aumento considerável da concentração celular, indica uma metabolização distinta deste substrato em decorrência da privação de soro. Com a CHO produtora foram observados padrões de consumo de glicose similares aos verificados com a CHO parental, mas o substrato foi consumido mais rapidamente, o que condiz com as maiores concentrações celulares observadas em cultivos com a célula produtora.

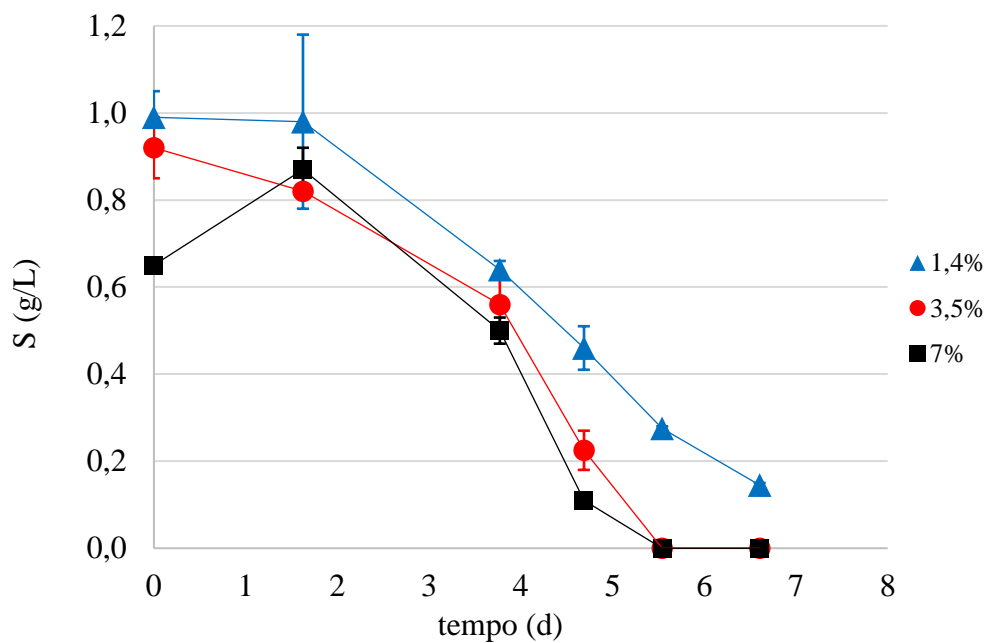


Figura 16 - Curvas de concentração de glicose em cultivos da CHO parental em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

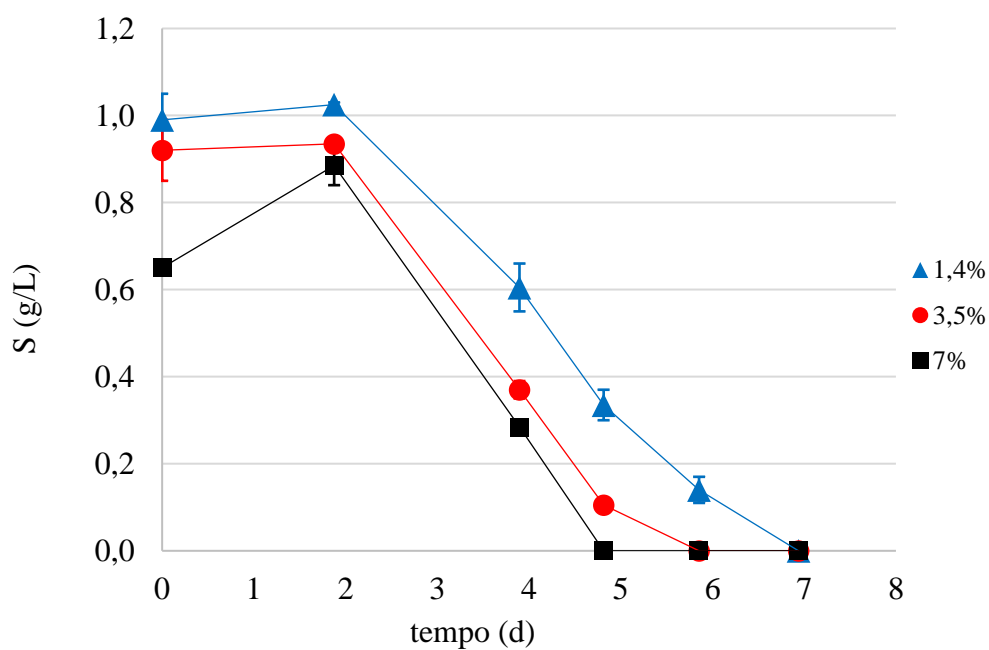


Figura 17 - Curvas de concentração de glicose em cultivos da CHO produtora em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

### 5.3.3 Curvas de formação de produto

Curvas de concentração de TGF- $\beta$ 1 determinadas por ELISA foram obtidas para a terceira replicata biológica do cultivo com a CHO produtora (Figura 18), e também com a CHO parental cultivada em 7% SFB – servindo como controle (dados não apresentados). Vale constar que, com base nos dados de concentração de TGF- $\beta$  em soro bovino apresentados em CYTIVA (2020) – vide Tabela 9, capítulo 5.2 –, em meio com 7% SFB haveria uma concentração de 0,88 ng/mL de TGF- $\beta$ , e ainda, de acordo com Dianelpour e colaboradores (1989) e Oida e Weiner (2010), haveria entre 1 e 2 ng/mL de TGF- $\beta$  latente em meio de cultura suplementado com 10% SFB.

Com a célula parental cultivada em meio 7% SFB, não foram verificadas diferenças significativas da concentração de TGF- $\beta$ 1 em relação ao controle nos pontos analisados ( $F(3, 7)=4,6$ ,  $p=0,087$ ; vide capítulo 4.11.2.1 para tratamento estatístico). Com a célula produtora, testes estatísticos revelaram que a concentração do produto sofreu um efeito de interação das variáveis concentração de SFB e o tempo de cultivo ( $F(8, 29)=12,9$ ,  $p=0,00002$ ), sendo apenas as medidas do último dia nas condições 3,5% e 7% SFB consideradas significativamente diferentes do controle. Nestes pontos foram atingidas concentrações máximas de produto ( $P_{MÁX}$ ) em torno de 0,7 e 0,8 ng/mL, sendo calculado um teor médio de TGF- $\beta$ 1 de  $1,1 \pm 0,1$  ng/ $10^6$  cel.

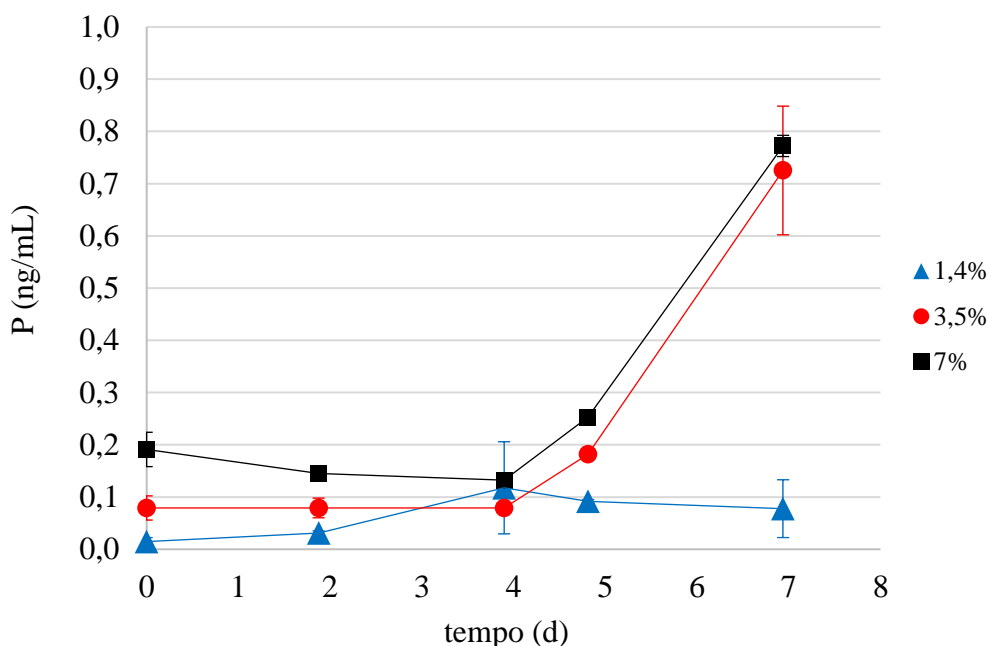


Figura 18 - Curvas de concentração de TGF- $\beta$ 1 em cultivos da CHO produtora em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 96 poços (replicata de ELISA) e, exceto controles ( $t=0$ ), 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

### 5.3.4 Análise de parâmetros

A Figura 19 apresenta os valores de  $\mu X_{MÁX}$  determinados para células CHO parentais e produtoras em função da concentração de SFB. Um valor de  $\mu X_{MÁX}$  praticamente idêntico de aproximadamente  $1 \text{ d}^{-1}$  foi verificado para ambas linhagens CHO quando cultivadas na condição padrão de 7% SFB.

Testes de análise de variância provaram haver uma interação entre os efeitos das variáveis independentes sobre a variável dependente ( $F(2, 12)=8,3, p=0,005$ ), e revelaram diferenças significativas entre o  $\mu X_{MÁX}$  da célula parental em cada condição de SFB, e em 1,4% SFB entre a linhagem parental e produtora. A redução da concentração padrão de 7% SFB no meio de cultura pela metade provocou uma diminuição de aproximadamente 27% no  $\mu X_{MÁX}$  da CHO parental, e a concentração de 1,4% SFB (80% menor que o padrão) levou a uma diminuição de 60% deste parâmetro, enquanto nenhuma destas condições de soro afetou de forma significativa o  $\mu X_{MÁX}$  da célula produtora - que pode ser considerado significativamente superior ao da célula parental apenas na condição 1,4% SFB.

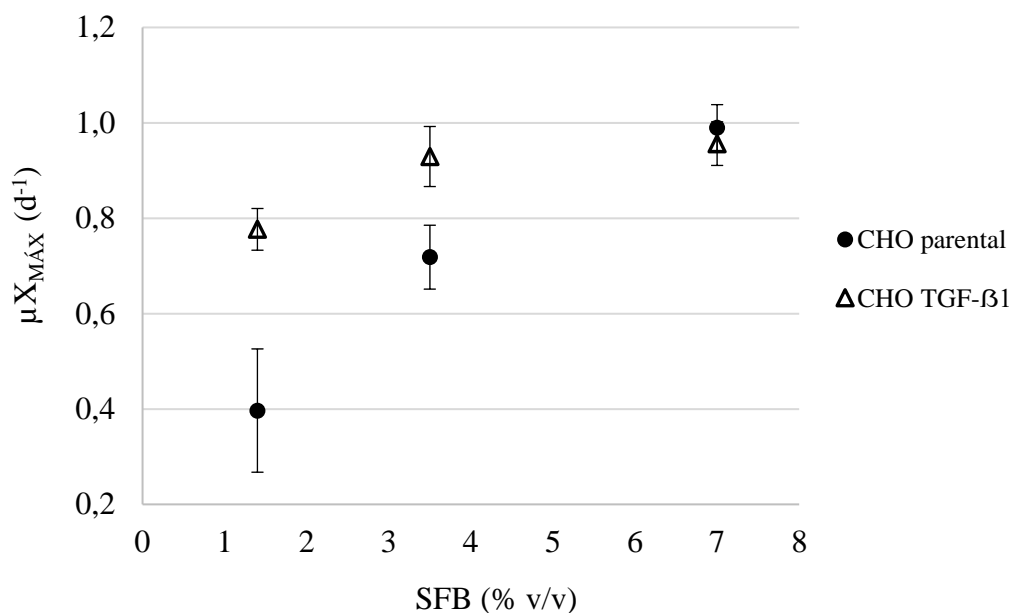


Figura 19 -  $\mu X_{MÁX}$  de células CHO em função da concentração de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 3 cultivos independentes (replicata biológica).

A Figura 20 apresenta o efeito da expressão heteróloga de TGF-B1 sobre o  $\mu X_{MÁX}$  de células CHO em três concentrações de SFB, tomando os dados da linhagem parental como controle e subtraindo-os dos da sublinhagem produtora ( $\Delta\mu X_{MÁX}$  d<sup>-1</sup>). Parece evidente aqui o papel do TGF-B1 recombinante no fornecimento de estímulo proliferativo às células CHO em relação inversamente proporcional à concentração de SFB no meio. Contudo, vale lembrar que análises estatísticas revelaram que os valores de  $\mu X_{MÁX}$  das sublinhagens em 3,5% SFB não são significativamente diferentes, que no intervalo de tempo a partir do qual o  $\mu X_{MÁX}$  foi determinado não foram detectados níveis de TGF-B1 no meio de cultura acima da condição de controle, e que não foram realizados estudos à nível molecular necessários para devida comprovação desta hipótese.

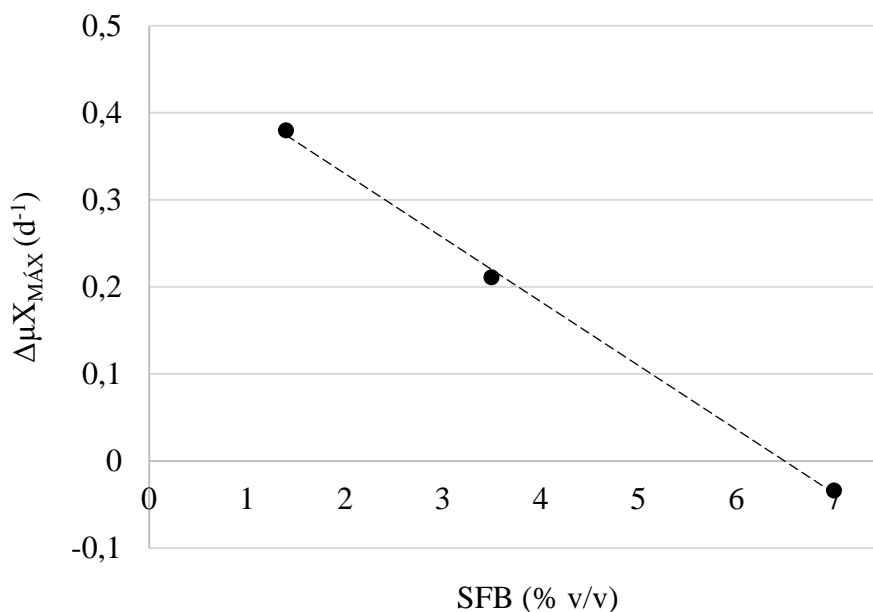


Figura 20 - Diferença de  $\mu X_{MÁX}$  entre CHO produtora de TGF- $\beta$ 1 e parental, em função da concentração de SFB

A Figura 21 mostra a variação dos valores de  $X_{MÁX}$  nos cultivos com células CHO parentais e produtoras em diferentes concentrações de SFB, tendo sido verificado um efeito de interação entre as variáveis independentes ( $F(2, 12)=36,1$ ,  $p=0,00001$ ). Houve diferenças significativas entre os dados de todas condições de SFB da célula parental, da condição 1,4% SFB e demais, na célula produtora, e entre os parâmetros das sublinhagens em cada condições de soro.

A diferença entre o  $X_{MÁX}$  atingido pelas células CHO parental e produtora verificada nas 3 concentrações soro é ilustrada pela Figura 22. A expressão de TGF- $\beta$ 1 parece afetar o  $X_{MÁX}$  de modo similar ao  $\mu X_{MÁX}$ : na condição padrão de concentração de SFB, não se detectou efeito estimulante, em 50% da concentração padrão a linhagem produtora apresentou um  $X_{MÁX}$  aproximadamente 80% superior, e em 20% a vantagem da sublinhagem produtora foi de quase 5 vezes.

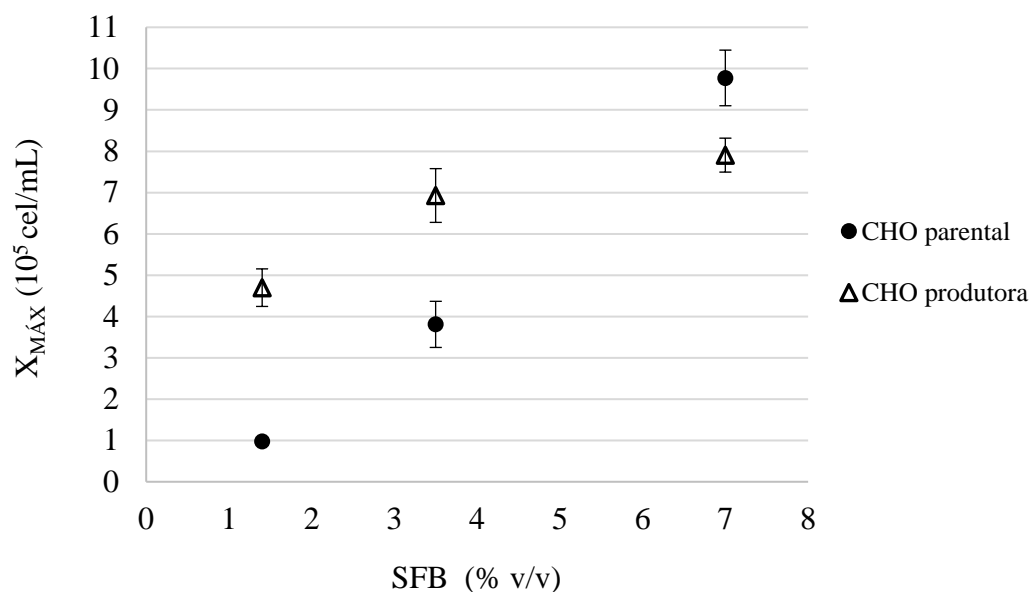


Figura 21 -  $X_{MÁX}$  de células CHO em função da concentração de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 3 cultivos independentes (replicata biológica).

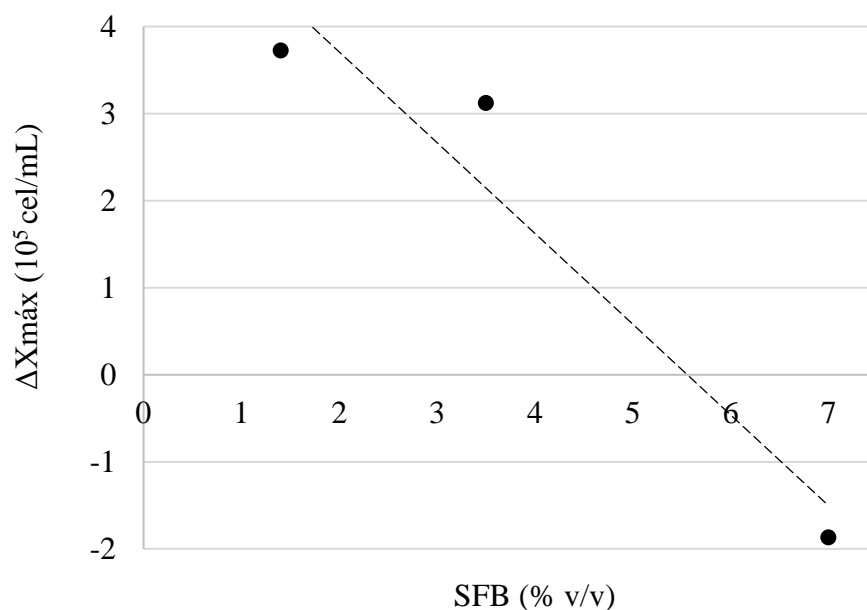


Figura 22 - Diferença de  $X_{MÁX}$  entre CHO produtora de TGF- $\beta$ 1 e parental, em função da concentração de SFB

A Figura 23 apresenta os valores de  $Y_{X/GLC}$  determinados durante a fase exponencial de crescimento da terceira replicata biológica do cultivo das células CHO parentais e produtoras, em função da concentração de SFB. Observa-se com a célula parental um forte impacto negativo da diminuição da concentração de SFB sobre o  $Y_{X/GLC}$ , chegando a uma



redução de quase 10 vezes do valor deste parâmetro na condição 1,4% SFB – o que é reflexo de um aproveitamento menor do substrato pelas células frente à carência por fatores de crescimento. Com a célula produtora se verifica, em média, uma eficiência menor de conversão de glicose à célula, o que pode indicar efeitos fora de alvo da transfecção e integração genômica do TGF-  $\beta$ 1 durante o processo de geração do clone produtor, que podem ter sido prejudiciais ao metabolismo energético. Ainda assim, se verifica com a célula produtora uma menor flutuação dos valores de  $Y_{X/GLC}$  frente à variação de SFB, o que sinaliza que o metabolismo energético se tornou menos dependente de soro. Vale lembrar que a glutamina presente no meio de cultura é também uma das principais fontes de carbono e energia, portanto conclusões acerca do metabolismo tiradas apenas com base apenas na avaliação do  $Y_{X/GLC}$  têm significado biológico restrito.

Na condição de cultivo com 7% SFB foi verificado para a célula produtora um  $Y_{X/GLC}$  2,5 vezes menor, diferença que explica o alcance de um  $X_{MÁX}$  significativamente maior pela célula parental nessa condição de cultivo. Em 3,5% SFB, a o rendimento da célula parental ainda é maior que o da produtora, só que nesta condição registrou-se uma melhora dos parâmetros cinéticos pela expressão do FC recombinante. Já em 1,4% SFB, assim como o  $X_{MÁX}$ ,  $\mu_{X_{MÁX}}$ , o  $Y_{X/GLC}$  também é superior na célula produtora. Os valores de  $Y_{X/GLC}$  obtidos no presente trabalho estão próximos a valores reportados na literatura para células CHO produtoras de anticorpos em cultivo em suspensão – 1,7 a  $4,1 \cdot 10^8$  cel/mmol (XING *et al.*, 2010; KORNECKI; STRUBE, 2019) –, e parentais em cultivo aderente –  $2,2 \cdot 10^8$  cel/mmol (KURANO *et al.*, 1990).

A Figura 24 apresenta os valores de  $\mu_{S_{MÁX}}$  determinados a partir da terceira replicata biológica do cultivo das células CHO parentais e produtoras em função da concentração de SFB. Apesar da diferença de  $Y_{X/GLC}$  verificada entre as condições com 3,5% e 7% SFB para a CHO parental (Figura 23), aqui o  $\mu_{S_{MÁX}}$  é aproximadamente  $1 \cdot 10^8$  cel/mmol/dia em ambas as concentrações de soro, o que é explicado pela equiparação do  $\mu_{X_{MÁX}}$  das células parentais e produtoras na condição de cultivo com 7% SFB.

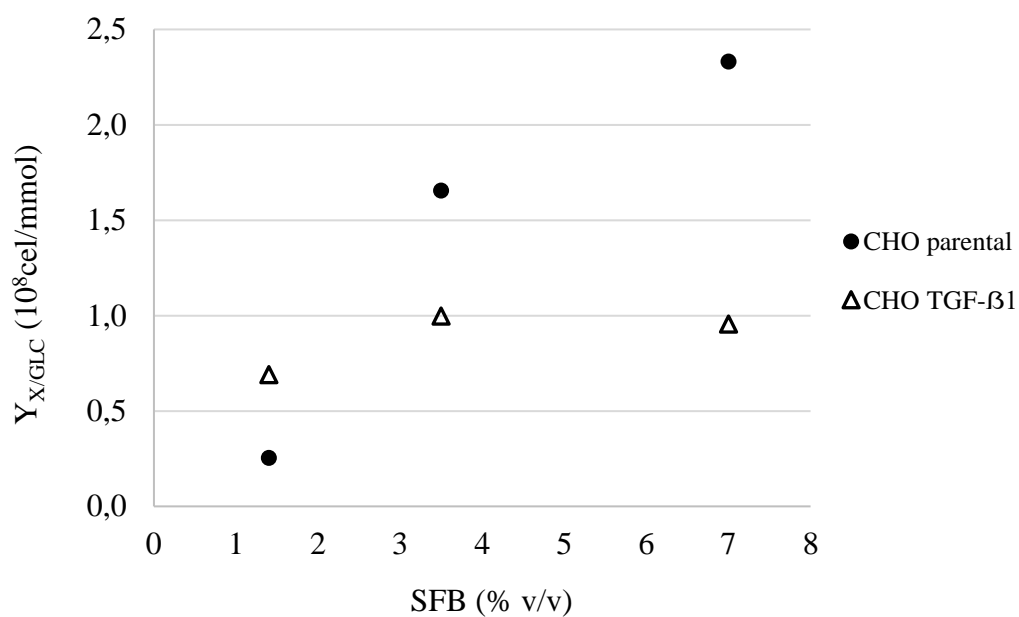


Figura 23 –  $Y_{X/GLC}$  de células CHO em função da concentração de SFB

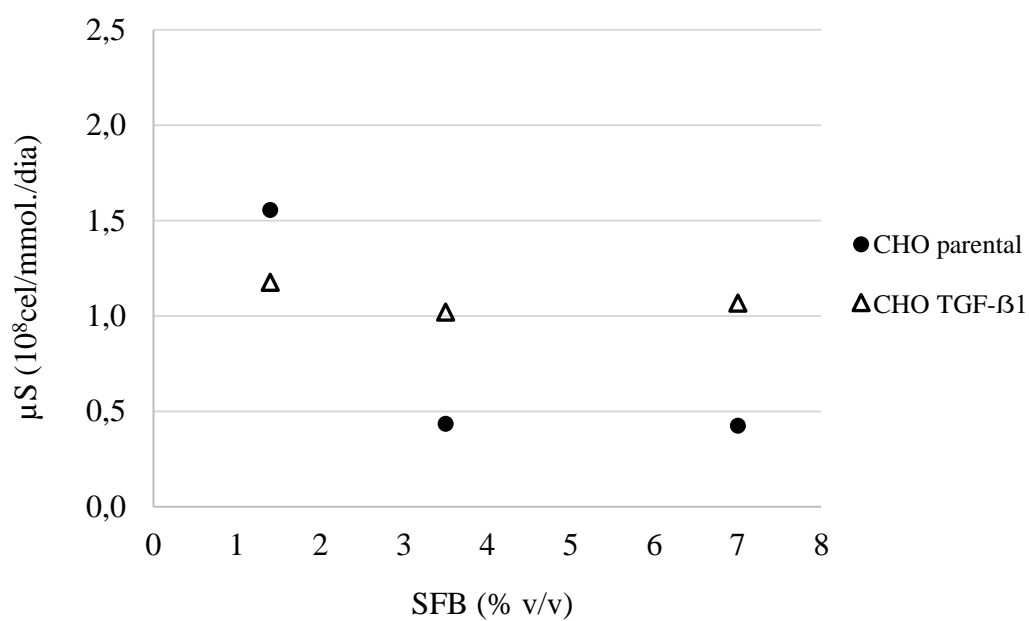


Figura 24 –  $\mu_S$  de células CHO em função da concentração de SFB

## 5.4 CULTIVO DE CÉLULAS CHO COM ADIÇÃO EXÓGENA DE FATOR DE CRESCIMENTO

### 5.4.1 Curvas de crescimento

Na última replicata biológica do cultivo com as células CHO foram ensaiadas condições de adição exógena de 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 e 25 ng/mL PDGF-BB em meio com 3,5% SFB, sendo estas curvas de crescimento apresentadas nas Figuras 25 e 26 junto com a curva sem adição exógena já apresentada anteriormente, como controle (capítulo 5.3.1). O crescimento da célula parental manteve-se praticamente idêntico ao controle nas três condições de adição de FC, enquanto o da produtora foi atenuado com a adição de TGF- $\beta$ 1 de forma isolada e junto com PDGF-BB.

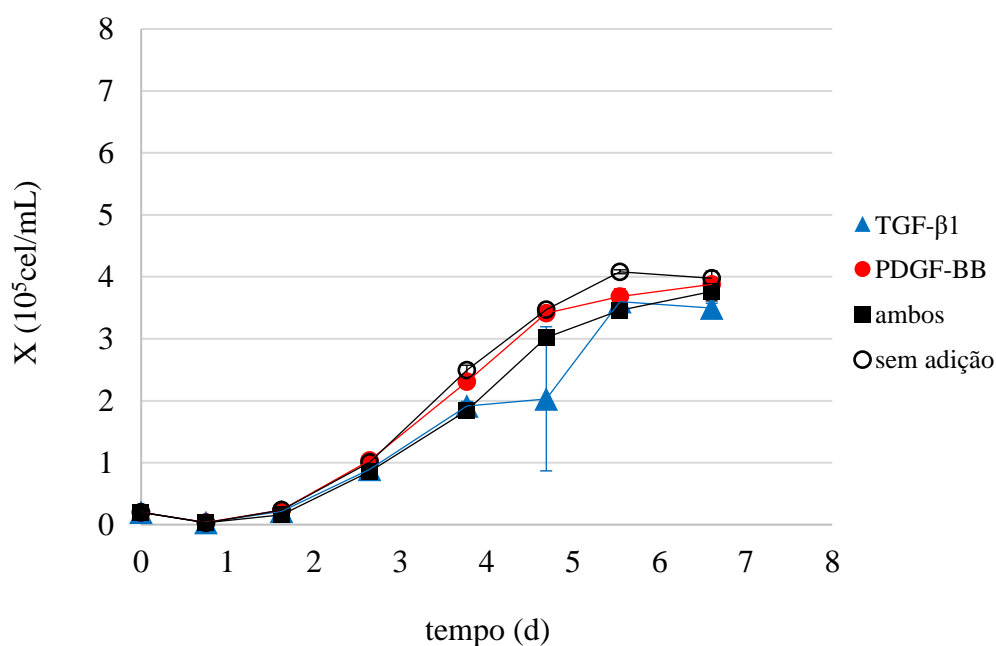


Figura 25 - Crescimento de células CHO parentais em 3,5% SFB com e sem adição de FC. Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

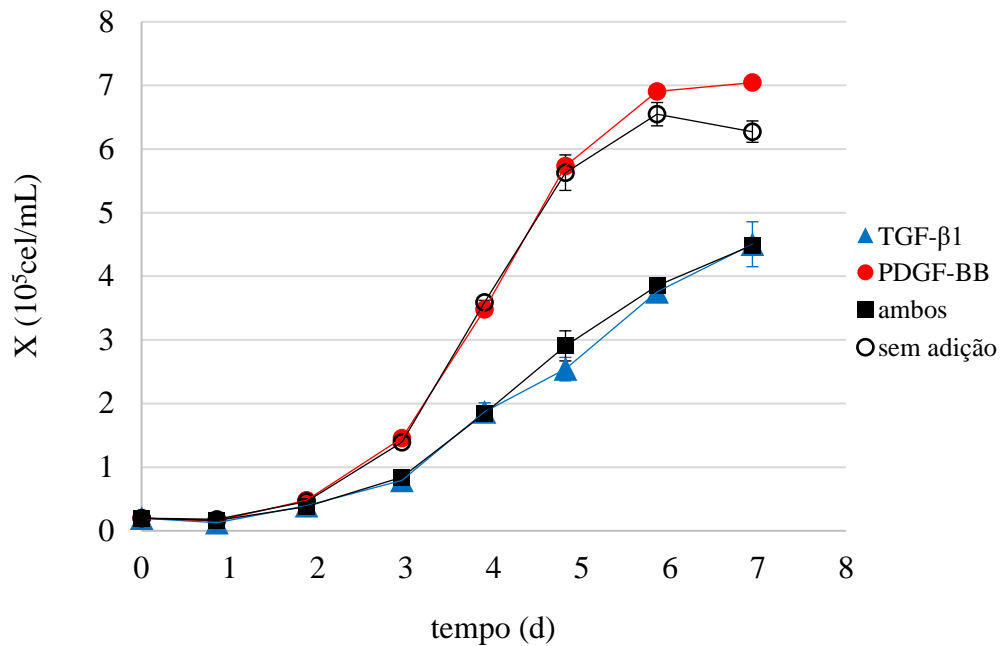


Figura 26 - Crescimento de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3,5% SFB com e sem adição de FC

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

As Figuras 27 e 28 apresentam as curvas  $\ln(X)$  para as células parentais e produtoras, com linhas de tendência ajustadas entre os pontos considerados dentro da fase exponencial de crescimento, com e sem a adição exógena de FC. Com a linhagem parental a adição isolada de TGF- $\beta$ 1 ou PDGF-BB não alterou a duração da fase exponencial de crescimento, mas observa-se a prorrogação do término dessa fase por mais um dia na condição com adição combinada. Já com a célula produtora, as condições de adição de FC não afetaram a duração da fase exponencial exceto pela adição isolada de TGF- $\beta$ 1, que prorrogou o seu começo em 1 dia. Convém mencionar que a falta de replicatas biológicas dessas condições de cultivo torna as observações feitas aqui carentes de devida comprovação.

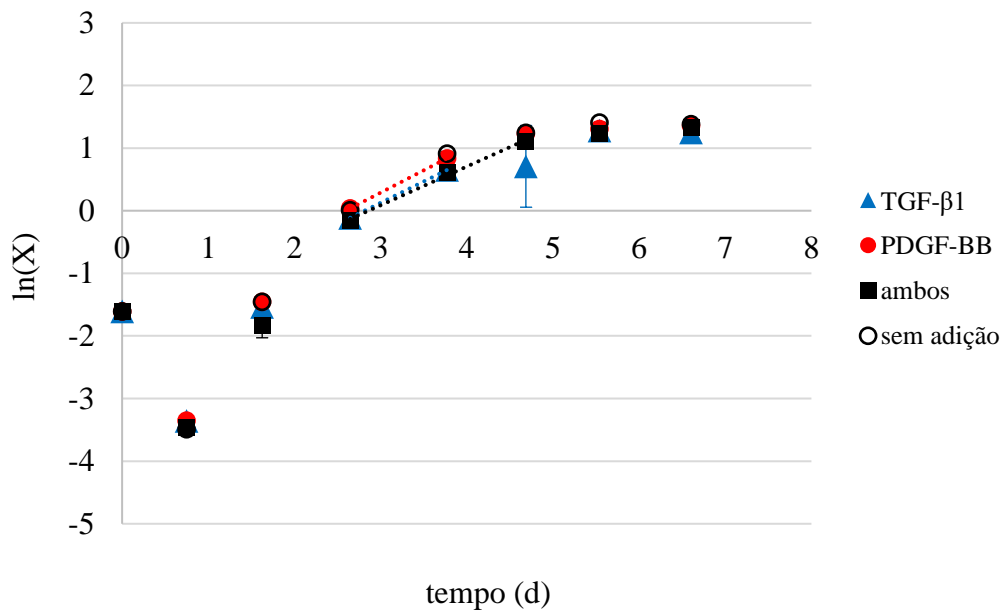


Figura 27 -  $\ln(X)$  de células CHO parentais em 3,5% SFB com e sem adição de FC  
Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

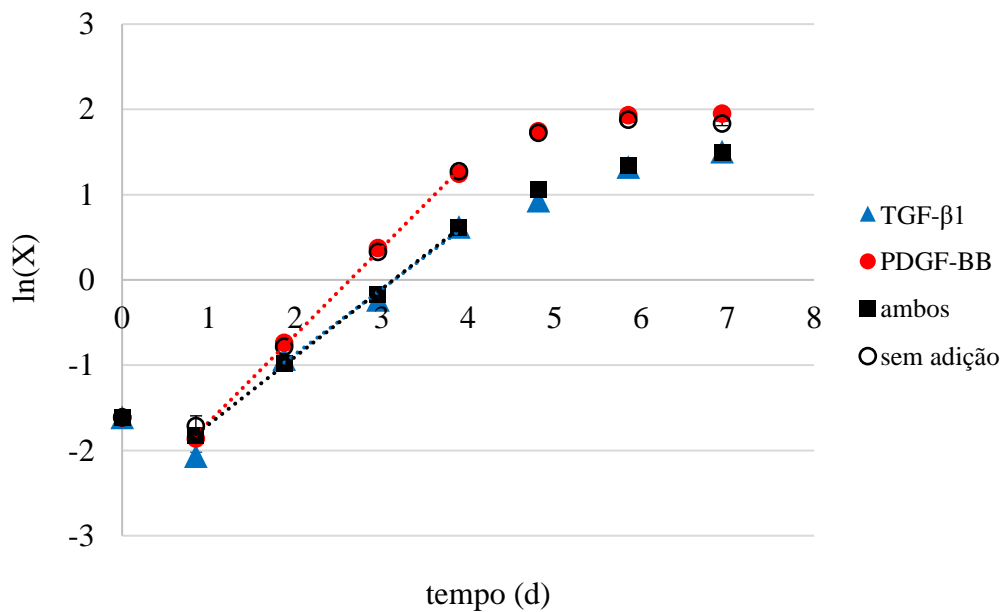


Figura 28 -  $\ln(X)$  de células CHO produtoras de TGF-β1 em 3,5% SFB e sem com adição de FC

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

### 5.4.2 Curvas de consumo de substrato

Assim como a adição exógena de FC não alterou significativamente o crescimento das células CHO parentais cultivadas em meio 3,5%, as curvas de concentração glicose se apresentaram praticamente idênticas (Figura 29). Já com o cultivo da CHO produtora nas condições de adição exógena contendo TGF- $\beta$ 1, observou-se um retardamento da depleção da glicose, o que vai ao encontro da redução do crescimento celular verificada nestas condições de cultivo (Figura 30).

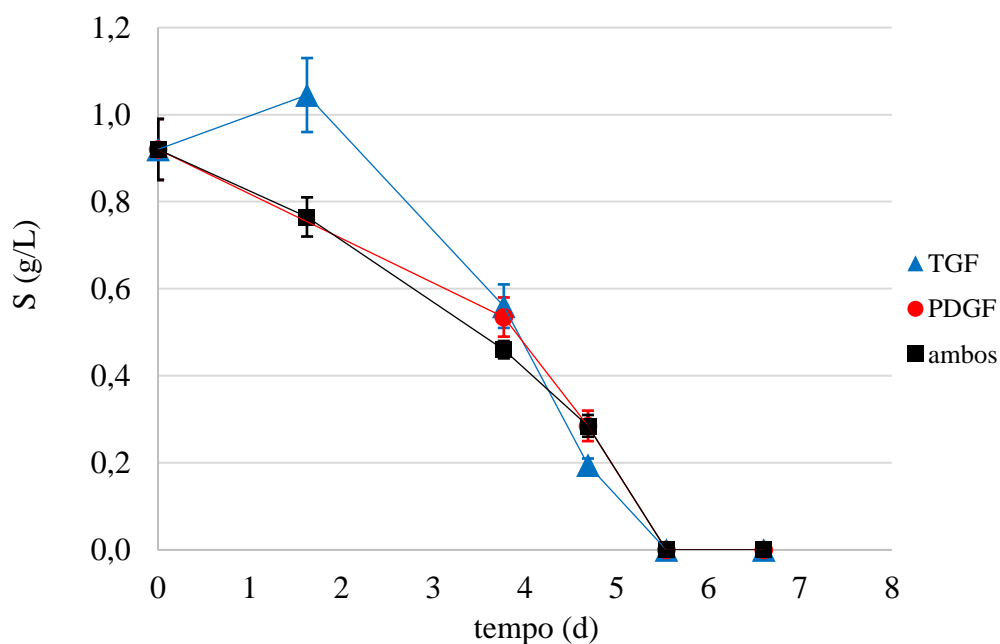


Figura 29 - Curvas de concentração de glicose em cultivos da CHO parental em 3,5% SFB com a adição de FC

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

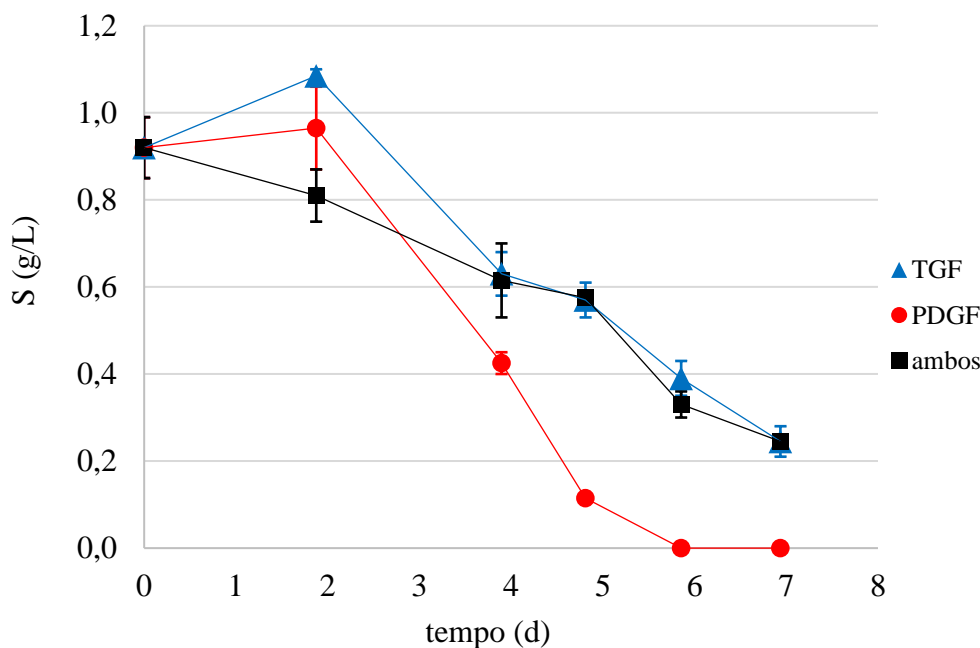


Figura 30 - Curvas de concentração de glicose em cultivos da CHO produtora em 3,5% SFB com a adição de FC

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

### 5.4.3 Curvas de concentração de TGF- $\beta$ 1

As Figuras 31 e 32 apresentam os níveis de concentração de TGF- $\beta$ 1 detectados em amostras do tempo 0 (controle de meio fresco 3,5% SFB sem adição exógena), 2, 4 e 6 dos cultivos com as células CHO parentais e produtoras em meio 3,5% SFB com adição exógena de 5 ng/mL de TGF- $\beta$ 1. Com a célula parental o desvio das medidas é alto e apenas a medida no último ponto pode ser considerada significativamente diferente do controle (nível de TGF- $\beta$ 1 no meio 3,5% SFB sem adição exógena;  $F(3, 7)=12,1$ ,  $p=0,018$ ), enquanto com a sublinhagem produtora os níveis de TGF- $\beta$ 1 nos últimos dois pontos são significativamente diferentes do controle ( $F(3, 7)=20,4$ ,  $p=0,007$ ) – vide capítulo 4.11.2.1 para tratamento estatístico.

A detecção de baixos níveis de TGF- $\beta$ 1 já no segundo dia de cultivo das células parentais e produtoras, apesar da adição de uma concentração calculada de 5 ng/mL no começo dos cultivos, poderia ser explicada tanto pela internalização e degradação por vias endossomais de receptores específicos à TGF- $\beta$ 1, quanto pela degradação química ou deformação estrutural da proteína dissolvida em caldo de cultura. Além disso a degradação do FC já na solução concentrada utilizada como fonte de TGF- $\beta$ 1 para adição exógena, devido ao tempo de armazenamento, assim como imprecisões no processo de diluição e

pipetagem também poderiam explicar o observado.

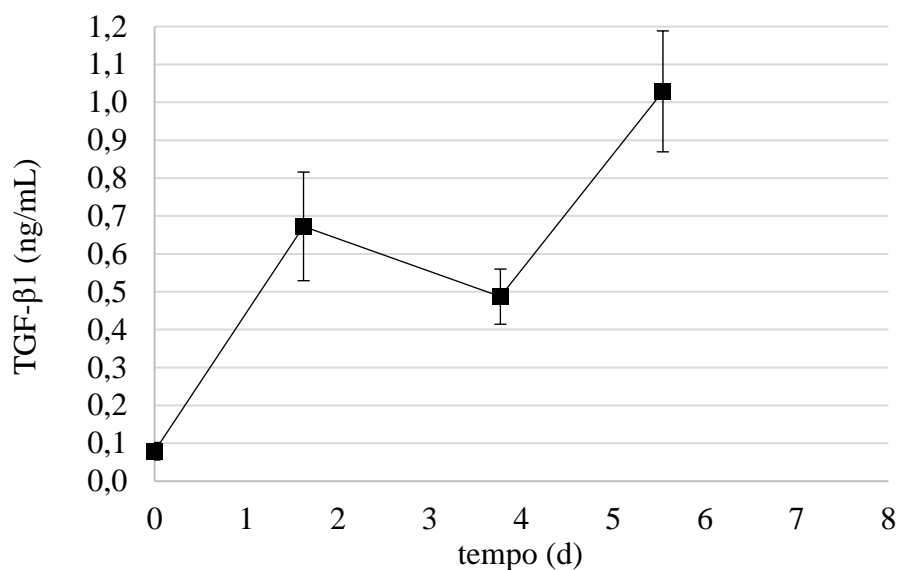


Figura 31 - Curvas de concentração de TGF-β1 no cultivo da CHO parental em meio com 3,5% SFB e adição exógena de TGF-β1

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 96 poços (replicata de ELISA) e, exceto controle, 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

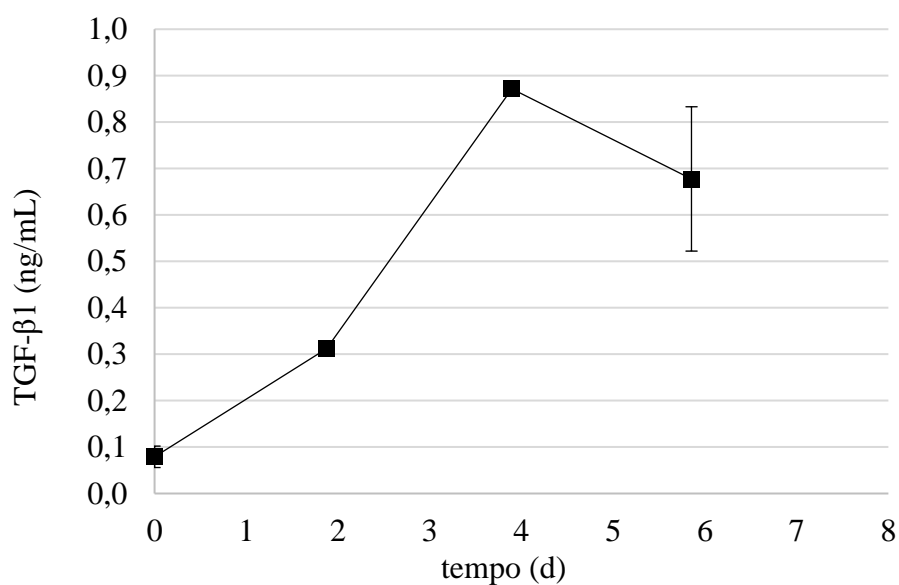


Figura 32 - Curvas de concentração de TGF-β1 no cultivo da CHO produtora em meio com 3,5% SFB e adição exógena de TGF-β1

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 96 poços (replicata de ELISA) e, exceto controle, 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).



#### 5.4.4 Análise de parâmetros cinéticos

As Figuras 33 e 34 apresentam os valores de  $\mu_{X_{MÁX}}$  determinados em cultivos das células CHO parentais e produtoras da terceira replicata biológica em meio 3,5% SFB, 3 condições de adição exógena de FC e em relação aos controles sem adição exógena. Não foram verificadas variações relevantes do  $\mu_{X_{MÁX}}$  de ambas linhagens nas condições de adição exógena estudadas.

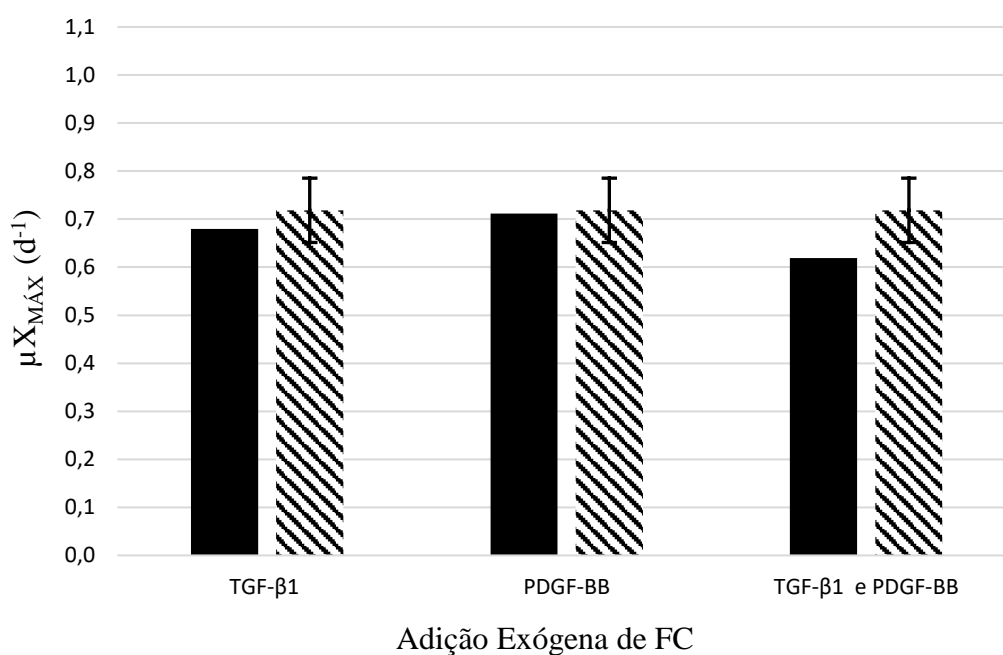


Figura 33 -  $\mu_{X_{MÁX}}$  da célula CHO parental em meio 3,5% SFB e 3 condições de adição exógena de FC

Coluna listrada: controle sem adição exógena. Coluna preta: condições de adição exógena. Barras de erro: desvio padrão de 3 cultivos independentes (replicata biológica).

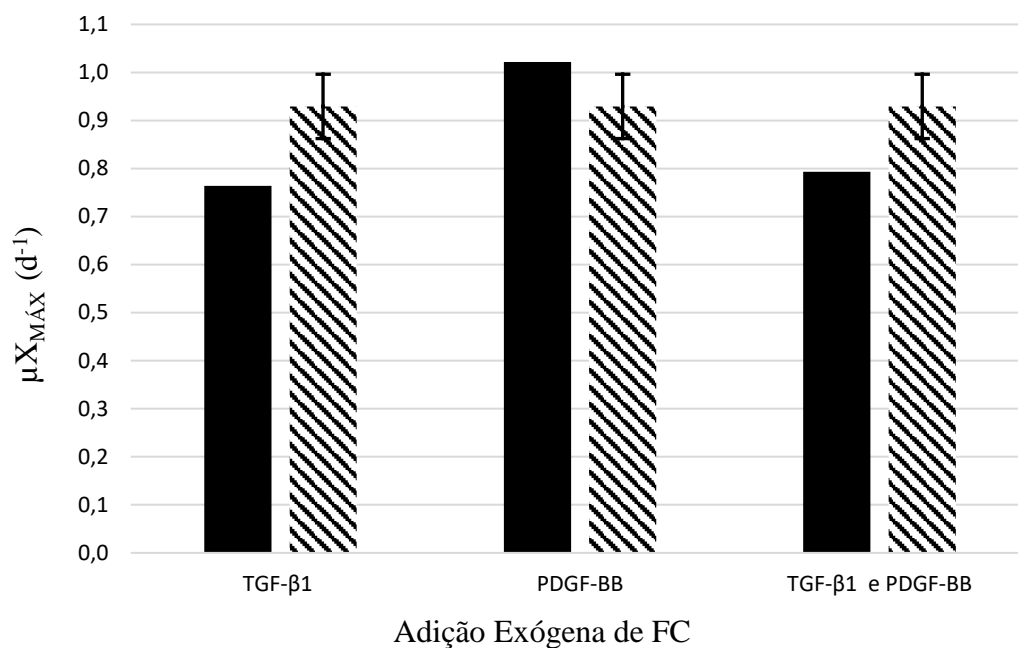


Figura 34 -  $\mu X_{MÁX}$  da célula CHO produtora em meio 3,5% SFB e 3 condições de adição exógena de FC

Coluna listrada: controle sem adição exógena. Coluna preta: condições de adição exógena. Barras de erro: desvio padrão de 3 cultivos independentes (replicata biológica).

Análises estatísticas revelaram não haver diferenças significativas entre o  $X_{MÁX}$  de células CHO parentais nas 3 condições de adição exógena estudadas e o controle, mas com a célula produtora, as condições contendo TGF- $\beta$ 1 diminuíram o  $X_{MÁX}$  de forma significativa em 35%, conforme a Figura 35 ( $F(3,7)=45,5$ ,  $p=0,0015$ ).

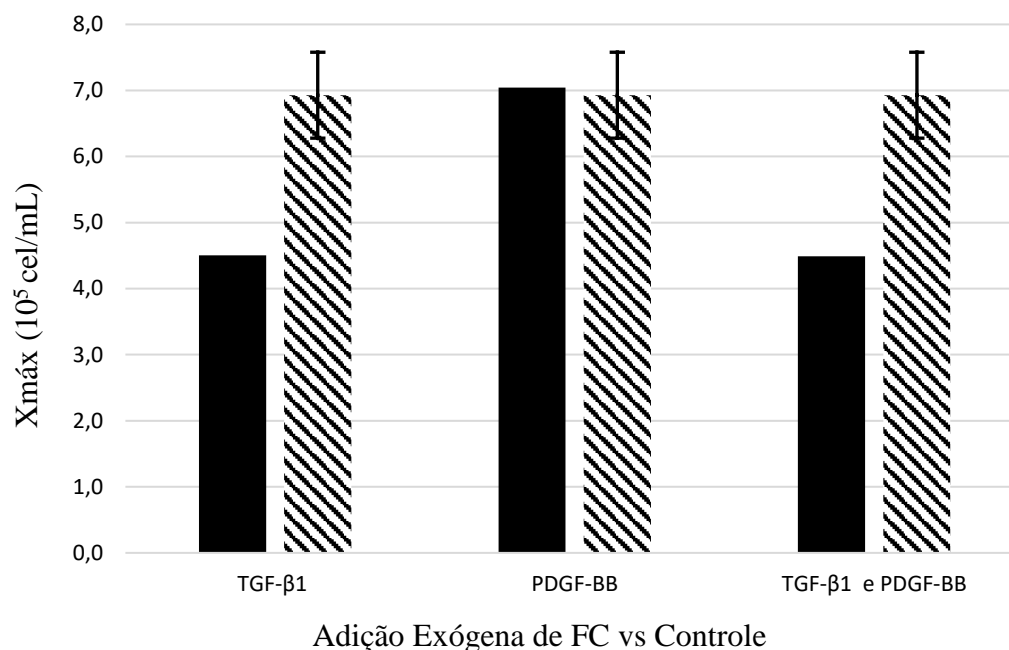


Figura 35 -  $X_{MÁX}$  da célula CHO produtora em meio 3,5% SFB e 3 condições de adição exógena de FC com relação ao controle

Coluna listrada: controle sem adição exógena. Coluna preta: condições de adição exógena. Barras de erro: desvio padrão de 3 cultivos independentes (replicata biológica).

## 5.5 CULTIVO DE CÉLULAS HEK EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO

### 5.5.1 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento obtidas para células HEK parentais e produtoras de PDGF-BB em 3 concentrações de SFB são apresentadas nas Figuras 36 e 37. Aqui são apresentadas as curvas médias obtidas a partir de triplicata biológica, enquanto as curvas de replicatas individuais são apresentadas nos apêndices C e D. Com ambas linhagens se verificou uma fase lag de 1 dia em todas condições de SFB, e as condições de 5 e 10% SFB promoveram de forma similar as melhores performances de crescimento, com a densidade celular atingindo um platô perto de  $10^6$  cel/mL já pelo 5º dia de cultivo. A condição com 2% SFB sustentou um crescimento contínuo ao longo dos 7 dias de cultivo até um  $X_{MÁX}$  de  $0,6 \cdot 10^6$  cel/mL, com a célula parental, e  $0,3 \cdot 10^6$  cel/mL com a célula produtora.

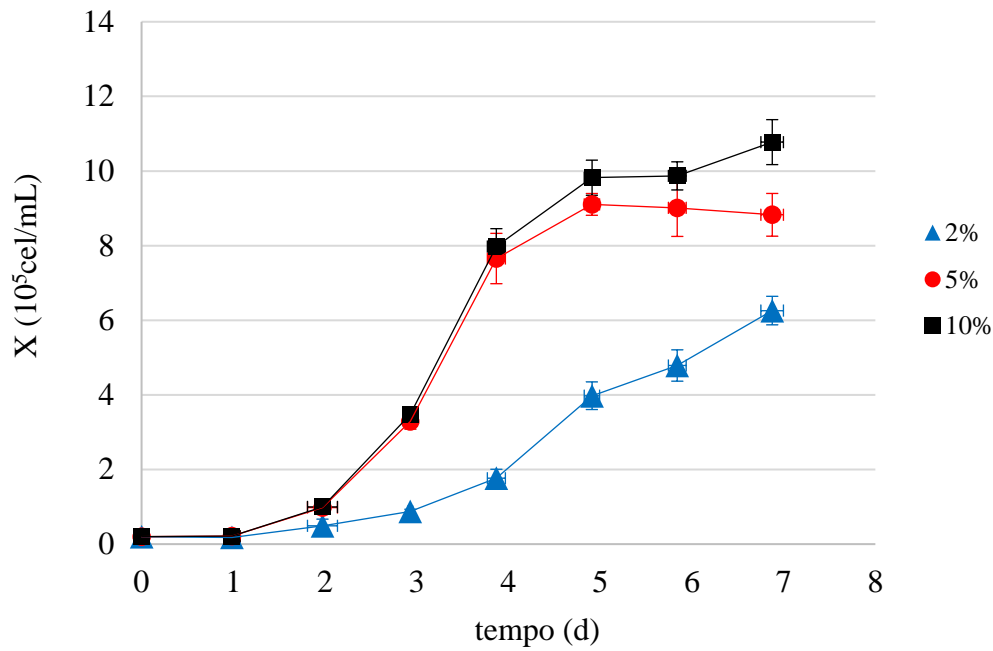


Figura 36 - Crescimento de células HEK parentais em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços<sup>4</sup> (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica).

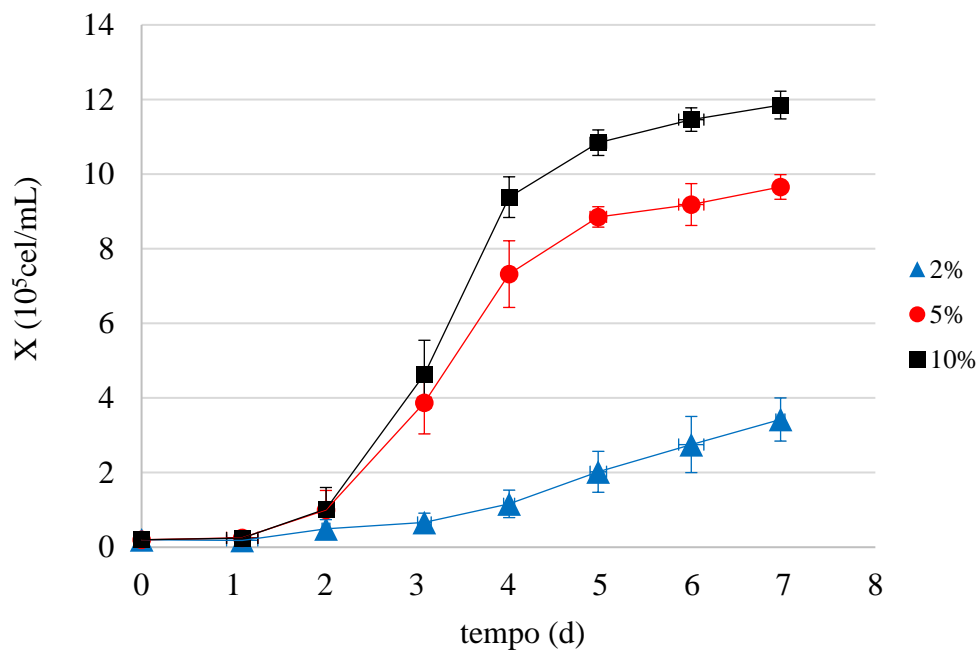


Figura 37 - Crescimento de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica) exceto que o último ponto da primeira replicata biológica não possui replicata de cultivo e os dois últimos pontos da terceira replicata biológica não possuem a condição 5% SFB.

As Figuras 38 e 39 apresentam as curvas  $\ln(X)$  para as células HEK parentais e produtoras cultivadas em diferentes concentrações de SFB, com linhas de tendência ajustadas entre os pontos considerados dentro da fase exponencial de crescimento. Estas curvas não foram, contudo, utilizadas para determinação do  $\mu_{X_{MÁX}}$ , sendo o valor médio deste parâmetro determinado a partir de curvas individuais para cada replicata biológica.

Com ambas linhagens as curvas de  $\ln(X)$  das condições 5 e 10% SFB indicam claramente fases exponenciais entre o segundo e quarto dia de cultivo, ainda que ao observar individualmente as curvas da primeira replicata biológica os pontos  $t=2$  não se ajustaram a tendência linear e não foram considerados para o ajuste das retas nestas replicatas (Apêndice C Figura 7). Com a célula parental a condição 2% SFB parece ter promovido uma fase exponencial de crescimento entre os pontos  $t=2$  e  $t=5$ , mas observando as replicatas individualmente, os pontos  $t=2$  não se ajustaram a tendência linear e não foram considerados como parte da fase exponencial de crescimento – ainda que na curva média o ponto tenha se ajustado perfeitamente. Com a célula produtora o ponto  $t=2$  médio da condição 2% SFB parece também indicar um início de fase exponencial, contudo a análise individual das replicatas biológicas também levou ao descarte dessa hipótese.

Esse atraso do início e prorrogação do fim da fase exponencial por 1 dia, verificado na condição 2% SFB com ambas linhagens parental e produtora, poderia ser explicado pela carência de estímulos proliferativos nesta condição de meio com baixa concentração de soro - o que parece não ter sido compensado pela expressão heteróloga de PDGF-BB na linhagem produtora. Este cenário pode ter atrasado o estabelecimento da eficiência metabólica máxima das células característica da fase exponencial de crescimento, e, levando a uma densidade celular mais baixa, pode ter postergado a depleção de nutrientes essenciais, assim como o acúmulo de subprodutos metabólicos tóxicos, a níveis críticos no meio de cultura – fatores comumente associados ao término da fase exponencial de crescimento.

Para ambas linhagens HEK cultivadas nas três condições de concentração de SFB não foi possível a obtenção de dados consistentes de concentração de glicose pelo tempo.

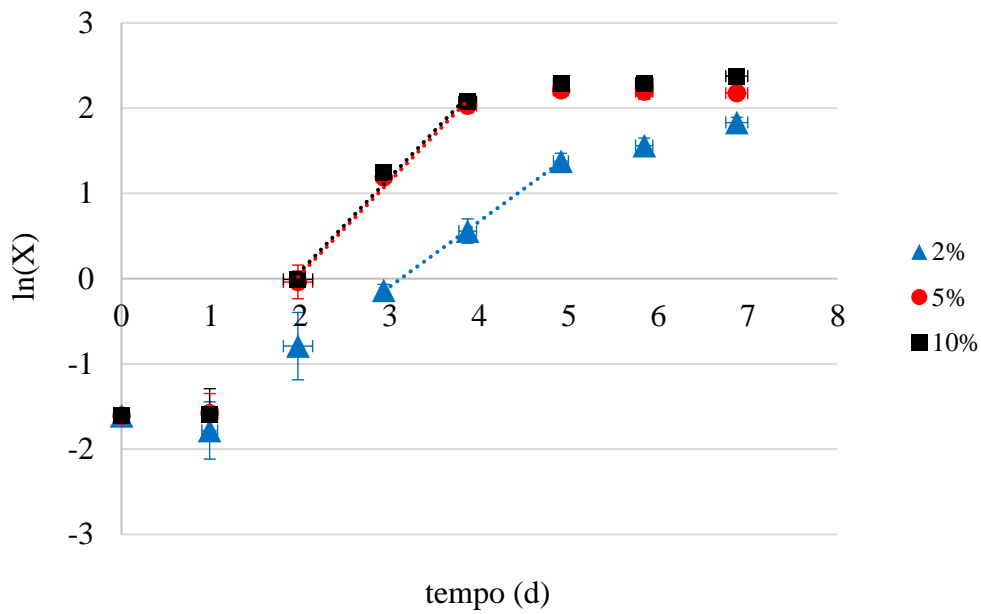


Figura 38 -  $\ln(X)$  de células HEK parentais em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica).

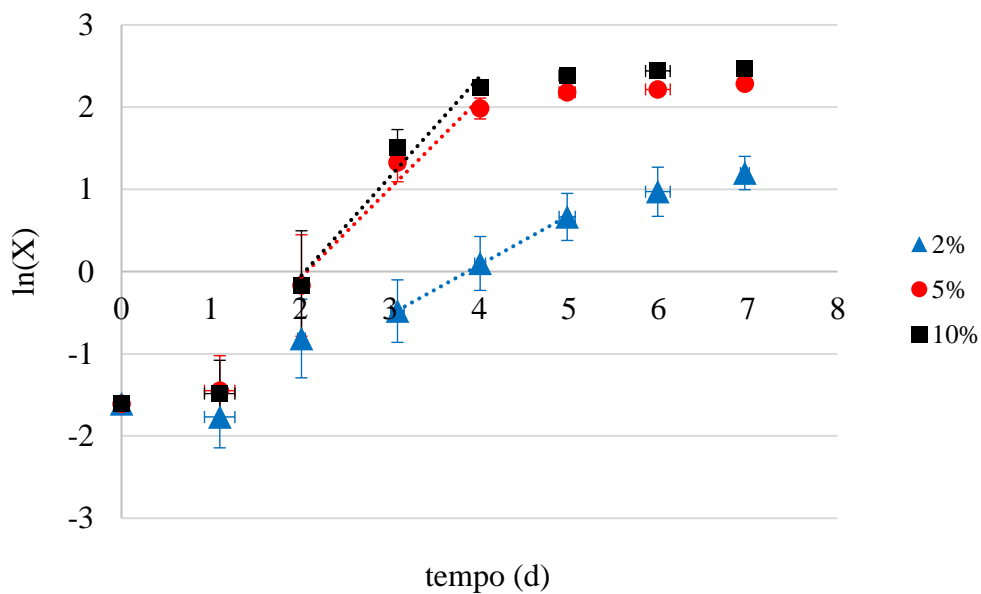


Figura 39 -  $\ln(X)$  de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica) exceto que o último ponto da primeira replicata biológica não possui replicata de cultivo e os dois últimos pontos da terceira replicata biológica não possuem a condição 5% SFB.

### 5.5.2 Curvas de formação de produto

Na Figura 40 são apresentadas as curvas concentração de PDGF-BB determinadas por ELISA para os cultivos em triplicata biológica com a célula HEK produtora em 3 concentrações de SFB, sendo as medidas no tempo zero relativas a amostras de meio fresco, servindo como controle. Tomando como referência os dados da concentração de PDGF-BB detectados em soro humano por WITZENEDER e colaboradores (2013), em meio 10% SFB haveria uma concentração de 0,25 ng/mL de PDGF-BB – valor bem próximo de 0,33 ng/mL conforme detectado no presente estudo para soro de origem bovina –, enquanto, considerando o dado relatado por MORAES; MENDONÇA, SUAZO (2001), haveria 4-6 ng/mL – porém não foi especificado por estes autores a isoforma do FC e nem a origem do soro (vide Tabela 9, capítulo 5.2).

Aqui, alguns dados considerados imprecisos (levando a um CV maior que 50%) não foram levados em conta para construção das curvas: uma replicata de cultivo em  $t=7$  na condição 2% SFB da 2ª replicata biológica, outra em  $t=2$  na condição 2% da 3ª replicata biológica, e uma replicata de ELISA em  $t=5$  nas condições 5 e 10% SFB da 2ª replicata biológica. Testes estatísticos (capítulo 4.11.3.1) revelaram que a concentração do produto sofreu um efeito de interação das variáveis concentração de SFB e tempo de cultivo ( $F(8, 30)=17,8$ ,  $p=2.10^{-9}$ ), sendo significativamente diferente do controle apenas nos 2 últimos pontos das condições 2% e 10% SFB, e nos últimos 3 pontos da condição 5% SFB.

Ao quinto dia de cultivo a concentração de PDGF-BB no cultivo em meio 2% SFB já é significativamente inferior à dos cultivos em 5% e 10% SFB, e no sétimo e último dia é verificada a maior concentração de produto ( $P_{MÁX}$ ) nas 3 condições de soro estudadas, apresentando uma relação diretamente proporcional à esta variável, conforme Figura 41. A redução da concentração padrão de 10% SFB no meio de cultura pela metade provocou uma diminuição de 27% no  $P_{MÁX}$  de 42,6 ng/mL da HEK produtora, e a concentração de 2% SFB (80% menor que o padrão) levou a uma diminuição de 64% do parâmetro. O teor de PDGF-BB em  $ng/10^6 cel$  determinado em cada concentração de SFB ao quinto e sétimo dia de cultivo é apresentado na Figura 42.

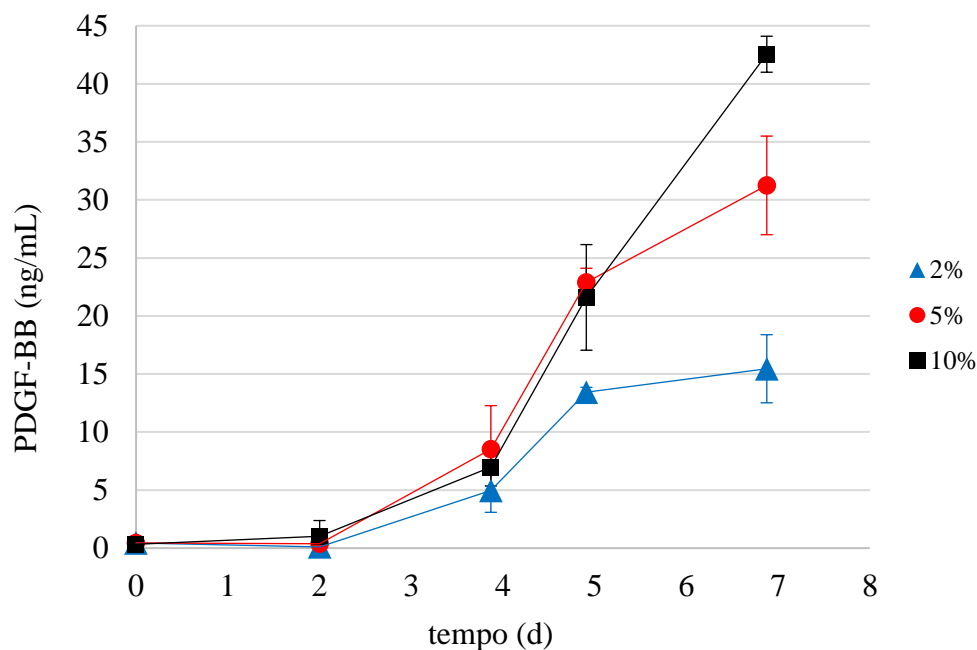


Figura 40 - Curvas de concentração de PDGF-BB em cultivos da HEK produtora em 3 concentrações de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 96 poços (replicata de ELISA), 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica) exceto 1ª replicata biológica não possui replicata de cultivo (condições da primeira placa de ELISA), 3ª replicata biológica não possui últimos 2 pontos (devido a um comprometimento geral da terceira placa de ELISA), e 2ª replicata biológica não possui replicata de cultivo nos pontos t=2 e t=4 (condições específicas da placa teste de ELISA).



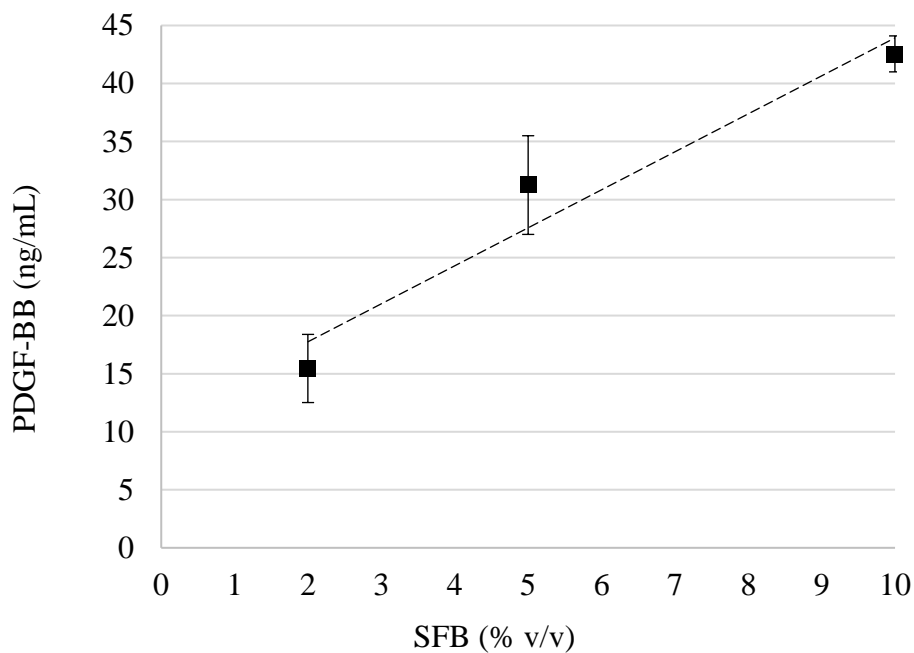


Figura 41 -  $P_{MÁX}$  da célula HEK produtora de PDGF-BB em função da concentração de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 96 poços (replicata de ELISA) e 2 cultivos independentes (replicata biológica) exceto condições 5% e 10% SFB da segunda replicata biológica que incluem também 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).

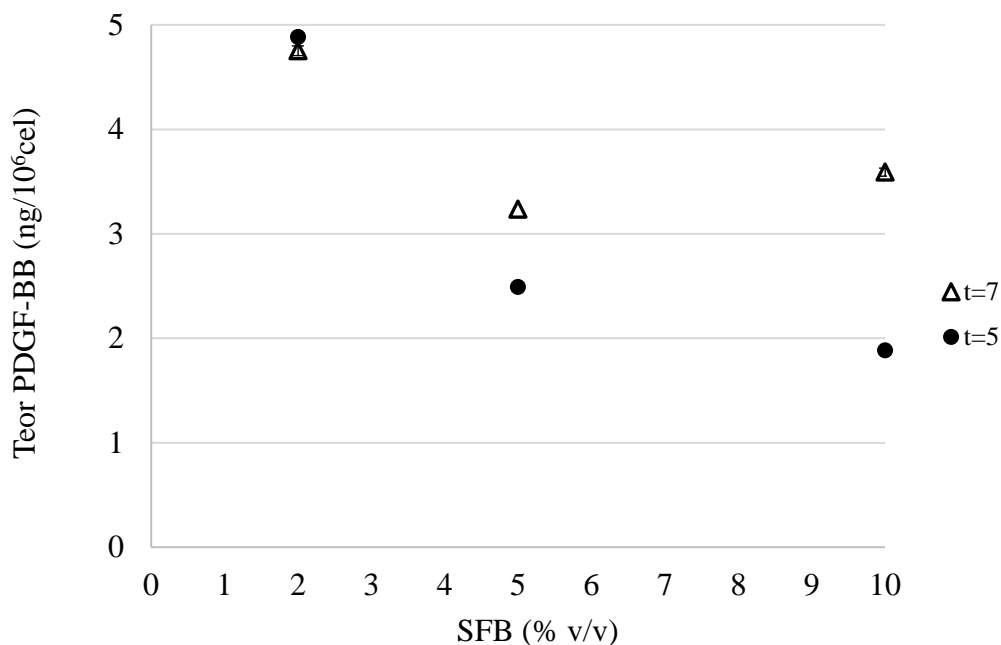


Figura 42 - Teor de PDGF-BB na célula HEK produtora em função das concentrações de SFB ao quinto e sétimo dia de cultivo

Comparando a curva de crescimento da célula produtora (Figura 37) com a curva de formação de produto (Figura 40), não é possível afirmar que a formação do produto se dê apenas de forma associada ao crescimento. Desse modo, não é possível simplificar o modelo cinético de formação de produto Luedeking-Piret para determinação simplificada do  $\mu_P$  e, portanto, o parâmetro não foi determinado.

Curvas de concentração de PDGF-BB foram obtidas também para a terceira replicata biológica do cultivo da célula HEK parental em meio 10% SFB, e os resultados ficaram todos abaixo do nível de PDGF-BB determinado no controle (meio fresco).

### 5.5.3 Análise de parâmetros cinéticos

A Figura 43 apresenta os valores de  $\mu_{X_{MÁX}}$  determinados para células HEK parentais e produtoras em função da concentração de SFB. Um valor de  $\mu_{X_{MÁX}}$  praticamente idêntico de quase  $1 \text{ d}^{-1}$  foi verificado para ambas linhagens parentais e produtoras quando cultivadas na condição padrão de 10% SFB, e também na condição 5% SFB. Não foi verificado efeito de interação entre as variáveis independentes e apenas a variação de SFB provocou alterações significativas no  $\mu_{X_{MÁX}}$  ( $F(2, 12)=19,32, p=0,0002$ ). Com ambas linhagens a concentração de 2% SFB resultou em  $\mu_{X_{MÁX}}$  significativamente diferente do observado nas demais condições de SFB, sendo cerca de 20% menor na linhagem parental e 30% menor na produtora.

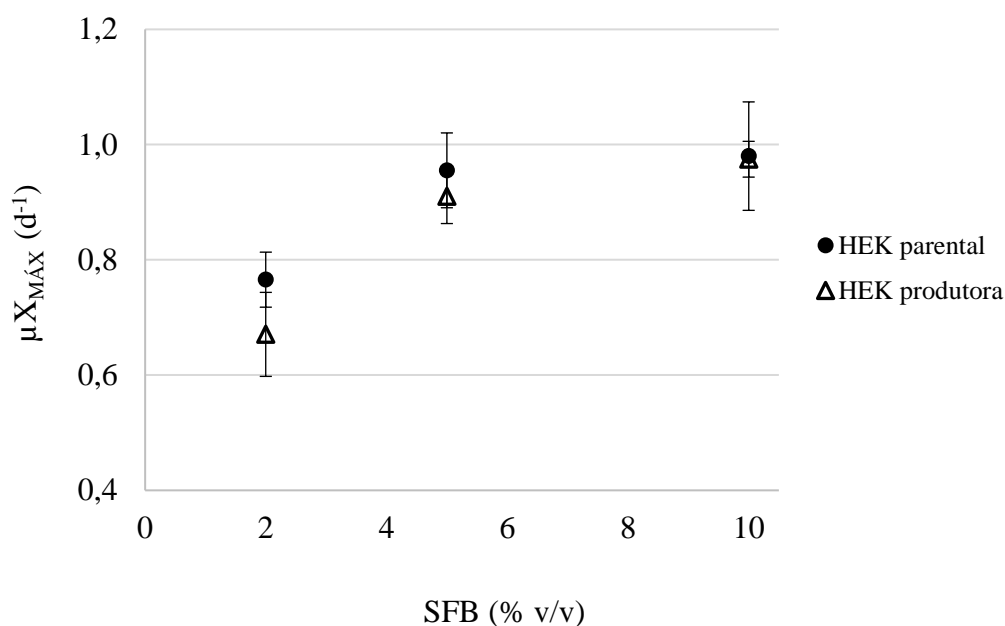


Figura 43 -  $\mu_{X_{MÁX}}$  de células HEK em função da concentração de SFB

Barra de erro: desvio padrão de dados obtidos em 3 replicatas biológicas.

A Figura 44 mostra a variação de  $X_{MÁX}$  nos cultivos com células HEK parentais e produtoras em diferentes concentrações de SFB. O efeito do SFB sobre o  $X_{MÁX}$  se assemelha ao observado para o  $\mu X_{MÁX}$ , destacando-se uma redução expressiva de 3 vezes do  $X_{MÁX}$  da sublinhagem produtora na condição 2% SFB com relação ao verificado em 10% SFB. Foi verificado um efeito de interação entre as variáveis independentes ( $F(2, 12)=21,37, p=0,0001$ ), e diferenças significativas, para célula parental, entre condição 2% SFB e demais, para produtora, entre todas condições de soro, e entre sublinhagens na condição 2% SFB.

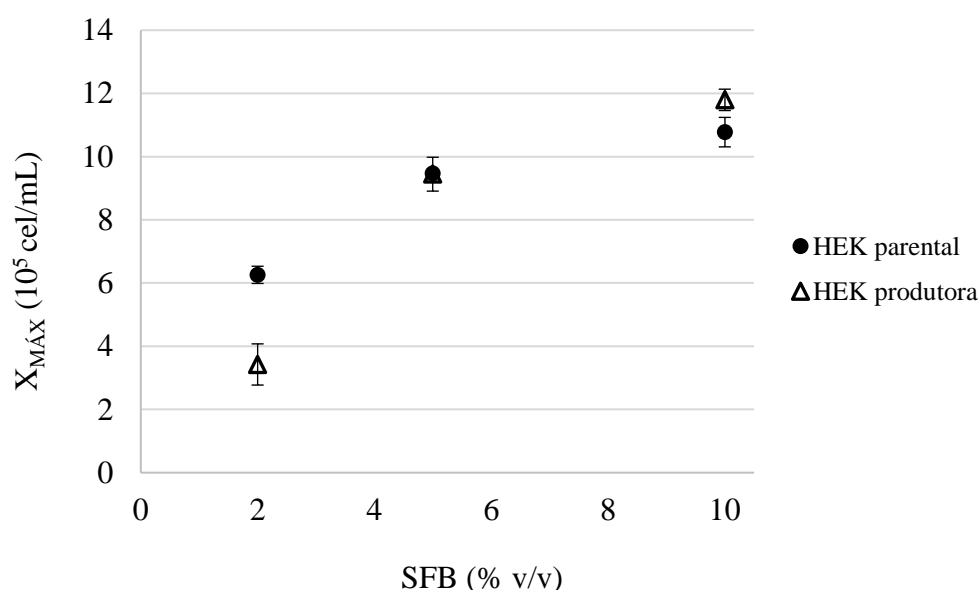


Figura 44 -  $X_{MÁX}$  de células HEK em função da concentração de SFB

Barras de erro: desvio padrão de 3 cultivos independentes (replicata biológica).

## 5.6 CULTIVO DE CÉLULAS HEK COM ADIÇÃO EXÓGENA DE FATOR DE CRESCIMENTO

### 5.6.1 Curvas de crescimento

Na Figura 45 são apresentadas as curvas de crescimento médias obtidas com a célula HEK parental a partir de cultivos em triplicata nas 3 condições de adição exógena de FC. As diferentes condições com FC exógeno parecem ter provocado efeitos similares de estimulação proliferativa sobre a célula HEK parental em 2% SFB, com o  $X_{MÁX}$  controle (condição sem adição) sendo ultrapassado já pelo 5º dia, mantendo-se então mais ou menos constante. Já a adição de FC exógeno à célula produtora na terceira replicata biológica do

cultivo em meio 2% SFB (Figura 46) não provocou grandes efeitos sobre o crescimento da célula, exceto com a adição de ambos FC, o que levou a um dobramento do  $X_{MÁX}$ .

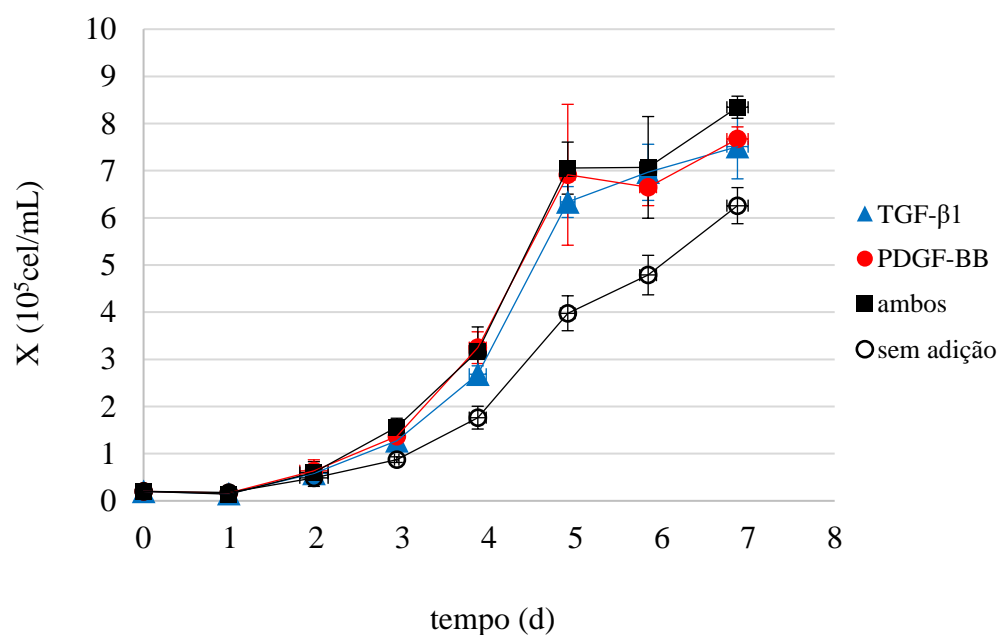


Figura 45 - Crescimento de células HEK parentais em 2% SFB com e sem adição de FC  
Barras de erro: desvio padrão de 2 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica) exceto ponto  $t=7$  que não conta com a terceira replicata biológica.

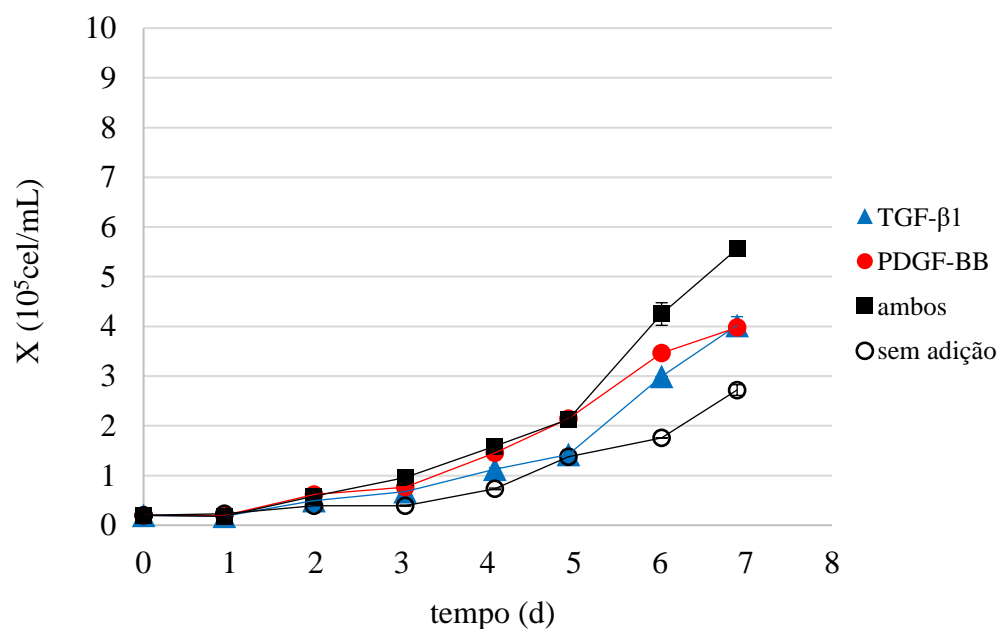


Figura 46 - Crescimento de células HEK produtoras de PDGF-BB em 2% SFB com e sem adição de FC

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços (replicata de cultivo).

A Figura 47 apresenta as curvas médias de  $\ln(X)$  para a célula HEK parental em meio 2% SFB nas diferentes condições de adição exógena de FC, com linhas de tendência ajustadas entre os pontos considerados dentro da fase exponencial de crescimento (condição sem adição incluída na figura como controle). Nas 3 condições de adição exógena de FC verificou-se com a célula parental a regularização do início da fase exponencial de crescimento das células em meio 2% SFB, começando ao mesmo tempo que nas condições 5 e 10% SFB, mas ainda se estendendo até o ponto  $t=5$ .

Para as células produtoras cultivadas em meio 2% SFB sem adição exógena, foi observada uma fase exponencial de crescimento entre os pontos  $t=3$  e  $t=5$ , então, conforme a Figura 48, ao se adicionar FC exógeno vê-se a prorrogação do fim da fase exponencial por mais um dia com a adição individual de PDGF-BB, e uma extensão para o intervalo entre  $t=2$  e  $t=7$  na condição com adição individual de TGF- $\beta$ 1 e de adição combinada de ambos FC. Para as condições de adição exógena com ambas linhagens HEK não foi possível a obtenção de dados consistentes de concentração de glicose pelo tempo.

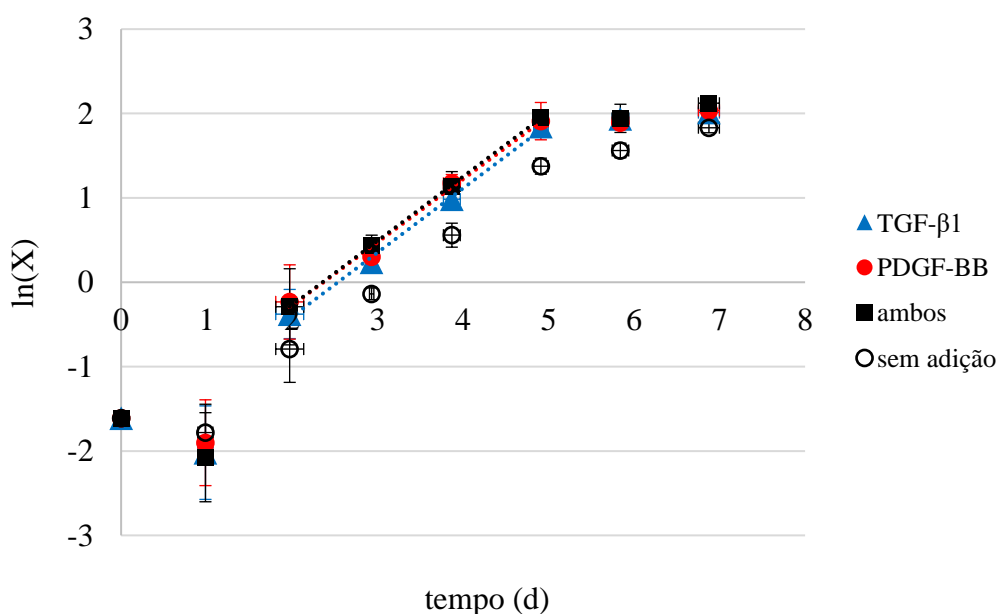


Figura 47 -  $\ln(X)$  de células HEK parentais em 2% SFB com e sem adição de FC

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços (replicata de cultivo) e 3 cultivos independentes (replicata biológica) exceto terceira replicata biológica que não conta com o ponto  $t=7$ .

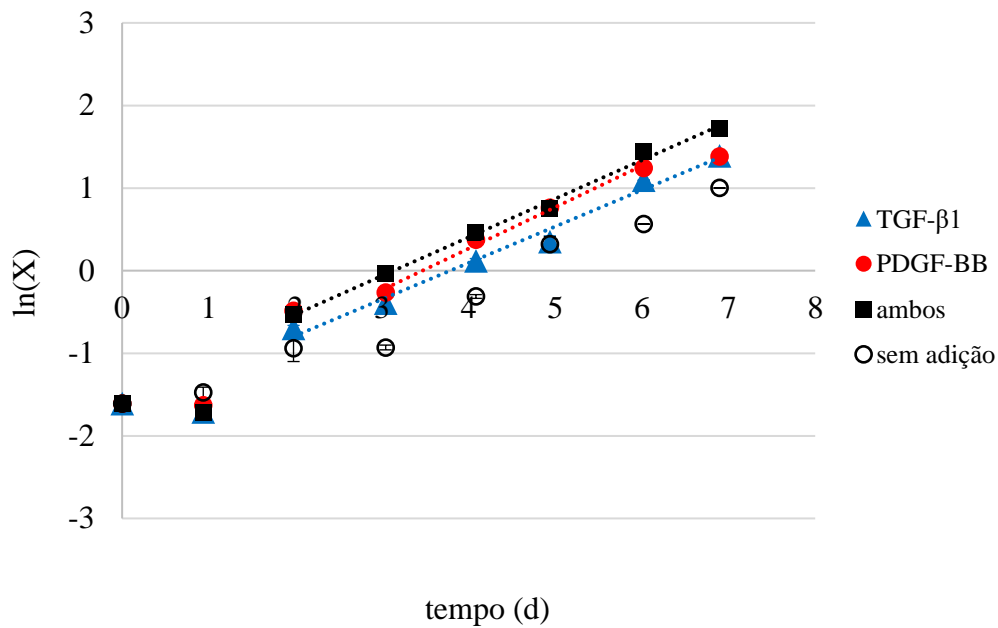


Figura 48 -  $\ln(X)$  de células HEK produtoras de PDGF-BB em 2% SFB com e sem adição de FC

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços (replicata de cultivo).

### 5.6.2 Curvas de concentração de PDGF-BB

Na Figura 49 é apresentada a variação da concentração de PDGF-BB pelo tempo na terceira replicata biológica do cultivo da célula HEK parental em meio 2% SFB com adição isolada de 25 ng/mL de PDGF-BB, sendo que apenas o valor em  $t = 4$  se mostrou significativamente diferente do controle (meio 2% SFB sem adição exógena;  $F(2,5)=307,3$ ,  $p=0,0003$ ). De forma similar ao verificado com a adição exógena de TGF- $\beta$ 1 na célula CHO (capítulo 5.4.3), os baixos níveis de PDGF-BB detectados aqui sugerem uma rápida degradação do FC no meio de cultura ou imprecisões nas etapas de diluição e aplicação de alíquotas.

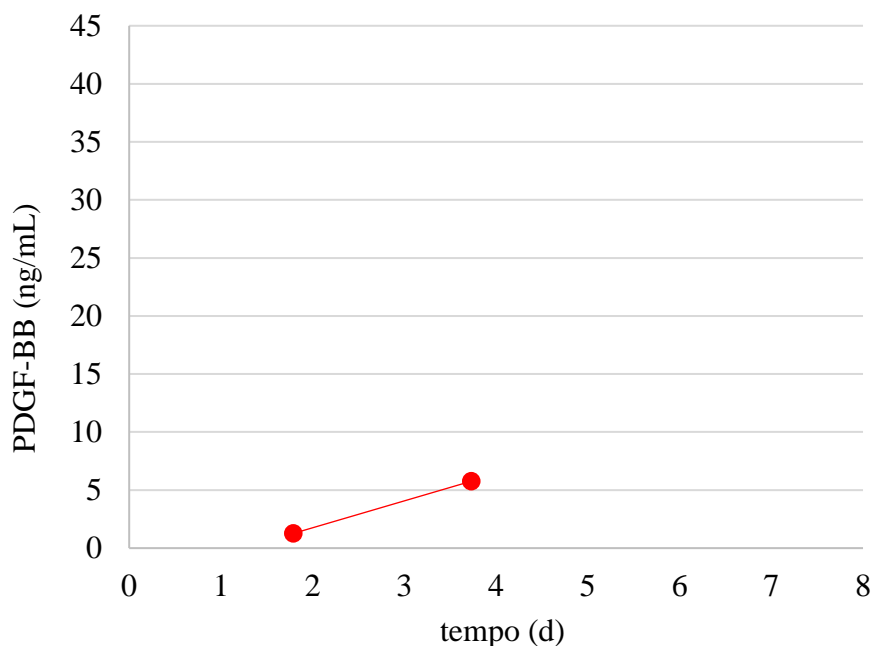


Figura 49 - Curvas de concentração de PDGF-BB no cultivo da HEK parental em meio com 2% SFB com adição exógena de PDGF-BB

Barras de erro: desvio padrão de 2 poços da placa de 96 poços (replicata de ELISA) e 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo); ponto t=6 não pôde ser aproveitado devido a um comprometimento geral da terceira placa de ELISA.

### 5.6.3 Análise de parâmetros cinéticos

Os valores de  $\mu X_{MÁX}$  e  $X_{MÁX}$  determinados para as células HEK parentais cultivadas em triplicata em meio 2% SFB com 3 condições de adição exógena de FC não se mostraram significativamente diferentes do controle (meio 2% SFB sem adição exógena).

As Figuras 50 e 51 apresentam os valores de  $\mu X_{MÁX}$  e  $X_{MÁX}$  determinados em cultivos das células HEK produtoras da terceira replicata biológica em meio 2% SFB, 3 condições de adição exógena de FC e em relação aos controles sem adição exógena. Conforme indicado pela Figura 50, foi observado um decréscimo de pelo menos 20% no  $\mu X_{MÁX}$  nas 3 condições de adição exógena avaliadas, já de acordo com a Figura 51, a condição de adição combinada de ambos FC leva a um  $X_{MÁX}$  significativamente superior ao controle.

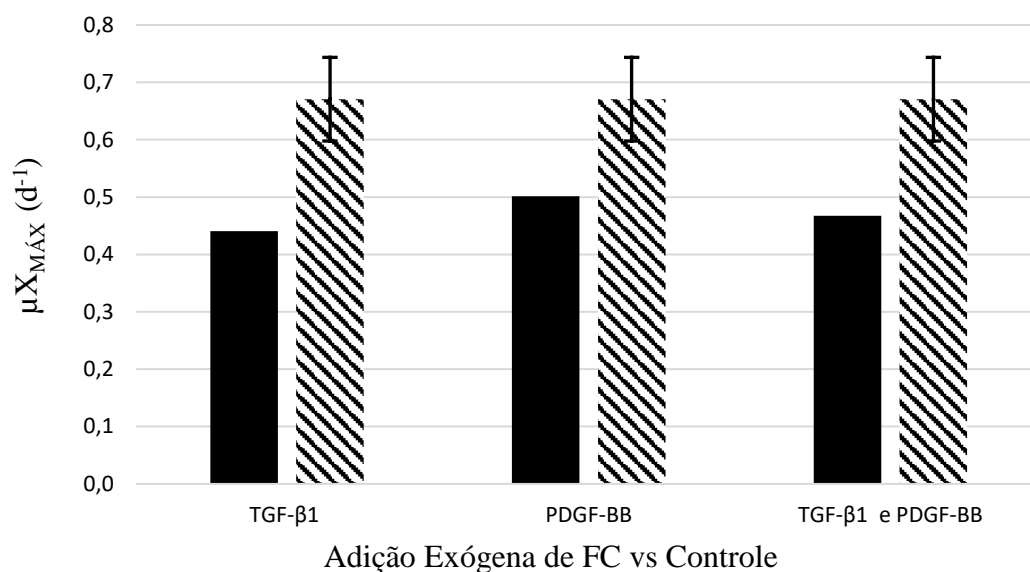


Figura 50 -  $\mu X_{MÁX}$  da célula HEK produtora em meio 2% SFB e 3 condições de adição exógena de FC

Coluna listrada: controle sem adição exógena. Coluna preta: condições de adição exógena. Barras de erro: desvio padrão de 3 cultivos independentes (replicata biológica).

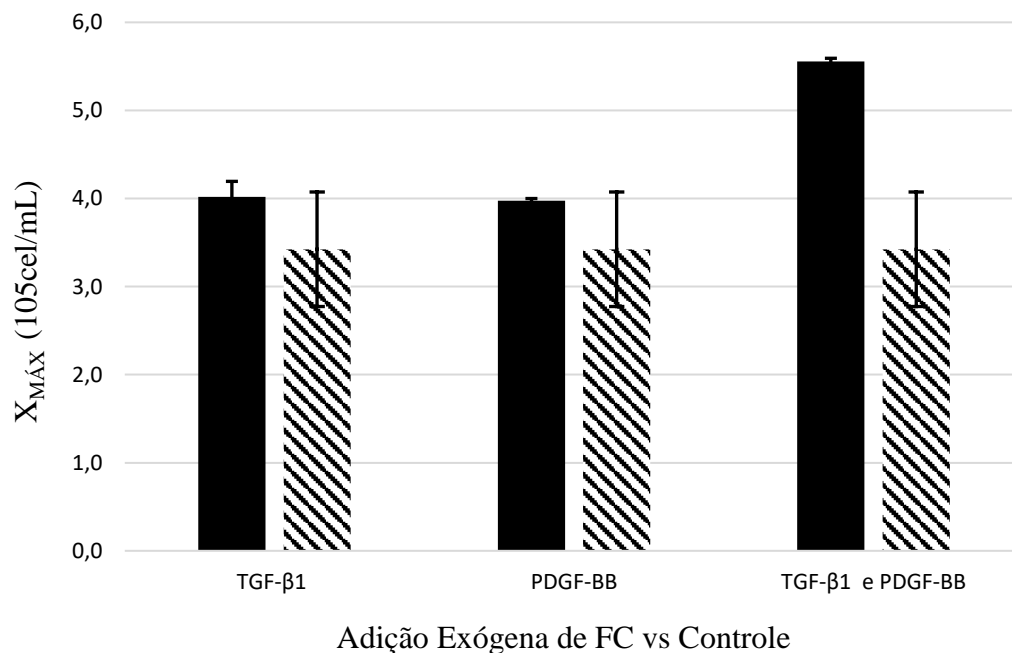


Figura 51 -  $X_{MÁX}$  da célula HEK produtora em meio 2% SFB e 3 condições de adição exógena de FC

Coluna listrada: controle sem adição exógena. Coluna preta: condições de adição exógena. Barras de erro: no controle, desvio padrão de 3 cultivos independentes (replicata biológica) e nas demais condições desvio padrão de 2 poços da placa de 24 poços (replicata de cultivo).



## 5.7 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS CHO E HEK ADERENTES

Para fins de comparação com os dados obtidos no presente trabalho, a Tabela 10 apresenta valores dos parâmetros  $\mu X_{MÁX}$  e  $X_{MÁX}$  levantados da literatura para células CHO e HEK aderentes, sendo verificada uma escassez de estudos cinéticos de cultivos em monocamada.

Célula	Meio de Cultura		Sistema de Cultivo	$\mu X_{MÁX}$ (d <sup>-1</sup> )	$X_{MÁX}$ (10 <sup>6</sup> cel/mL)	Referência
	Meio Basal	SFB (%)				
CHO-K1	DMEM/F12	5	monocamada	0,40	1,10	KUYSTERMANS; AL-RUBEAI, 2009
CHO-K1	DMEM	10	microcarregador e frasco <i>spinner</i>	0,67	2,76	SWIECH <i>et al.</i> , 2007
CHO-K1	F-12K	10	microcarregador e frasco <i>spinner</i>	0,81	1,95	JALURIA <i>et al.</i> , 2007
HEK293	DMEM	10	microcarregador e frasco <i>spinner</i>	0,73	1,98	JALURIA <i>et al.</i> , 2007

Tabela 10 - Valores de  $\mu X_{MÁX}$  e  $X_{MÁX}$  levantados na literatura para células CHO e HEK

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO EM CONDIÇÕES PADRÃO DE CULTIVO

Um valor de  $\mu X_{MÁX}$  de aproximadamente  $1 \text{ d}^{-1}$  foi verificado para células CHO e HEK parentais e produtoras de FC quando cultivadas em concentração padrão de SFB - 7% para CHO e 10% para HEK. O cultivo das linhagens HEK parental e produtora, e da CHO parental nestas condições padrão de SFB resultou em um parâmetro de  $X_{MÁX}$  de aproximadamente  $10^6 \text{ cel/mL}$ , valor 17% maior que o observado com a CHO produtora.

Em comparação ao valor de  $\mu X_{MÁX}$  de  $0,40 \text{ d}^{-1}$  reportado por Kuystermans e Al-Rubeai (2009) para células CHO cultivadas em monocamada em meio 5% SFB, o  $\mu X_{MÁX}$  determinado no presente trabalho para a mesma linhagem é semelhante já em cultivos contendo 1,4% SFB, e 60% maior em cultivos com 7% SFB. No entanto, um valor de  $X_{MÁX}$  comparável ao reportado pelos autores foi verificado no presente estudo apenas em cultivos com 7% SFB. O cultivo das células com microcarregadores e frasco *spinner* oferece uma grande vantagem sobre o crescimento em monocamada pelo aumento da área de superfície de adesão disponível para propagação celular, fator crucial para o parâmetro  $X_{MÁX}$  – de modo que os valores obtidos aqui são pelo menos duas vezes menores que os relatados pelos autores – mas não para o  $\mu X_{MÁX}$  – sendo os valores reportados pelos autores inferiores aos obtidos para células CHO e HEK no presente estudo.

### 6.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TGF- $\beta$ 1 E PDGF-BB EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

O  $P_{MÁX}$  em cultivos com a célula HEK produtora apresentou relação diretamente proporcional à concentração de SFB no meio, chegando na condição padrão de 10% SFB à  $42,6 \text{ ng/mL}$ , valor cerca de 50% maior que a expressão natural de PDGF-BB por algumas linhagens celulares tumorais, e pelo menos 100 vezes menor que o já reportado com a produção da isoforma PDGF-AA por células de mamífero (EICHNER *et al.*, 1989).

Ao sétimo dia de cultivo foi atingido com a célula CHO produtora nas condições 3,5% e 7% SFB um teor de cerca de  $1 \text{ ng TGF-}\beta 1/10^6 \text{ cel}$ , o que corresponde a um  $P_{MÁX}$  de quase  $1 \text{ ng/mL}$ . Este valor é pelo menos  $10^3$  menor que os apresentados na Tabela 4 (capítulo 3.4.3) para sistemas de expressão similares, porém aqueles foram obtidos a partir da manutenção de cultivos confluentes em meio fresco sem soro por alguns dias para

acúmulo do FC recombinante, o que é dificultada a comparação direta entre resultados. Este valor de  $P_{MÁX}$  verificado aqui corresponde à concentração do FC relatada anteriormente para meios de cultura suplementados com 10% SFB (DANIELPOUR *et al.*, 1989; OIDA; WEINER, 2010), ainda que para condição controle de meio fresco com 7% SFB tenha sido determinada aqui uma concentração de 0,2 ng/mL.

Se o teor de TGF- $\beta$ 1 de cerca de 1 ng/10<sup>6</sup> cel detectado ao final do cultivo ( $t = 7$ ) para as condições 3,5 e 7% SFB fosse constante ao longo do cultivo e entre diferentes concentrações de soro, a partir de  $t = 4$  não seria possível diferenciar significativamente a concentração de produto do controle nas condições 2% e 7% SFB, e em nenhuma das condições em  $t = 2$ . Porém como não foram observados níveis de P significativos para as diferentes concentrações de soro ainda no 5º dia de cultivo, supõe-se que o teor de produto tenha aumento com o tempo de cultivo e com a saída da fase exponencial de crescimento – o que condiz com a observação geral de que velocidade específica de crescimento e produtividade específica são inversamente proporcionais (AL-RUBEAI, 2015).

### 6.3 EFEITOS DA PRIVAÇÃO DE SFB, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ADIÇÃO EXÓGENA DE FC SOBRE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

#### 6.3.1 Célula HEK

Com a célula HEK a expressão heteróloga de PDGF-BB não levou a alterações significativas do  $\mu X_{MÁX}$  em nenhuma das concentrações de soro investigadas, sendo o valor do parâmetro afetado apenas pela condição 2% SFB, condição na qual verificou-se para a sublinhagem produtora um valor de  $X_{MÁX}$  45% menor, apesar de um acúmulo de 15,5 ng/mL PDGF-BB recombinante no meio condicionado. Já quando a célula produtora foi cultivada em meio 2% SFB com a adição exógena de 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 e 25 ng/mL PDGF-BB, o  $X_{MÁX}$  aumentou em mais de 60%. Isto sugere uma possível atividade inibitória para o PDGF-BB quando expresso constitutivamente em meio com baixa concentração de soro, efeito que seria regulado pela ação de outros FC presentes em condições de cultivo com maiores concentrações de soro ou com adição exógena. No estudo cinético com a célula HEK parental cultivada em meio 2% SFB, nenhuma condição de adição exógena de FC surtiu efeito significativo sobre o valor de  $\mu X_{MÁX}$  ou  $X_{MÁX}$ .

Nos ensaios de dose-resposta de adição exógena de FC com a célula HEK (capítulo 5.2) foi verificado aumento de 40% no  $X_F$  4 dias após inoculação em meio 1% SFB com

adição exógena de 25 ng/mL PDGF-BB. Isto parece ir de encontro ao observado com a adição exógena no estudo cinético, ou com decréscimo do  $X_{MÁX}$  observado com a expressão de 15,5 ng/mL PDGF-BB pela célula produtora em meio 2% SFB. Contudo, a adição exógena do FC em apenas um pulso no começo do cultivo, ou a exposição progressiva e prolongada das células ao PDGF-BB expresso de forma constitutiva, resultam em padrões de sinalização distintos sob as células, e como a regulação da proliferação por mitógenos costuma ser altamente dependente de contexto e da dimensão temporal, o significado da comparação direta entre estes resultados deve ser bem justificado.

Não foram encontrados relatos na literatura de atividade regulatória de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB sobre o crescimento de células HEK ou outras linhagens. Contudo, há resultados de quase dobramento do  $X_{MÁX}$  de células humanas LNCaP com a expressão heteróloga de PDGF-D (USTACH *et al.*, 2004), e de aumentos de 38% e 72% no  $\mu X_{MÁX}$  e  $X_{MÁX}$  de células CHO expressando c-myc, gene envolvido na regulação do ciclo celular e induzível por PDGF-BB (KUYSTERMANS; AL-RUBEAI, 2009; OSTER *et al.*, 2000).

### 6.3.2 Célula CHO

Com a célula CHO parental o  $X_{MÁX}$  apresentou uma relação diretamente proporcional à concentração de SFB no meio, e não foi afetado, assim como o  $\mu X_{MÁX}$ , pelas diferentes condições adição exógena de FC em meio 3,5% SFB. A relação direta entre  $X_{MÁX}$  e SFB em cultivos aderentes já foi há muito tempo observada no cultivo de células 3T3 de camundongo (HOOLEY; KIERNAN, 1968), quando ainda se supunha erroneamente que o fator limitante do  $X_{MÁX}$  fosse a saturação da superfície disponível para adesão e expansão celular. Ainda que nem a expressão heteróloga de TGF- $\beta$ 1 pela célula produtora nem a variação da concentração de SFB tenham afetado a duração da fase exponencial de crescimento da linhagem CHO, os resultados obtidos aqui evidenciam um efeito estimulador do TGF- $\beta$ 1 recombinante, que promoveu um aumento do  $\mu X_{MÁX}$  em relação inversamente proporcional à concentração de SFB no meio, e levou a valores de  $X_{MÁX}$  quase cinco vezes maior em meio 1,4% SFB, e duas vezes maior em meio 3,5% SFB.

O TGF- $\beta$ 1 recombinante parece exercer um efeito positivo sobre a performance de crescimento da célula produtora mesmo em meio 1,4% SFB, condição para a qual não foi possível dosar quantidades significativas do TGF- $\beta$ 1 por ELISA. Considerando o alcance de um  $X_{MÁX}$  razoável de  $4 \cdot 10^5$  cel/mL nestas condições de cultivo, supõe-se que o teor de produto deve ter diminuído em função da redução da concentração de SFB no meio, o que,

no entanto, não perturbou a capacidade do TGF- $\beta$ 1 fornecer estímulo proliferativo às células.

No estudo cinético com a célula CHO parental nenhuma condição de adição exógena de FC surtiu efeito significativo sobre os parâmetros de crescimento, mas com a sublinhagem produtora as condições contendo TGF- $\beta$ 1 provocaram uma diminuição de 35% no  $X_{MÁX}$ , o que se aproxima dos efeitos observados com a adição exógena de TGF- $\beta$ 1 sobre o  $X_F$  de células CHO parentais no ensaio de dose-resposta (capítulo 5.2). O contraste entre estes efeitos inibitórios do crescimento observados com a adição exógena de TGF- $\beta$ 1, e o efeito estimulador provocado pela expressão heteróloga do FC pode ser reflexo dos diferentes padrões de sinalização suscitados em cada circunstância. Ademais, o TGF- $\beta$ 1 adicionado de forma exógena passou por processo de ativação ácida, enquanto o FC expresso pelas células produtoras parece exercer atividade biológica independente disto, o que talvez também poderia contribuir para as diferenças observadas aqui.

O efeito verificado aqui, de incremento do  $\mu X_{MÁX}$  e do  $X_{MÁX}$  por TGF- $\beta$ 1 recombinante via mecanismo autócrino de sinalização em função da concentração SFB no meio é inédito, e indica uma boa direção de pesquisa para o desenvolvimento de fórmulas de meio de cultura livre de componentes animais e estratégias de intensificação de bioprocessos. Vale notar que, geralmente, linhagens recombinantes têm velocidades de crescimento menores devido ao fardo metabólico adicional encarregado a estas (MOHAN *et al.* 2008). Além disso, nem sempre um aumento de  $\mu X_{MÁX}$  reflete uma melhoria de  $X_{MÁX}$ , sendo que a medida do aumento de um destes parâmetros não é correlacionada com o do outro (KIM; KIM; LEE, 2012; AL-RUBEAI, 2015). Ainda assim, verificou-se aqui para a célula CHO produtora de TGF- $\beta$ 1 um aumento expressivo de ambos parâmetros com relação ao controle, apesar do TGF- $\beta$ 1 ser geralmente secretado em forma latente e necessitar de ativação para exercício de sua atividade biológica.

A expressão heteróloga de TGF- $\beta$ 1 teve aqui um impacto positivo sobre os parâmetros de crescimento das células CHO nas condições 3,5 e 7% SFB que ultrapassa os efeitos relatados por Jaluria e colaboradores (2007) a partir da expressão dos genes *cdk13* e *cox15* nesta, e nas demais linhagens celulares investigadas pelos pesquisadores. Contudo, uma vez que os dados deste trabalho foram obtidos em condições de cultivo contendo 10% SFB, presume-se que a experimentação com menores concentrações de SFB poderia levar à verificação de efeitos ainda maiores de melhora do crescimento. No que tange a estratégias de engenharia genética para otimização de linhagens, parece fazer mais sentido a superexpressão de genes efetores do processo proliferativo envolvidos no controle do ciclo

celular, como c-myc e o cdk13, do que na de mitógenos responsáveis pela sua sinalização e regulação, como TGF- $\beta$ 1 e o PDGF-BB.

## 7 CONCLUSÃO

Apesar de muitos fatores de crescimento (FC) serem reconhecidos agentes mitógenos estimuladores da proliferação e do crescimento celular, o estudo direto dos efeitos destas moléculas sob linhagens de células animais com potencial de utilização comercial não é muito frequente na literatura – ainda menos relatos sobre impactos da expressão heteróloga de FC sobre o crescimento de células hospedeiras. O presente trabalho investigou a hipótese de que os fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB podem melhorar a performance de crescimento de células CHO-DG44 e HEK293T em culturas aderentes mediante adição exógena ou expressão heteróloga estável.

A expressão de PDGF-BB ou a adição exógena de FC no começo do cultivo não produziram aqui efeitos significativos sobre células HEK293, mas a célula CHO produtora de TGF- $\beta$ 1 apresentou parâmetros cinéticos superiores ao controle em cultivos com concentração reduzida de SFB. Isto reflete uma compensação dos impactos deletérios da redução de soro por uma atividade estimuladora do TGF- $\beta$ 1 acumulado no meio de cultura. Este resultado inédito pode ser de relevância para esforços de desenvolvimento de meio de cultura livre de componentes de origem animal, atualmente uma demanda urgente da indústria biotecnológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRO, M. A.; NIMS, R. J.; DURNEY, K. M.; CIGAN, A. D.; SHIM, J. J.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; HUNG, C. T.; ATESHIAN, G. A. Heterogeneous engineered cartilage growth results from gradients of media-supplemented active TGF- $\beta$  and is ameliorated by the alternative supplementation of latent TGF- $\beta$ . **Biomaterials**, v. 77, p. 173-185, Jan, 2016.

ALEKSEI, A. S.; HENRY, H. H. Transient and stable vector transfection: pitfalls, off-target effects, artifacts. **Mutation Research**, v. 773, p. 91-103, May, 2017.

AL-RUBEAI, M. **Animal Cell Culture**. 5. ed. New York: Springer Cham, 2015, v. 9.

ALTAMIRANO, C.; GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas *in vitro*. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Editora Roca, p. 81-104, 2008.

ARMELIN, H.A. Peptide growth factors and cell cycle control. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 44, p. 103-108, 1990.

AYYAR, History of growth hormone therapy. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v 15, p.162-165, 2011.

BABAVALIAN, H.; LATIFI, A. M.; SHOKRGOZAR, M. A.; BONAKDAR, S.; TEBYANIAN, H.; SHAKERI, F. Cloning and expression of recombinant human platelet-derived growth factor-BB in *Pichia Pink*. **Cellular and Molecular Biology**, v. 62, p. 45-51, Jul, 2016.

BAICUS, A. History of polio vaccination. **World Journal of Virology**, v. 4, p. 108-114, Aug, 2012.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, MARJANA. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, Sep, 2008.

BELLANI, C. F.; AJEINAN, J.; DUFFY, L.; MIOTTO, M.; GROENEWEGEN, L.; CONNON, C. J. Scale-up technologies for the manufacture of adherent cells. **Frontiers in Nutrition**, v. 07, Nov, 2020.

BRINDLEY, D. A.; DAVIE, N, L.; CULME-SEYMOR, E. L.; SMITH, D. W.; ROWLEY, J. A. Peak serum: implications of serum supply for cell therapy manufacturing. **Regenerative Medicine**, v. 7, n. 1, p. 7-13, Jan, 2012.

BROWN, T. A. **Gene cloning and DNA analysis**. Manchester: John Wiley & sons, 2010.

BROWNE, S. M.; AL-RUBEAI, M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. **Trends in biotechnology**, v. 25, n.9, p. 425-432, Sep, 2007.



BURG, B.; RUTTEMAN, G. R.; BLANKENSTEIN, M. A.; LAAT, S. W.; ZOELLEN, E. J. J. Mitogenic stimulation of human breast cancer cells in a growth factor-defined medium: synergistic action of insulin and estrogen. **Journal of Cellular Physiology**, v. 134, p. 101-108, Jan, 1988.

CARIO, H.; SMITH, D. E. C.; BLOM, H.; BLAU, N.; BODE, H.; HOLZMANN, K.; PANNICKE, U.; HOPFNER, K.; RUMP, E.; AYRIC, Z.; KOHNE, E.; DEBATIN, K.; SMULDERS, Y.; SCHWARZ, K. Dihydrofolate reductase deficiency due to a homozygous DHFR mutation causes megaloblastic anemia and cerebral folate deficiency leading to severe neurologic disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 88, p. 226-231, Feb, 2011.

CHA, J. H.; SHIN, H. S.; LIM, H. J.; CHO, H. S.; DALAL, N. N.; PHAM, M. Q.; BENTLEY, W. E. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 225-233, Jan-Feb, 2005.

CHEN, A.; CHITTA, R.; CHANG, D.; AMANULLAH. Twenty-four well plate miniature bioreactor system as a scale-down model for cell culture process development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 148-160, Jan, 2009.

CHIOU, H.C.; VASU S.; LIU C.Y.; CISNEROS I.; JONES M.B.; ZMUDA, J.F. Scalable transient protein expression. In: PÖRTNER, R. **Animal cell biotechnology: methods in molecular biology (methods and protocols)**. New York: Springer, p.35-55, 2014, v. 1104.

CHISHOLM, V. High efficiency gene transfer into mammalian cells. In: GLOVER, D. M.; HAMES, B. D. **DNA Cloning: a practical approach**. Mammalian Systems. Oxford: Oxford University Press, 1995, v. 4.

CHIU, I. M. Growth factor genes as oncogenes. **Molecular Chemical Neuropathology**, v. 10, p 37-52, Feb, 1989.

COLIN, N.; DEMASI, M. A.; NUCEL (cell and molecular therapy center): a multidisciplinary center for translational research in Brazil. **Molecular Biotechnology**, v. 39, p. 89-95, Jun, 2008.

COOK, J. R.; WANG, D.; CHEN, J. Nonresponsiveness of an SV40-transformed BALB/c-3t3 cell line to PDGF mitogenicity is correlated with an irreversible reduction in PDGF receptor number responsiveness. **Life Sciences**, v. 53, p. 803-810, 1993.

CYTIVA. Growth factors in serum products. CY12584-20Jun20-DF. Disponível em: <<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=18092>>. Acesso em: 5 jan 2021.

DAI, M; YU, C.; FANG, T.; FU, L.; WANG, J.; ZHANG, J.; REN, J.; XU, J.; ZHANG, X.; CHEN, W. Identification and functional characterization of glycosylation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB in *Pichia pastoris*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, Dec, 2015.

DANIELPOUR, D.; KIM, K.; DART, L. L.; WATANABE, S.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (SELISAs) quantitate and distinguish two forms of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2) in complex biological fluids. **Growth Factors**, v. 2, p. 61-71, 1989.

DE PAULA, G. C. G. M. **Produção da proteína recombinante humana TGF-  $\beta$ 1 (fator de crescimento transformante beta 1 em células de mamífero)**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

DEVESCOVI, V.; LEONARDI, E.; CIAPETTI, G.; CENNI, E. Growth factors in bone repair. **La Chirurgia degli organi di movimento**, v. 92, n. 3, p. 161-168, Dec, 2008.

DILLMAN, R. O. An update on GM-CSF and its potential role in melanoma management. **Melanoma Management**, v. 7, n. 3, Jul, 2020.

DONALDSON, M. S.; SHULER, M. L. Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell line. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 573-579, Jul – Aug, 1998.

DUBRIDGE, R. B.; TANG, P.; HSIA, H.C.; LEONG, P. M.; MILLER, J.H.; CALOS, M. P. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, p. 379-387, Jan, 1987.

DULBECCO, R.; FREEMAN, G. Plaque production by the polyoma virus. **Virology**, v. 8, p. 396-397, Jul, 1959.

DUMONT, J.; EUWART, D.; MEI, B.; ESTES, S.; KSHIRSAGAR, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 1110-1122, Dec, 2016.

EICHNER, W.; JÄGER, V.; HERBST, D.; HAUSER, H.; HOPPE, J. Large-scale preparation of recombinant platelet-derived growth factor AA secreted from recombinant baby hamster kidney cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 185, p. 135-140, Oct, 1989.

FAROQUE, A. K. The immortal life of Henrietta Lacks. **The Journal of IMA**, v. 43, n. 2, p. 93-94, Aug, 2011.

FERREIRA, P.; GAMBA, M. A.; SACONATO, H.; GUTIÉRREZ, M. G. R. Tratamento da mucosite em pacientes submetidos a transplante de medula óssea: uma revisão sistemática. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 4, p. 563-570, 2011.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, Apr, 2016.

FINNISON, K. W.; MCLEAN, S.; DI GUGLIELMO, G. M.; PHILIP, A. Dynamics of transforming growth factor beta signaling in wound healing and scarring. **Advances in Wound Care**, v. 2, p. 195-214, Jun, 2013.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cell**: a manual of basic technique. 5. ed. Hoboken: John Wiley & sons, 2005.

GENTRY, L. E.; WEBB, N. R.; LIM, G. J.; BRUNNER, A. M.; RANCHALIS, J. E.; TWARDZIK, D. R.; LIOUBIN, M. N.; MARQUARDT, H.; PURCHIO, A. F. Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in chinese hamster ovary cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, p. 3418-3427, Oct, 1987.

GHARIBI, B. HUGHES, J. F. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and *in vitro* expansion of mesenchymal stem cells. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, p. 771-782, Nov, 2012.

GIRARD, P.; JORDAN, M.; TSAO, M.; WURM, F. M. Small-scale bioreactor system for process development and optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 117-119, Mar, 2001.

GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolic engineering of animals cells. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 24, p. 289-298, May, 2002.

GOSPODAROWICZ, D.; MORAN, J. S. Growth factors in mammalian cell culture. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 45, p. 531-558, Jul, 1976.

GRIFFITHS, J. B. Scaling-up of animal cell cultures. In: FRESHNEY, R. I. **Animal cell culture**: a practical approach. Oxford: IRL Press, p. 33-70, 1986.

HAM, R.G. Formulation of basal nutrient media. In: BARNES, D. W.; SIRBASKU, D. A.; SATO, G. H. **Cell Culture Methods for Cell Biology**. New York: Alan R. Liss, p. 3-21, 1984, v. 1.

HERLYN, M.; KATH, R.; WILLIAMS, N.; VALYI-NAGY, I.; RODECK, U. Growth-regulatory factors for normal premalignant, and malignant human cells *in vitro*. **Advances in Cancer Research**, v. 54, p. 213-34, 1990.

HERSCHMAN, H. R. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 60, p. 281-319, 1991.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHIMIDELL, W.; DE ALMEIDA, U. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001, v. 2.

HOLLINGER, F. O.; HART, C.E.; HIRSCH, S.N.; LYNCH, S.; FRIEDLAENDER, G.E. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. **Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume**, v. 90, p. 48-54, Feb, 2008.

HOOLEY, B. W.; KIERNAN, J. A. "Contact Inhibition" of cell division in 3T3 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 60, n. 1, p. 300-304, May, 1968.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, Oct, 2019.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 1-20, Jul, 2003.

ILIO, K. Y.; SENSIBAR, J. A.; LEE, C. Effect of TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$  and EGF on cell proliferation and cell death in rat ventral prostatic epithelial cells in culture. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 482-490, Dec, 1995.

JALURIA, P.; BETENBAUGH, M.; KONSTANTOPOULOS, K.; SHILOACH, J. Enhancement of cell proliferation in various mammalian cell lines by gene insertion of a cyclin-dependent kinase homolog. **BMC Biotechnology**, v. 7, p. 71, Oct, 2007.

JESUS, M. D.; WURM, F. M. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, p. 184-188, Jun, 2011.

JOCHEMS, C. E. A.; van der VALK, J. B. F.; STAFLEU, F. R.; BAUMANS, V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 30, p. 219-227, Apr, 2002.

JOSH, F.; TOBIDA, M.; TANAKA, R.; ORBAY, H.; OGATA, K.; SUZUKI, K.; HYAKUSOKU, H.; MIZUNO, H. Concentration of PDGF-AB, BB and TGF- $\beta$ 1 as value human serum parameters in adipose-derived stem cell proliferation. **Journal of Nippon Medical School**, v. 80, n. 2, p. 140-147, May, 2013.

JOZALA, A. F.; GERALDES, D. C.; TUNDISI, L. L.; FEITOSA, V. A.; BREYER, C. A.; CARDOSO, S. L.; MAZZOLA, P. G.; OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; RANGEL-YAGUI, C. O.; MAGALHÃES, P. O.; OLIVEIRA, M. A.; PESSOA JR., A. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 51-63, Dec, 2016.

JUNG, S.; SEN, A.; ROSENBERG, L.; BEHIE, L. A. Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 12, p. 637-657, Sep, 2010.

KARUMURI, N. N.; GANGIREDDY, S. R.; NARALA, V. R.; MAJEE, S. S.; GUNWAR, S.; REDDY, R. C. Simple, rapid, high-purity preparation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1333-1339, Sep, 2007.

KIM, J. Y.; KIM, Y. G.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 917-930, Dec, 2012.

KOGA, B. A. A. Efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes (PDGF-BB e/ou VEGF165) no secretoma de células-tronco mesenquimais e em modelo

**animal de cicatrização de pele.** Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

KORNECKI, M.; STRUBE, J. Accelerating biologics manufacturing by upstream process modelling. **Processes**, v. 7, n. 166, Mar, 2019.

KURANO, N.; LEIST, C.; MESSI, F.; GANDOR, C.; KURANO, S.; FIECHTER, A. Growth kinetics of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 3. Selection and characterization of an anchorage-independent subline and medium improvement. **Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 245-258, Mar, 1990.

KUYSTERMANS, D.; AL-RUBEAI, M. cMyc increases cell number through uncoupling of cell division from cell size in CHO cells. **BMC Biotechnology**, v. 7, p. 9-76, Sep, 2009.

KWON, D.; KIM, J.; CHA, B.; PARK, K.; HAN, I.; PARK, K.; BAE, H.; HAN, M.; KIM, K.; LEE, S. The effect of fetal bovine serum (FBS) on efficacy of cellular reprogramming for induced pluripotent stem cell (iPSC) generation SV40. **Cell Transplantation**, v. 25, p. 1025-1042, Oct, 2016.

LAI, T.; YANG, Y.; NG, S. K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 579-603, Apr, 2013.

LEE, S. Y. High cell-density culture of Escherichia coli. **Trends in Biotechnology**, v. 14, p. 98-105, Mar, 1996.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LI, F.; VIJAYASANKARAN, N.; SHEN, A. Y.; KISS, R.; AMANULLAH, A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. **mAbs**, v. 2, n. 5, p. 466-477, Sep – Oct, 2010.

LIÉNARD, D.; SOURROUILLE, C.; GOMORD, V.; FAYE, L. Pharming and transgenic plants. **Biotechnology Annual Review**, v. 13, p. 115-147, 2007

LIN, X.; LI X.; LIN, X. A Review on applications of computational methods in drug screening and design. **Molecules**, v. 25, p. 1375, Mar, 2020.

LISTE-CALLEJA, L.; LECINA, M.; CAIRÓ, J. J. HEK293 cell culture media study: increasing cell density for different bioprocess applications. **BMC Proceedings**, v. 7, n. 6, p. 15, Dec, 2013.

LIU, R.; LI, X.; LAM, K. S. Combinatorial chemistry in drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 117-126, Jun, 2017.

MAQSOOD, I. M.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R.; GHASROLDASHT, M. M. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. **Science**, v. 37, 10, p. 1038-45, Oct, 2013.

MIKI, H.; TAKAGI, M. Design of serum-free medium for suspension culture of CHO cells on the basis of general commercial media. **Cytotechnology**, v. 67, p. 689-697, Aug, 2014.

MIYAZONO, K.; ICHIJO, H.; HELDIN, C. H. Transforming growth factor- $\beta$ : latent forms, binding proteins and receptors. **Growth Factors**, v. 8, p. 11-22, 1993.

MOHAN, C.; KIM, Y. G.; KOO, J.; LEE, G. M. Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 624-630, May, 2008.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais**: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Editora Roca, 2008.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de cultura para células animais. In: SCHIMIDELL, W.; DE ALMEIDA, U. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001, v. 2.

NEUSHUL, P. Science, government and the mass production of penicillin. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**. v. 48, p. 317-395, Oct, 1993.

NUCEL. Nucleo group of cellular and molecular therapy. Disponível em: <<http://w3nucel.webhostusp.sti.usp.br/?lang=en>> Acesso em: 12 de set. 2022.

OBEMBE, O. O.; POPOOLA, J. O.; LEELAVATHI, S.; REDDY, S. V. Advances in plant molecular farming. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 210-222, Mar-Apr, 2011.

OIDA, T.; WEINER, H. L. Depletion of TGF- $\beta$  from fetal bovine serum. **Journal of Immunological Methods**, v. 362, n. 1-2, p. 195-198, Oct, 2010.

OSTER, S. K.; MARHIN, W. W.; ASKER, C.; FACCHINI, L. M.; DION, P. A.; FUNA, K.; POST, M.; SEDIVY, J. M.; PENN, L. Z. Myc is an essential negative regulator of platelet-derived growth factor beta receptor expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 18, p. 6768-6778, Sep, 2000.

OZTURK, S. S.; HU, W. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York: CRC Press, 2006.

PAK, S. C. O.; HUNT, S. M. N.; BRIDGES, M. W.; SLEIGH, M. J.; GRAY, P. P. Super-CHO - a cell line capable of autocrine growth under fully defined protein-free conditions. **Cytotechnology**, v. 22, p. 139-146, Jan, 1996.

PAPANAS, N.; MALTEZOS, E. Benefit-risk assessment of becaplermin in the treatment of diabetic foot ulcers. **Drug safety**, v. 33, p 455-461, Jun, 2010.

PHAM, P.V. Medical biotechnology: techniques and applications. In: BARTH, D.; AZEVEDO, V. **Omics technologies and bio-engineering**. Towards improving quality of life. Amsterdam: Elsevier, p. 449-469, 2017, v. 1.

PICHE, J. E.; CARNES, D. L.; GRAVES, D. T. Initial characterization of cells derived from human periodontia. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 5, p. 761-767, May, 1989.

PIERCE, G. F.; MUSTOE, T. A. Pharmacologic enhancement of wound healing. **Annual Review of Medicine**, v. 46, p. 467-481, 1995.

POLLACK, I. F.; RANDALL, M. S.; KRISTOFIK, M. P.; KELLY, R. H.; SELKER, R. G.; VERTOSICK, F. T. Response of malignant glioma cell lines to epidermal growth factor and platelet-derived growth factor in a serum-free medium. **Journal of Neurosurgery**, v. 73, p. 106-112, Jul, 1990.

PORTNER, R. Bioreactors for mammalian cells, In: AL-RUBEAI, M. **Animal cell culture**. Dublin: Springer, p 89-136, 2015, v. 9.

RAMANI, B.; KONDAIAH, P. Recombinant expression of human transforming growth factor- $\beta$  isoforms in Chinese hamster ovary cells. **Journal of Biosciences**, v. 23, p. 577-583, Dec, 1998.

RAMIREZ, H.; PATEL, S. B.; PASTAR, I. The role of TGF- $\beta$  signaling in wound epithelialization. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 482-491, Jul, 2014.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 422-430, Apr, 1999.

RIZZINO, A. Behavior of transforming growth factor in serum-free media: an improved assay for transforming growth factors. **In Vitro**, v. 20, p. 815-822, Oct, 1984.

RIZZINO, A.; RUFF, E.; RIZZINO, H. Induction and modulation of anchorage-independent growth by platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor  $\beta$ . **Cancer Research**, v. 46, p. 2816-2820, Jun, 1986.

ROOBOL, A.; ROOBOL, J.; SMITH, M. E.; CARDEN, M. J.; HERSHEY, J. W. B.; WILLIS, A. E.; SMALES, C. M. Engineered transient and stable overexpression of translation factors eIF3i and eIF3c in CHOK1 and HEK293 cells gives enhanced cell growth associated with increased c-Myc expression and increased recombinant protein synthesis. **Metabolic Engineering**, p. 98-105, May, 2020.

SAUER, M. K.; HANNINK, M.; DONOGHUE, D. J. Deletions in the n-terminal coding region of the v-sis gene: determination of the minimal transforming region. **Journal of Virology**, v. 59, p. 292-300, Aug, 1986.

SEIFERT, R. A.; COATS, S. A.; RAINES, E. W.; ROSS, R.; BOWEN-POPE, D. F. Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor  $\alpha$ -subunit mutant and reconstituted cell lines demonstrate that transforming growth factor- $\beta$  can be mitogenic through PDGFA-

chain-dependent and -independent Pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13951-13955, May, 1994.

SHILOACH, J.; FASS, R. Growing E. coli to high cell density - a historical perspective on method development. **Biotechnology Advances**, p. 345-357, Jul, 2005.

SHUKLA, A. A. WOLFE, L.S.; MOSTAFA, S. S.; NORMAN, C. Evolving trends in mAb production processes. **Bioengineering & Translational Medicine**, p. 58-69, Mar, 2017.

SCHIMIDELL, W.; DE ALMEIDA, U. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001, v. 2.

SCHOP, D.; JANSSEN, F. W.; BORGART, E.; BRUIJN, J. D.; RADERSMA, R. V. D. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Netherlands**, v. 2, p. 126-135, Mar-Apr, 2008.

SCHWANKE, R. C. **Clonagem, expressão, purificação e ensaio biológico da proteína GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Biociências, Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SINGH, P.; SURESH, D. K. Clinical evaluation of GEM 21S<sup>®</sup> and a collagen membrane with a coronally advanced flap as a root coverage procedure in the treatment of gingival recession defects: A comparative study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 16, n. 4, p. 577-583, Oct, 2012.

SINKOVICS, J. G. Oncogenes and growth factors. **Critical Reviews in Immunology**, v. 8, p. 217-98, 1988.

SMITH, K. A. Edward Jenner and the small pox vaccine. **Frontiers in Immunology**, v. 2, p.21, Jun, 2011.

SOLOMON, J.; CSONTOS, L.; CLARKE, D.; BONYHADI, M.; ZYLBERBERG, C.; MCNIECE, I.; KURTZBERG, J.; BELL, RESMARIE.; DEANS, R. Current perspectives on the use of ancillary materials for the manufacture of cellular therapies. **Cytotherapy**, v. 18, n. 1, p. 1-12, Jan, 2015.

SORKIN, A.; WATERS, M. Endocytosis of growth factor receptors. **BioEssays**, v. 15, p. 6, Jun, 1993.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**, Ed. 5, Burlington: Elsevier Science, 1995.

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



- SWIECH, K.; SILVA, G. M. C.; ZANGIROLAMI, T. C.; LEMMA, M. R.C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. SUAZO, C. A. T. Evaluating kinetic and physiological features of rCHO-K1 cells cultured on microcarriers for production of a recombinant metalloprotease/disintegrin. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 200-210, Apr, 2007.
- THOMAS, P.; SMART, T. G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 51, p. 187-200, May-Jun, 2005.
- TULLAI, J. W; SCHAFFER, M. E.; MULLENBROCK, S.; SHOLDER, G.; KASIF, S.; COOPER, G. M. Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. **Journal of Biological Chemistry**, v. 17, p. 282, Aug, 2007.
- URLAUB, G.; CHASIN, L. A. Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 77, p. 4216-4220, Jul, 1980.
- URLAUB, G.; KAS, E.; CAROTHERS, A.; CHASIN, L. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. **Cell**, v. 33, p. 405-412, Jun, 1983.
- USTACH, C. V.; TAUBE, M. E.; HURST, N. J. J.; BHAGAT, S.; BONFIL, R. D.; CHER, M. L.; SCHUGER, L.; KIM, H. C. A potential oncogenic activity of platelet-derived growth factor D in prostate cancer progression. **Cancer Research**, v. 64, p. 1722-1729, Mar, 2004.
- WADA, K.; GERBAUDO, V. H.; SPECTOR, M. Effects of PDGF-BB and OP-1 on mesenchymal stem cell in a porous mineral block. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 33, p. 72-78, Mar-Apr, 2013.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1136-1145, Dec, 2018.
- WANG, Y.; XUE, L.; LI, Y.; ZHU, Y.; YANG, B.; WANG, X. High-level secretory production of recombinant human platelet-derived growth factor-BB by *Saccharomyces cerevisiae* under the non-selective conditions. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, p. 156-161, Mar-Apr, 2009.
- WEAKE, V. M.; WORKMAN, J. L. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 426-437, Jun, 2010.
- WHARTON, W.; LEOF, E.; PLEDGER, W. J.; O'KEEFE, E. J. Modulation of the epidermal growth factor receptor by platelet-derived growth factor and cholera toxin: effects on mitogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 79, p. 5567-5571, Sep, 1982.

WIEMAN, T. J.; SMIELL, J. M.; SU, Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (Becaplermin) in Patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. **Diabetes Care**, v. 21, n. 5, p. 822-827, May, 1998.

WILLIAMS, C.; JOHNSON, S. L.; ROBINSON, P. S.; TRANQUILLO, R. T. Cell sourcing and culture conditions for fibrin-based valve constructs. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 6, p. 1489-1502, Jun, 2006.

WITZENEDER, K.; LINDENMAIR, A.; GABRIEL, C.; HÖLLER, K.; THEIß, D.; REDL, H.; HENNERBICHLER, S. Human-derived alternatives to fetal bovine serum in cell culture. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 40, n. 6, p. 417-23, 2013.

WURM, F. M. CHO Quasispecies - implications for manufacturing processes. **Processes**, v. 1, p. 296-311, Dec, 2013.

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

XING, Z.; BISHOP, N.; LEISTER, K.; LI, Z. J. Modeling kinetics of a large-scale fed-batch CHO cell culture by markov chain Monte Carlo method. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 1, 2010.

ZHENG, D.; CHO, Y.; LAU, A. T. Y.; ZHANG, J.; MA, W.; BODE, A. M.; DONG, Z. Cdk3-mediated ATF1 phosphorylation enhances cell transformation. **Cancer Research**, v. 68, n. 18, p. 7650-7660, Sep, 2008.

ZOU, Z.; SUN, P. D. Overexpression of human transforming growth factor- $\beta$ 1 using a recombinant CHO cell expression system. **Protein Expression and Purification**, v. 37, p. 265-272, Oct, 2004.

**APÊNDICE A – Replicatas biológicas das curvas de crescimento em diferentes concentrações de soro com a linhagem CHO parental**

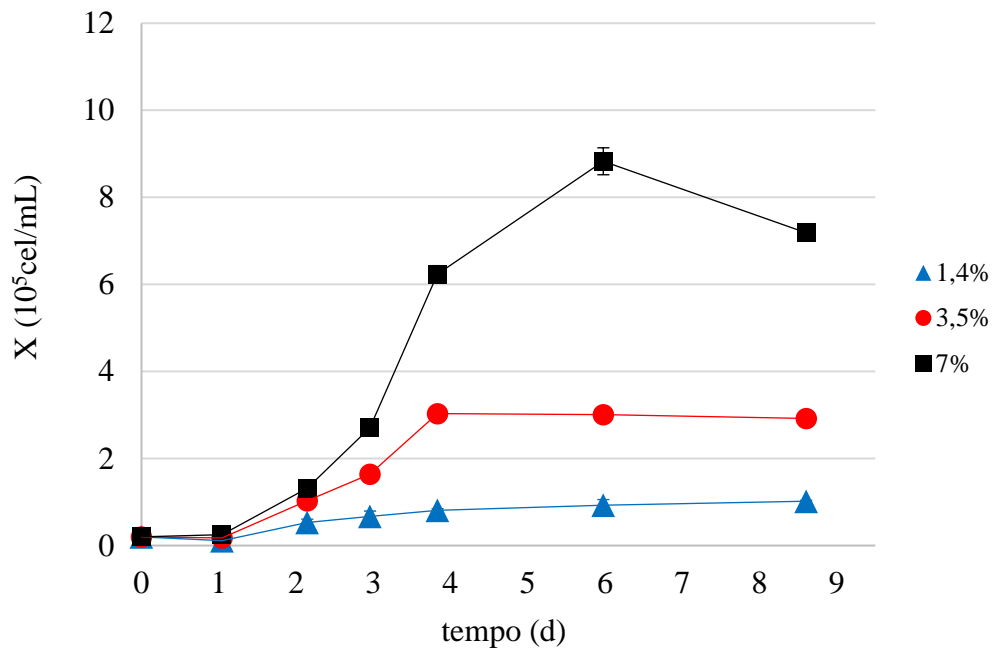


Figura A - 1 - Crescimento de células CHO parentais em 3 condições de SFB (1ª REPLICATA)

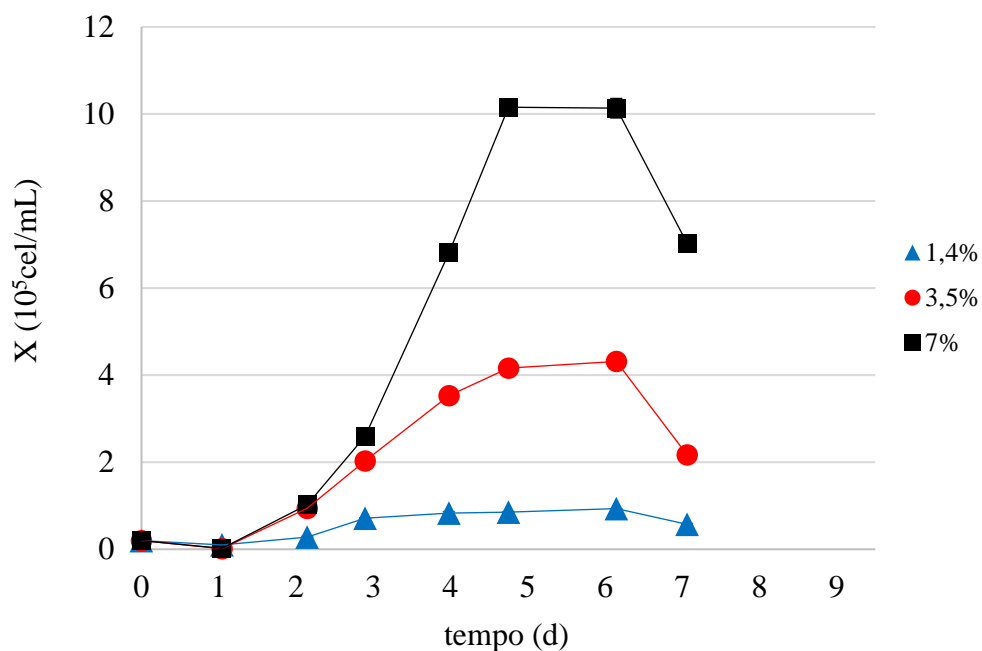


Figura A - 2 - Crescimento de células CHO parentais em 3 condições de SFB (2ª REPLICATA)

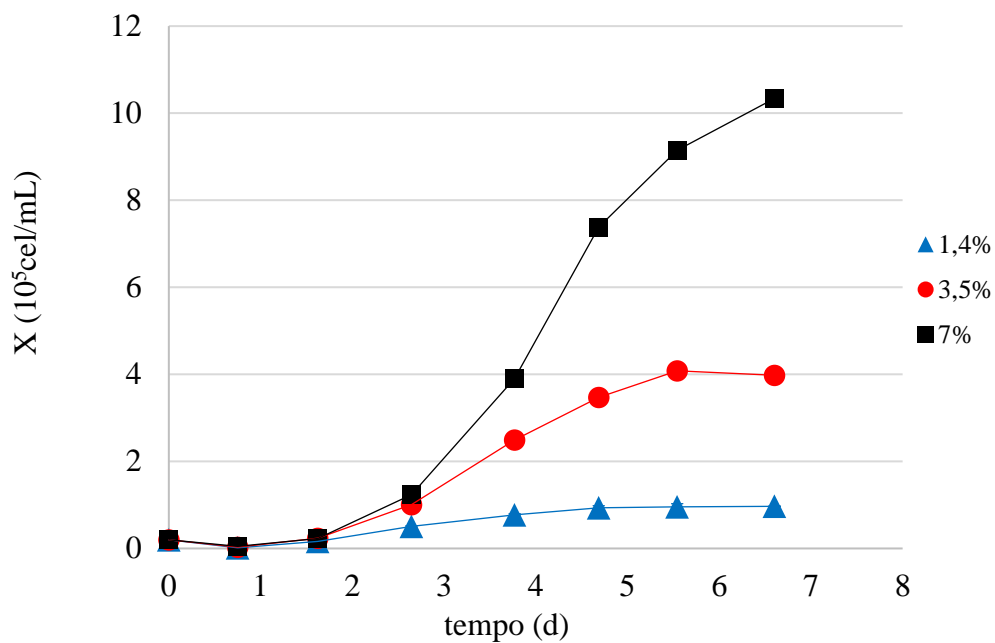


Figura A - 3 - Crescimento de células CHO parentais em 3 condições de SFB (3<sup>a</sup> REPLICATA)

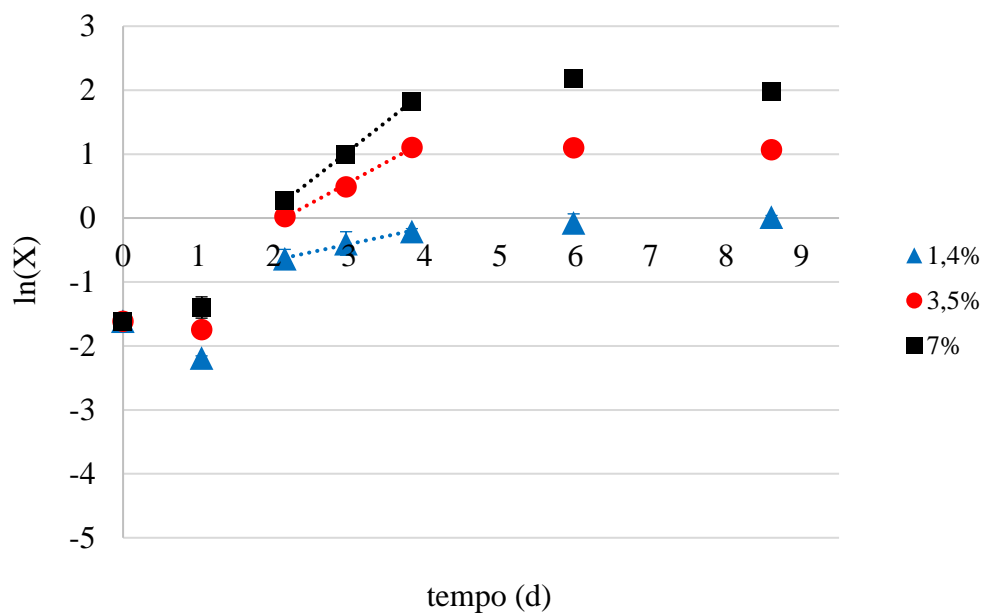


Figura A - 4 -  $\ln(X)$  de células CHO parentais em 3 condições de SFB (1<sup>a</sup> REPLICATA)

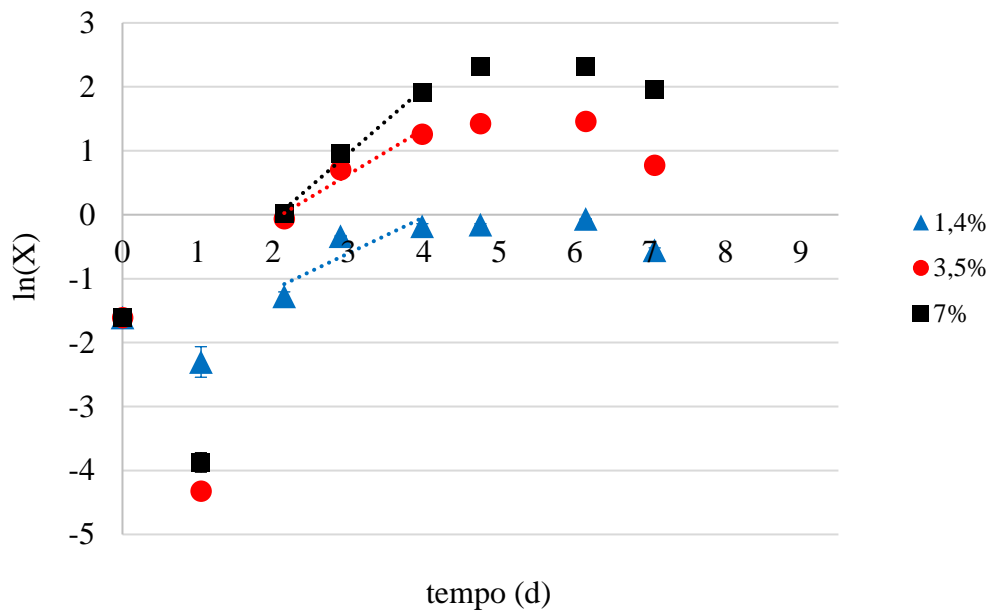


Figura A - 5 -  $\ln(X)$  de células CHO parentais em 3 condições de SFB (2ª REPLICATA)

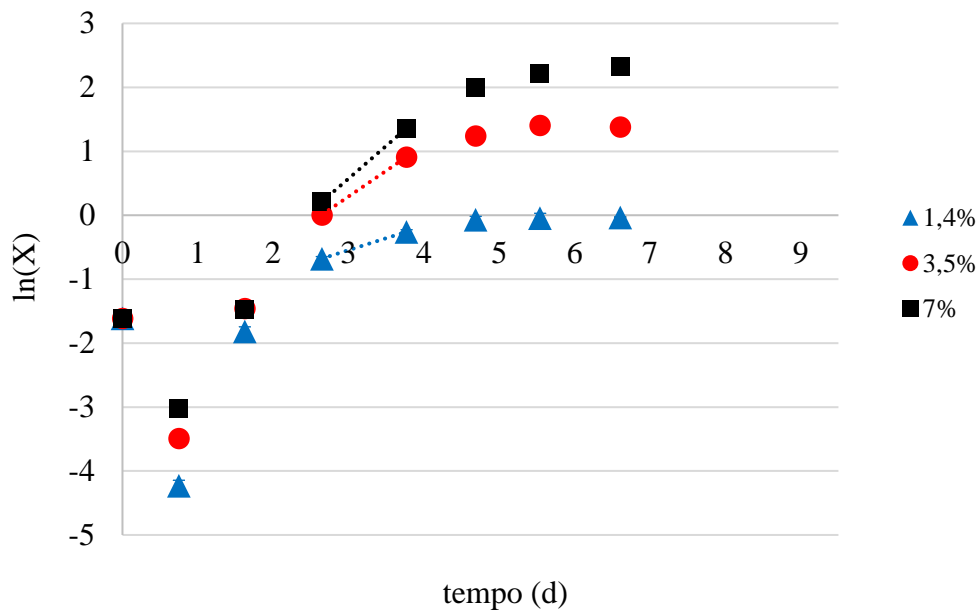


Figura A - 6 -  $\ln(X)$  de células CHO parentais em 3 condições de SFB (3ª REPLICATA)

**APÊNDICE B – Replicatas biológicas das curvas de crescimento em diferentes concentrações de soro com a linhagem CHO produtora de TGF- $\beta$ 1**

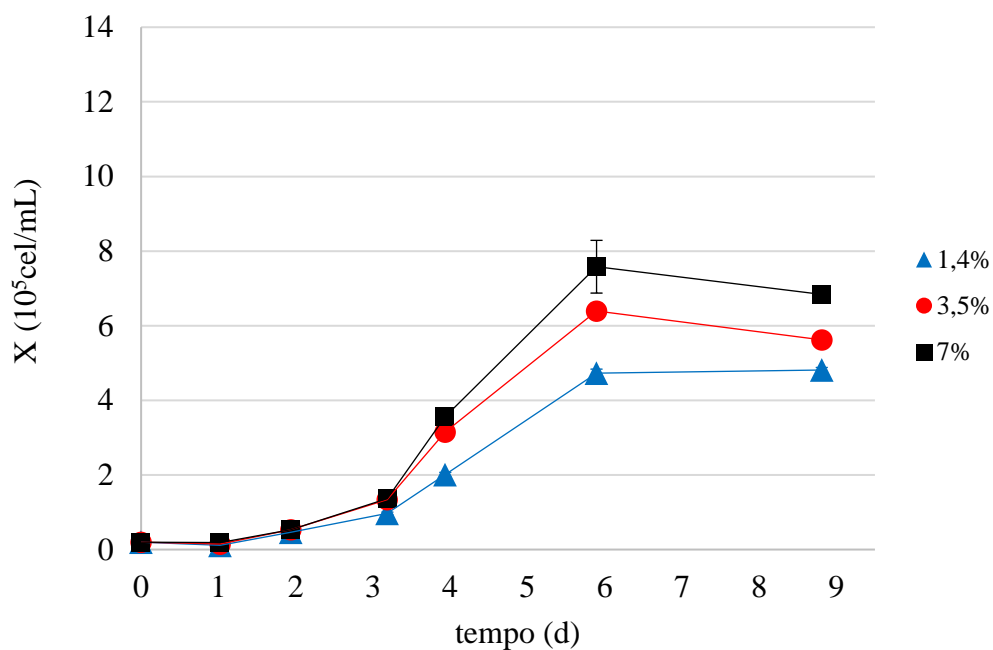


Figura C - 1 -  $\ln(X)$  de células HEK parentais em 3 condições de SFB (2ª REPLICATA)

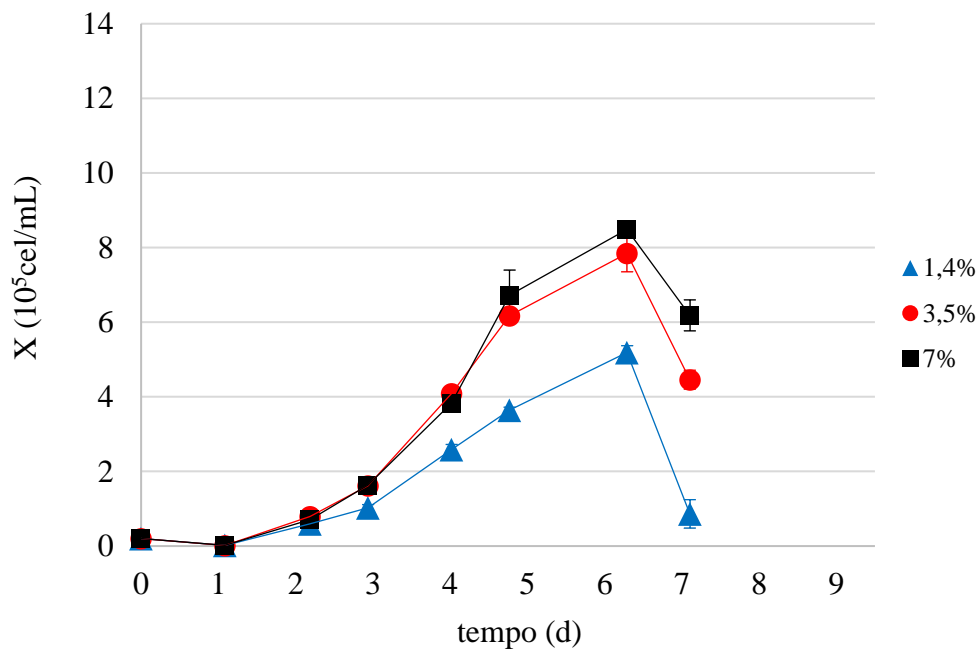


Figura B - 1 - Crescimento de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3 condições de SFB (2ª REPLICATA)

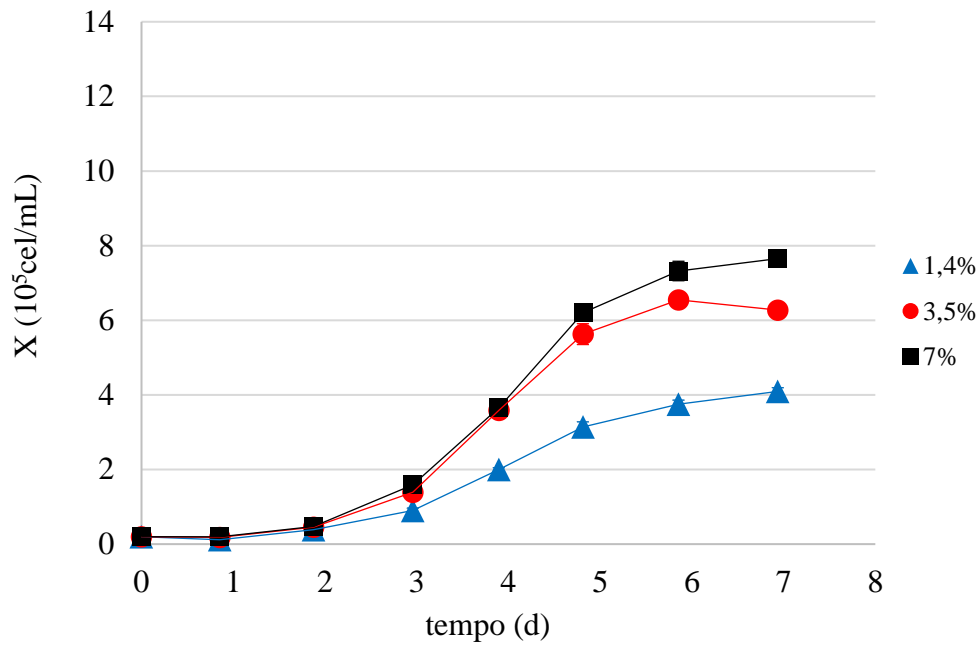


Figura B - 2 - Crescimento de células CHO produtoras de TGF-β1 em 3 condições de SFB (3ª REPLICATA)

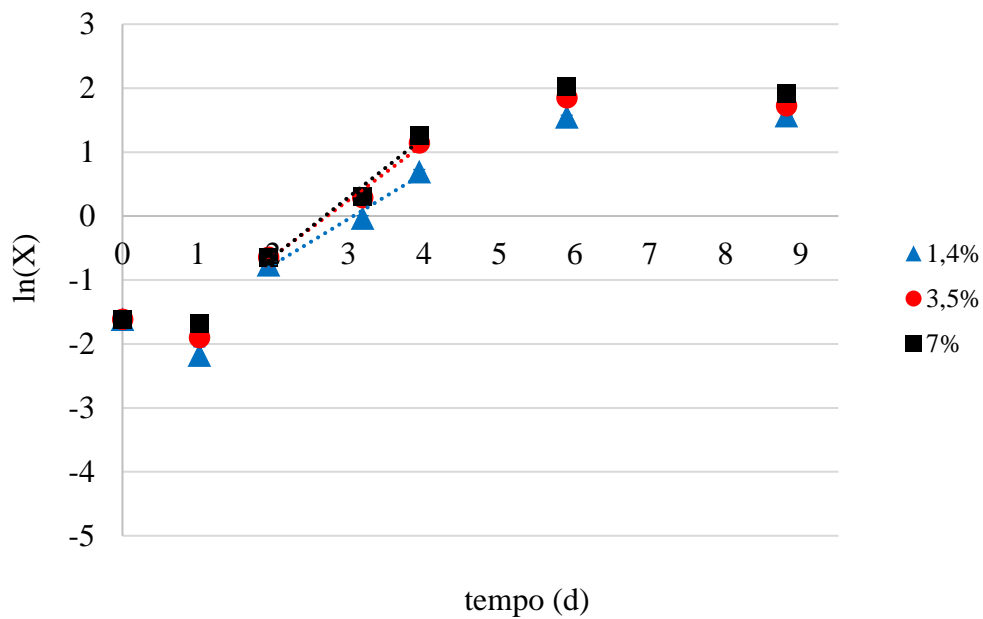


Figura B - 3 -  $\ln(X)$  de células CHO produtoras de TGF-β1 em 3 condições de SFB (1ª REPLICATA)

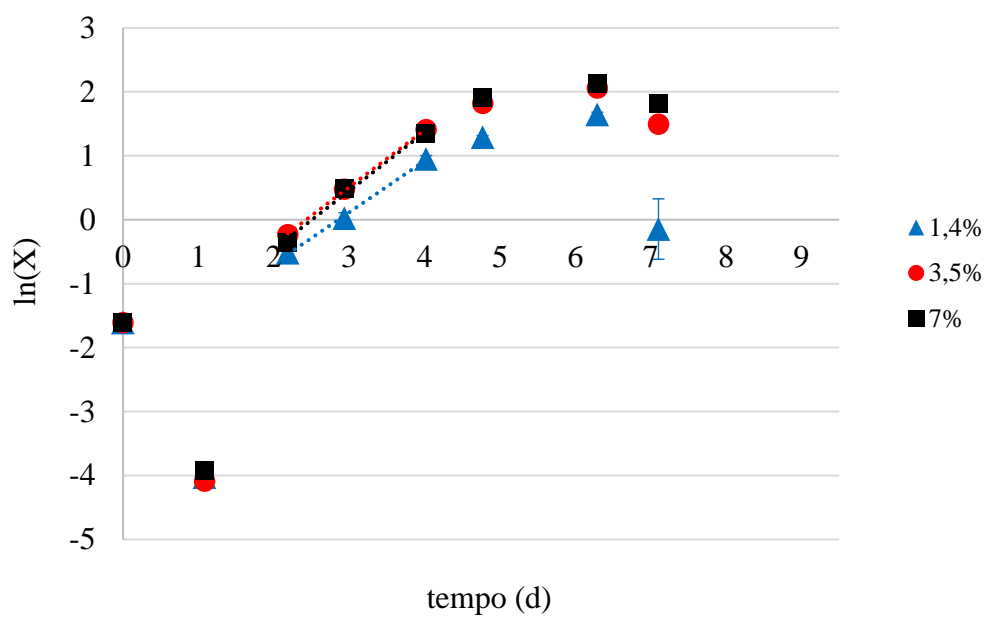


Figura B - 4 -  $\ln(X)$  de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3 condições de SFB (2ª REPLICATA)

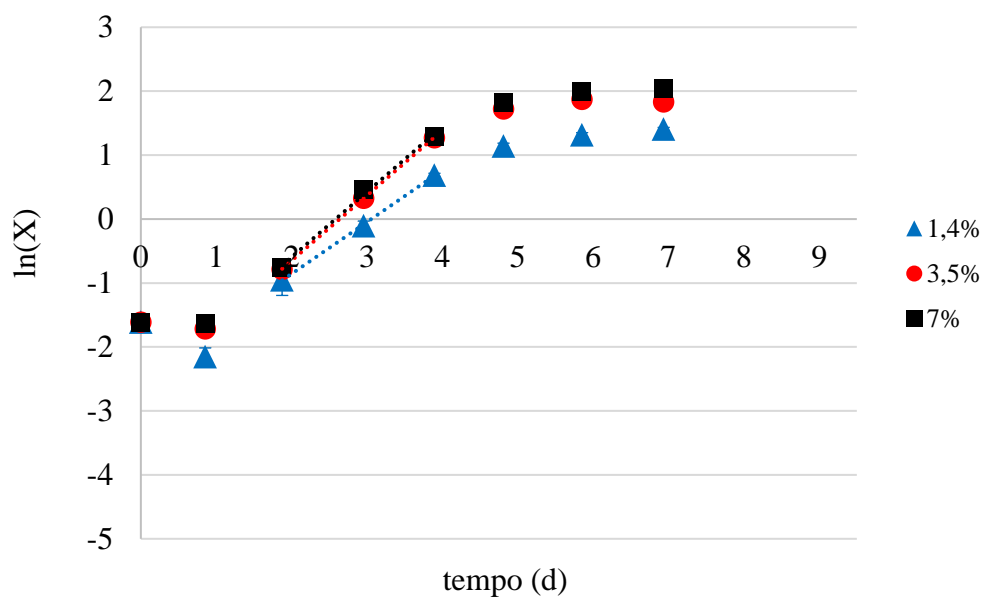


Figura B - 5 -  $\ln(X)$  de células CHO produtoras de TGF- $\beta$ 1 em 3 condições de SFB (3ª REPLICATA)



**APÊNDICE C – Replicatas biológicas das curvas de crescimento em diferentes concentrações de soro e adição exógena de FC com a linhagem HEK parental**

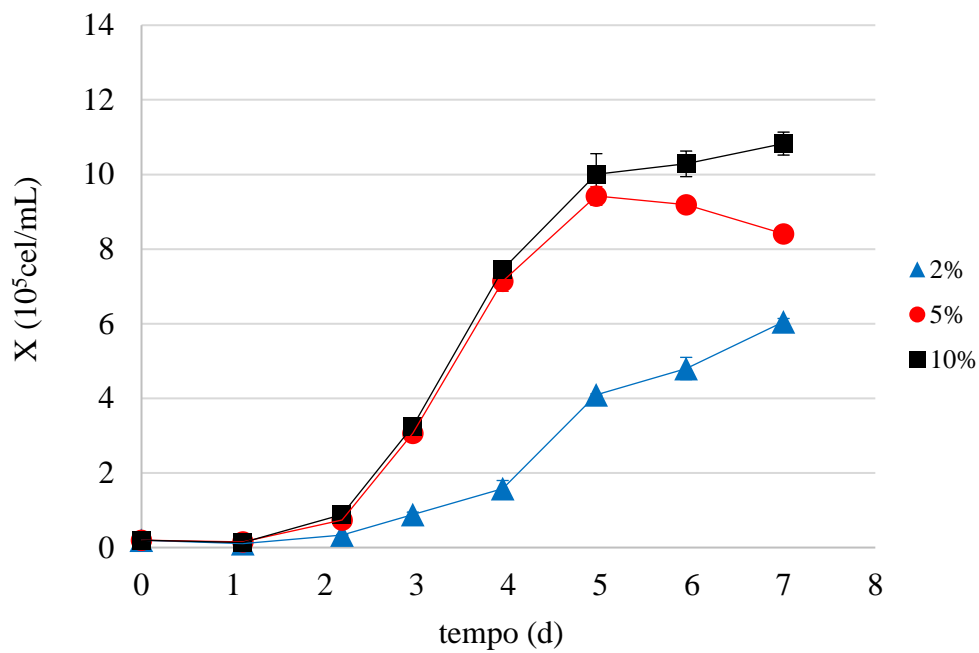


Figura C - 2 - Crescimento de células HEK parentais em 3 condições de SFB (1ª REPLICATA)

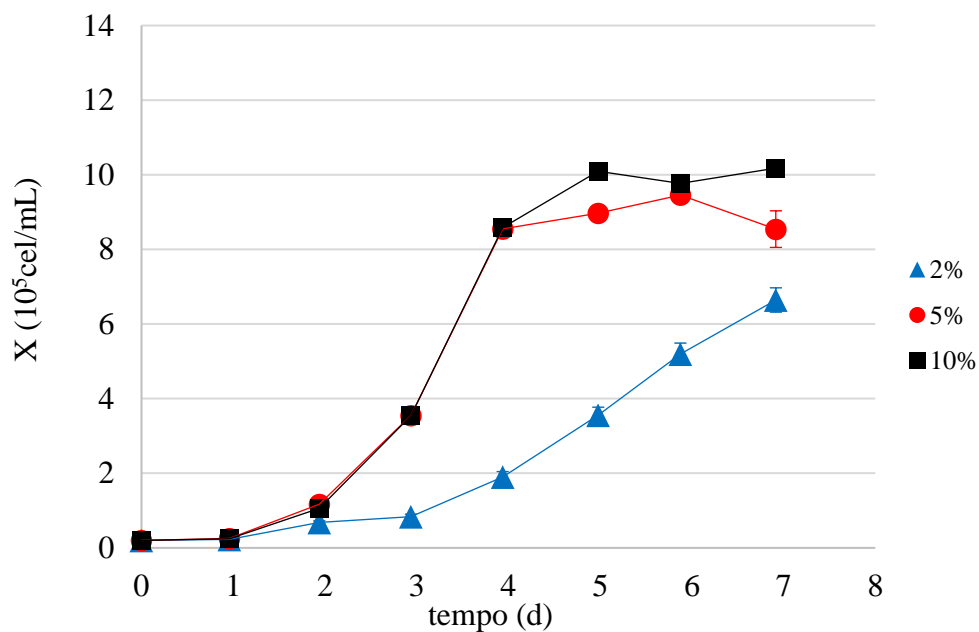


Figura C - 3 - Crescimento de células HEK parentais em 3 condições de SFB (2ª REPLICATA)

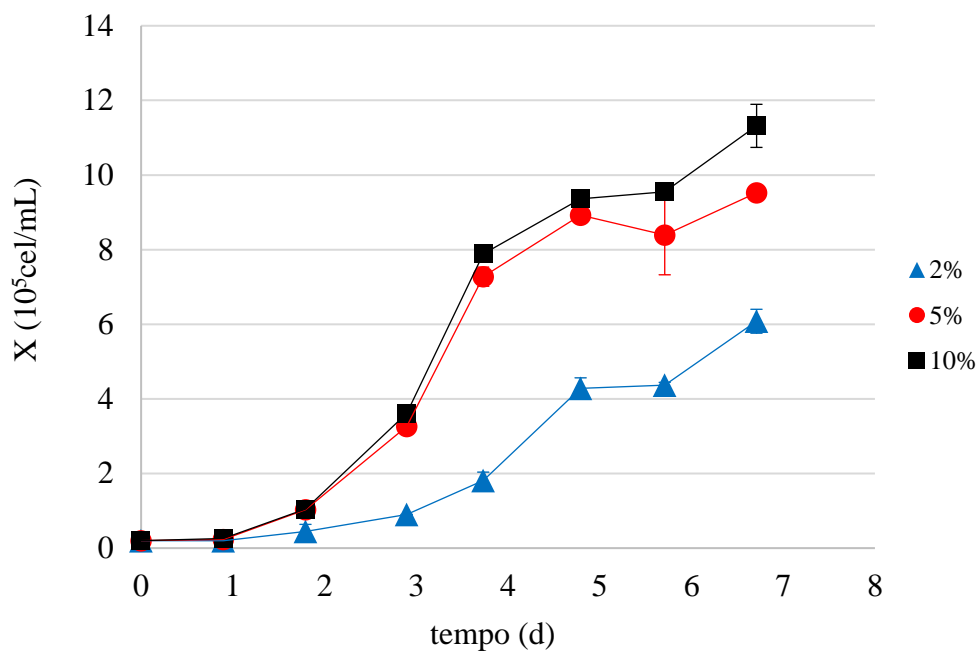


Figura C - 4 - Crescimento de células HEK parentais em 3 condições de SFB (3<sup>a</sup> REPLICATA)

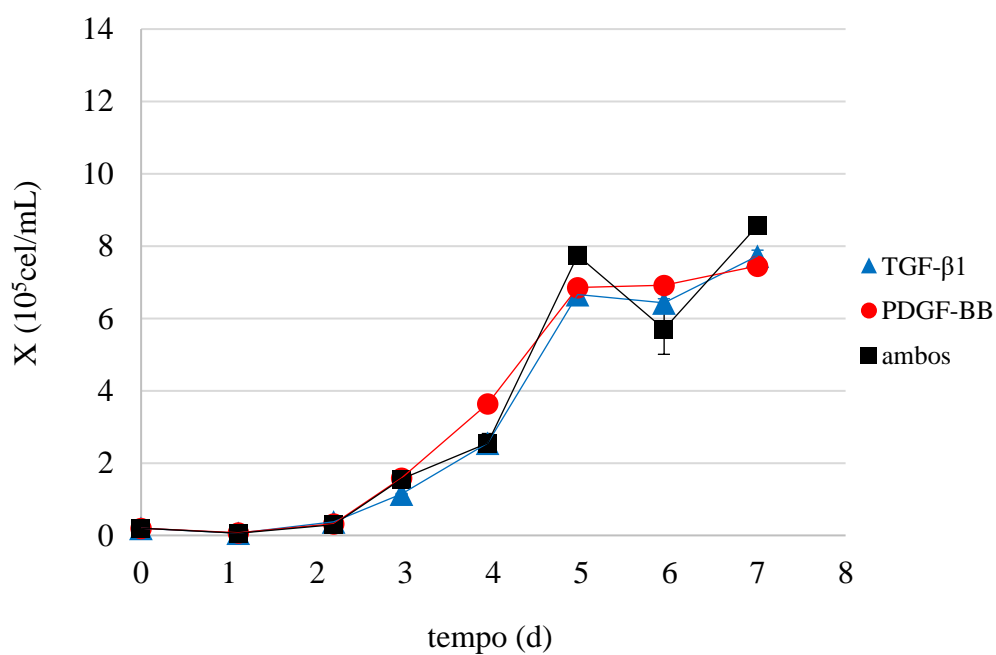


Figura C - 5 - Crescimento de células HEK parentais em 2% SFB com adição de FC (1<sup>a</sup> REPLICATA)

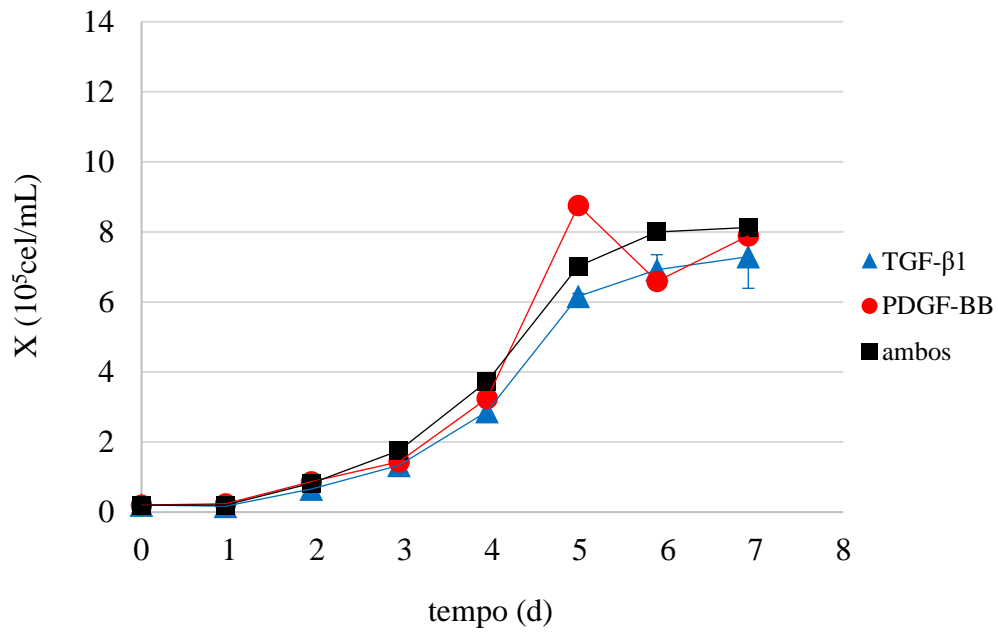


Figura C - 6 - Crescimento de células HEK parentais em 2% SFB com adição de FC (2<sup>a</sup> REPLICATA)

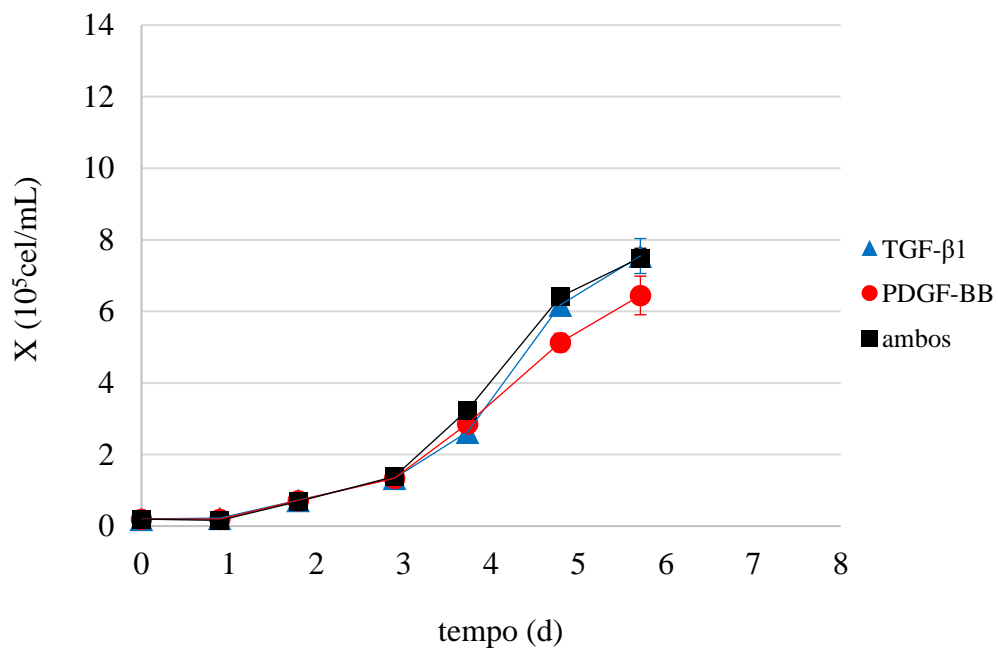


Figura C - 7 - Crescimento de células HEK parentais em 2% SFB com adição de FC (3<sup>a</sup> REPLICATA)

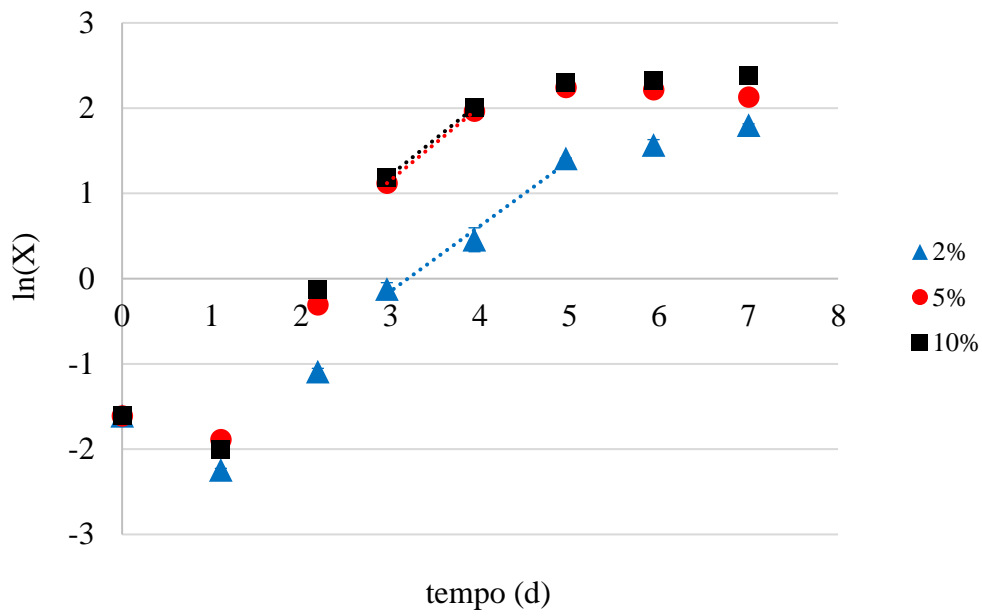


Figura C - 8 -  $\ln(X)$  de células HEK parentais em 3 condições de SFB (1ª REPLICATA)

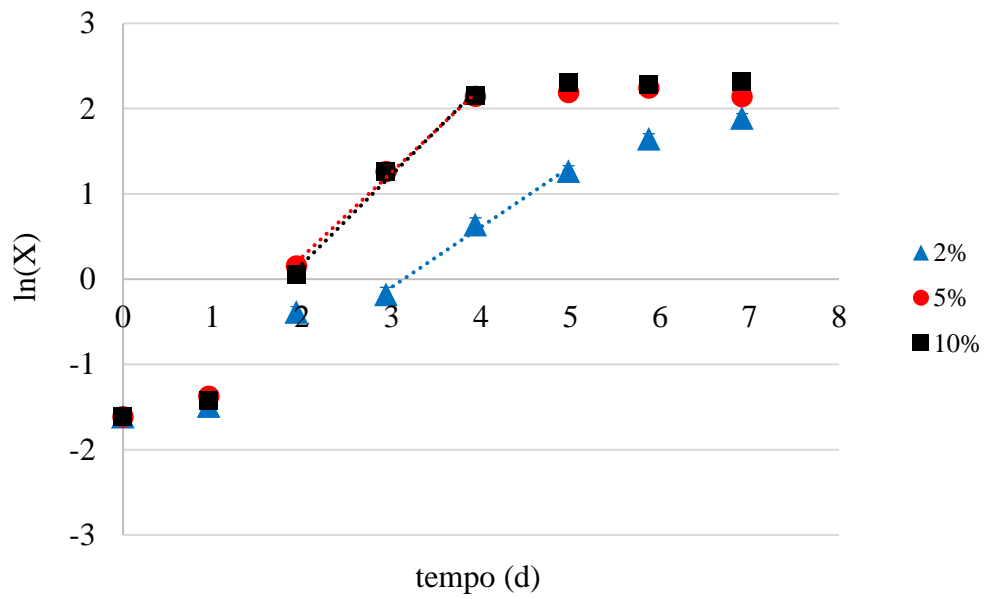


Figura C - 9 -  $\ln(X)$  de células HEK parentais em 3 condições de SFB (2ª REPLICATA)

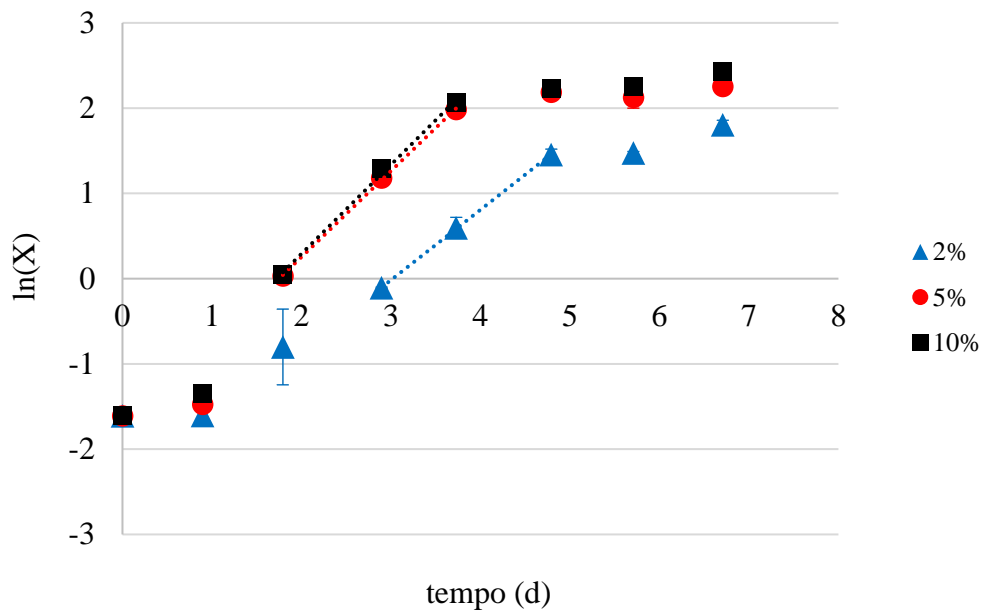


Figura C - 10 -  $\ln(X)$  de células HEK parentais em 3 condições de SFB (3ª REPLICATA)

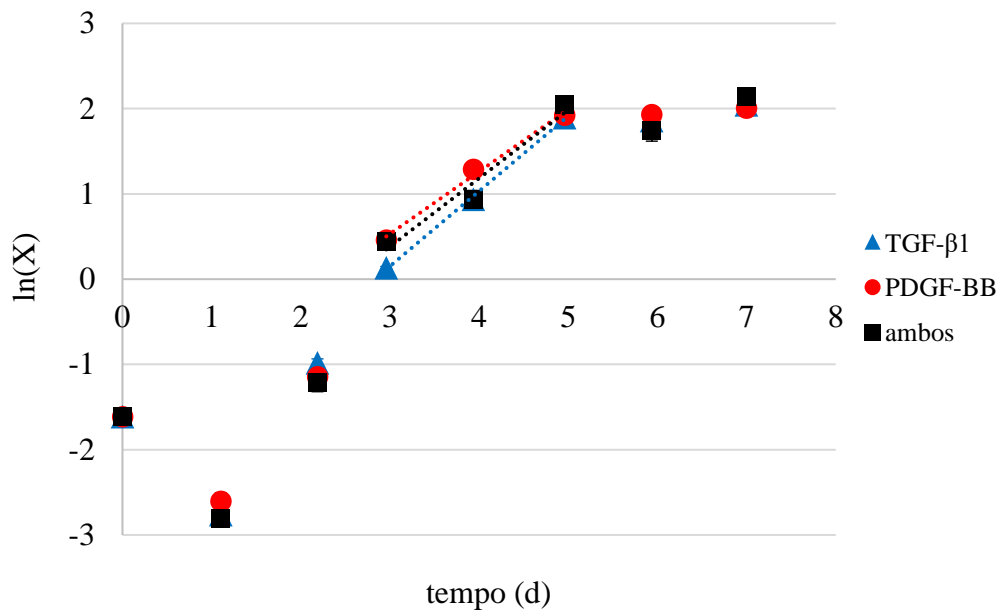


Figura C - 11 -  $\ln(X)$  de células HEK parentais em 2% SFB com adição de FC (1ª REPLICATA)

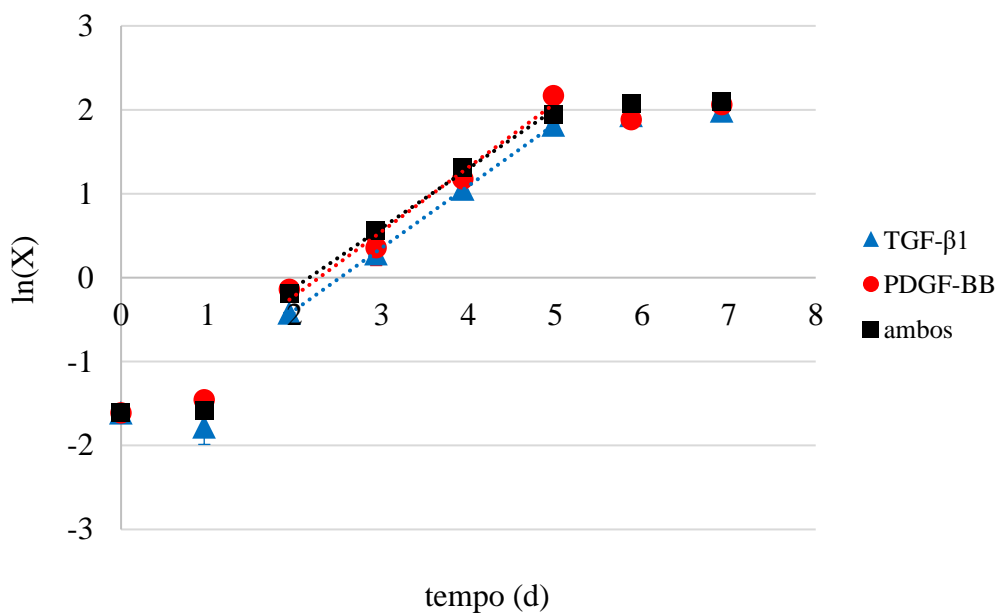


Figura C - 12 -  $\ln(X)$  de células HEK parentais em 2% SFB com adição de FC (2ª REPLICATA)

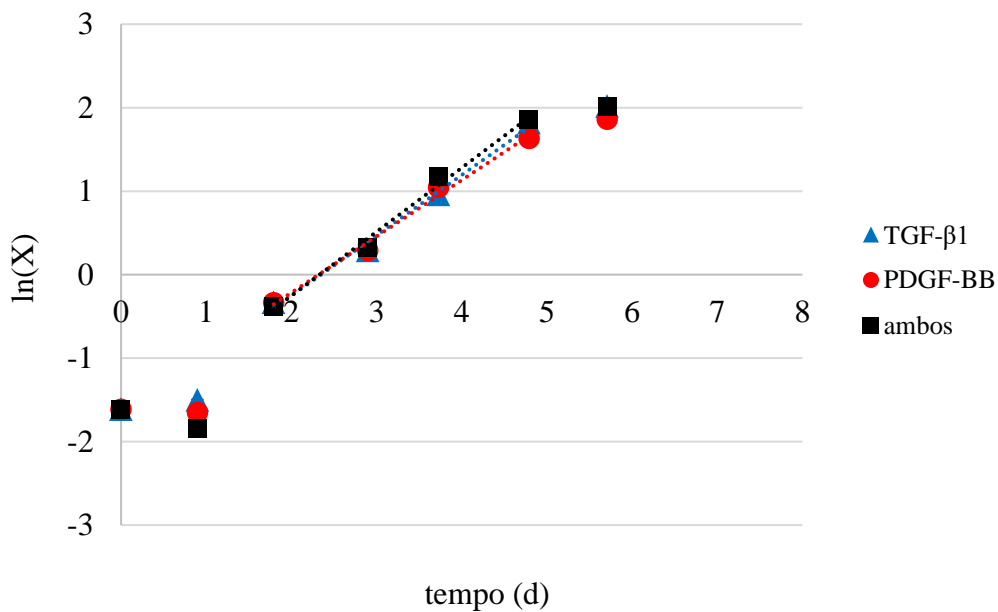


Figura C - 13 -  $\ln(X)$  de células HEK parentais em 2% SFB com adição de FC (3ª REPLICATA)

**APÊNDICE D – Replicatas biológicas das curvas de crescimento em diferentes concentrações de soro com a linhagem HEK produtora de PDGF-BB**

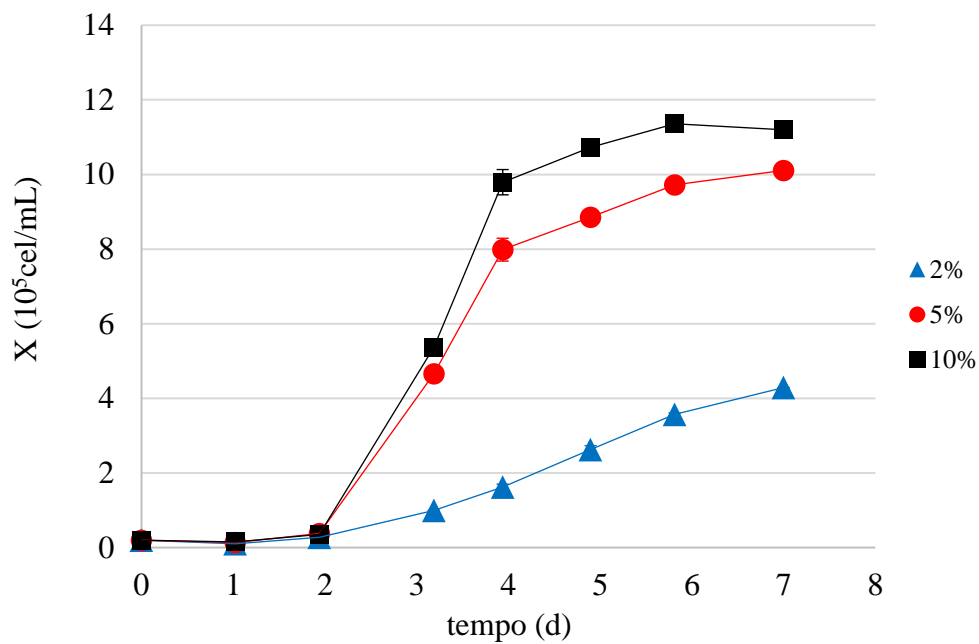


Figura D - 1 - Crescimento de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 condições de SFB (1ª REPLICATA)

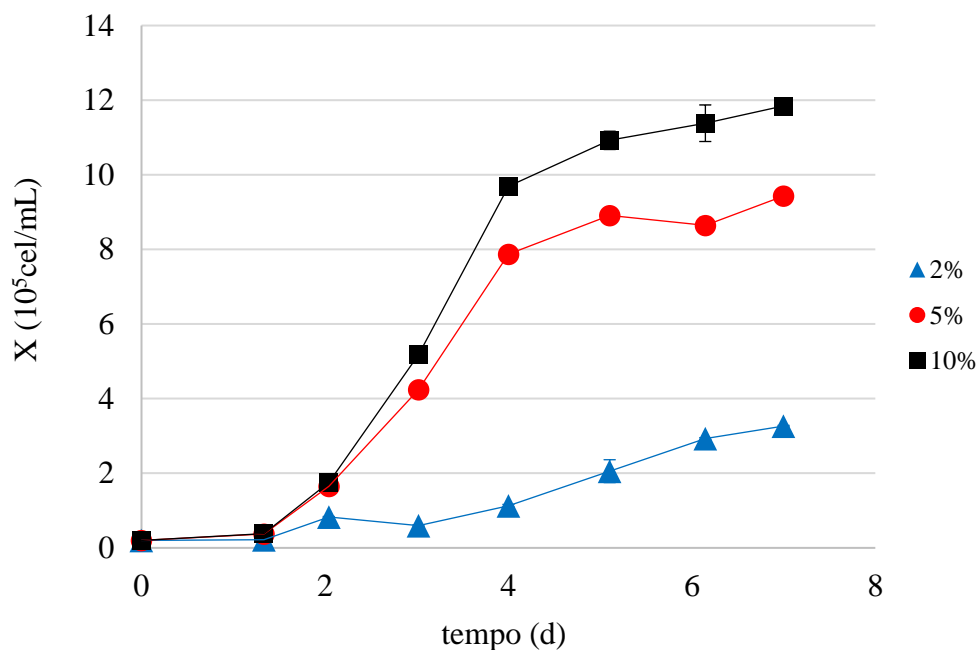


Figura D - 2 - Crescimento de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 condições de SFB (2ª REPLICATA)

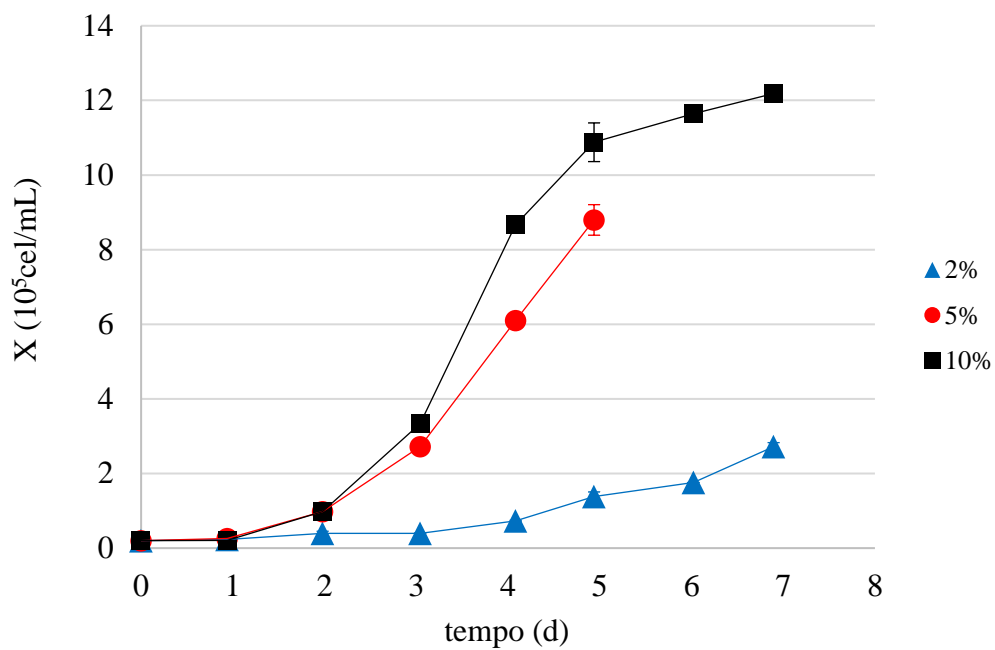


Figura D - 3 - Crescimento de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 condições de SFB (3ª REPLICATA)

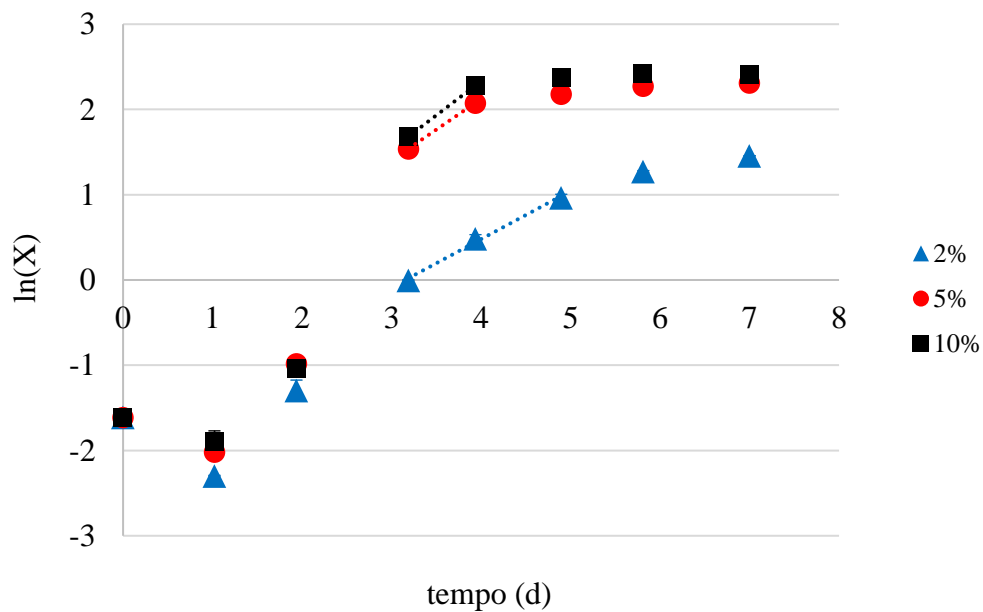


Figura D - 4 -  $\ln(X)$  de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 condições de SFB (1ª REPLICATA)



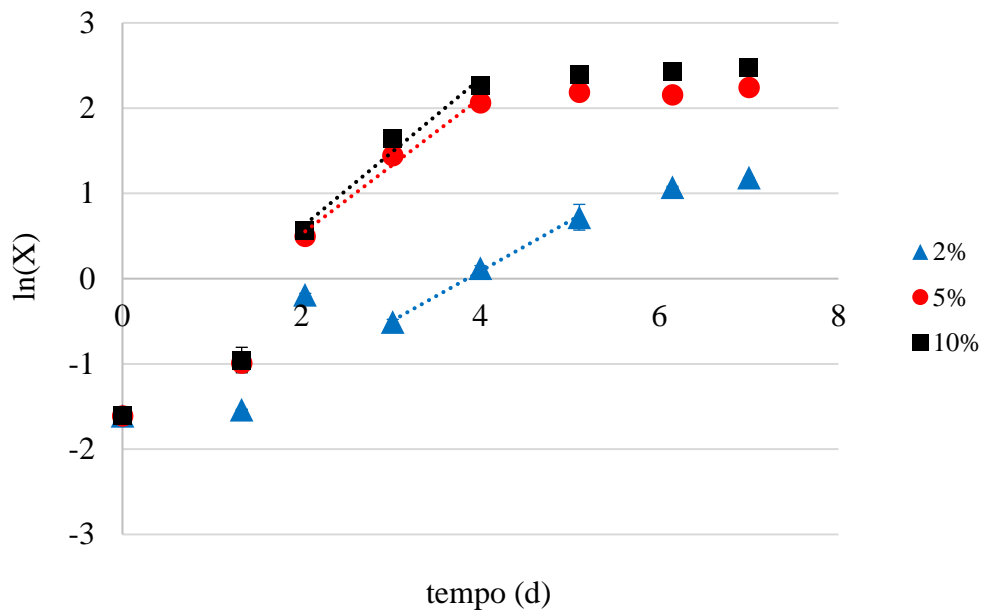


Figura D - 5 -  $\ln(X)$  de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 condições de SFB (2ª REPLICATA)

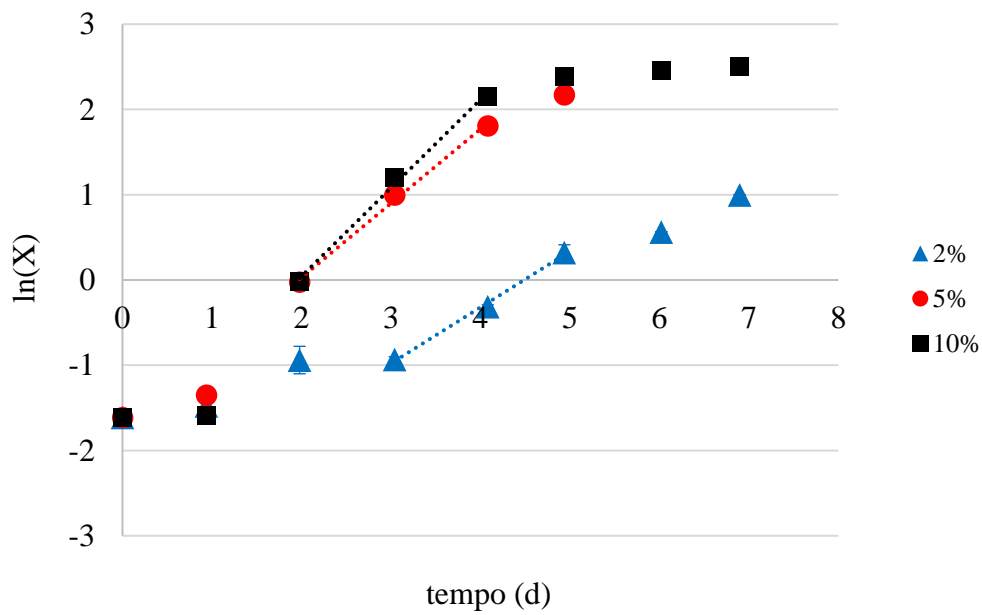


Figura D - 6 -  $\ln(X)$  de células HEK produtoras de PDGF-BB em 3 condições de SFB (3ª REPLICATA)