



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Potencial de produção de eritropoietina recombinante em
linhagens celulares humanas em condições de cultivo em
suspensão e meios livres de soro fetal bovino**

Luciano Costa e Silva

**Ribeirão Preto
2019**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LUCIANO COSTA E SILVA

Potencial de produção de eritropoietina recombinante em linhagens celulares humanas em condições de cultivo em suspensão e meios livres de soro fetal bovino

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e cosméticos

Orientador(a): Profa.Dra Kamilla Swiech Antonietto

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 27/03/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

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

Costa e Silva, Luciano

Potencial de produção de eritropoietina recombinante em linhagens celulares humanas em condições de cultivo em suspensão e meios livres de soro fetal bovino, 2019.

108 p: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e cosméticos.

Orientador: Kamilla Swiech Antonietto

1. Glicoproteínas recombinantes. 2. Linhagens celulares humanas. 3. Cultivo em meio em suspensão livre de soro fetal bovino

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Luciano Costa e Silva

Título: Potencial de produção de eritropoietina recombinante em linhagens celulares humanas em condições de cultivo em suspensão e meios livres de soro fetal bovino

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais Altair
(in memoriam) e Beth, pelo amor, carinho
e principalmente pela dedicação
incansável à minha formação. À minha
querida irmã Jackeliny e minha sobrinha
Rebeca Lara, que seja este mais um
pequeno exemplo para sua caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Ao ETERNO, por me aceitar de braços abertos em sua casa mesmo depois de tantos anos distante, e me conceder conforto, alento e paz para um coração que sofria em silêncio.

Aos meus pais Altair (*in Memoriam*) e Beth, que mesmo com todas as dificuldades e limitações sempre me mostraram que o conhecimento é o bem mais valioso.

À Profa. Dra. Kamilla Swiech Antonietto, pela orientação, amizade, sinceridade, franqueza e honestidade demonstrada durante o desenvolvimento desse trabalho.

A todos meus colegas de laboratório, em especial ao Robson, Tarik e Rafael Biaggio, com certeza nossa amizade não se restringirá apenas ao âmbito profissional.

Ao Matheus, pelas intermináveis discussões científicas e por me emprestar seu ouvido e paciência para escutar e contribuir com o devido “romantismo” que a ciência merece.

Aos amigos pessoais Lucas Benício, Jonas Mangabeira, Lucas Coelho e João “Drama” pela amizade e pelo constante incentivo. Como diria meu velho pai, “Amigo, uma palavra fácil de se pronunciar, difícil de encontrar”.

À Universidade de São Paulo e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP, por nos fornecer as condições necessárias para realizações de trabalhos como o aqui apresentado.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

SILVA, L. C. **Potencial de produção de eritropoietina recombinante em linhagens celulares humanas em condições de cultivo em suspensão e meios livres de soro fetal bovino** 2019. 108f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Atualmente, a maioria das proteínas terapêuticas comerciais é produzida em linhagens de células de mamíferos não humanas. No entanto, linhagens celulares humanas têm alcançado proeminência tanto na academia quanto na indústria. As células humanas são capazes de produzir proteínas recombinantes com modificações pós-traducionais que são mais semelhantes às proteínas nativas. Com o intento de estudar novos sistemas de expressão baseados em células humanas e eliminar o constituinte não humano de produtos biofarmacêuticos, este trabalho teve como objetivo estudar o perfil cinético, metabólico e potencial de produção das linhagens celulares humanas Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 cultivadas em suspensão e meio livre de soro fetal bovino (SFB). Foi selecionada a eritropoietina humana (EPO) como proteína modelo para avaliar a produtividade das linhagens celulares. Linhagens celulares recombinantes foram geradas por transdução lentiviral usando um MOI de 1 (multiplicidade de infecção de 1 vírus por célula), posteriormente as células positivas para a expressão da proteína repórter GFP foram separadas e coletadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células positivas para GFP após o processo de separação foi de 99%, 95% e 90% para as células SK-Hep-1, HKB-11 e Huh-7, respectivamente. Após a geração das linhagens celulares estáveis, foi testado o melhor meio de cultura livre de soro para o crescimento celular e produção de rhEPO. O meio CDM4 CHO foi o melhor meio para as linhagens Sk-Hep-1 e HKB-11 e o meio Freestyle, para a linhagem Huh-7. Foram caracterizados o número de cópias do gene da EPO por célula, a expressão do RNAm da EPO, a cinética de crescimento celular, o metabolismo e a produção de rhEPO. Todas as células apresentaram altas taxas de crescimento celular específico e altos níveis de produção de rhEPO quando comparadas à literatura. A concentração celular máxima alcançada pelas células Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 foi de $2,1 \times 10^6$ células/mL, $5,7 \times 10^6$ células/mL e $4,3 \times 10^6$ células/mL, com taxa de crescimento específico máxima de $0,023 \text{ h}^{-1}$, $0,022 \text{ h}^{-1}$, $0,031 \text{ h}^{-1}$ e uma concentração máxima de rhEPO de $112,35 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $112,0 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e $571 \text{ } \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A rhEPO produzida pelas células humanas foi capaz de diferenciar células CD34+ em células eritróides terminalmente diferenciadas, demonstrando assim sua funcionalidade. Com este trabalho, foi possível descrever as características cinéticas, metabólicas e a produtividade de três linhagens celulares humanas adaptadas para o cultivo em meio em suspensão e livre de SFB, contribuindo assim, tanto com estudo das linhagens celulares humanas quanto para a avaliação do uso das mesmas como alternativa para a produção industrial de glicoproteínas recombinantes.

Palavras-chave: Glicoproteínas recombinantes, linhagens celulares humanas, cultivo em suspensão, meios isentos de soro fetal bovino, vetores lentivirais, eritropoietina.

ABSTRACT

SILVA, L. C. **Potential production of recombinant erythropoietin in human cell lines under suspension culture conditions and fetal bovine serum free media** 2019. 108f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Currently, most commercial therapeutic proteins are produced in non-human mammalian cell lines. However, human cell lines have achieved prominence in both academia and industry. Human cells are capable of producing recombinant proteins with post-translational modifications that cause them to be more similar to native proteins. To study new human cell-based expression systems and eliminate the non-human constituent of biopharmaceuticals, this study aimed to examine the kinetic and metabolic profiles and the productivity of SK-Hep-1, HKB-11, and Huh-7 cell lines cultured in suspension serum-free medium. Human erythropoietin (EPO) was selected as a model protein to evaluate the productivity of the cell lines. Recombinant cell lines were generated by lentiviral transduction using a multiplicity of infection of 1 (MOI of 1). Subsequently, cells positive for the expression of the reporter protein GFP were separated and collected using flow cytometry. The percentage of GFP-positive cells after the separation process was 99 %, 95 %, and 90 % for SK-Hep-1, HKB-11, and Huh-7 cells, respectively. After the generation of stable cell lines, experiments were run to determine the serum-free culture medium most suitable for cell growth and rhEPO production. The results indicated that the CDM4 CHO medium was the most suitable for SK-Hep-1 and HKB-11 cells and the Freestyle medium was the most suitable for Huh-7 cells. The number of gene copies per cell, EPO mRNA expression, cell growth kinetics, metabolic profile, and rhEPO production were characterized. All cells had high rates of specific cell growth and high levels of rhEPO production when compared to the results reported in the literature. The maximum cell concentration achieved by SK-Hep-1, HKB-11, and Huh-7 cells was 2.1×10^6 cells/mL, 5.7×10^6 cells/mL, and 4.3×10^6 cells/mL; with a maximum specific growth rate of 0.023 h^{-1} , 0.022 h^{-1} , and 0.031 h^{-1} ; and a maximum rhEPO concentration of $112.35 \text{ }\mu\text{g/mL}$, $112.0 \text{ }\mu\text{g/mL}$, and $571 \text{ }\mu\text{g/mL}$, respectively. The rhEPO produced by human cells was able to differentiate CD34+ cells into terminally differentiated erythroid cells, thus demonstrating their functionality. The present study allowed to describe the kinetics, metabolic profile, and the productivity of three human cell lines cultured in suspension and serum-free medium, contributing to the study of human cell lines and the evaluation of their use as an alternative to producing recombinant glycoproteins.

Keywords: Recombinant glycoproteins, human cell lines, serum-free suspension culture, lentiviral vectors, erythropoietin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quadro esquemático de estruturas glicídicas típicas dos principais sistemas de expressão

Figura 2. Principais sistemas de expressão baseados em células de mamíferos utilizados na produção de biofármacos.

Figura 3. Esquema das vias glicolítica e glutaminolítica, ciclo do ácido tricarboxílico e principais sistemas mitocondriais de transporte.

Figura 4. Determinação da eficiência de transdução das linhagens celulares Skhep-1, HKB-11 e Huh-7.

Figura 5. Percentual de células GFP positivas após o processo de separação por citometria de fluxo

Figura 6. Intensidade de fluorescência de cada linhagem celular após o processo de separação por citometria de fluxo.

Figura 7. Fotomicrografia mostrando a morfologia e fluorescência das células após processo de separação por citometria de fluxo.

Figura 8. Produção volumétrica (A) e específica (B) da rhEPO pela linhagem celular Sk-Hep-1, usando diferentes meios de cultura.

Figura 9. Produção volumétrica (A) e específica (B) de rhEPO pela linhagem celular HKB-11, usando diferentes meios de cultura.

Figura 10. Produção volumétrica (A) e específica (B) de rhEPO pela linhagem celular Huh-7, usando diferentes meios de cultura.

Figura 11. Produção volumétrica (A) e específica (B) da rhEPO pelas linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 cultivadas nos melhores meios de cultura.

Figura 12. Concentração de células viáveis durante o cultivo das linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 em seus melhores meios.

Figura 13. Expressão relativa do gene da EPO nas linhagens celulares Sk-hep-1, HKB-11 e Huh-7.

Figura 14. Caracterização cinética e metabólica da linhagem celular Sk-Hep-1 modificada para a expressão estável da rhEPO.

Figura 15. Caracterização cinética e metabólica da linhagem celular HKB-11 modificada para a expressão estável da rhEPO.

Figura 16. Caracterização cinética e metabólica da linhagem celular Huh-7 modificada para a expressão estável da rhEPO.

Figura 17. Cinética da produção de rhEPO de células SK-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 cultivadas em suspensão e meio livre de soro fetal bovino.

Figura 18. Análise funcional das rhEPOs produzidas pelas linhagens celulares humanas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de glicoproteínas recombinantes aprovadas, sistema de expressão e potencial de contaminação pelo Neu5Gc.

Tabela 2. Quantificação por qPCR do número de cópias do vetor lentiviral 1054-EPO inseridas no genoma das linhagens celulares SK-Hep-1, HKB-11 e Huh-7.

Tabela 3. Média dos Cts do gene alvo (rhEPO) e dos genes de referência nas linhagens Sk-hep-1, HKB-11 e Huh-7 transduzidas e não transduzidas e seus respectivos Δ Cts.

Tabela 4. Parâmetros de crescimento e metabolismo das linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 cultivados em condições de suspensão isenta de soro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ Max	Velocidade específica de crescimento máxima
1,3BPG	1,3-bifosfatoglicerato
2PG	2-fosfoglicerato
3PG	3-fosfoglicerato
AcCoA	Acetyl-CoA
ALA	Alanina
AlaTA	Alanina transaminase
ALD	Aldolase
ASP	Aspartato
AspTA	Aspartato transaminase
ATCC	American Type Culture Collection
BHK	Baby Hamster Kidney cells, (Células renais de hamster neonato)
CAP	CEVEC's Amniocyte Production cells
cDNA	DNA complementar
CHO	Chinese Hamster Ovary cells (Células de ovário de hamster chinês)
CIT	Citrato
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dióxido de carbono
CPS-I	Carbamoyl fosfato sintetase I
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DHAP	Di-hidroxiacetona fosfato
DHFR	Dihidrofolato redutase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EBNA1	Epstein Barr Virus Nuclear Antigen – 1 (Antígeno Nuclear 1 do vírus Epstein Barr)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
EM-I	Enzima málica do tipo I
EM-II	Enzima Málica do tipo II
ENO	Enolase
F1,6BP	Frutose-1,6-fosfato
F2,6BP	Frutose-2,6-bifosfato
F6P	Frutose-6-fosfato
F6P	Frutose-6-fosfato isomerase
FITC	Fluorescein isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína)
FRC	Frutose
G1P	Glicose-1-fosfato
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
G6P	Glicose-6-fosfato
GAL	Galactose
GAL1P	Galactose-1-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GDP-GAL	UDP-galactose
GLC	Glicose
GLN	Glutamina
Glnse	Glutaminase
Gln-T	Transportador de glutamina

GLU	Glutamato
Glu-T	Transportador de glutamato
GLUT1	Transportador da glicose (Isoforma 1)
GLUT3	Transportador de glicose (Isoforma 3)
GLUT5	Transportador de glicose (Isoforma 5)
GFP	Green fluorescent protein (Proteína verde fluorescente)
GPI	Glicose-6-fosfato isomerase
GS	Glutamina sintetase
HEK	Human embryonic kidney cells (Células renais de embrião humano)
Huh-7	Hepato cellular carcinoma cells (Células de hepato carcinoma celular)
HK	Hexoquinase
HKB-11	Hybrid of kidney and B cells (Híbrido de células renais e células B)
HK-II	Hexoquinase (Isoforma II)
HT-1080	Célula derivada de fibrosarcoma humano
Ig	Imunoglobulina
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IRES	Internal ribosome entry site (Sítio interno de ligação ao ribossomo)
LAC	Lactato
LB	Lysogenic Broth (Caldo Lisogênico)
LDA	Lactato desidrogenase
Leu	Leucina
Lis	Lisina
LTR	Long terminal repeat (repetição terminal longa)
M6F	Manose-6-fosfato
MAL	Malato

MAN	Manose
MAS	Lançadeira do malato aspartato
MDHc	Malato desidrogenase (citoplasmática)
MDHm	Malato desidrogenase (mitocondrial)
MPI	Manose-6-fosfato isomerase
NaCl	Cloreto de Sódio
NC	Nucleocapsídeo
Neu5Ac	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
Neu5Gc	Ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico
NS0	Non-Ig Secreting myeloma Cells (Células de mieloma não secretoras de Ig)
OAA	Oxaloacetato
OXPHOS	Fosforilação Oxidativa
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
PC	Piruvato carboxilase
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PDH	Piruvato desidrogenase
PDHK	Piruvato desidrogenase quinase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PER.C6	Human Embryonic Retinoblast Cells (Células de retinoblastos embriônicos humanos)
PFK-1	Phosphofruitoquinase-1
PFK-2FB3	Fosfofrutoquinase-2 isoforma FB3
PGH	Fosfogliceromutase
PGK	Fosfoglicerato quinase
PK	Piruvato quinase
PYC	Piruvato carboxilase de levedura

PYR	Piruvato
qPCR	PCR quantitativo
R5P	Ribose-5-fosfato
RNAm	RNA mensageiro
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Reverse transcriptase (Transcriptase reversa)
Sk-Hep-1	Célula humana derivada de adenocarcinoma de fígado
STD	Transportador padrão do dicarboxilato
TPI	Triosefosfato isomerase
UDP-GLC	UDP-glicose
VSV-G	Vesicular stomatitis virus glycoprotein (glicoproteína do vírus da estomatite vesicular)
X	Concentração celular
α -Gal	Epítipo Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc
α KG	Alfa-cetogluturato

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 O mercado de biofármacos	24
2.2 Sistemas de expressão baseados em células de mamíferos.....	25
2.3 Linhagens celulares humanas.....	29
2.3.1 HEK-293	29
2.3.2 PER.C6	30
2.3.3 CAP	30
2.3.3 HKB-11	31
2.3.4 HUH-7	31
2.4 Introduzindo o DNA nas células de mamíferos	32
2.4.1 Expressão por transfecção transiente e por modificação estável	33
2.5 A Eritropoietina (EPO).....	35
2.6 Metabolismo das linhagens celulares de mamíferos.....	37
2.7 Cultivo celular em suspensão e meios livres de soro fetal bovino	40
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo	46
4.2 Vetores e transformação bacteriana	47
4.3 Produção das partículas lentivirais e determinação do título viral	48
4.4 Geração das linhagens celulares estáveis produtoras de rhEPO	48
4.5 Seleção do melhor meio de cultivo para produção rhEPO.....	49
4.6 Determinação do número de cópias virais integradas.....	50

4.7	Análise da expressão do RNAm da rhEPO nas linhagens celulares modificadas.....	51
4.8	Caracterização da cinética de crescimento celular, metabolismo e cinética de produção de rhEPO nas linhagens celulares modificadas.....	52
4.9	Análise dos resultados.....	53
4.10	Análise da atividade <i>in vitro</i> da rhEPO produzida.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	Geração de linhagens celulares estáveis produtoras de rhEPO.....	57
5.2	Seleção do melhor meio de cultivo para produção rhEPO.....	62
5.3	Determinação do número de cópias virais inseridas.....	65
5.4	Análise da expressão do RNAm da rhEPO nas linhagens celulares modificadas.....	66
5.5	Caracterização cinética e metabólica das linhagens celulares modificadas.....	67
5.6	Produção de rhEPO pelas linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7.....	75
5.7	Ensaio de diferenciação e maturação eritróide de células CD34+ de sangue periférico.....	77
6	CONCLUSÃO.....	81
8	PERSPECTIVAS.....	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
	ANEXOS.....	97

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Proteínas para uso terapêutico representam a maior classe de novos produtos que atingem o mercado farmacêutico. O estudo mais recente mostra que 155 novos produtos biofarmacêuticos foram aprovados nos Estados Unidos e na União Europeia no período de janeiro de 2014 a julho de 2018 e as vendas acumuladas nesse período alcançaram mais de 651 bilhões de dólares (WALSH, 2018). Uma parte significativa destas proteínas são glicoproteínas recombinantes que necessitam ser produzidas em células de mamíferos; tal requisito se dá pelas modificações pós-traducionais contidas nesses produtos biológicos, principalmente a glicosilação (LALONDE e DUROCHER, 2017). A glicosilação é um fator crucial que causa impacto no rendimento, bioatividade, solubilidade, estabilidade contra proteólise, imunogenicidade e taxa de depuração do biofármaco da circulação. Sendo assim, o uso de sistemas de expressão baseado em células de mamíferos é devido à sua capacidade de sintetizar proteínas com estruturas moleculares e propriedades bioquímicas similares àquelas que ocorrem naturalmente em humanos (DUROCHER e BUTLER, 2009).

A aprovação do ativador do plasminogênio tecidual humano em 1986 (Genentech, EUA) como primeira proteína terapêutica produzida em células de mamíferos colocou esta plataforma de expressão como uma alternativa promissora para a produção de proteínas recombinantes para a indústria biofarmacêutica. Diferentes tipos de células de mamíferos são utilizadas para a produção de produtos biofarmacêuticos, mas as células de ovário de hamster chinês (CHO) são de longe a linhagem celular de mamífero mais utilizada, sendo 60-70% de todos os produtos recombinantes sendo produzidos em células CHO (KIM *et al.*, 2012). Outras linhagens celulares, como as células renais de hamster neonato (BHK 21) e células de mieloma murino (NS0 e Sp/0), também são usadas para produção de proteínas recombinantes terapêuticas (GHADERI *et al.*, 2012). Embora linhagens celulares não humanas tenham se mostrado confiáveis no campo da produção de proteínas recombinantes, sintetizando proteínas que são similares àquelas que ocorrem naturalmente em humanos, algumas diferenças nas modificações pós traducionais foram observadas, as quais têm um impacto significativo na qualidade da proteína recombinante produzida (ZHU, 2012).

As principais diferenças estruturais entre proteínas produzidas em células não humanas incluem a presença do ácido siálico *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e a

ausência de ligações α (2,6) do ácido siálico à galactose (LEE *et al.*, 2012). A presença deste *N*-glicano pode contribuir para a imunogenicidade e neutralização dos bioterapêuticos, uma vez que foi confirmada a presença de anticorpos naturais circulantes contra os mesmos no soro humano. (GALILI *et al.*, 1984; NOGUCHI *et al.*, 1995; TANGVORANUNTAKUL *et al.*, 2003; GHADERI *et al.*, 2010a). Além disso, a captação de Neu5Gc presente em proteínas recombinantes terapêuticas pode levar à indução de inflamação crônica e ao aumento do risco de câncer e ataques cardíacos (VARKI, 2010).

Uma maneira de superar os problemas relacionados aos sistemas de expressão não humanos é o uso de células humanas para a produção de glicoproteínas recombinantes. Células humanas podem gerar proteínas recombinantes mais semelhantes às proteínas nativas humanas, o que significa características de maior qualidade para biofármacos, incluindo menor imunogenicidade, maior atividade biológica e aumento da meia-vida (SWIECH *et al.*, 2015).

Alguns sistemas de expressão baseados em células humanas demonstraram resultados promissores para a produção de proteínas recombinantes (DUMONT *et al.*, 2016). Dentre eles, podemos citar a AGE1.HN, uma linhagem celular humana desenvolvida pela Probigen AG a partir de células precursoras neuronais primárias, a CAP (CEVEC's Amniocyte Production) uma linhagem celular imortalizada baseada em amniócitos humanos primários, a linhagem celular de rim embrionário humano 293 (HEK-293), a linhagem celular de retina embrionária humana PER.C6 desenvolvida pela Crucell e a linhagem de fribrosarcoma humano HT1080. (RASHEED *et al.*, 1974; GRAHAM *et al.*, 1977; PAU *et al.*, 2001; SCHIEDNER *et al.*, 2008; NIKLAS *et al.*, 2011). No entanto, mesmo quando comparando células humanas, já foram descritas variações nas estruturas glicídicas entre moléculas produzidas em células humanas normais diferenciadas e células tumorais (VARKI *et al.*, 2009; VARKI *et al.*, 2015).

É essencial salientar que o uso de células humanas para abordar esta questão não pode ser considerado como a solução final, uma vez que constituintes não humanos como ácido Neu5Gc podem ser absorvidos de produtos de origem animal, como o soro fetal bovino ou de qualquer outro produto derivado de origem não humana usado nas formulações dos meios de cultura, e então serem metabolicamente incorporados à glicoproteína secretada (BARDOR *et al.*, 2005). Além disso, existem vários inconvenientes relacionados ao uso de soro animal em cultura de células: o

mesmo torna o processo de purificação mais difícil por aumentar o número de contaminantes, diminui o conteúdo de ácido siálico da molécula, é uma fonte potencial de agentes infecciosos como vírus e prions e apresenta variabilidade de lote para lote (FROUD, 1999; LE FLOCH *et al.*, 2004). Assim, o desenvolvimento de um processo industrial deve considerar a seleção do sistema de expressão adequado bem como a adaptação da linhagem celular recombinante à cultura livre de constituintes de origem animal.

Outro ponto importante é o estudo do comportamento cinético e metabólico das linhagens humanas adaptadas ao cultivo em suspensão livre de SFB, tendo em vista que tais parâmetros impactam diretamente no rendimento e na qualidade das glicoproteínas produzidas.

Geralmente, o metabolismo das linhagens celulares de mamíferos quando cultivadas *in vitro* é caracterizado pelo alto consumo de glicose e glutamina, sendo essas as principais fontes de energia para a cultura. A glicose é utilizada quer através da via das pentoses-fosfato para proporcionar nucleótidos e energia para a biossíntese, quer através da via da glicólise e do subsequente ciclo de Krebs para proporcionar intermediários metabólicos e energia para o crescimento e sobrevivência das células (BUTLER e JENKINS, 1989). A glutamina por sua vez, é uma importante fonte de energia e um precursor biossintético para o crescimento celular, servindo como fonte de carbono para o ciclo de Krebs e como fonte de nitrogênio para a síntese de purinas, pirimidinas e aminoácidos (OZTURK *et al.*, 1992; LAO e TOTH, 1997b; ALTAMIRANO *et al.*, 2013). Tal comportamento leva ao acúmulo de alguns metabólitos que podem comprometer a cultura celular, sendo os principais o lactato e o íon amônio (ALTAMIRANO *et al.*, 2013).

O acúmulo de íons amônio durante o cultivo *in vitro* de células de mamíferos é uma das principais causas de inibição do crescimento e da heterogeneidade proteica. A principal fonte de amônia em culturas de células de mamíferos é o metabolismo da glutamina. Antes da glutamina entrar no ciclo do ácido cítrico, os grupos amônia são liberados via glutaminólise devido à ação da glutaminase e da glutamato desidrogenase, podendo um mol de glutamina gerar até dois moles de íon amônio (MCQUEEN e BAILEY, 1990; MCQUEEN e BAILEY, 1991).

Pensando nisso, nosso grupo de pesquisa vem estudando o processo de adaptação de células humanas ao cultivo em suspensão e meios livres de soro fetal bovino, a caracterização cinética, metabólica e a avaliação da produção de

glicoproteínas em tais células (DA ROSA *et al.*, 2012; PICANCO-CASTRO *et al.*, 2013; BIAGGIO *et al.*, 2015; DE SOUSA BOMFIM *et al.*, 2016; DO AMARAL *et al.*, 2016; CORREA DE FREITAS *et al.*, 2017).

Considerando a limitada literatura descrevendo tais características das linhagens celulares humanas, o presente trabalho teve o objetivo de estudar as características cinéticas metabólicas e o potencial de produção das linhagens celulares humanas Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 cultivadas em suspensão e meios livres de soro fetal bovino utilizando-se a eritropoietina humana como proteína modelo para a avaliação do potencial de produção.

Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O mercado de biofármacos

Em 1982 foi aprovada a primeira proteína recombinante para uso em humanos, o Humulin, uma insulina recombinante produzida em *E.coli*. Desde então o mercado de biofármacos passou por intenso crescimento (WALSH, 2014). De janeiro de 2014 a julho de 2018 foram aprovados 155 novos produtos biofarmacêuticos nos Estados Unidos e na União Europeia, e as vendas acumuladas durante esse período alcançaram mais de 651 bilhões de dólares; somente as vendas totais de 2017 chegaram a 188 bilhões de dólares, sendo neste mesmo ano aprovados 36 novos biofármacos (WALSH, 2018).

Com essas novas aprovações, o número de produtos biofarmacêuticos que obtiveram uma licença nessas regiões totaliza 374, sendo que 285 contém princípios ativos distintos. Contudo, com o passar dos anos, alguns desses produtos foram retirados do mercado; mais precisamente 58 biofármacos foram retirados de circulação. Quando contabilizados os produtos retirados do mercado, chegamos ao número de 316 biofármacos com licenças ativas no mercado atualmente (WALSH, 2018).

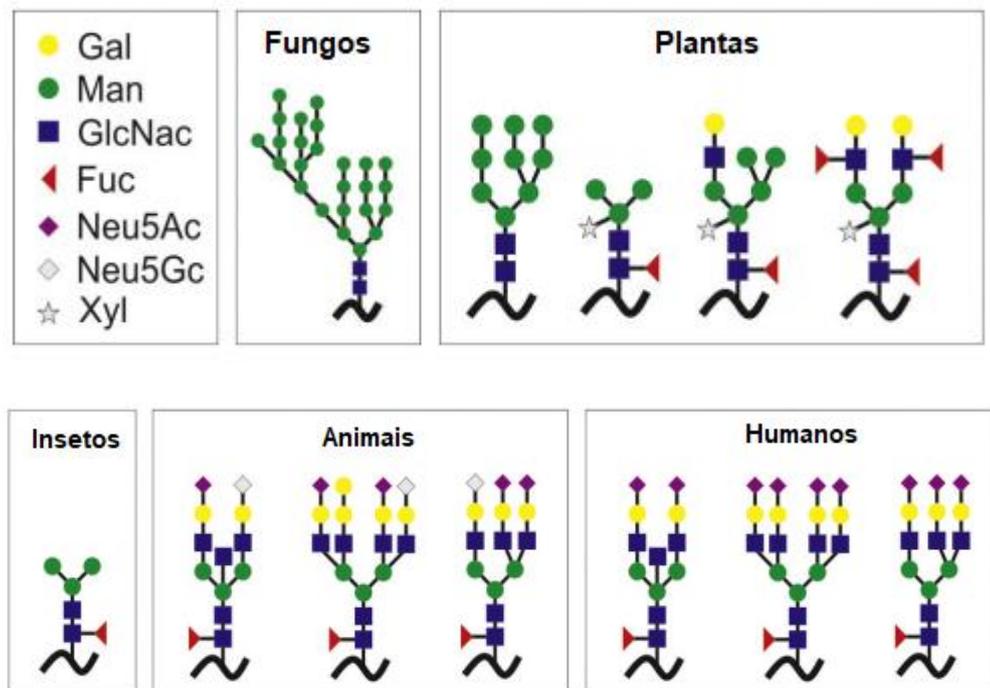
O número de produtos aprovados em cada período de cinco anos permaneceu notavelmente constante de 1995 a 2014, com uma média 54-60 produtos aprovados a cada 5 anos (WALSH, 2003; WALSH, 2006; WALSH, 2010; WALSH, 2014). Contudo, essa tendência foi quebrada no período de 2015 a 2018, onde as aprovações aumentaram consideravelmente, representando o dobro das aprovações dos cinco anos anteriores (WALSH, 2018). Apesar da onda de aprovações de biossimilares contribuir para esta tendência, o número de produtos genuinamente novos aprovados não ficou muito atrás: tais produtos representaram 52% das aprovações nos últimos quatro anos e meio em comparação com 59% no período de 2010 a 2014 (WALSH, 2014; WALSH, 2018).

Uma tendência evidente ao longo dos anos na produção de produtos biofarmacêuticos aprovados é o aumento constante da utilização de sistemas de expressão baseados em células de mamíferos em relação aos não mamíferos. Essa tendência também se confirmou nos últimos quatro anos, sendo que 62 dos 71 novos biofármacos são proteínas recombinantes, das quais 84% são produzidas em sistemas de expressão baseados em células de mamíferos. Esta tendência coincide

com o aumento contínuo na proporção de moléculas complexas, que abrigam modificações pós-traducionais como principalmente a glicosilação, que entram no mercado todos os anos (WALSH, 2018).

Dentre vários fatores, a glicosilação da proteína é principalmente influenciada pelo sistema de expressão utilizado (Figura 1). Diferentes tipos celulares expressam diferentes enzimas e transportadores, contribuindo para a especificidade, heterogeneidade nos perfis de glicosilação e subsequente eficácia clínica do produto terapêutico; sendo assim, a escolha do sistema de expressão impactua diretamente na qualidade da proteína terapêutica produzida (GOH e NG, 2018).

Figura 1. Quadro esquemático de estruturas glicídicas típicas dos principais sistemas de expressão.



Adaptado de (FLIEDL *et al.*, 2015)

2.2 Sistemas de expressão baseados em células de mamíferos

Desde a aprovação do primeiro biofármaco recombinante, houve uma crescente tendência na utilização de células de mamíferos na produção dos mesmos (WALSH, 2014). A aprovação do ativador do plasminogênio tecidual humano em 1986 (Genentech, USA) como a primeira proteína terapêutica produzida em células de mamíferos, colocou os sistemas de expressão baseados em células de mamíferos

como uma promissora alternativa na produção de proteínas recombinantes para a indústria biofarmacêutica (KIM *et al.*, 2012).

Esta tendência foi principalmente impulsionada pelo aumento da atenção dirigida para modificações pós-traducionais contidas nos produtos biológicos, em particular para o seu estado de glicosilação. Aproximadamente 70% das proteínas terapêuticas no mercado correspondem a proteínas glicosiladas. Considerando esse fator, a necessidade da escolha de sistemas de expressão que permitam a produção dessas moléculas com alto grau de acurácia, torna-se fundamental (BUTLER e SPEARMAN, 2014). De fato, vários esforços foram feitos nos últimos anos para entender como a glicosilação pode influenciar na atividade biológica da terapêutica. Estudos demonstraram que perfis de glicosilação adequados podem melhorar as propriedades das proteínas recombinantes bem como aumentar a sua estabilidade e meia-vida na circulação sanguínea e diminuir sua imunogenicidade (ASHWELL e HARFORD, 1982; RUNKEL *et al.*, 1998; LALONDE e DUROCHER, 2017). Abaixo será descrito o principal sistema de expressão baseado em células de mamíferos utilizado na produção de glicoproteínas terapêuticas.

Apesar da disponibilidade de várias linhagens celulares de mamíferos (Figura 2), tais como de células renais de hamster neonato (BHK), células NS0 derivadas de mieloma de rato, células de rim embrionário humano (HEK-293) e células de retina humana (PerC6), quase 70% de todas as proteínas terapêuticas recombinantes produzidas atualmente são derivadas de células de ovário de hamster chinês (CHO) (JAYAPAL *et al.*, 2007; WALSH, 2014; WALSH, 2018).

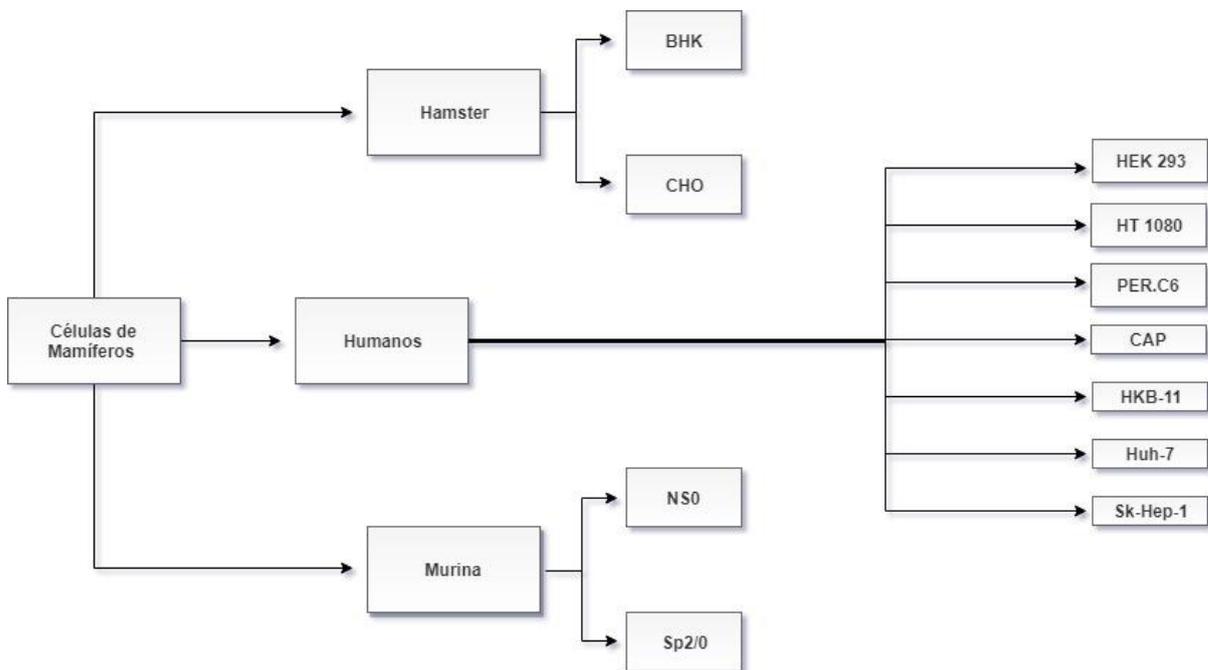
As células CHO são amplamente utilizadas na produção de glicoproteínas terapêuticas por causa de suas numerosas vantagens. Estas células podem atingir uma taxa de produção substancial e são adequadas para cultura em suspensão visando cultivos em escala industrial bem como podem ser adaptadas ao crescimento em diversos tipos de meio de cultura quimicamente definidos e isentos de soro fetal bovino. As células CHO são capazes de produzir glicoproteínas recombinantes com modificações pós traducionais semelhantes às humanas, gerando então produtos mais compatíveis e bioativos em hospedeiros humanos (KIM *et al.*, 2012).

As células CHO são uma das plataformas de expressão mais estudadas no campo da produção de biofármacos em células de mamíferos, tendo seu comportamento cinético e metabólico, sua caracterização genética e sua produtividade sido bem descritos na literatura. Tais estudos possibilitaram

consideráveis avanços no uso das células CHO na produção de glicoproteínas recombinantes, como por exemplo o desenvolvimento de sistemas de amplificação gênica, os quais permitiram obter altas taxas de produção nesse sistema de expressão (KIM *et al.*, 2012; LALONDE e DUROCHER, 2017).

Existem variados exemplos de glicoproteínas bioterapêuticas aprovadas pelas principais agências regulatórias do mundo atualmente produzidas em células CHO. Anticorpos monoclonais como o Siltuximab (SYLVANT®), Pertuzumab (PERJETA®) e Rituximab (RITUXAN®), bem como outras proteínas, como o ativador do plasminogênio tecidual (tPa, ACTILYSE®, ACTIVASE®) e a DNase humana (PULMOZYME®) são apenas alguns dos muitos exemplos de bioterapêuticos gerados em células CHO (para uma consulta mais detalhada recomenda-se (DUMONT *et al.*, 2016).

Figura 2. Principais sistemas de expressão baseados em células de mamíferos utilizados na produção de biofármacos



Adaptado de (LALONDE e DUROCHER, 2017)

Apesar das vantagens da utilização de células CHO para a produção de glicoproteínas recombinantes, elas são incapazes de produzir alguns tipos de modificações pós tradução humana, tais como a sialilação α -2,6 e a fucosilação α -

1,3/4. Somado a isso, as células CHO produzem glicanos que não ocorrem em células humanas, dentre eles o ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e galactose- α 1,3-galactose (α -gal) (PATNAIK e STANLEY, 2006; BOSQUES *et al.*, 2010; GHADERI *et al.*, 2010b).

Conforme já mencionado anteriormente, o sistema imunológico humano pode produzir anticorpos contra esses *N*-glicanos, o que poderia contribuir para a imunogenicidade/neutralização dos biofármacos. A Tabela 1 mostra alguns biofármacos produzidos em diferentes sistemas de expressão e seu potencial risco de conter Neu5Gc (GALILI *et al.*, 1984; NOGUCHI *et al.*, 1995; TANGVORANUNTAKUL *et al.*, 2003; 2008; GHADERI *et al.*, 2010a; GHADERI *et al.*, 2012).

Tabela 1. Lista de glicoproteínas recombinantes aprovadas, sistema de expressão e potencial de contaminação pelo Neu5Gc

Agente		Fonte	Risco de Neu5Gc
Actemra[®]	Tocilizumab	CHO	++
Aranesp[®]	Darbepoetin- α	CHO	++
Arzerra[®]	Ofatumumab	NS0	+++
Avastin[®]	Bevacizumab	CHO	++
Benlysta[®]	Belimumab	NS0	+++
Bexxar[®]	Tositumomab-I131	Híbridoma	+++
Creon[®]	Pancrelipase	Porco	+++
Elaprase[®]	Idursulfase	HAT-1080	+
Epogen[®]	Epoetin- α	CHO	++
Erbix[®]	Cetuximab	Sp2/0	+++
Herceptin[®]	Trastuzumab	CHO	++
Humira[®]	Adalimumab	CHO	++
NovoSeven[®]	Factor-VIIa	BHK	++
Rituxan[®]	Rituximab	CHO	++
Soliris[®]	Eculizumab	Mieloma Murino	+++
Synagis[®]	Palivizumab	NS0	+++
Vitrax[®]	Hyaluronidase	Ovelha	+++
Xigris[®]	Drotrecogin-a	HEK293	+
Xolair[®]	Omalizumab	CHO	++

Risco de contaminação com Neu5Gc é minimizado para linhagens celulares humanas (+); CHO e BHK mostram risco moderado (++) e NS0, Sp2/0, mieloma murino e células de híbridoma, bem como os animais, apresentam maior risco (+++). Adaptado de (FLIEDL *et al.*, 2015).

Apesar da segurança e eficiência das proteínas recombinantes produzidas em células não humanas, há a necessidade de estudos com outros sistemas de expressão que possam circunvir os inconvenientes relacionados ao uso de células não humanas. A fim de contribuir com o desenvolvimento de tal intento, nosso grupo de pesquisa vem estudando a utilização de células humanas para a produção de proteínas terapêuticas com resultados promissores (DA ROSA *et al.*, 2012; PICANCO-CASTRO *et al.*, 2013; BIAGGIO *et al.*, 2015; DE SOUSA BOMFIM *et al.*, 2016; DO AMARAL *et al.*, 2016; CORREA DE FREITAS *et al.*, 2017).

2.3 Linhagens celulares humanas

Uma possível forma de favorecer a produção de proteínas recombinantes mais semelhante às proteínas humanas seria a utilização de linhagens celulares humanas. Tal estratégia garantiria proteínas recombinantes sem potencial imunogênico (SWIECH *et al.*, 2012a).

Abaixo serão brevemente descritas as características de algumas linhagens celulares humanas potencialmente utilizáveis na produção de proteínas recombinantes.

2.3.1 HEK-293

A linhagem HEK-293 é uma linhagem derivada de células embrionárias renais humanas que foi desenvolvida aproximadamente há 35 anos (GRAHAM *et al.*, 1977), mas apenas nos últimos anos tem sido extensamente usada para produção de proteínas recombinantes e vetores virais. Esta linhagem celular é provavelmente a linhagem humana mais utilizada para pesquisas relacionadas à expressão de proteínas recombinantes (BALDI *et al.*, 2005; SWIECH *et al.*, 2015; DUMONT *et al.*, 2016). Apesar da primeira proteína licenciada para uso terapêutico Xigris, (proteína C ativada, aprovada em 2001) ter sido retirada do mercado em 2011 devido a falta de efetividade, hoje existem diversas glicoproteínas disponíveis no mercado que são produzidas na linhagem HEK 293; algumas delas são: o fator VIII da coagulação sanguínea denominado Nuwiq (Simoctocog Alfa) produzido pela Octapharma; o Dulaglutide utilizado para o tratamento do diabetes tipo 2; o Elocta um fator VIII da coagulação fusionado a uma porção Fc e o Alprolix um fator IX da coagulação (SWIECH *et al.*, 2012b).

Células HEK-293 também são amplamente utilizadas para a produção de vetores virais (adenovírus, retrovírus e lentivírus). Muitos vetores produzidos usando esta linhagem estão atualmente em fase II e III de ensaios clínicos (HENRY *et al.*, 2011). Uma das razões para a sua larga aplicação é o fato destas células crescerem facilmente em suspensão e em meios livres de soro, e se encontrarem disponíveis comercialmente nesta condição. Apesar das vantagens, essas células formam grandes agregados em biorreatores, dificultando o processo de escalonamento (MEI *et al.*, 2006; DUROCHER e BUTLER, 2009; ZHU, 2012).

2.3.2 PER.C6

A linhagem celular PER.C6 já tem grande impacto no mercado biofarmacêutico, este sistema de expressão foi estabelecido a partir de retinoblastos embrionários humanos imortalizados pela transfecção com o minigene E1 do adenovírus tipo 5 (FALLAUX *et al.*, 1998). Essa linhagem celular foi inicialmente desenvolvida para uma produção segura de uma categoria de vetores adenovirais. Tais vetores são usados atualmente como proposta de vacinas e terapias gênicas. Mais recentemente, a linhagem PER.C6 tem sido avaliada como plataforma de expressão para algumas proteínas terapêuticas (Havenga, Holterman *et al.* 2008). A linhagem celular PER.C6 cresce facilmente tanto em culturas em suspensão ou em aderência, atingindo alta densidade celular em meios com ou sem soro animal.

Muitas empresas já licenciaram a PER.C6 para uso em larga escala e para a produção interna de candidatos terapêuticos. Atualmente vários produtos expressos em PER.C6 estão em Fase I / II de estudos clínicos (DUROCHER e BUTLER, 2009).

2.3.3 CAP

A CEVEC desenvolveu um novo e exclusivo sistema de expressão para produtos biofarmacêuticos (Linhagem de células CAP) baseado em amniócitos humanos obtidos do fluido amniótico. Estes amniócitos humanos primários foram imortalizados pela genética adenoviral. As células CAP foram otimizadas para crescer em uma variedade de sistemas de cultivo e podem ser eficientemente transfectadas com os reagentes de transfecção comercialmente disponíveis. Além disso, um banco de células CAP que crescem em suspensão foi estabelecido, testado e certificado de acordo com a farmacopeia europeia, o que faz dessas células plataformas disponíveis para a produção de biofármacos comercialmente.

2.3.3 HKB-11

A linhagem HKB-11 foi desenvolvida pela fusão das células 293S com células de linfoma de Burkitt's (célula 2B8), sendo patenteada pela Bayer (CHO *et al.*, 2001). Esta célula possui tanto características da HEK-293, como fácil transfecção e expressão de grandes quantidades de proteína, quanto propriedades de célula B, como a eficiente secreção de proteínas (CHO *et al.*, 2001). A HKB-11 foi desenvolvida com o propósito de resolver o problema de agregados da HEK- 293S cultivadas em suspensão em meio livre de SFB. Portanto, essas células crescem bem em meios isentos de soro e em suspensão, possuem elevada eficiência de transfecção e secretam grandes quantidades de proteínas recombinantes com perfil de glicosilação humana (MEI *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos exemplificam sua elevada capacidade de produção. Algumas glicoproteínas, como o fator VIII (FVIII), são difíceis de expressar devido ao seu tamanho e complexidade, tanto que a magnitude de expressão do fator VIII é de 2 a 3 vezes menor do que outras proteínas recombinantes produzidas por células de mamíferos. Em comparação com outras linhagens, a HKB-11 mostrou um aumento nos níveis de FVIII de 8 vezes em comparação com HEK-293 e 30 vezes em relação a BHK-21 (MEI *et al.*, 2006). Em outro estudo, as células HKB-11 apresentaram maior eficiência de transfecção e expressão (aproximadamente duas vezes) de interleucina e anticorpos que as células HEK-293S (ZHU, 2012). No seu uso para expressar a muteína da interleucina IL-2SA, Cho e colaboradores (2001) alcançaram produtividade de 470 mg/L, indicando seu potencial de escalonamento (CHO *et al.*, 2001). Apesar do potencial, ainda não foram relatados produtos comerciais relacionados a esta célula.

2.3.4 Huh-7

A linhagem Huh-7 é derivada de um carcinoma hepatocelular caracterizada por Nakabayashi e colaboradores (1982), os quais procuravam células que mantivessem as funções diferenciadas dos tecidos originais e que pudessem ser mantidas em meios quimicamente definidos sem a necessidade da adição de SFB. A Huh-7 possuía esses requisitos, uma vez que produz um grande número de proteínas plasmáticas e enzimas hepatoespecíficas (NAKABAYASHI *et al.*, 1982). Em 2011, Kausar e colaboradores expressaram transientemente eritropoietina humana e foram obtidos

níveis de produção semelhantes aos obtidos com a célula CHO, usualmente utilizada pela indústria para produção desta glicoproteína (KAUSAR *et al.*, 2011).

Em 2012, pesquisadores demonstraram que a linhagem Huh-7 pode ser uma alternativa viável à produção do fator de coagulação IX, uma vez que promove as corretas γ -carboxilação, fosforilação e sulfatação da proteína, além de possuir naturalmente a maquinaria para expressão da vitamina K 2,3-epóxido redutase C (VKORC), não sendo necessária sua coexpressão (ENJOLRAS *et al.*, 2012). Outros estudos demonstraram a expressão de vírus e outras proteínas recombinantes nesta célula (NAKABAYASHI *et al.*, 1984; MATSUGUCHI *et al.*, 1990; SAINZ e CHISARI, 2006).

Além das linhagens acima citadas, o nosso grupo de pesquisa vem estudando outras linhagens celulares humanas como a SK-HEP- 1 e Hep-G2 (BIAGGIO *et al.*, 2015).

Deste modo, buscando plataformas alternativas para produção de proteínas recombinantes, as células humanas têm ganhado destaque pela produção de proteínas com correto perfil de carboidratos e sem a presença de resíduos imunogênicos, auxiliando assim na terapia de pacientes crônicos.

2.4 Introduzindo o DNA nas células de mamíferos

Células de mamíferos em cultura estão constantemente a incorporar elementos do seu ambiente, não só através de mecanismos de transporte específicos, mas também por endocitose, isto é, formação e internalização de vacúolos a partir da superfície celular. Uma vez que as superfícies celulares são negativamente carregadas, complexos de DNA com substâncias que conferem uma carga global positiva (dextrana, fosfato de cálcio, polímeros catiônicos e lipídios catiônicos) aderem à superfície celular e são internalizados em vesículas ligadas à membrana (DANON *et al.*, 1972; GRAHAM, 1988; BOUSSIF *et al.*, 1995). A liberação desses compartimentos pode ocorrer via fusão de vesículas endocíticas aos lisossomos ou por lise osmótica que ocorre como resultado da neutralização dos complexos de DNA catiônico (KICHLER *et al.*, 2001). Acredita-se que o movimento do DNA transfectante do citoplasma para o núcleo ocorra durante a divisão celular, quando a dissolução e a remontagem da membrana nuclear permitem o acesso ao compartimento nuclear. No entanto, reagentes de transfecção, como a polietilenimina, podem promover o movimento do DNA para o interior de núcleos intactos (DHEUR *et al.*, 1999)

2.4.1 Expressão por transfecção transiente e por modificação estável

A transfecção de células de mamíferos funciona de acordo com diferentes princípios. Utilizando os protocolos de transfecção mais comuns, milhares de moléculas do plasmídeo entram em cada célula transfectada; os plasmídeos transfectados não se replicam, mas sim são linearizados e ligados um ao outro; a partir de então, a célula expressará a proteína de interesse através do DNA plasmidial, os quais serão posteriormente perdidos por diluição após a divisão das células hospedeiras (HARTLEY, 2012). Além disso, as moléculas de plasmídeo podem ser degradadas ou modificadas (silenciadas) ao longo do tempo, de modo que a expressão proteica seja perdida. Dentro da população de células transfectadas, há uma pequena porcentagem (menos de 10%; às vezes, menos de 1%) de células nas quais o DNA que entra integra-se aleatoriamente ao genoma da célula hospedeira (HARTLEY, 2012; BANDARANAYAKE e ALMO, 2014). Clones contendo o DNA de interesse podem ser selecionados utilizando genes de resistência contidos nos plasmídeos usados. No entanto, a seleção com fármacos não origina clones idênticos, mas resulta em clones que variam largamente na produtividade da proteína de interesse e até mesmo em clones que são altamente resistentes ao fármaco, mas não produzem proteína alguma. Clones que possuem características desejáveis podem mudar com o tempo e perder seu valor. O tempo requerido para conseguir um clone de mamífero de alta qualidade, expressando estavelmente uma proteína de interesse, é tipicamente medido em meses (HACKER e BALASUBRAMANIAN, 2016).

Como consequência, a expressão proteica em células de mamíferos é dividida em expressão transiente e estável. Ambos os modos podem ser realizados com a introdução do DNA plasmidial em uma linhagem celular. Na transfecção transiente, além da perda da expressão com o decorrer do tempo, há alguns outros pontos inconvenientes; a preparação de plasmídeo em grande escala tem se tornado cada vez mais cara e o procedimento é bastante trabalhoso e gera resíduos plásticos e biológicos consideráveis. Juntamente a isso, os volumes de biomassa e meios de expressão tipicamente exigidos, e o grande número de garrafas rotativas de plástico usadas com frequência para um determinado alvo, somam substanciais encargos financeiros e ambientais. Vale ressaltar que a eficiência do processo de transfecção transiente em grande escala usando polietilenimina (PEI) é tipicamente limitada a 60-75% das células, significando que aproximadamente um terço da massa total da cultura é desperdiçado (ELEGHEERT *et al.*, 2018). Para a expressão transiente, o

intervalo de tempo para obtenção da proteína geralmente é de alguns dias após a transfecção, já para a modificação estável, a transfecção é seguida em um ou dois dias por condições de seleção (nutricional ou medicamentosa). Dentro de uma semana ou duas de cultura, a maioria das células morrem ou porque não foram transfectadas ou porque o DNA plasmidial não foi integrado ao genoma celular. As células resistentes assumem a cultura e, posteriormente, os clones individuais são isolados e avaliados quanto ao seu potencial de produtividade a longo prazo. Como muitos aspectos são aleatórios, o mais importante é a localização cromossômica da integração e sua influência na expressão de proteínas; dezenas a milhares de clones podem ser avaliados sem qualquer garantia de que um clone com produção satisfatória possa ser encontrado. Para a produção comercial, vários clones podem ser seguidos em escala moderada por muitos meses para garantir uma produtividade alta e estável a longo prazo (HARTLEY, 2012; KHAN, 2013).

Um método ideal combinaria a facilidade de uso e a velocidade da transfecção transiente com a expressão robusta das linhagens celulares estáveis. O uso dos lentivírus, pertencentes ao gênero retrovírus, apresenta tal possibilidade. Vetores lentivirais recombinantes, contendo elementos genéticos do HIV, são amplamente utilizados para entrega de genes em aplicações médicas (NALDINI *et al.*, 2016).

Como os transposons, os vetores lentivirais tendem a se integrar em genes ativamente transcritos (OBERBEK *et al.*, 2011). O número de integrações do DNA lentiviral por célula pode ser modulado, em alguma extensão, pela variação da multiplicidade de infecção (MOI) utilizada (MOIANI *et al.*, 2012). Os vetores lentivirais apresentam algumas desvantagens que impactaram seu uso no campo de produção de proteínas. A geração do próprio vetor é demorada e requer contenção de nível de biossegurança 2, assim como o processo de infecção das células hospedeiras com o vetor. Além disso, a transcrição reversa do genoma viral após a infecção é propensa a erros e pode resultar na mutação do transgene. Apesar dos aspectos inconvenientes, os vetores lentivirais têm sido aplicados na geração de linhagens celulares altamente produtivas de células CHO, BHK e HEK-293, usando promotores induzíveis ou constitutivos (GAILLET *et al.*, 2010; OBERBEK *et al.*, 2011; BARANYI *et al.*, 2013; MUFARREGE *et al.*, 2014; MAO *et al.*, 2015). Portanto, este método contorna a necessidade de preparações de DNA em larga escala e procedimentos de transfecção laboriosos enquanto é possível estabelecer rapidamente a integração

estável do genoma do transgene na célula hospedeira com alta eficiência (ELEGHEERT *et al.*, 2018).

2.5 A Eritropoietina (EPO)

A molécula escolhida como modelo para a avaliação das linhagens celulares humanas neste estudo foi a eritropoietina humana, um hormônio glicoproteico ácido de aproximadamente 35 kDa e constituído de uma sequência primária de 165 aminoácidos e com 40% do seu peso molecular derivado da presença de estruturas glicídicas (JELKMANN, 1992). A EPO regula a eritropoiese, estimulando a proliferação e diferenciação dos precursores eritróides na medula óssea, resultando em aumento do número de glóbulos vermelhos na circulação sanguínea. Por causa da função de transporte de oxigênio exercido pelas hemácias na corrente sanguínea, a concentração *in vivo* de EPO é importante para o controle da concentração de oxigênio no sangue (JELKMANN, 2004).

A falta de EPO é a principal causa da anemia associada à insuficiência renal crônica. Antes da EPO recombinante humana (rhEPO) se tornar disponível, cerca de 25% dos pacientes renais em diálise necessitavam de transfusões regulares de glóbulos vermelhos. O tratamento com rhEPO mostrou-se muito útil para aumentar a qualidade de vida de pacientes anêmicos; tal fato colocou esse biofármaco entre os produtos farmacêuticos mais vendidos em todo o mundo (JELKMANN, 2004). Tal sucesso pode ser creditado ao trabalho pioneiro de Miyake *et al.* (MIYAKE *et al.*, 1977), que coletou e concentrou 2550 litros de urina de pacientes com anemia aplástica na cidade de Kumamoto no Japão. O material foi utilizado para purificar o hormônio e identificar parcialmente sua sequência de aminoácidos. Baseado neste trabalho, o gene da EPO humana pôde ser caracterizado e a proteína então expressa de maneira recombinante. Tal feito permitiu o desenvolvimento e uso clínico da EPO recombinante humana, a qual tem sido usada para o tratamento clínico da anemia associada à doença renal crônica, quimioterapia, neoplasias como mielodisplasia e nas complicações derivadas do tratamento da AIDS (CAZZOLA *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2012).

A molécula de rhEPO ativa consiste de um único polipeptídeo de 165 aminoácidos com um único sítio de O-glicosilação localizada na Ser 126, e três sítios de N-glicosilação em Asn 24, Asn 38 e Asn 83. A massa teórica dos 165 aminoácidos da rhEPO é 18,240 Da. No entanto, a massa molecular real é de 34 a 36 kDa de

acordo com análise por SDS-PAGE, o que indica que o teor médio de carboidratos da rhEPO é de aproximadamente 40% (LAI *et al.*, 1986).

A glicosilação é um importante fator para a atividade biológica da EPO, influenciando na solubilidade, processamento celular, secreção e principalmente no metabolismo *in vivo* da molécula. Devido à complexidade associada à formação da EPO, atualmente as preparações terapêuticas de rhEPO são produzidas em células de mamíferos (LEE *et al.*, 2012). Os carboidratos têm influência direta na bioatividade da EPO, sendo o fator mais relevante a presença do ácido siálico em sua estrutura terminal. Vários estudos relataram que os resíduos de ácido siálico são críticos para sua bioatividade *in vivo* (YANAGIHARA *et al.*, 2010). As glicofomas com maior teor de ácido siálico demonstram uma atividade *in vivo* mais elevada, uma meia vida no soro mais longa e uma depuração sérica mais lenta. A presença do ácido sálico fornece carga negativa à molécula de rhEPO e os diferentes graus de sialilação dão origem às muitas glicofomas diferentes da molécula (METTA *et al.*, 2017).

Os carboidratos ligados à molécula compreendem oligossacarídeos com estrutura terminal bi-, tri- e tetra-antênários, que terminam tipicamente com um resíduo de ácido siálico carregado negativamente. Por causa da microheterogeneidade gerada pelo número variável de resíduos de ácido siálico, a rhEPO expressa geralmente existe como uma mistura de glicofomas com diferentes cargas e consequentemente, diferentes pontos isoelétricos (LEE *et al.*, 2012). Essas variações nas estruturas glicídicas das glicoproteínas são governadas principalmente por fatores como a linhagem celular utilizada, as condições de cultivo e os tipos de processos de purificação empregados (GOTO *et al.*, 1988; GOOCHEE e MONICA, 1990; JENKINS e CURLING, 1994; YUEN *et al.*, 2005; LEFLOCH *et al.*, 2006). Um exemplo é a rhEPO de primeira geração (epoetina alfa; Amgen), a qual é produzida em garrafas rotativas usando células cultivadas de maneira aderente (LEE *et al.*, 2012). Comparando o perfil glicídico da rhEPO produzida nesse modo de produção com a produzida em biorreatores do tipo fibra oca, demonstrou-se que as produzidas em garrafas rotativas apresentam mais estruturas teta antenárias tetra sialiladas que as produzidas em biorreatores do tipo fibra oca e consequentemente maior atividade *in vivo* (YUEN *et al.*, 2005). Mas, considerando a alta demanda de mercado da rhEPO, sistemas com maior capacidade de produção e utilizando células adaptadas ao cultivo em suspensão são um recurso necessário.

Também são encontradas diferenças no perfil glicídico da rhEPO entre células cultivadas em suspensão. Padrões incomuns de *N*-glicanos, incluindo Neu5Gc elevado, glicanos truncados e estruturas oligomanosídicas, foram observados quando células CHO foram cultivadas em um frasco T ou em frascos spinner, em contraste com a maior produção de estruturas tetra sialiladas obtidas nos cultivos em biorreatores operados em batelada ou perfusão (DUVAR *et al.*, 2005). Um fator que também influencia diretamente os tipos de glicofomas e o grau de sialilação da rhEPO corresponde ao método escolhido para o processo de purificação, podendo-se usar o mesmo para seleção e enriquecimento de determinadas glicofomas desejadas (YUEN *et al.*, 2005).

Como o sistema de expressão empregado compreende um fator importante na qualidade da rhEPO, um exemplo da superior capacidade de produção das células humanas foi a epoetina delta (Dynepo). As eritropoetinas recombinantes disponíveis atualmente (epoetina alfa, epoetina beta e darbepoetina alfa) são produzidas em células CHO e BHK e resultam em estruturas diferentes das proteínas nativas no que diz respeito ao perfil de carboidratos (SKIBELI *et al.*, 2001). A epoetina delta, produzida na linhagem HT-1080 possui um perfil de glicanas imunologicamente semelhante à proteína circulante no organismo, e, portanto, não causa reações em humanos, sendo um exemplo de êxito da utilização de células humanas para a produção glicoproteínas recombinantes (Durocher & Butler, 2009, Ghaderi *et al.* 2012). Apesar dos bons resultados, o Dynepo foi retirado mercado pela *Shire Pharmaceutical Contract Limited* devido a questões comerciais.

2.6 Metabolismo das linhagens celulares de mamíferos

As alterações relacionadas ao metabolismo energético das células de mamíferos que apresentam rápido crescimento celular, tais como linhagens celulares carcinogênicas (HeLa, MCF-7, hepatomas) e células de mamíferos transformadas (CHO, BHK, HEK- 293 e hibridoma) têm sido descritas. As principais alterações estão relacionadas com um aumento na capacidade glicolítica, mesmo na presença de altas concentrações de oxigênio (glicólise aeróbica) e um catabolismo da glutamina (glutaminólise) que excede as necessidades puramente biossintéticas das células (Figura 3) (ALTAMIRANO *et al.*, 2013).

Os principais mecanismos para explicar tais fenômenos em células altamente proliferativas estão relacionados à super expressão de algumas proteínas ou às

isoformas incomuns das mesmas, à regulação negativa de proteínas-chave para o transporte de NADH do citosol para a mitocôndria e à oxidação do piruvato através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCAC) (ALTAMIRANO *et al.*, 2013). O alto fluxo glicolítico pode estar associado com a super expressão dos transportadores de glicose GLUT1, GLUT3 e de todas as enzimas associadas à via glicolítica (MACHEDA *et al.*, 2005; MORENO-SANCHEZ *et al.*, 2007). No caso da via glicolítica, por exemplo, a expressão da hexoquinase II (HK-II) e fosfofrutoquinase tipo 1 (PFK-1) é 300 vezes maior nesse tipo de célula (MORENO-SANCHEZ *et al.*, 2007).

Em relação às principais enzimas que ligam a glicólise ao TCAC - piruvato desidrogenase e carboxilase piruvato - em duas linhagens diferentes de células animais (BHK e CHO), nenhuma delas teve atividade significativa e os autores explicam que a taxa de formação de piruvato é semelhante à taxa de formação de lactato (NEERMANN e WAGNER, 1996). A atividade da piruvato desidrogenase foi indetectável em culturas do tipo batelada de células de hibridoma. Os autores demonstraram que na fase de crescimento exponencial, 96% da glicose era catabolizada via glicólise e 36% da glutamina era oxidada a CO₂. Curiosamente, a contribuição energética do catabolismo desses dois substratos foi semelhante: 55% pela glutamina e 45% pela glicose (FITZPATRICK *et al.*, 1993).

As atividades do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa são mantidas devido à expressão de proteínas mitocondriais incomuns, como a enzima málica dependente de NADP⁺, glutaminase e transportador de glutamina, os quais possuem alta atividade e afinidade por seus substratos (Figura 3).

São conhecidas três isoformas de enzimas málicas, sendo a mais comum a do tipo II (EM-II), encontrada em células carcinogênicas (MOREADITH e LEHNINGER, 1984) A EM-II é uma enzima mitocondrial (dependente de NADP⁺/NADPH) que catalisa irreversivelmente a formação de piruvato a partir do malato, e sua atividade é 10 a 20 vezes maior nessas células que nas células normais. Esta enzima é importante para a formação de piruvato mitocondrial a partir da glutamina, determinando que sua atividade aumenta simultaneamente com a atividade da glutaminase. Em células carcinogênicas, a glutamina é transportada para a mitocôndria em uma taxa 4 a 10 vezes maior do que em células normais e é então oxidada a glutamato, com uma atividade de 10 a 20 vezes maior do que a enzima normal (SOUBA, 1993).

O lactato e a amônia são os principais produtos gerados em consequência desse comportamento metabólico exacerbado, podendo exceder certas concentrações críticas, e então inibir o crescimento de células animais cultivadas *in vitro* bem como a qualidade da proteína recombinante produzida (LAO e TOTH, 1997a; GAMBHIR *et al.*, 2003).

O lactato pode causar uma redução significativa do pH do meio, o que pode inibir o crescimento celular, mas esse efeito pode ser evitado com um sistema de controle que mantenha o pH dentro de uma faixa ideal. No entanto, o principal mecanismo pelo qual o lactato parece afetar negativamente as culturas é através do aumento da osmolaridade do meio de cultura (CRUZ *et al.*, 2000). Em geral, concentrações inferiores a 20 mM de lactato não costumam afetar o crescimento ou a produtividade celular; no entanto uma concentração de lactato de 20-40 mM pode prejudicar a produtividade e quando superior a 40 mM, pode inibir o crescimento celular (ALTAMIRANO *et al.*, 2013).

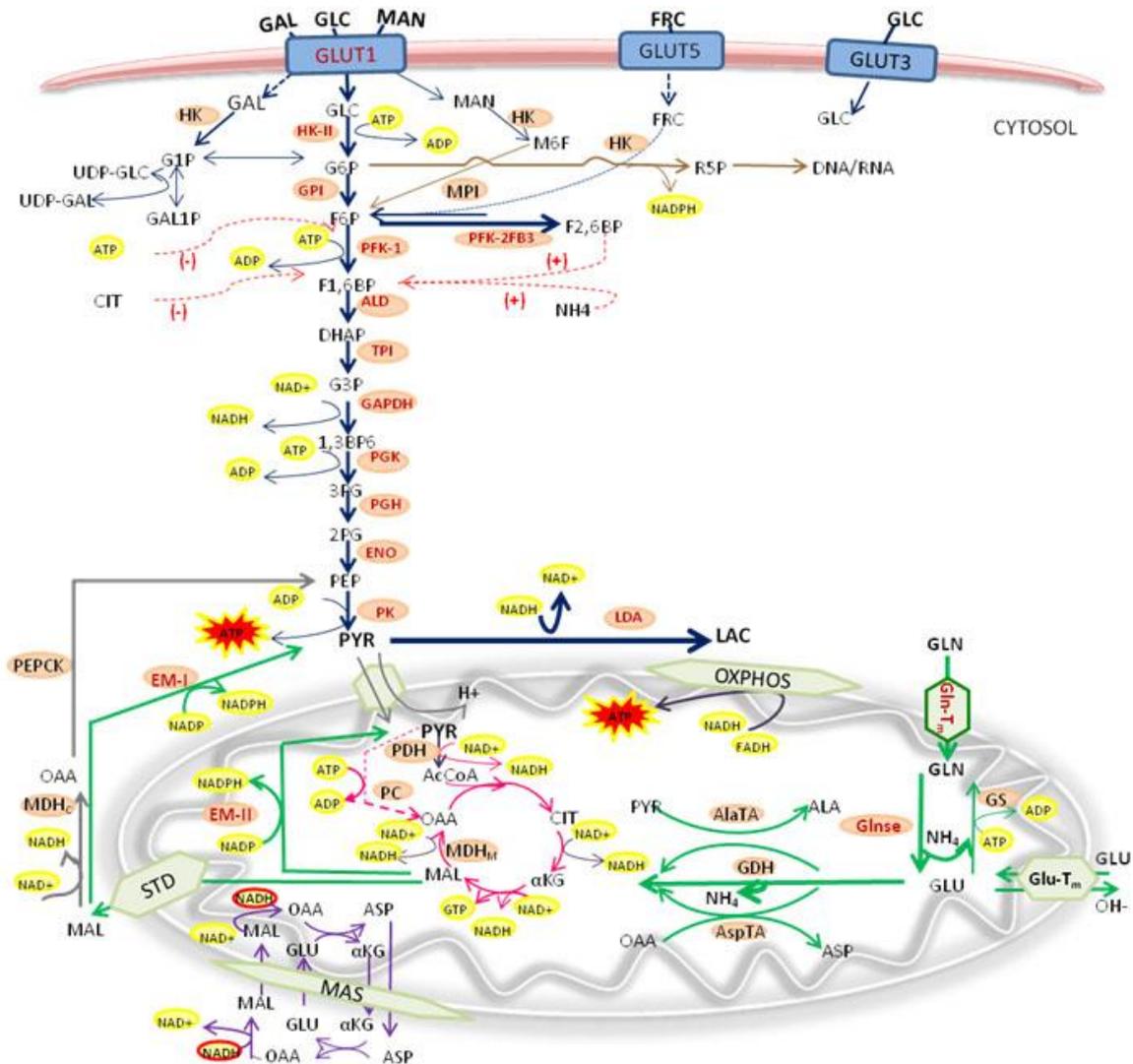
Todavia, o íon amônio tem maior impacto na cultura de células do que o lactato, porque as concentrações entre 2 e 5 mM de íon amônio podem inibir o crescimento e prejudicar a produtividade. O mecanismo preciso da toxicidade do íon amônio nas células não é claro, apesar de se verificar que este efeito depende do pH. Além disso, o íon amônio pode afetar negativamente a glicosilação em culturas de células de mamíferos, uma vez que provoca uma diminuição do conteúdo do ácido siálico (NeuAc), da galactose (Gal) e variações dos sítios ocupados pelos carboidratos (macroheterogeneidade)(GAWLITZEK *et al.*, 2000; YANG e BUTLER, 2002).

A liberação de amônia pelas células é devida ao metabolismo dos aminoácidos, principalmente o da glutamina. Este último é rotineiramente adicionado a muitos meios de cultura, uma vez que foi demonstrado que estimula o crescimento das células em cultura bem como a produção da proteína recombinante (SCHNEIDER *et al.*, 1996). A glutamina não é apenas um constituinte das proteínas ou um doador do grupo amino em algumas vias biossintéticas, como na síntese de purinas e pirimidinas, mas também uma importante fonte de energia. Uma quantidade considerável de energia metabólica é derivada da glutamina, em vez da glicose, em células cultivadas *in vitro* (FITZPATRICK *et al.*, 1993).

Em resumo, podemos afirmar que a substância inibitória mais importante que se acumula nas culturas de células é o íon amônio e que uma redução nos níveis do mesmo pode ser primordial para garantir a devida expansão do processo para escalas

maiores bem como garantir uma viabilidade econômica bem-sucedida de tais processos para a produção de proteínas de alto valor.

Figura 3. Esquema das vias glicolítica e glutaminolítica, ciclo do ácido tricarboxílico e principais fatores mitocondriais sistemas de transporte.



Fonte: (ALTAMIRANO *et al.*, 2013). Linhas azuis: etapas de reação da via da glicólise; linhas verdes: etapas de reação da via da glutaminólise; linha rosa: reação da piruvato desidrogenase e etapas da reação do ciclo de Krebs; linhas roxas: etapas de reação do transporte da malato aspartato; palavras em vermelho: enzimas super expressas em células altamente proliferativas; linha vermelha pontilhada: regulação positiva (+) ou negativa (-).

2.7 Cultivo celular em suspensão e meios livres de soro fetal bovino

Tradicionalmente, os meios de cultura desenvolvidos para células de mamíferos necessitam de uma fonte alternativa de suplementos para prover os complexos requerimentos nutricionais das células e garantir um bom nível de crescimento celular. O suplemento mais utilizado para esta finalidade é o soro fetal bovino (SFB). Sua principal vantagem é que sua utilização permite que um mesmo

meio de cultura seja empregado para o cultivo de diferentes linhagens celulares. O SFB também possui funções de estímulo ao cultivo (fatores de crescimento, hormônios e proteases) e de proteção celular, seja proteção biológica (antitoxina, antioxidante, antiprotease) ou mecânica. Entretanto, este suplemento é um dos componentes de maior valor agregado no meio de cultivo. Além disso, a suplementação com soro pode aumentar de maneira significativa a complexidade e o custo do processo de recuperação e purificação devido à presença de diversas proteínas e outros componentes não definidos (BRUNNER *et al.*, 2010).

Outro ponto a ser levado em consideração quanto ao uso do soro fetal é o risco de contaminação do produto final com agentes adventícios como vírus e proteínas (príons). Mesmo linhagens celulares que não produzam glicosilações reconhecidas como imunogênicas, quando cultivadas em meio contendo soro fetal bovino, podem incorporar esses carboidratos presentes no soro fetal bovino nas glicoproteínas produzidas através da captação dos mesmos do meio de cultura (GHADERI *et al.*, 2010a). Além disso, a possível presença de micoplasmas pode comprometer o crescimento celular e conseqüentemente a produção da proteína recombinante. Outra limitação da sua utilização seria a variabilidade em relação aos diferentes lotes e fornecedores, o que dificulta a padronização do meio de cultura e a própria reprodutibilidade da cultura, interferindo na interpretação dos dados obtidos nos experimentos (BRUNNER *et al.*, 2010). Em função disso, agências regulatórias como FDA e EMEA têm priorizado a não utilização de derivados de componentes animais na formulação dos meios de cultura e do produto final. Muitos estudos têm sido desenvolvidos na busca de meios de culturas livres de derivados animais que sejam eficientes, tanto para atender as necessidades nutricionais específicas de algumas linhagens celulares, quanto para garantir a produção da proteína recombinante em altos níveis (CHEN *et al.*, 1993; GSTRAUNTHALER, 2003; BRUNNER *et al.*, 2010).

Economicamente, a cultura em suspensão e em meio livre de soro é bem atrativa. Há uma queda nos custos do processo de purificação já que o meio livre de soro contém, por definição, uma concentração significativamente baixa de proteínas (HALDANKAR *et al.*, 1999). Esta queda no custo do processo de purificação diminui também o custo total da proteína de interesse uma vez que os custos do processo de purificação podem representar 70% do custo total de produção.

Considerando-se a necessidade e as vantagens de uma produção livre de soro fetal bovino, nosso grupo de pesquisa já realizou a adaptação das linhagens celulares

humanas Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 para condições de cultivo em suspensão e meios livres de soro fetal bovino (BIAGGIO *et al.*, 2015).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar as características cinéticas e metabólicas e o potencial de produção de glicoproteína recombinante pelas linhagens celulares humanas SK-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 adaptadas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino, usando a eritropoietina humana como proteína modelo.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Gerar linhagens celulares recombinantes estáveis através da estratégia de transdução lentiviral.
- ✓ Selecionar o meio de cultivo mais adequado para cada linhagem celular modificada.
- ✓ Determinar o número de cópias lentivirais integradas ao genoma das células.
- ✓ Analisar a expressão relativa do RNAm da eritropoietina humana.
- ✓ Caracterizar o comportamento cinético e metabólico das linhagens modificadas.
- ✓ Avaliar a produção volumétrica e específica.
- ✓ Avaliar a atividade *in vitro* da proteína recombinante produzida pelas linhagens celulares modificadas.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

As linhagens celulares humanas HKB-11 (CRL-12568) e Sk-Hep-1 (HTB-52) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e foram previamente adaptadas para o crescimento em suspensão e em meio de cultura livre de soro fetal bovino (BIAGGIO *et al.*, 2015). A linhagem Huh-7 foi cordialmente fornecida pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira, do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan da Universidade de São Paulo. As células HKB-11 e Sk-Hep-1 foram cultivadas em meio HyClone CDM4CHO (GE Healthcare Life Sciences, Chigago, IL, Estados Unidos), suplementadas com 6 mM de Glutamax (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e 0,1% de Pluronic F-68 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos); e as células Huh-7, previamente adaptadas à cultura livre de soro, foram cultivadas em meio CD 293 AGT (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) suplementado com 2 mM Glutamax (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). As células foram mantidas em frascos tipo *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 20 mL de meio de cultura sob agitação orbital de 150 rpm (Shaker Minitron, Infors HT, Basileia, Suíça), num ambiente com 5% de CO₂ a 37°C. Os subcultivos foram realizados a cada 2-3 dias, sendo o conteúdo dos frascos centrifugados a 1200 rpm (Universal 320R, Hettich, Tuttlingen, Alemanha) por 5 minutos, e as células ressuspensas em meio de cultura fresco na concentração de 3x10⁵ células/mL.

As células foram criopreservadas em condições livres de soro fetal bovino no meio HyClone™ Cryopreservation Media (GE Healthcare Life Sciences, Chigago, IL, Estados Unidos). Para o congelamento, as células foram quantificadas, centrifugadas a 1200 rpm (Universal 320R, Hettich, Tuttlingen, Alemanha), a 20 °C por 5 minutos e ressuspensas a uma concentração de 3 x 10⁶ células/mL. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspensado em 1 mL de meio de criopreservação e transferido para criotubos (Greiner BioOne, Kremsmünster, Upper Austria). Estes foram mantidos à 4 °C por 10 minutos, posteriormente transferidos para o sistema de resfriamento Mr. Frosty™ (Nalgene) e mantidos a -80°C por 24 horas e então preservados em nitrogênio líquido a -194 °C.

O descongelamento foi realizado aquecendo-se rapidamente o criotubo a 37°C por 1-2 minutos até que restasse apenas um pequeno pedaço de gelo e este conteúdo

foi diluído em 10 mL de meio fresco. O crescimento celular pós-descongelamento foi acompanhado por 3 passagens para avaliar a estabilidade da criopreservação.

4.2 Vetores e transformação bacteriana

Os vetores lentivirais p1054, pCMVΔR 8.91 (ZUFFEREY *et al.*, 1997) contendo os genes gag, pol, rev e tat do HIV-1, e pMD2.VSV-G (DULL *et al.*, 1998) codificando o envelope derivado do vírus da estomatite vesicular (VSV-G), foram gentilmente cedidos pela Dra. Virginia Picanço do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O vetor p1054 teve a sequência sintética do gene que codifica para a eritropoietina humana inserida pela empresa *GenScript Biotech Corp.* O vetor também contém um gene de resistência à ampicilina e um gene repórter que codifica para a proteína GFP, a qual é expressa de maneira bicistrônica com o gene da eritropoietina humana através da inserção de um sítio interno de ligação ao ribossomo (IRES) (HENNECKE *et al.*, 2001).

Foi realizada a transformação de bactérias competentes *E.coli* Stable 3 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) utilizando a metodologia de choque térmico. As bactérias foram descongeladas a temperatura ambiente por 15 minutos, e 40 µL da suspensão foram distribuídos em um tubo de microcentrífuga previamente resfriado no gelo. Em seguida foram adicionados 2 µL do DNA de interesse. A mistura repousou no gelo por 30 minutos, e então foi colocada em banho-maria a 42°C por 1 minuto e depois colocada em gelo por 5 minutos. Após o período no gelo, foram adicionados 250 µL de meio SOC (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e em seguida, as mesmas foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB-ágar com o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) com a finalidade de selecionar as colônias contendo os plasmídeos recombinantes. Colônias da placa transformada foram então inoculadas em uma cultura contendo 5 mL de LB líquido/ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C sob agitação de 200 rpm, por 16h. Após esse período, 200 µL da cultura das bactérias foram inoculadas em 100 mL de meio LB líquido/ampicilina (100 µg/mL) e incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Para isolar o DNA plasmidial foi utilizado o kit QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação e a pureza do DNA extraído foram mensuradas por espectrofotometria e utilizando-se os seguintes cálculos:

Concentração ($\mu\text{g/ml}$) = (Absorbância em comprimento de onda 260 – absorvância em comprimento 320) \times fator de diluição \times 50 $\mu\text{g/ml}$

Pureza (A260/A280) = (Absorbância em comprimento de onda 260 – absorvância em comprimento de 320) \div (Absorbância em comprimento de onda 280 – Absorbância em comprimento de onda 320). Valores entre 1,8 e 2,0 foram considerados aceitáveis.

4.3 Produção das partículas lentivirais e determinação do título viral

Para a produção das partículas lentivirais, a linhagem celular HEK-293T foi cultivada em frascos de 75 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de SFB) e transfectada com uma mistura de DNA e o polímero catiônico polietilenoimina (25-kDa linear PEI, Polysciences). Para a transfecção, os três plasmídeos foram utilizados nas seguintes quantidades: 20 μg do vetor p1054-rhEPO, 13 μg do vetor pCMV Δ R8.91 e 7 μg do vetor pMD2.VSV-G. Após 48 horas o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 450 x g por 5 minutos a 4°C, filtrado (filtro de 0,45 μm) e armazenado a -80 °C. O título viral foi determinado por citometria de fluxo medindo a expressão da proteína repórter GFP após a transdução das células HEK-293 com o sobrenadante lentiviral produzido. Para tal, no dia um, 3x10⁵ células/poço foram semeadas em placas de 6 poços num volume final de 2 mL por poço. No dia dois, foi utilizada uma duplicata dos poços para contagem das células e alíquotas de 500 μL , 100 μL , 50 μL , 20 μL e 10 μL não concentradas do sobrenadante contendo o lentivírus, foram adicionados às células. No dia cinco as células foram lavadas com PBS e desafixadas da superfície da placa pela adição de 1 mL de tripsina/EDTA 1X (Sigma-Aldrich), durante um minuto de incubação, a 37°C. Um volume de 1 mL de meio DMEM com 10% SFB foi adicionado para inativação da tripsina. As células foram então centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato salino 0,01 M para leitura em citômetro de fluxo. O título viral foi calculado como unidade de transdução = número de células (dia 1) \times [% GFP positivo /100] /volume de sobrenadante adicionado ao poço.

4.4 Geração das linhagens celulares estáveis produtoras de rhEPO

Alíquotas contendo 1 MOI (Multiplicidade de infecção) do sobrenadante viral produzido pelas células HEK293T transfectadas foram adicionadas às culturas das

células Sk-Hep-1, HKB11 e Huh-7. Para isto, as células Sk-Hep-1 e HKB-11 foram cultivadas sob agitação a 150 rpm em CO₂ a 5% a 37 °C em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 10 mL de meio CDM4CHO (FS, Invitrogen, Grand Island, NY). As células Huh-7 foram cultivadas sob as mesmas condições, mas com o meio de cultura CD293 AGT (CD 293, Invitrogen, Grand Island, NY), sendo ambos livres de SFB. No momento da transdução, 2 mL das suspensões de células foram semeadas a uma concentração de 3×10^5 células/poço numa placa de 6 poços. Após adição do sobrenadante viral, as células foram incubadas a 37°C numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 72 horas, as células foram retiradas para análise da expressão de GFP bem como da viabilidade celular por citometria de fluxo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

O passo subsequente foi selecionar populações celulares positivas para a expressão da proteína repórter GFP. A seleção de células positivas para GFP foi realizada por citometria de fluxo utilizando o citômetro BD FACSAria. Para tanto, as linhagens celulares modificadas foram cultivadas nos seus respectivos meios de cultura e, no dia do processo, após a calibração do citômetro de fluxo, foi realizada a seleção das células GFP positivas, de modo que somente tais células foram coletadas, enquanto que as células GFP negativas foram descartadas. As células selecionadas foram colocadas novamente em cultivo e após a terceira passagem foram levadas para avaliação da porcentagem de células GFP positivas. As células foram então expandidas e congeladas para a criação do banco de células modificadas.

4.5 Seleção do melhor meio de cultivo para produção rhEPO

Para selecionar o melhor meio de cultivo para produção da rhEPO, foi realizada uma cinética de produção em tempo reduzido para cada linhagem, utilizando-se dois meios de cultivos diferentes. As cinéticas de produção foram realizadas com os meios previamente citados, os quais apresentaram melhores taxas de crescimento e viabilidade no processo de adaptação realizados por Biaggio e colaboradores (BIAGGIO *et al.*, 2015) e com o meio Freestyle 293 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Para tal foram inoculados 1×10^6 células/mL de cada linhagem em 20 mL dos meios em frasco tipo *Erlenmyer* de 125 mL, sendo cultivadas nas condições de cultivo previamente citadas. O crescimento, viabilidade e produção de rhEPO foram acompanhados durante 72 horas. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada célula e após centrifugação a 1200 rpm, os

sobrenadantes foram congelados a -20°C para análises posteriores. Foi conferido o volume final de cada cultura e o mesmo foi ajustado para 20 mL com a adição de meio de cultura fresco. As concentrações e viabilidades celulares foram medidas pelo método de exclusão do corante azul de Tripán (0,4%) em hemocitômetro. A concentração de rhEPO foi determinada pelo método de ELISA (*Erythropoietin Human* ELISA kit-Abcam), seguindo as informações fornecidas pelo fabricante.

4.6 Determinação do número de cópias virais integradas

O número de cópias do vetor lentiviral 1054-rhEPO inserido no genoma celular foi calculado pela técnica de qPCR em tempo real (Reação em cadeia da polimerase quantitativa). O DNA genômico foi extraído das células usando o kit DNeasy Tissue (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Utilizaram-se iniciadores e sondas de hidrólise fluorescentes do tipo *TaqMan*® específicas para a região do LTR viral (repetição terminal longa). O volume total de reação foi de 20 µL por poço, sendo 10 µL de Master Mix *TaqMan*®, 1 µL do iniciador LTR 5' (5' TGCTTTTTGCTTGTACTGTGGG-3'), 1 µL LTR 3' (5'CTAGTTACCAGAGTCACACAA-3'), 0,5 µL das sondas de hidrólise fluorescentes e amostras de DNA genômico diluídas em 5 µL de água livre de nuclease pura. As condições da reação foram: 50°C durante 2 minutos; 95°C durante 10 minutos; 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto, em um total de 40 ciclos programados no equipamento *7500 ABI 7500 Real-Time PCR System*. Como controle negativo, foi utilizado DNA genômico das linhagens celulares não transduzidas bem como foram incluídas reações sem DNA molde. Os dados foram processados com o software SDS 2.1 (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

Para a quantificação absoluta do número de cópias, construiu-se uma curva padrão do vetor utilizando-se uma diluição seriada, partindo-se de 10¹ a 10⁶ cópias do vetor 1054-rhEPO por poço. Tendo o peso molecular do vetor, o número de cópias presente no DNA estoque foi então calculado usando-se a seguinte equação (WHELAN *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2006):

$$\text{DNA (cópia)} = 6,02 \times 10^{23} \text{ (cópia/mol)} \times \text{concentração de DNA (g)} / \text{comprimento do DNA (tamanho em pares de base do produto)} \times 660 \text{ (g/mol/bp)}$$

Em seguida, uma curva padrão foi gerada pela regressão linear usando-se os valores dos Ct (limiar de detecção) de cada ponto e o logaritmo do seu respectivo número de cópias. O número absoluto de cópias nas amostras foi quantificado pela análise de 100 ng de DNA genômico de cada linhagem celular. O número absoluto de cópias foi dividido pelo número de moléculas do genoma de cada linhagem celular correspondente a 100 ng de DNA genômico, obtendo-se então o número de cópias integradas por célula. O ensaio foi realizada em triplicata.

4.7 Análise da expressão do RNAm da rhEPO nas linhagens celulares modificadas

As linhagens celulares transduzidas foram analisadas quanto ao nível de expressão do gene rhEPO em relação aos controles não transduzidos pela metodologia RT-qPCR (*Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*) em tempo real. Para isso, o RNA total foi extraído de 1×10^6 células usando o *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e a pureza do RNA total foram avaliadas por leitura espectrofotométrica em comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O grau de pureza do RNA foi estimado pela razão entre a absorvância medida em 260 e 280 nm, e valores entre 1,8 e 2,0 foram considerados aceitáveis.

O cDNA foi produzido utilizando o kit de *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Uma quantidade de 2 µg de RNA total, 5 µL de 10X RT buffer, 10 mmol de dNTPs, 5 µL dos iniciadores aleatórios, 0,15 µL de inibidor de ribonuclease e 2,5 µL da enzima *Transcriptase MultiScribe* foram adicionados a um volume final de reação de 50 µL. O equipamento *GeneAmp PCR Cyclor System 9700* (Applied Biosystems) foi programado para um ciclo de 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C.

A metodologia de análise quantitativa da expressão de mRNA utilizou iniciadores específicos e sondas de hidrólise fluorescentes do tipo Taqman®, marcadas com FAM/MGB-NFQ específicas para uma região do cDNA da rhEPO e para os genes de referência. O volume final da reação foi de 20 µL por poço, consistindo de 1 µL de *Taqman® gene expression assay 20X* contendo os iniciadores e a sonda de hidrólise, 10 µL de *TaqMan® Master Mix 2X* e 100 ng de cDNA diluídos em 4 µL de água ultrapura. Os volumes finais de todas as reações foram acertados usando água pura livre de nuclease. A análise dos dados foi realizada utilizando a

metodologia da expressão relativa do gene alvo sobre o seu controle, através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Bustin et al., 2009). A reação de PCR quantitativa foi realizada no equipamento *ABI 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®) programado para 40 ciclos consistindo dos seguintes parâmetros: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 60°C por 1 min. A normalização foi realizada usando a média aritmética do Ct dos genes de referência. Os genes de referência utilizados foram os genes da $\beta 2$ microglobulina e β -actina endógenos e cada corrida da qPCR foi realizada em triplicata.

A expressão relativa do gene rhEPO foi analisada usando o método $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A diferença entre os Cts do gene alvo e a média aritmética dos Cts dos genes de referência nas células transduzidas e não transduzidas foi calculada, gerando os valores denominados ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ do gene de interesse – Ct do gene de referência). A diferença entre os ΔCt s da célula transduzidas e não transduzidas é referido como $\Delta\Delta Ct$ (BUSTIN et al., 2009). Quando aplicado o valor obtido à equação $2^{\Delta\Delta Ct}$, se tem quantas vezes o gene de interesse foi expresso em relação ao seu controle não transduzido.

4.8 Caracterização da cinética de crescimento celular, metabolismo e cinética de produção de rhEPO nas linhagens celulares modificadas

Após a determinação dos melhores meios de cultura para cada célula foi realizada uma cinética completa para caracterização do crescimento celular, do metabolismo e da produção da rhEPO. Para isto, 5×10^5 células/mL foram inoculadas em um frasco de 125 mL tipo *Erlenmeyer* contendo 20 mL dos meios selecionados e as culturas foram mantidas durante 312 horas. A cada 24 horas, foram retiradas alíquotas de 2 mL e após centrifugação a 1200 rpm, os sobrenadantes foram congelados a -20°C para a quantificação da rhEPO bem como para a análise do metabolismo celular. A concentração e viabilidade celular foram medidas pelo método de exclusão do corante azul de Tripán (0,4%) em hemocitômetro. Com os valores encontrados de crescimento celular, foi confeccionado um gráfico de concentração e viabilidade celular ao longo do tempo.

A concentração de rhEPO foi determinada pelo método de ELISA (*Human Erythropoietin ELISA kit, Abcam*), seguindo as informações fornecidas pelo fabricante. A determinação da concentração de glicose, ácido láctico, glutamina, glutamato e amônia presente nos sobrenadantes de cultivo foi realizada no analisador bioquímico

YSI2700 (Yellow Springs Instruments) e a concentração de amônia foi determinada usando um eletrodo íon-seletivo (Orion 720A +, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 Análise dos resultados

O tempo de duplicação é definido como o tempo necessário para duplicar o número de células na cultura. O mesmo foi calculado a partir da seguinte equação:

$$T_d = \ln 2 / \mu_{\max} \quad [1]$$

Onde: $\ln 2$ = logaritmo natural de 2 e μ_{\max} = velocidade específica de crescimento máximo.

Para a determinação da velocidade específica de crescimento máximo, μ_{\max} , foi utilizada a seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad [2]$$

Onde: μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1}), X = concentração de células (células/mL) e t = tempo (h).

Na fase exponencial de crescimento da célula pode-se considerar que:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \text{cte} = \mu_{\max} \quad [3]$$

Ao integrar esta equação da concentração inicial de células X_0 a uma concentração X em um intervalo de tempo t , tem-se que:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} \cdot t \quad [4]$$

O valor de μ_{\max} é o coeficiente angular do gráfico de $\ln X$ em função do tempo.

A velocidade de produção específica da EPO ($qEPO$), velocidades de consumo específico de glicose ($qGlc$) e velocidades de produção específica de lactato ($qLac$) e amônio ($qAmm$) foram calculadas plotando as concentrações dos produtos ou substratos contra os valores da integral de células viáveis (IVC) na fase de crescimento exponencial. Sinal positivo para taxa específica indica produção e

negativo indica consumo. O valor de IVC representa a área sob a curva de crescimento de células viáveis e foi estimada pelo software Origin 8.5.

O coeficiente de conversão de glicose-lactato foi calculado utilizando os valores obtidos da fase exponencial do cultivo e conforme indicado na equação abaixo:

$$Y_{\text{lac/Glc}} = \frac{\Delta \text{lac}}{\Delta \text{glc}} \quad [5]$$

4.10 Análise da atividade *in vitro* da rhEPO produzida

Com o intento de avaliar a funcionalidade das rhEPO produzidas pelas linhagens celulares humanas, realizou-se um ensaio de diferenciação e maturação eritróide *in vitro* de células CD34 + do sangue periférico. As células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foram obtidas das câmaras do sistema de leucorredução dos doadores de plaquetas por aférese, com consentimento informado, de acordo com o comitê de ética local. Células CD34+ derivadas de PBMC foram isoladas por seleção magnética positiva (MACS) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). O método de cultura para enriquecimento da população de eritroblastos foi adaptado do protocolo descrito por Freyssinier e (FREYSSINIER *et al.*, 1999) e Hu (HU *et al.*, 2013). Este protocolo de diferenciação é dividido em duas fases. Na fase 1, as células CD34 + foram cultivadas durante 7 dias em meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) suplementado com 15% (v/v) de substituto de soro fetal bovino BIT9500 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina (Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos), Glutamax 2mM (Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos), 100 ng/mL de Fator de Células-Tronco (SCF) , 100 ng/mL de IL-6 (Interleucina 6) e 10 ng/mL de IL-3 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Na fase 2, as células foram cultivadas por 12 dias nos meios de cultura previamente descritos com a substituição da IL-6 pelo sobrenadante contendo 2 U/mL de eritropoietina (EPO) expressa nas linhagens celulares humanas Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 ou pela *Recombinant Human Erythropoietin* (R&D Systems) comercialmente disponível, produzida em células CHO. As células foram cultivadas a 37 °C, 5% de CO₂ e 85% de umidade. A diferenciação eritróide foi analisada pela coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG) em esfregaços obtidos por *cytospin* e pela análise por citometria de fluxo de células marcadas com anticorpo anti-CD235a conjugado com FITC, num citômetro FACSAria II (BD Biosciences, San Jose, EUA).

A análise dos dados obtidos foi realizada no programa FCS Express 6.06.0014 (DeNovo Software, Glendale, CA, Estados Unidos).

Resultados

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Geração de linhagens celulares estáveis produtoras de rhEPO

O sistema de expressão é o principal fator que afeta a produtividade e qualidade das proteínas recombinantes com aplicação terapêutica. Assim, a seleção do sistema hospedeiro apropriado é um fator crucial para uma produção eficiente de glicoproteínas terapêuticas (DUROCHER e BUTLER, 2009).

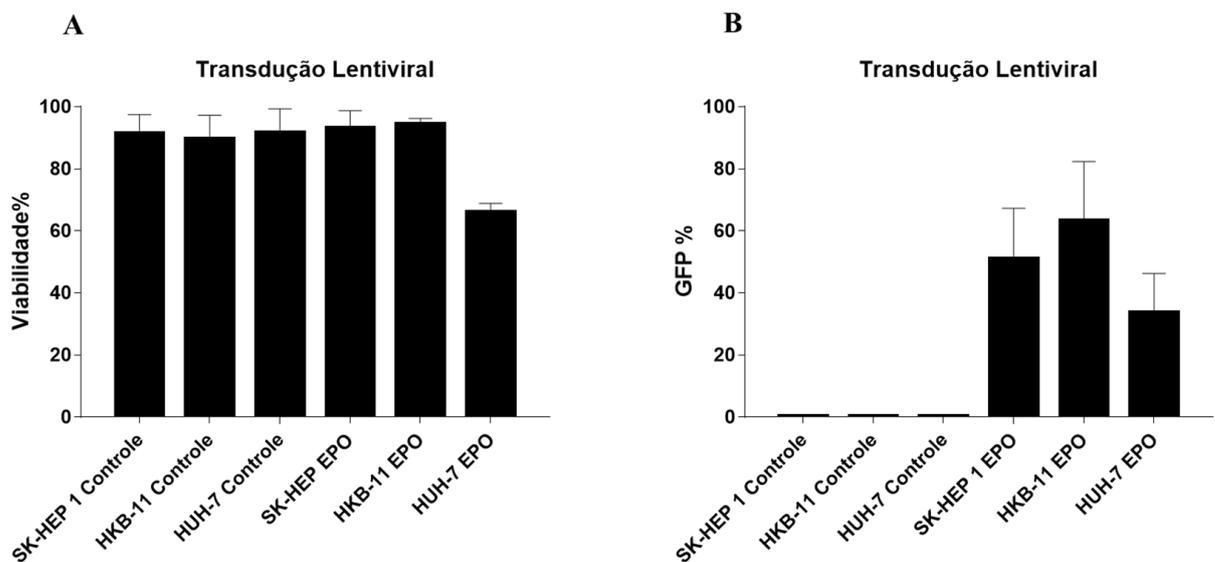
A geração de linhagens celulares recombinantes estáveis é geralmente feita usando técnicas clássicas de transfecção. O uso de plasmídeos é o método mais comumente empregado e tem sido uma alternativa de sucesso na modificação gênica de linhagens celulares para expressão de proteínas recombinantes; no entanto, o mesmo pode ser um processo demorado bem como heterogêneo em relação ao número de cópias do transgene integrado, trazendo diferenças significativas no nível de produtividade de proteína recombinante entre os clones e fornecendo alguns resultados imprevisíveis, já que o DNA heterólogo se integra aleatoriamente no genoma (GORMAN e BULLOCK, 2000). Nesse caso, a seleção clonal é uma ferramenta útil para eliminar clones de baixa produção. Por sua vez, um grande processo de triagem deve ser realizado para encontrar clones que expressem a proteína de interesse no nível desejado, tornando o processo consideravelmente trabalhoso (OBERBEK *et al.*, 2011).

Os vetores lentivirais derivados do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) podem ser uma alternativa para superar essas situações indesejadas, uma vez que o HIV-1 tende a se integrar com alta frequência à cromatina transcricionalmente ativa (BUSHMAN *et al.*, 2005). Usando a transferência gênica baseada nos vetores lentivirais é possível a geração de linhagens recombinantes com níveis mais altos e estáveis de expressão dos transgenes quando comparados aos métodos clássicos de entrega de DNA (OBERBEK *et al.*, 2011).

Um vetor lentiviral contendo a região codificadora da rhEPO, cuja expressão está ligada à proteína verde fluorescente (GFP) através de um sitio interno de ligação ao ribossomo (IRES), foi usado para a geração das linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB- 11 e Huh-7 recombinantes. Apesar dos vetores lentivirais terem evoluído durante a última década, infelizmente algumas características relacionadas à integração dos vetores lentivirais ao genoma celular podem causar expressão gênica desequilibrada, silenciamento gênico e mutagênese insercional, podendo esta resultar

até mesmo em transformação maligna das linhagens celulares (KOHN *et al.*, 2003). A fim de diminuir o risco de tais fenômenos, as células foram transduzidas a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1, usando apenas um ciclo de transdução. A Figura 4 mostra a média da eficiência de transdução das células Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 através do percentual de células positivas para a expressão de GFP (A), bem como a viabilidade das mesmas após o processo de transdução (B).

Figura 4. Determinação da eficiência de transdução das linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7.



As linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 foram transduzidas com vetores lentivirais carregando o gene da rhEPO utilizando-se um MOI=1. A medida da eficiência foi realizada por citometria de fluxo através da avaliação do percentual de células positivas para a expressão do GFP. A Figura acima demonstra a média de três experimentos independentes. Fonte: Elaborado pelo autor

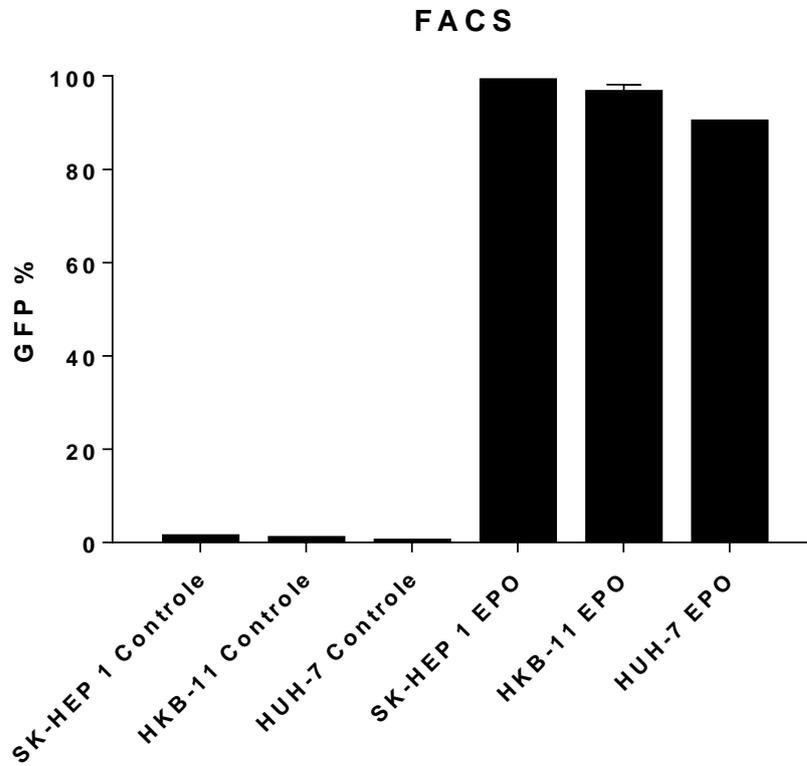
A linhagem HKB-11 apresentou uma porcentagem maior de células GFP positivas, com 63% das células que expressam GFP, seguindo-se a Sk-Hep-1 e a Huh-7 com 50% e 34%, respectivamente (Figura 4B). Comparando com outros trabalhos que usaram abordagens semelhantes, podemos concluir que as linhagens testadas não foram tão permissivas ao processo de transdução (OBERBEK *et al.*, 2011; ELEGHEERT *et al.*, 2018). Quanto à viabilidade, apenas a Huh-7 apresentou um declínio em relação ao seu controle, mostrando que essa linhagem celular parece ser mais sensível ao processo de transdução.

Após o processo de transdução, as células foram expandidas e congeladas para a criação de um banco de células modificadas, e posteriormente foram submetidas a um processo de separação das células GFP positivas por citometria de fluxo, onde as células positivas para expressão do GFP foram separadas e coletadas, enquanto as negativas foram descartadas. Esse processo teve como objetivo o aumento da população de células produtoras de rhEPO. Após o processo de separação, as células Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 apresentaram, 98%, 96% e 90% de células positivas para a expressão do GFP, respectivamente (Figura 5).

Além da eficiência do processo de separação, foi analisada a intensidade da expressão do gene repórter pelas linhagens celulares modificadas, já que a mesma pode estar associada à expressão do gene de interesse (LIU *et al.*, 2006). Como pode ser observado na Figura 6, as células Huh-7 apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparada às outras linhagens celulares, bem como a presença de duas populações com níveis de expressão diferentes. Tal fenômeno pode ser explicado pela heterogeneidade da população celular após o processo de separação, já que as células Huh-7 tiveram aproximadamente 10% de sua população total não transduzida (Figura 5).

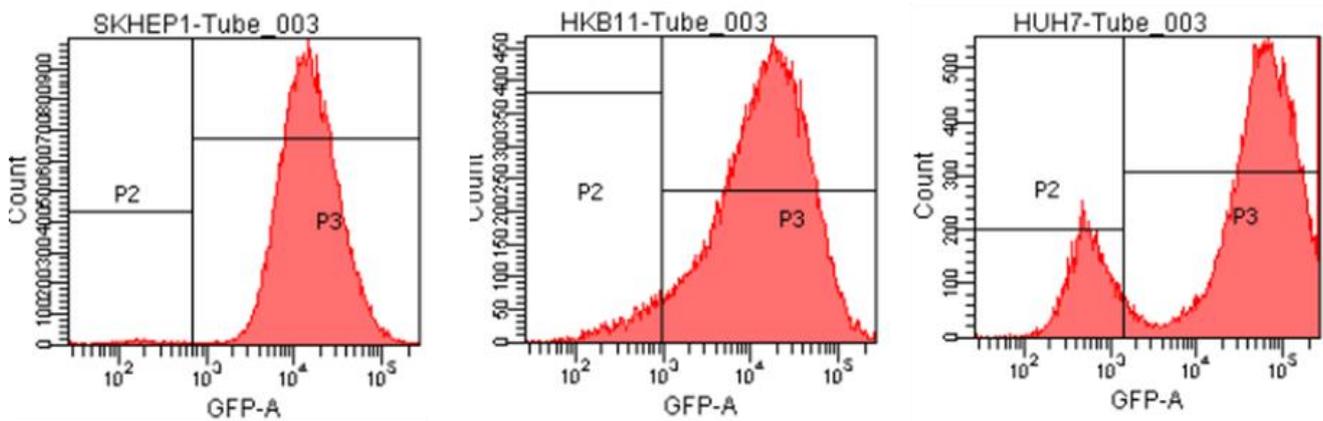
A Figura 7 mostra a morfologia e a fluorescência das células transduzidas após processo de separação por citometria de fluxo. Mesmo a linhagem HKB-11 sendo um híbrido construído para evitar a formação de agregados celulares, é possível observar a maior formação destes na mesma (Figura 7C e D).

Figura 5. Percentual de células GFP positivas após o processo de separação por citometria de fluxo



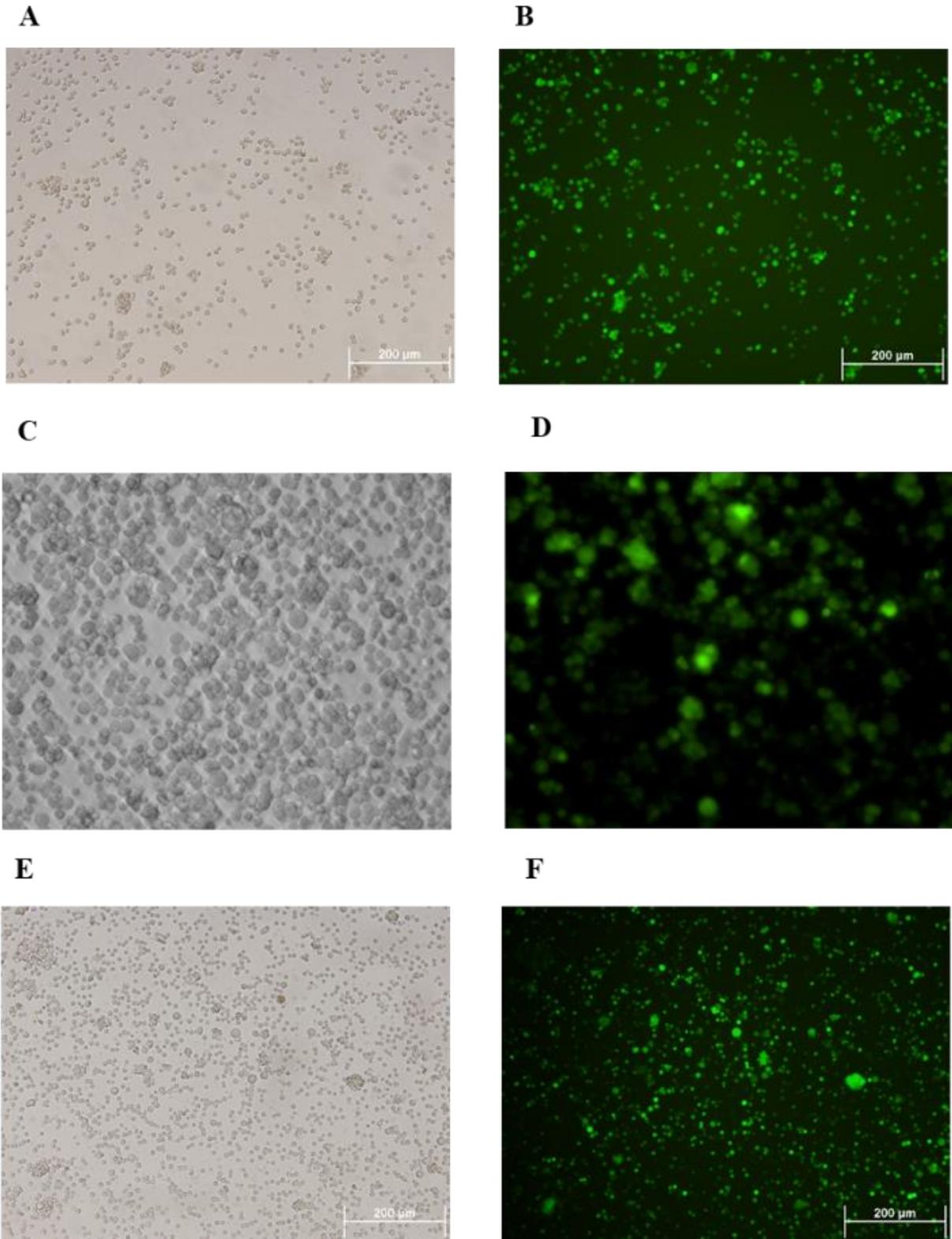
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6. Intensidade de fluorescência de cada linhagem celular após o processo de separação por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 7. Fotomicrografia mostrando a morfologia e fluorescência das células após processo de separação por citometria de fluxo.

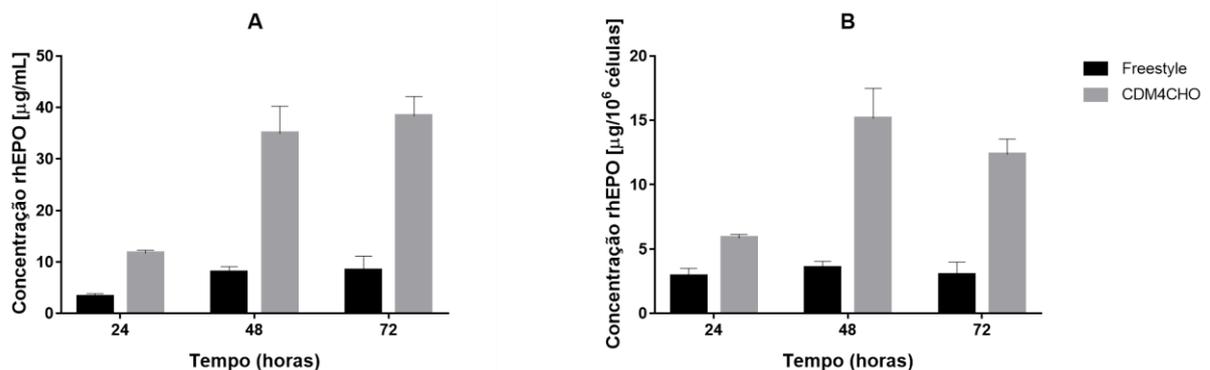


A e B) Linhagem Sk-Hep-1, C e D) Linhagem HKB-11. E e F) Linhagem Huh-7. Fonte: Elaborado pelo autor

5.2 Seleção do melhor meio de cultura para produção rhEPO

Após a modificação genética para expressão estável da rhEPO e separação da população de células positivas para a expressão de GFP, foram avaliados diferentes meios de cultura com o intuito de selecionar aquele em que as células apresentassem maior produtividade. Foram comparados os meios previamente determinados por Biaggio e colaboradores (BIAGGIO *et al.*, 2015) durante o processo de adaptação (CDM4CHO para as células HKB-11 e Sk-Hep-1 e CD293 AGT para as células Huh-7) com o meio Freestyle 293, sendo este meio de cultivo frequentemente utilizado na produção de proteínas recombinantes na linhagem celular humana HEK-293. As Figuras 8, 9 e 10 mostram a produção volumétrica (A) e específica (B) das células Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7, respectivamente.

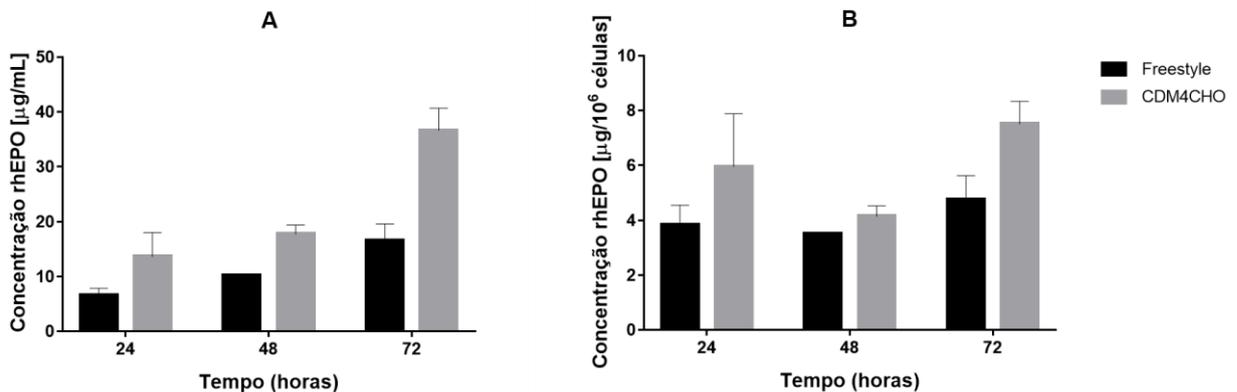
Figura 8. Produção volumétrica (A) e específica (B) da rhEPO pela linhagem celular Sk-Hep-1, usando diferentes meios de cultura.



A produção da rhEPO pela linhagem celular Sk-Hep-1 foi comparada usando os meios CDM4CHO e Freestyle 293. A produção de rhEPO foi monitorada por 72 horas e a quantificação foi feita pelo ensaio de ELISA ($n = 2$). Fonte: Elaborado pelo autor.

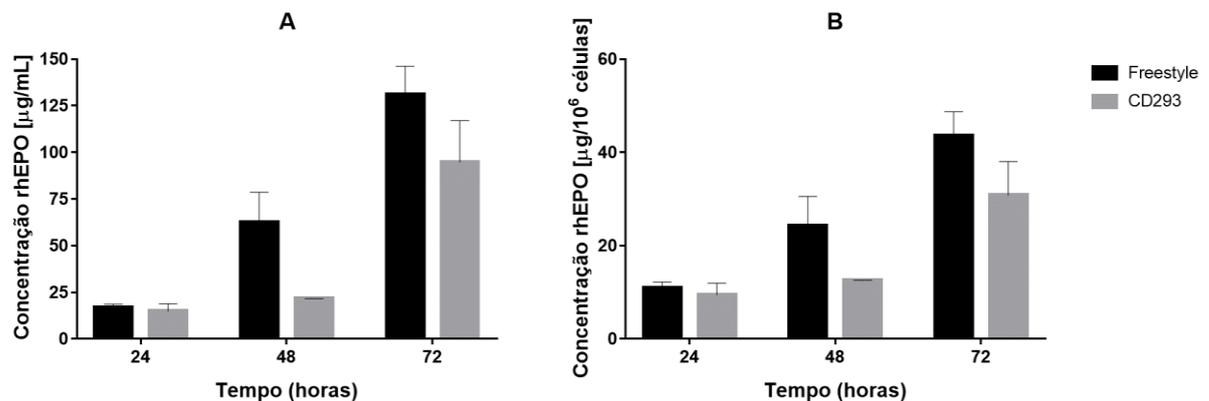
As linhagens celulares Sk-Hep-1 e HKB-11 atingiram uma produção máxima de 38,35 µg/mL e 36,65 µg/mL quando cultivadas em meio CDM4CHO, e 8,3 µg/mL e 16,55 µg/mL quando cultivadas no meio Freestyle 293, respectivamente, confirmando que o melhor meio durante o processo de adaptação também foi o melhor para a produção de rhEPO. Para a célula Huh-7, uma maior produção foi alcançada com o meio Freestyle 293 quando comparado ao CD293 AGT, atingindo uma concentração máxima de 130 µg/mL e 94,96 µg/mL, respectivamente, demonstrando que o meio escolhido para adaptação não foi o que apresentou melhor produção volumétrica da rhEPO.

Figura 9. Produção volumétrica (A) e específica (B) de rhEPO pela linhagem celular HKB-11, usando diferentes meios de cultura.



A produção da rhEPO pela linhagem celular HKB-11 foi comparada usando os meios CDM4CHO e Freestyle 293. A produção de rhEPO foi monitorada por 72 horas e a quantificação foi feita pelo ensaio de ELISA (n = 2). Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10. Produção volumétrica (A) e específica (B) de rhEPO pela linhagem celular Huh-7, usando diferentes meios de cultura.

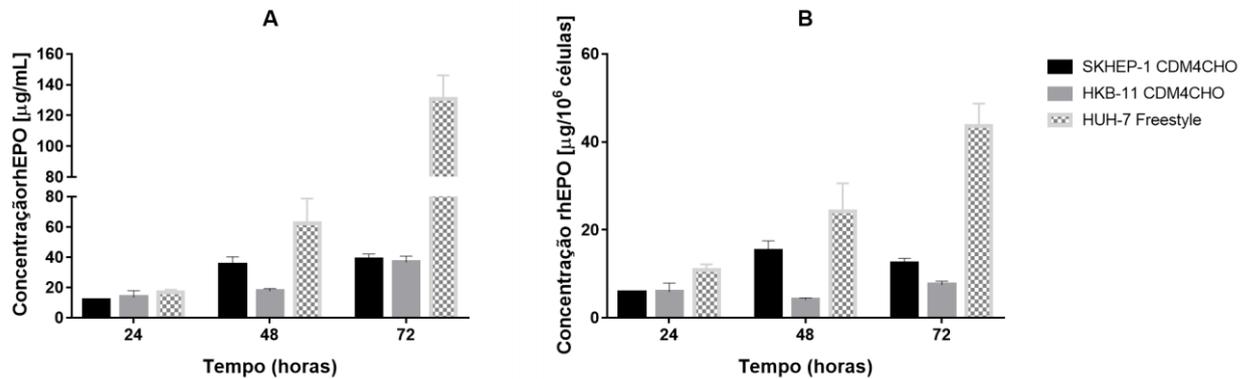


A produção da rhEPO pela linhagem celular Huh-7 foi comparada usando os meios CD293 AGT e Freestyle 293. A produção de rhEPO foi monitorada por 72 horas e a quantificação foi feita pelo ensaio de ELISA (n = 2). Fonte: Elaborado pelo autor.

Visando-se comparar a produção específica de cada célula, foi feita a relação da produção de rhEPO por 10⁶ células. Como pode ser observado as células Huh-7 também apresentaram uma produção específica superior às obtidas nas outras linhagens celulares. A Figura 11 compara a produtividade das linhagens celulares quando cultivadas em seus respectivos melhores meios de cultura, ficando claro a maior produção volumétrica e específica da linhagem Huh-7. Como pode ser visto na Figura 12, as linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 alcançaram uma

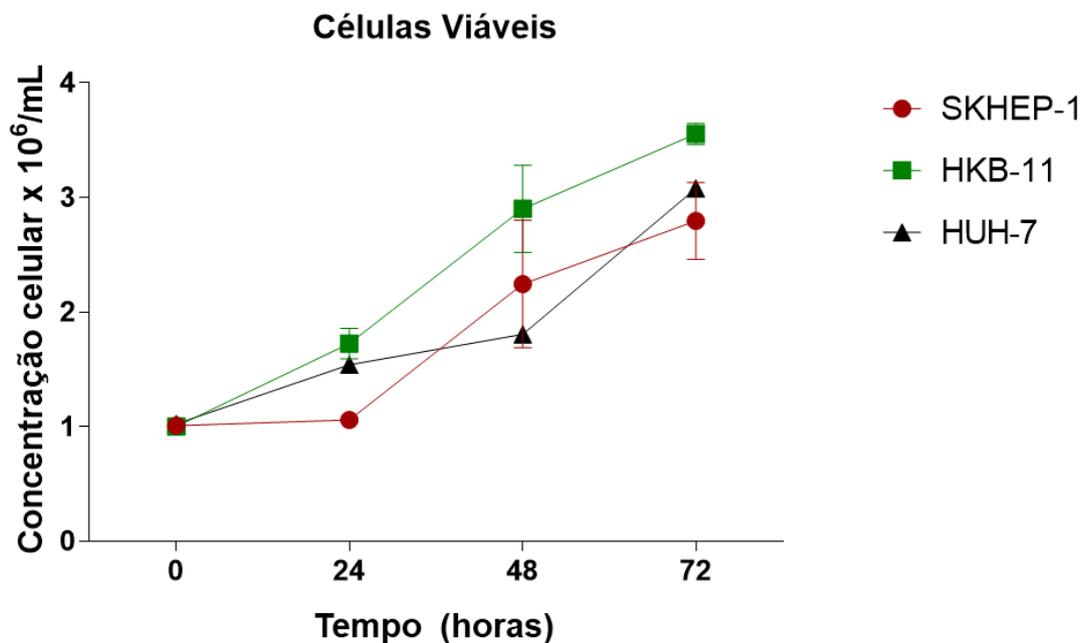
concentração de células viáveis máxima de $2,7 \times 10^6$ células/mL, $3,5 \times 10^6$ células/mL e $3,0 \times 10^6$ células/mL, respectivamente, ao final das 72 horas de cultivo.

Figura 11. Produção volumétrica (A) e específica (B) da rhEPO pelas linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 cultivadas nos melhores meios de cultura.



A produção de rhEPO pelas células Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 foi comparada usando os meios CDM4-CHO para as células Sk-Hep-1 e HKB-11 e Freestyle 293 para as células Huh-7. A produção de rhEPO foi monitorada por 72 horas e quantificação foi feita pelo ensaio de ELISA (n = 2). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12. Concentração de células viáveis durante o cultivo das linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 em seus melhores meios.



As linhagens celulares Sk-Hep-1e HKB-1 foram cultivadas em meio de cultura CDM4-CHO e a linhagem Huh-7 foi cultivada em meio Freestyle 293. A cultura foi monitorada por 72 horas e a concentração celular foi medida através do método de exclusão do corante azul de Trypan (n = 2). Fonte: Elaborado pelo autor

5.3 Determinação do número de cópias virais inseridas

Vários efeitos adversos na estabilidade cariotípica estão relacionados ao alto número de cópias de genes integrados no genoma das células de mamíferos, especialmente após longos períodos de cultivo. O alto número de cópias pode prejudicar o crescimento e a sobrevivência celular superando qualquer efeito benéfico da produtividade específica aumentada (BATARD; JORDAN; WURM, 2001; LATTENMAYER et al., 2007). Por outro lado, é comum que um alto nível de cópias integradas no genoma possa melhorar a produtividade da célula (GAILLET et al., 2010).

O DNA genômico das células transduzidas com o vetor lentiviral 1054-EPO foi coletado para a determinação do número de cópias integradas pela metodologia de qPCR. Para a determinação do número de cópias por qPCR foram utilizados iniciadores e sondas de hidrólise do tipo *Taqman*® específicos para a região 3' do LTR viral.

Cada amostra foi submetida à quantificação em triplicata, e a partir dos valores dos Cts gerados da curva padrão e das amostras das células transduzidas, foi possível mensurar o número total de cópias presentes em 100 ng de DNA genômico de cada célula. Dividindo-se o número absoluto de cópias pela quantidade de moléculas de genoma correspondente a 100 ng de DNA genômico de cada linhagem celular, foi possível então obter o número de cópias virais integrada por célula. Como mostrado na Tabela 2, a linhagem celular HKB-11 apresentou um número maior de cópias integradas ao genoma, sendo 10,1 cópias por célula, enquanto 8,3 e 1,97 cópias por células foram quantificadas para as linhagens Sk-Hep-1 e Huh-7, respectivamente.

Tabela 2. Quantificação por qPCR do número de cópias do vetor lentiviral 1054-EPO inseridas no genoma das linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7.

Linhagem celular	Número de cópias virais inseridas (Vírus/célula)
Sk-Hep-1	8,3
HKB-11	10,1
Huh-7	1,97

Fonte: Elaborado pelo autor

5.4 Análise da expressão do RNAm da rhEPO nas linhagens celulares modificadas

Com o intento de caracterizar as linhagens celulares quanto ao nível de expressão do gene da EPO, foi realizada a quantificação da expressão do RNAm da rhEPO através da técnica de PCR quantitativo em tempo real. A tabela 3 mostra a média dos Cts do gene alvo e de referência, bem como os Δ Ct obtidos dos mesmos.

Tabela 3. Média dos Cts do gene alvo (rhEPO) e dos genes de referência nas linhagens Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 transduzidas e não transduzidas e seus respectivos Δ Cts.

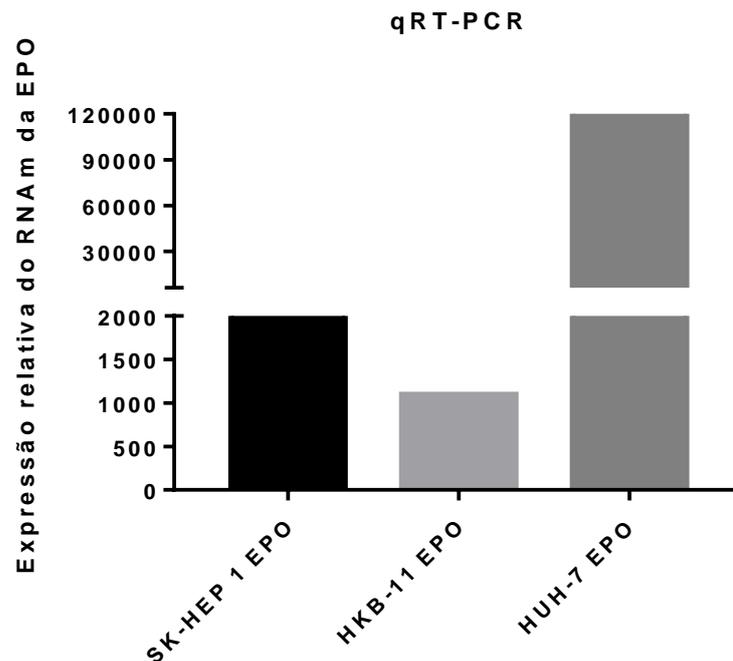
	Ct (Gene de alvo)	Ct (Gene de referência)	ΔCt
Sk-Hep-1EPO	26,8	27,2	-0,4
HKB-11 EPO	28,3	28,06	0,24
Huh-7 EPO	21,4	27,1	-5,7
Sk-Hep-1	38,9	28,1	10,8
HKB-11	38,4	28,03	10,35
Huh-7	37,7	26,5	11,2

O gene de referência apresenta a média aritmética dos valores dos Cts do gene da β actina e da β 2 microglobulina. O experimento foi realizado em triplicata. Fonte: Elaborado pelo autor

Como mostrado na Figura 13, a linhagem celular que apresentou maior expressão relativa em relação ao controle foi a linhagem Huh-7, sendo o gene da rhEPO 122.294 vezes mais expresso nessa linhagem em relação ao seu controle não transduzido, seguida pela linhagem Sk-Hep-1 com expressão de 2.352 vezes e a linhagem HKB-11 com 1.097 vezes. Neste trabalho, usamos um MOI de 1 para favorecer um baixo número de integrações por célula, visando a estabilidade das populações recombinantes em primeiro lugar. Como mostrado na Tabela 2, a análise do número de cópias lentivirais inseridas no genoma mostrou que a linhagem celular HKB-11 foi a que apresentou o maior número de cópias inseridas, com um total de 10,1 cópias/células seguidas pela Sk-Hep-1 com 8,3 cópias/célula, enquanto as células Huh-7 tiveram um valor significativamente menor, com 1,97 cópias/células. No entanto, a linhagem celular Huh-7 obteve produção superior durante a cinética de curta duração bem como uma expressão do RNAm da rhEPO consideravelmente

maior. Analisando os resultados obtidos, é possível afirmar que não houve uma correlação entre o número de cópias lentivirais integradas ao genoma das células, a expressão do RNAm e a produção da rhEPO.

Figura 13. Expressão relativa do gene da EPO nas linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7.



As amostras foram analisadas usando PCR quantitativa em tempo real. A alteração da expressão do gene alvo foi calculada usando o método $\Delta\Delta Ct$. O gene de referência é a média aritmética dos valores de ΔCt dos genes β actina e $\beta 2$ microglobulina. O experimento foi realizado em triplicata. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Caracterização cinética e metabólica das linhagens celulares modificadas

Compreender as características cinéticas e metabólicas das linhagens celulares é um passo essencial para melhorar o desempenho dos processos relacionados à cultura de células de mamíferos para a produção industrial de produtos biofarmacêuticos. O conhecimento das características metabólicas das linhagens celulares permite a determinação de quais parâmetros, substratos ou metabólitos devem ser controlados ou modificados durante o cultivo. Com o conhecimento e controle de tais parâmetros, é possível assim aumentar concentração celular e a produtividade bem como estudar a influência dos mesmos na qualidade das proteínas recombinantes produzidas.

Nessa etapa foram analisados o crescimento, o consumo de glicose, a produção de lactato, o consumo de glutamina, a produção de glutamato e a produção de amônia pelas linhagens celulares modificadas, utilizando-se os meios de cultura com maior produtividade para rhEPO. As Figuras 14, 15 e 16 mostram os resultados do crescimento e do metabolismo das linhagens Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 respectivamente.

Como mostrado na Figura 14, a linhagem Sk-Hep-1 apresentou crescimento celular até 72 horas após inóculo de 5×10^5 células/mL, atingindo uma concentração celular máxima de $2,14 \times 10^6$ células/mL (Tabela 4). Após tal ponto, as células permaneceram em uma fase estacionária de crescimento até o final da cultura. A viabilidade celular permaneceu acima de 90% durante todo o cultivo. A taxa de crescimento específico máxima durante a fase de crescimento exponencial foi de $0,0237 \text{ h}^{-1}$, com tempo de duplicação de 30,1 horas (Tabela 4).

A linhagem celular HKB-11 (Figura 15) apresentou crescimento celular intenso até 120 horas, atingindo uma concentração celular máxima de $5,74 \times 10^6$ células/mL (Tabela 4) e não apresentou uma fase estacionária como a célula Sk-Hep-1, tendo iniciado decaimento do número de células viáveis logo após atingida a concentração máxima. Ao final de 312 horas, tanto a concentração quanto a viabilidade das células diminuíram em aproximadamente 50% em comparação com seus respectivos pontos máximos. A taxa de crescimento específico máxima foi de $0,0220 \text{ h}^{-1}$, com tempo de duplicação de 31,5 horas (Tabela 4).

A linhagem celular Huh-7 (Figura 16) mostrou um padrão de crescimento celular semelhante às células HKB-11 até 96 horas de cultura, alcançando uma concentração celular máxima de $4,37 \times 10^6$ células/mL. Após 96 horas, a concentração celular começou a cair, resultando numa concentração celular final de $1,7 \times 10^6$ células, com viabilidade de 30%. A taxa de crescimento específico máxima foi de $0,0312 \text{ h}^{-1}$, com tempo de duplicação de 22,3 horas (Tabela 4).

Analisando a cinética de crescimento celular, pode ser observado que os valores de concentração celular alcançados no cultivo das células Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 são compatíveis aos valores comumente observados nas culturas de outras linhagens celulares humanas, como a HEK-293 e a PER.C6 sob condições de cultivo em suspensão em meios isentos de soro fetal bovino. Em um cultivo operado em batelada das células PER.C6, Maranga e colaboradores obtiveram uma concentração celular máxima de $3,2 \times 10^6$ células/mL, com crescimento máximo específico de $0,023 \text{ h}^{-1}$

(MARANGA *et al.*, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados em cultivos operados em batelada (SCHOOFS *et al.*, 1998) e em batelada alimentada (NADEAU *et al.*, 2000) utilizando a linhagem celular HEK-293. Comparando-se linhagens celulares humanas, pode-se observar que as células HKB-11 e Huh-7 utilizadas neste trabalho atingiram concentrações máximas superiores às células HEK-293 e PER.C6. No entanto, ao comparar os resultados das linhagens celulares descritas na literatura com plataformas extensivamente estudadas, como as células CHO e BHK, é possível notar a superioridade das últimas em relação às linhagens celulares humanas nesse tópico. Para tais células, têm sido comumente relatado na literatura resultados superiores a 10^7 células/mL, tendo diversas abordagens de modificação gênica para a otimização do metabolismo já sido testadas, como a super expressão dos genes da piruvato carboxilase 2, malato desidrogenase 2, do transportador de frutose e a utilização de fontes alternativas de carbono e nitrogênio (HOLMLUND *et al.*, 1992; IRANI *et al.*, 2002; WLASCHIN e HU, 2007; WILKENS e GERDTZEN, 2015).

Uma das principais consequências do comportamento metabólico de células animais cultivadas *in vitro* é a formação exacerbada de lactato e do íon amônio. Quando esses produtos excedem concentrações críticas específicas, eles inibem o crescimento celular e podem diminuir a produção da proteína recombinante (LAO e TOTH, 1997a; GAMBHIR *et al.*, 2003). O lactato pode causar uma redução significativa no pH do meio, o que pode inibir o crescimento celular, mas esse efeito pode ser evitado com um sistema de controle que mantém o pH dentro de uma faixa ideal. No entanto, o mecanismo primário pelo qual o lactato parece afetar negativamente as culturas é o de aumentar a osmolaridade do meio de cultura. Em geral, concentrações inferiores a 20 mM (1,78 g/L) não afetam a célula, enquanto de 20-40 mM (1,78-3,5 g/L) prejudicam a produtividade, e acima desse valor inibem o crescimento celular (WAGNER *et al.*, 1991; ALTAMIRANO *et al.*, 2013).

As células Sk-Hep-1 (Figura 14) apresentaram consumo de glicose até 120 horas de cultivo, não havendo exaustão da mesma no decorrer do cultivo. Em relação ao lactato, o mesmo não atingiu a concentração considerada inibitória para as células de mamíferos, havendo um aumento na concentração no início do cultivo, atingindo 3 g/L em 120 horas e permanecendo na faixa de 2 g/L até o final do cultivo, quando nas últimas 24 horas chegou novamente a 3 g/L. Não houve consumo total de glutamina durante o cultivo, tendo a mesma atingido uma concentração mínima de 0,2 g/L em 240 horas. Como pôde ser observado há um aumento na concentração de glutamina

no meio, tal fenômeno se deu pelo uso do suplemento glutamax (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e não da L-glutamina. Embora a L-glutamina seja um nutriente essencial em culturas de células, a mesma degrada de maneira espontânea, gerando amônia e ácido pirrolidino carboxílico como subprodutos. O suplemento GlutaMAX é um dipeptídeo, L-alanina-L-glutamina, que é mais estável em soluções aquosas e não se degrada espontaneamente, sendo a glutamina liberada gradativamente no meio de cultura.

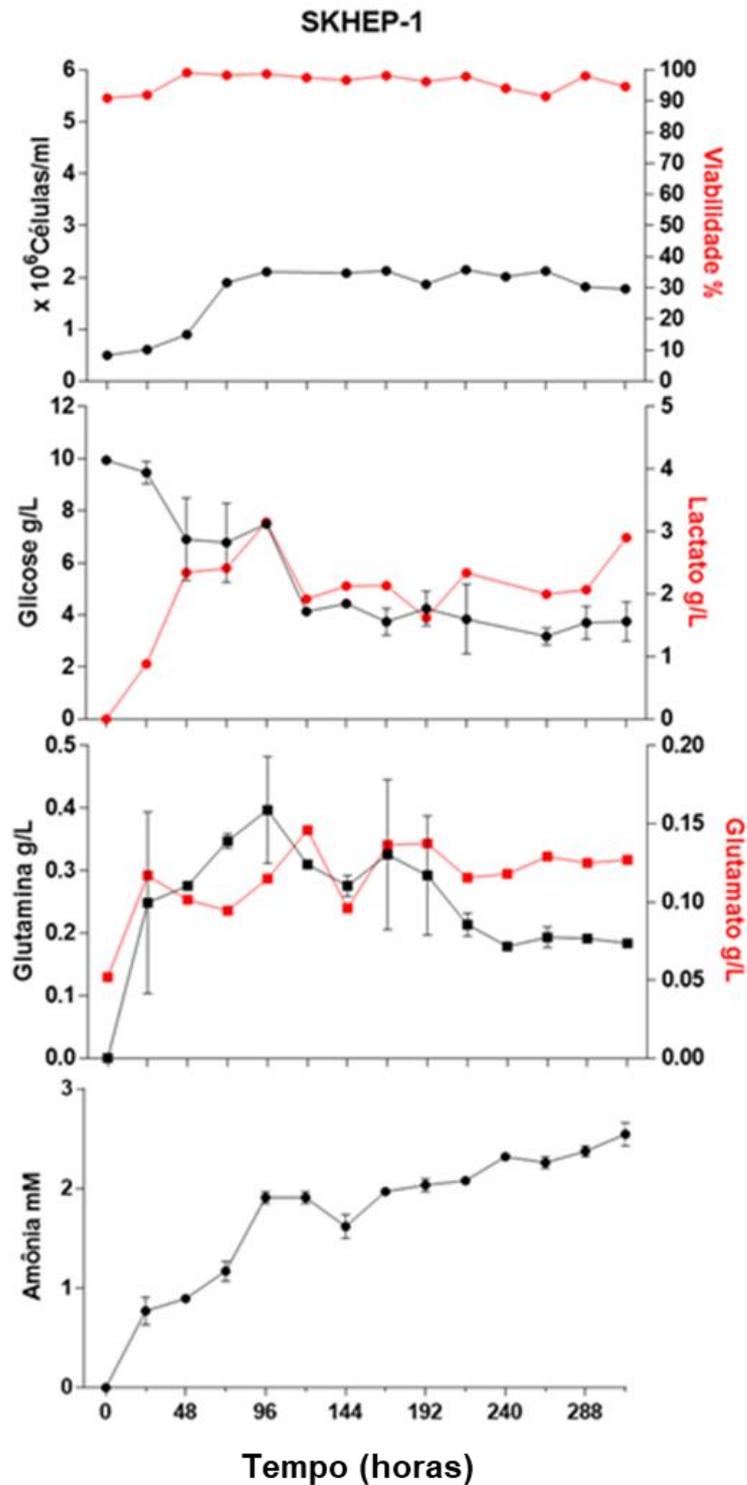
Como mostrado nas Figuras 15 e 16, as células HKB-11 e Huh-7 atingem a concentração de lactato considerada inibitória para células de mamíferos em 264 e 192 horas, respectivamente, o que pode estar relacionado à diminuição da viabilidade celular e à ausência da fase estacionária do crescimento, já que em tais concentrações o lactato demonstrou inibir o crescimento, alterar o metabolismo celular e diminuir a produtividade em células CHO, de hibridoma e células BHK (OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992; LAO; TOTH, 1997a; CRUZ et al., 2000a). Em nenhuma das duas culturas foi observado o consumo total de glicose ou glutamina.

Já o íon amônio tem um impacto mais significativo na cultura de células de mamíferos quando comparado ao lactato: sendo que concentrações acima 2 mM de íon amônio podem inibir o crescimento e prejudicar a produtividade (ALTAMIRANO et al., 2013). Além disso, uma alta concentração de íon amônio tem mostrado prejudicar a qualidade das proteínas recombinantes produzidas (YANG; BUTLER, 2000).

As células Sk-Hep-1 (Figura 14) atingiram a concentração considerada inibidora para o íon amônio em aproximadamente 168 horas, mas o crescimento celular atinge seu ponto máximo em torno de 72 horas, onde a concentração de amônia foi cerca de 1,96 mM. A partir de então, as células entraram em fase estacionária, onde permaneceram até o final do cultivo, sem apresentar no entanto decaimento das células viáveis totais.

As células HKB-11 (Figura 15) mostram uma diminuição no número de células viáveis logo após atingir sua concentração máxima em 96 horas; contudo, os níveis do íon amônio nesse período não são considerados pela literatura como inibidores do crescimento de células de mamíferos (ALTAMIRANO et al., 2013), o qual foi atingido somente após 288 horas de cultura.

Figura 14. Caracterização cinética e metabólica da linhagem celular Sk-Hep-1 modificada para a expressão estável da rhEPO.



Crescimento, consumo de glicose, produção de lactato, consumo de glutamina, produção de glutamato e produção de íon amônio pela linhagem celular Sk-Hep-1 modificada e cultivada em suspensão em meio CDM4-CHO (n=2). Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4. Parâmetros de crescimento e metabólicos das linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 cultivados em condições de suspensão em meios isentos de SFB.

	Sk-Hep-1	HKB-11	Huh-7
μ_{\max} (h^{-1})	0,023	0,022	0,031
$X_{v_{\max}}$ (10^6 cels/mL)	2,145	5,740	4,365
tD (h)	30,1	31,5	22,3
ICV	321,688	704,777	470,083
qEPO ($\mu\text{g}/10^6$ cels/h)	0,239	0,116	0,612
qGlu ($\text{g}/10^6$ cels/h)	-0,012	-0,012	-0,021
qLac ($\text{g}/10^6$ cels/h)	0,0085	-0,0008	0,018
qNH ₄ ($\text{g}/10^6$ cels/h)	0,0056	0,0023	0,0056
Ylac/Glu (g/g)	0,382	0,738	1,191
[EPO]max ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	112,7	112,5	571,5
P ($\mu\text{g}/\text{h}$)	0,671	0,669	3,4

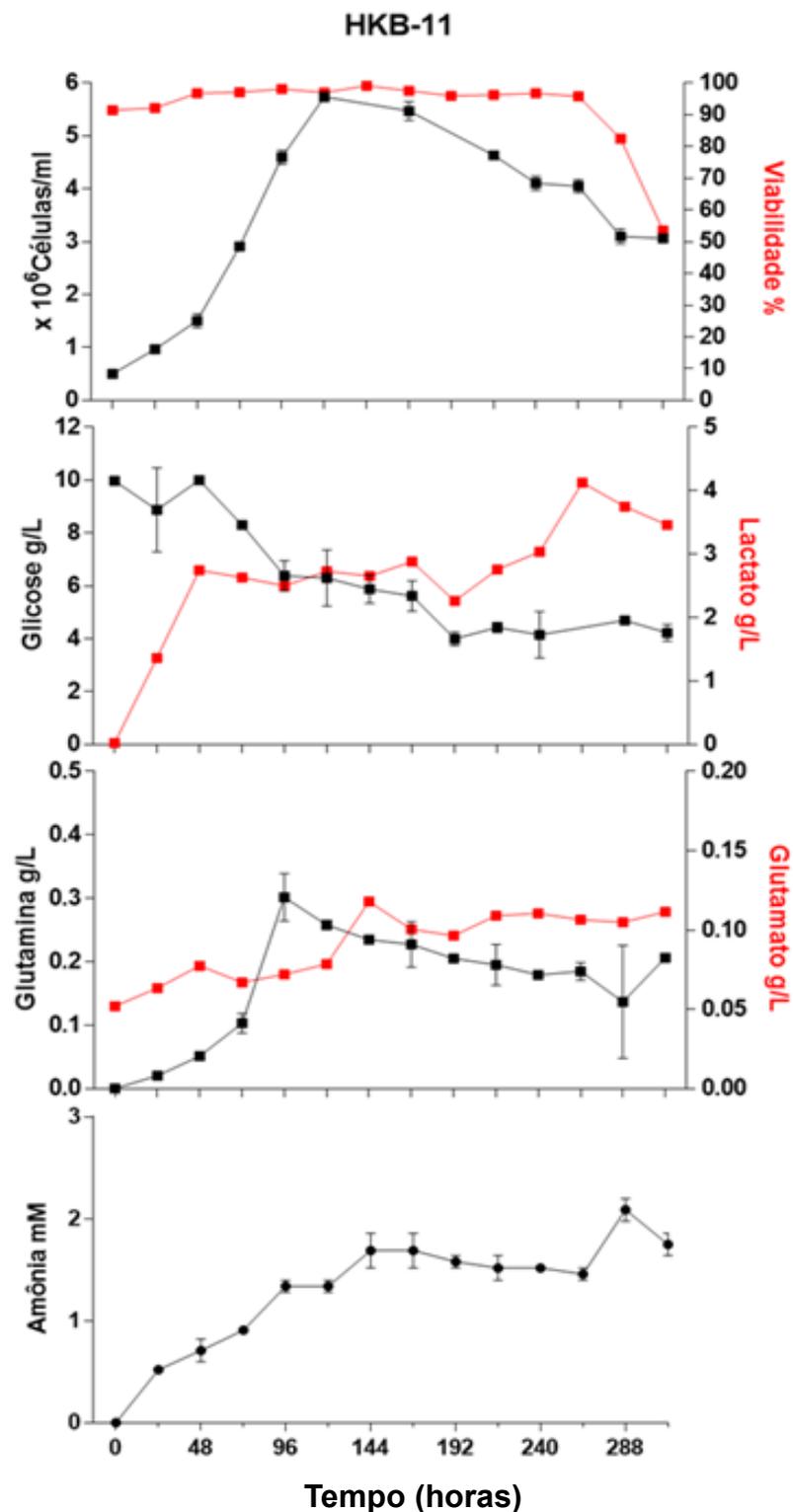
Taxa de crescimento específico máxima (μ_{\max}), X_v concentração máxima de células viáveis, Dt tempo de duplicação, ICV integral de células viáveis, qEPO taxa específica de produção de rhEPO, qGlu taxa específica de consumo de glicose, qLac taxa específica de produção de lactato, qNH₄ taxa específica de produção de amônia, Ylac/Glu fator de conversão, [EPO] máxima concentração máxima de rhEPO, P rhEPO produtividade. Fonte: Elaborado pelo autor.

A linhagem de células Huh-7 (Figura 16) atingiu tanto a concentração inibitória do íon amônio quanto de lactato nas primeiras 96 horas, o que se correlaciona com o início do decaimento de células viáveis no mesmo período.

A biossíntese de proteínas está associada a um alto custo energético; o recrutamento e liberação de tRNAs e a formação das ligações peptídicas requerem aproximadamente 3-4 ATP por ligação peptídica. Schmidt relatou que a síntese de proteínas em células animais consumia de 20 a 25% da energia celular total (SCHMIDT, 1999; MARTINEZ et al., 2013; KLEIN et al., 2015).

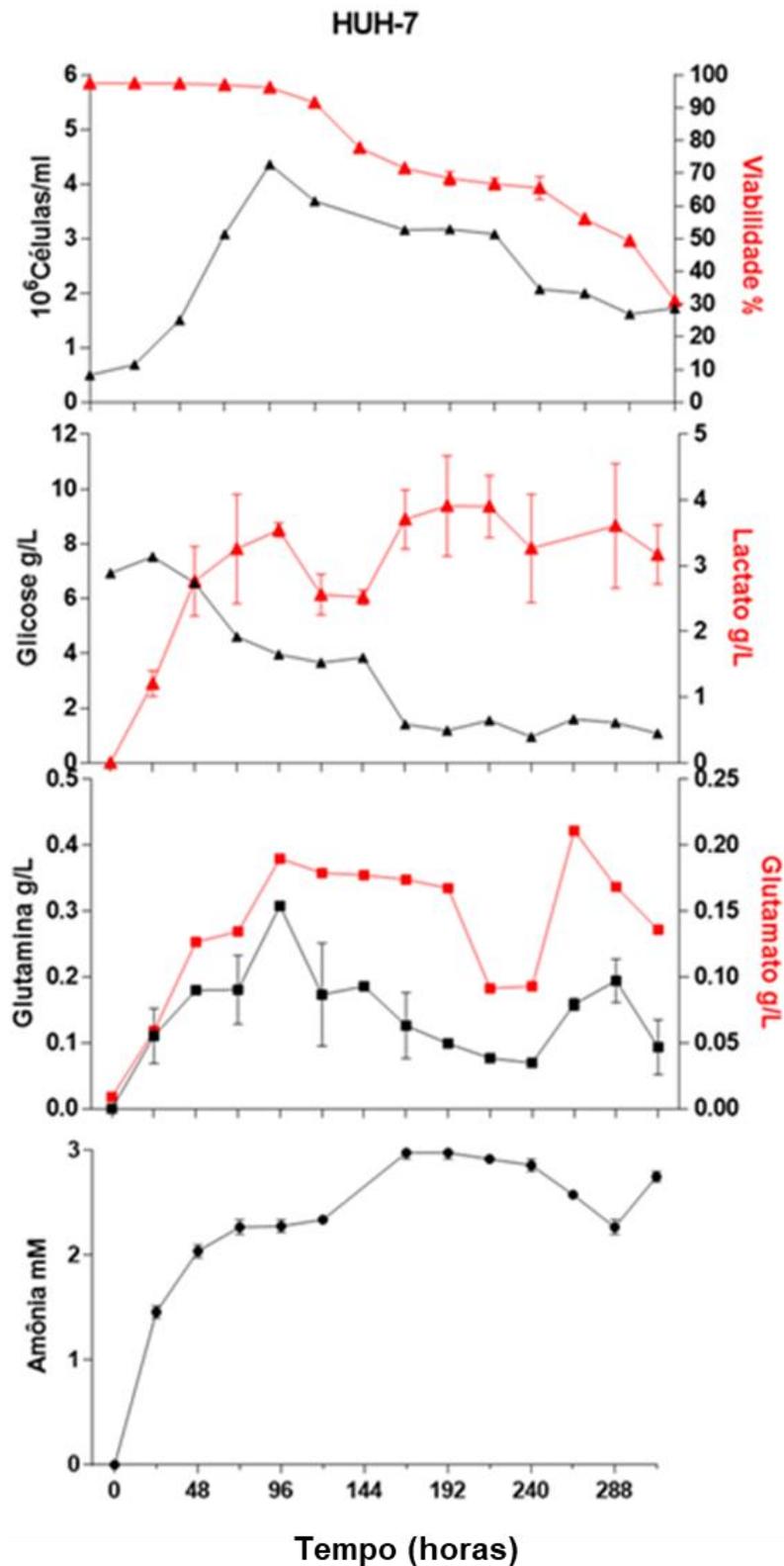
A linhagem Huh-7 atingiu maiores taxas específicas de produção de lactato e amônia, de consumo de glicose bem como maior taxa de conversão de glicose em lactato do que as demais linhagens (Tabela 4). Considerando tal fato é possível associar a maior intensidade do metabolismo da linhagem Huh-7 com o fardo associado à maior expressão do RNAm da rhEPO, bem como à uma produção significativamente maior da proteína recombinante.

Figura 15. Caracterização cinética e metabólica da linhagem celular HKB-11 modificada para a expressão estável da rhEPO.



Crescimento, consumo de glicose, produção de lactato, consumo de glutamina, produção de glutamato e produção de íon amônio pela linhagem celular HKB-11 modificada e cultivada em suspensão em meio CDM4-CHO livre de soro fetal bovino (n=2). Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 16. Caracterização cinética e metabólica da linhagem celular Huh-7 modificada para a expressão estável da rhEPO.



Crescimento, consumo de glicose, produção de lactato, consumo de glutamina, produção de glutamato e produção de amônia pela linhagem celular Huh-7 modificada e cultivada em suspensão em meio Freestyle 293 livre de soro fetal bovino (n=2). Fonte: Elaborado pelo auto

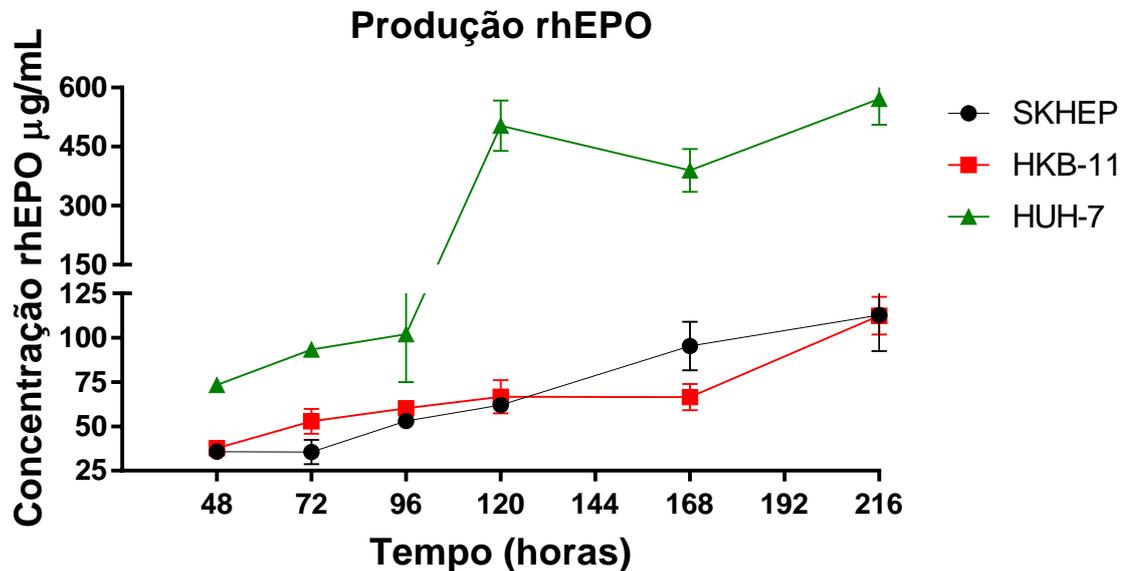
5.6 Produção de rhEPO pelas linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7

Após a caracterização genética, o aprimoramento da produção da rhEPO pelas linhagens celulares testando diferentes meios de cultura e a caracterização do crescimento e metabolismo celular, o próximo passo foi avaliar a cinética de produção da rhEPO. Como mostrado na Figura 17, a produção volumétrica da rhEPO pelas células Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 alcançou uma concentração máxima de 112,5 µg/mL, 112,7 µg/mL e 571 µg/mL, com uma taxa de produção específica de 0,239 µg/10⁶ cels/h, 0,116 µg/10⁶ cels/h e 0,612 µg/10⁶ cels/h, respectivamente. A produção de todas as linhagens celulares alcançou a concentração máxima ao final do cultivo.

Corroborando com os resultados anteriores, as células Huh-7 tiveram maior produção de rhEPO em comparação às células HKB-11 e Sk-Hep-1, que atingiram virtualmente a mesma produção. Este rendimento é comparável a alguns resultados obtidos usando plataformas de produção bem estabelecidas para glicoproteínas bioterapêuticas, como as células CHO, BHK, HEK293. Em 2002, em um estudo que objetivou analisar os efeitos da temperatura na produção de rhEPO por células CHO, Yoon e colaboradores alcançaram uma produção de 109,2 µg/mL de rhEPO em culturas mantidas a 33°C e 42,8 µg/mL a 37°C (YOON; SONG; LEE, 2003). Em um estudo similar usando células CHO, Ahn e colaboradores atingiram uma concentração máxima abaixo de 20 µg/mL em culturas mantidas a 37°C e aproximadamente 140 µg/mL em culturas mantidas a 32°C (AHN et al., 2008).

Após 13 dias de cultura, Gaillet e colegas tiveram uma produção de 206 µg/mL de rhEPO usando células CHO estáveis geradas por transdução lentiviral e cultivadas em condições isentas de soro. Neste estudo, um MOI de 200 foi utilizado para a transdução das células com uma média de 19 cópias do gene integrado por célula (GAILLET et al., 2010). Também usando vetores lentivirais para geração de células CHO estáveis, a maioria das células transduzidas por Baranyi e colegas produziram 50-250 µg/mL de rhEPO, sendo as mesmas transduzidas em MOI mais alto e tendo 62-94 cópias integradas por célula (BARANYI et al., 2013).

Figura 17. Cinética da produção de rhEPO de células Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 cultivadas em suspensão e meio livre de soro fetal bovino.



As células Sk-Hep-1 e HKB-11 foram cultivadas em meio CDM4-CHO e células Huh-7, em meio Freestyle 293 (n = 2).

Quanto à relação entre a produção de proteínas recombinantes, a cinética de crescimento e o metabolismo celular, foram relatados pontos de vista conflitantes na literatura; Hayter *et al* determinaram que a taxa de produção específica de proteína recombinante foi maior durante o período inicial de crescimento exponencial de células CHO-K1 em uma cultura operada em batelada agitada. Em contraste, Fussenegger *et al* estabeleceram uma fase de produção citostática de células CHO-K1 por super expressão dos genes supressores de tumor (p21, p27 ou p53/175P). Contudo, tais resultados mostraram que a produção de proteína recombinante foi maior quando as células estavam em um estado de baixa proliferação. Isso pode ocorrer porque os recursos celulares podem ser desviados diretamente para a síntese de proteínas ao invés do suprimento da produção de biomassa. Então, um processo ideal de produção de proteínas recombinantes através da cultura de células combinaria crescimento rápido até que a densidade celular desejada fosse alcançada, seguida de uma fase de produção com pouca ou nenhuma proliferação (HAYTER *et al.*, 1991; FUSSENEGGER *et al.*, 1997). Dean e Reddy mostraram que a maioria da produção de proteínas recombinantes em células CHO de alto desempenho (sistema de expressão DHFR) ocorreu durante os três últimos dias da cultura de batelada alimentada quando o crescimento foi mínimo. Templeton *et al.* demonstrou que a

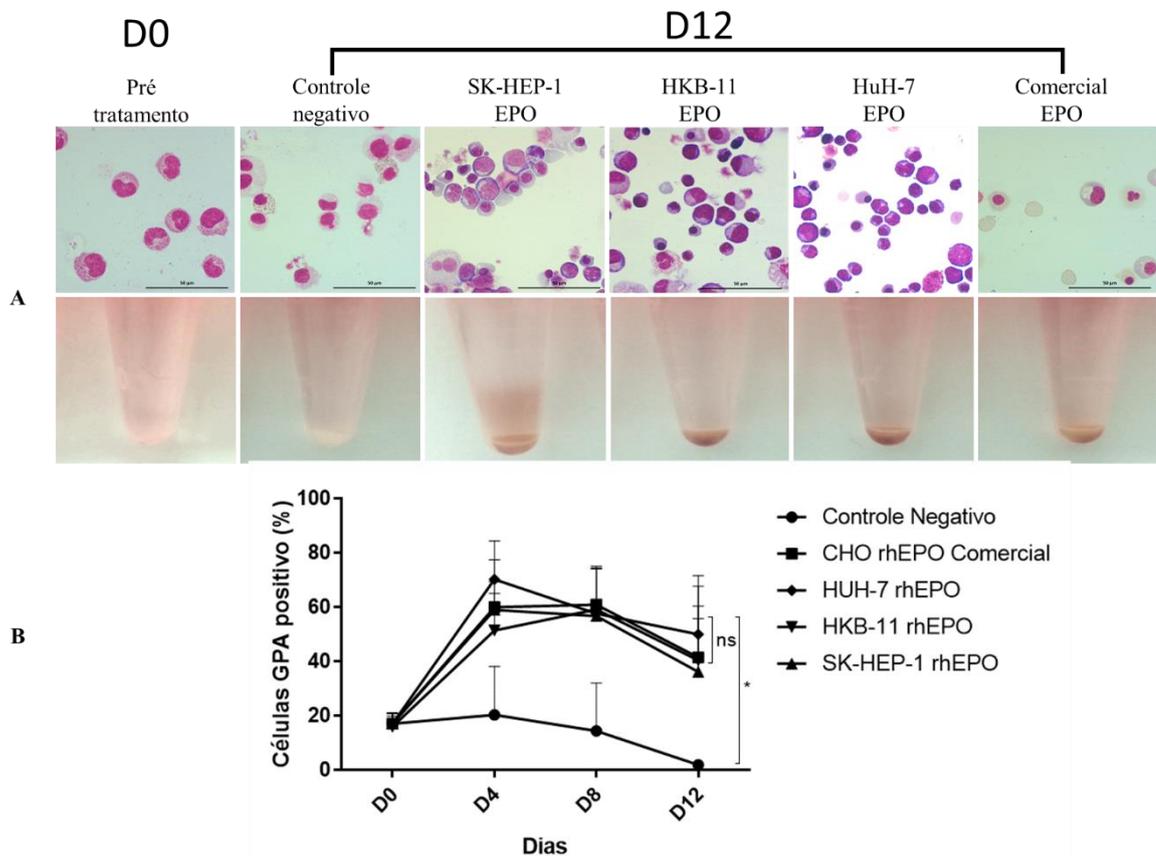
produção de anticorpos em células CHO (sistema de expressão DHFR) foi mínimo na durante a fase exponencial, mas a taxa de produção aumentou durante a fase estacionária quando a produção de biomassa diminuiu (DEAN e REDDY, 2013; TEMPLETON *et al.*, 2013). Tais comportamentos podem ser associados à produção das linhagens celulares utilizadas nesse trabalho. A linhagem Sk-Hep-1 por exemplo, apresentou uma fase estacionária a partir de 72 horas até o final do cultivo; foi possível observar a discreta produção da proteína recombinante até tal ponto bem como o aumento da produção na fase estacionária, sustentada até o final do cultivo (Figura 17). Já a linhagem HKB-11 teve sua produção dobrada nas últimas 48 do cultivo, onde a mesma se encontrava em fase de decaimento celular. Tal fenômeno fica mais evidente na linhagem que atingiu a maior produção, a linhagem Huh-7 teve uma rápida proliferação celular (Tabela 4), a qual cessou em 96 horas, entrando então diretamente em fase de decaimento. A concentração de proteína recombinante até ponto de 96 horas era de aproximadamente 100 µg/mL, sendo que 24 horas depois do fim da fase de proliferação, a concentração atingiria 502 µg/mL, ficando evidente a relação entre o estágio de baixa proliferação e a produção da linhagem celular.

5.7 Ensaio de diferenciação e maturação eritróide de células CD34+ de sangue periférico

A eritropoiese é definida como o processo que leva à diferenciação e proliferação de células tronco hematopoiéticas até o amadurecimento em glóbulos vermelhos. O processo inclui uma primeira fase, a qual está relacionada ao comprometimento eritróide da célula tronco hematopoiética, fase esta independente da eritropoietina e sensível a vários fatores de crescimento comuns a outras linhagens, e a fase dependente da eritropoietina, onde há maturação terminal de precursores eritróides em células maduras enucleadas (KOURY *et al.*, 2002).

A maioria dos ensaios *in vitro* de eritropoiese disponíveis baseia-se em linhagens celulares, tais como a linhagem murina MEL ou as linhagens celulares humanas K562, HEL, UT-7 humanas. No entanto, as linhagens celulares geralmente não recapitulam todo o processo de eritropoiese, já que muitas vias regulatórias foram alteradas durante o processo de transformação que levou à sua imortalização (MARKS e RIFKIND, 1978; RONZONI *et al.*, 2008).

Figura 18. Análise funcional das rhEPOs produzidas pelas linhagens celulares humanas



A) Imagens representativas da morfologia das células coradas com MGG nos dias 0 e 12 de cada grupo (Aumento de 63X). B) Percentagem média de células positivas para GPA ao longo da cultura. * ANOVA bidirecional e teste de correção de comparações múltiplas de Tukey computados com intervalo de confiança de 95%.

Baseado nisso foi escolhido um ensaio de diferenciação terminal eritróide com progenitores hematopoiéticos derivados do sangue periférico (HU *et al.*, 2013). Para isso, foi medida a expressão da glicoforina A (GPA), um importante marcador de superfície de células eritróides diferenciadas (ROBINSON *et al.*, 1981).

No dia 0 da Fase 2 de cada experimento independente, as amostras apresentaram níveis semelhantes de células positivas para GPA (Figura 18B). Com exceção do controle negativo (cultura de fase 2 privada de rhEPO), todas as amostras apresentaram um aumento importante de células GPA positivas ao longo do experimento, com pico na expressão de GPA no dia 4. Pode se notar que as células tratadas com as rhEPOs produzidas pelas linhagens celulares humanas obtiveram desempenho comparável às células tratadas com a rhEPO comercial em relação à percentagem de células positivas para a expressão da GPA. Em contraste, as células

GPA positivas do controle negativo diminuíram a sua frequência ao longo do ensaio. Como a eritropoiese é um processo dependente da EPO, seria esperado que as amostras privadas de EPO não se diferenciasssem terminalmente (KRANTZ, 1991). Isso ficou mais claro quando foram analisadas as características morfológicas das amostras entre cada grupo (Figura 18A). As células do controle negativo preservaram uma morfologia semelhante aos progenitores eritróides iniciais, mantendo um aspecto semelhante ao do dia 0. Em contraste, as células cultivadas com a rhEPO comercial ou com as rhEPOs produzidas pelas células humanas apresentaram um maior número de células eritróides com características morfológicas de diferenciação terminal bem como mais células semelhantes a reticulócitos e enucleadas. Embora os parâmetros de hemoglobinação não tenham sido medidos, as amostras tratadas com rhEPO mostraram um aspecto avermelhado, similar às amostras tratadas com EPO comercial e diferente das células no dia 0 ou do controle negativo (Figura 18A).

Em conclusão, as rhEPOs foram capazes de promover a expressão do marcador de diferenciação eritróide CD235a (GPA) sem diferença em relação ao controle com EPO comercial. Vale ressaltar que o marcador CD235a só é expresso na fase final de diferenciação, mais especificamente a partir do progenitor eritróide CFU-E (Unidade formadora de colônia-eritróide) até as células enucleadas maduras. Foi possível observar as diferenças morfológicas das células tratadas com o sobrenadante contendo as rhEPOs em relação ao controle tratado com o coquetel de citocinas sem EPO, bem como inferir a hemoglobinação das mesmas através do aspecto avermelhado presente somente nas células tratadas com o sobrenadante contendo as rhEPO produzidas pelas linhagens celulares humanas testadas e o controle contendo rhEPO comercial. Esses resultados mostram que as rhEPO produzidas pelas células Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 foram funcionais e que sua atividade biológica é equivalente à de um produto comercialmente disponível.

Como nenhuma publicação atualmente descreve o crescimento, o comportamento metabólico, a funcionalidade da proteína produzida e a produtividade das linhagens celulares testadas nas condições de cultura específicas desta pesquisa, os resultados apresentados aqui podem ser considerados uma contribuição útil ao estudo das linhagens celulares humanas como novos sistemas de expressão.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foram descritos o comportamento cinético, metabólico e a produção de proteína recombinante pelas linhagens celulares Sk-Hep-1, HKB-11 e Huh-7. Foi utilizada a eritropoetina humana como modelo para avaliar a produtividade dessas linhagens em condições de suspensão e meio livre de soro fetal bovino e todos os resultados foram compatíveis ou superiores aos encontrados na literatura. A linhagem Huh-7 apresentou produção superior quando comparada às células Sk-Hep-1 e HKB-11, o que a coloca como uma alternativa promissora a frente às atuais plataformas de expressão não humanas utilizadas pela indústria biofarmacêutica. Portanto, os resultados aqui apresentados podem contribuir tanto para o estado da arte no estudo das linhagens celulares humanas para a produção de proteínas recombinantes, quanto para indústria biofarmacêutica em direção ao estabelecimento de novos sistemas de expressão que possibilitem a produção de glicoproteínas recombinantes com alta produtividade e melhor qualidade.

Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

Apesar da alta produção de proteína recombinante apresentada neste trabalho, alguns passos adicionais devem ser realizados para caracterizar melhor as linhagens celulares aqui estudadas. A escalabilidade e compatibilidade dessas células com biorreatores são parâmetros essenciais que precisam ser avaliados para a produção de glicoproteínas recombinantes em escala comercial. Além disso, o perfil glicídico também é uma característica relevante a ser analisada, uma vez que o mesmo pode atestar a qualidade e heterogeneidade da proteína produzida pelas linhagens, bem como influenciar na seleção das estratégias de produção posteriores.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTAMIRANO, C. et al. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, May 15 2013.

ASHWELL, G.; HARFORD, J. Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver. **Annual Review of Biochemistry**, v. 51, p. 531-554, 1982.

BALDI, L. et al. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein production. **Biotechnol Prog**, v. 21, n. 1, p. 148-153, Jan-Feb 2005.

BANDARANAYAKE, A. D.; ALMO, S. C. Recent advances in mammalian protein production. **Febs Letters**, v. 588, n. 2, p. 253-260, Jan 21 2014.

BARANYI, L. et al. Rapid generation of stable cell lines expressing high levels of erythropoietin, factor VIII, and an antihuman CD20 antibody using lentiviral vectors. **Hum Gene Ther Methods**, v. 24, n. 4, p. 214-227, Aug 2013.

BARDOR, M. et al. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 6, p. 4228-4237, Feb 11 2005.

BIAGGIO, R. T. et al. Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth, and cryopreservation. **Bioprocess Biosyst Eng**, Mar 31 2015.

BOSQUES, C. J. et al. Chinese hamster ovary cells can produce galactose-alpha-1,3-galactose antigens on proteins. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 11, p. 1153-1156, Nov 2010.

BOUSSIF, O. et al. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in-Vivo - Polyethylenimine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 16, p. 7297-7301, Aug 1 1995.

BRUNNER, D. et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **ALTEX**, v. 27, n. 1, p. 53-62, 2010.

BUSHMAN, F. et al. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 11, p. 848-858, Nov 2005.

BUTLER, M.; JENKINS, H. Nutritional Aspects of the Growth of Animal-Cells in Culture. **J Biotechnol**, v. 12, n. 2, p. 97-110, Nov 1989.

BUTLER, M.; SPEARMAN, M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. **Curr Opin Biotechnol**, v. 30, p. 107-112, Dec 2014.

CAZZOLA, M.; MERCURIALI, F.; BRUGNARA, C. Use of recombinant human erythropoietin outside the setting of uremia. **Blood**, v. 89, n. 12, p. 4248-4267, Jun 15 1997.

CHEN, Z.; KE, Y.; CHEN, Y. A serum-free medium for hybridoma cell culture. **Cytotechnology**, v. 11, n. 3, p. 169-174, 1993.

CHO, M. S. et al. An oriP expression vector containing the HIV-1 Tat/TAR transactivation axis produces high levels of protein expression in mammalian cells. **Cytotechnology**, v. 37, n. 1, p. 23-30, Sep 2001.

CORREA DE FREITAS, M. C. et al. Production of coagulation factor VII in human cell lines Sk-Hep-1 and HKB-11. **Protein Expr Purif**, v. 137, p. 26-33, Sep 2017.

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

DA ROSA, N. G. et al. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. **Biotechnol Lett**, v. 34, n. 8, p. 1435-1443, Aug 2012.

DANON, D. et al. Use of Cationized Ferritin as a Label of Negative Charges on Cell Surfaces. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 38, n. 5-6, p. 500-+, 1972.

DE SOUSA BOMFIM, A. et al. Human cell lines: A promising alternative for recombinant FIX production. **Protein Expr Purif**, v. 121, p. 149-156, May 2016.

DEAN, J.; REDDY, P. Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. **Biotechnol Bioeng**, v. 110, n. 6, p. 1735-1747, Jun 2013.

DHEUR, S. et al. Polyethylenimine but not cationic lipid improves antisense activity of 3'-capped phosphodiester oligonucleolides. **Antisense & Nucleic Acid Drug Development**, v. 9, n. 6, p. 515-525, Dec 1999.

DO AMARAL, R. L. et al. Approaches for recombinant human factor IX production in serum-free suspension cultures. **Biotechnol Lett**, v. 38, n. 3, p. 385-394, Mar 2016.

DULL, T. et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 8463-8471, Nov 1998.

DUMONT, J. et al. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Crit Rev Biotechnol**, v. 36, n. 6, p. 1110-1122, Dec 2016.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, n. 6, p. 700-707, Dec 2009.

DUVAR, S. et al. Modulation of the glycosylation repertoire of a recombinant human EPO expressing model cell line under different culture conditions. **Animal Cell Technology Meets Genomics**, p. 723-725, 2005.

ELEGHEERT, J. et al. Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins. **Nat Protoc**, v. 13, n. 12, p. 2991-3017, Dec 2018.

ENJOLRAS, N. et al. Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications. **Thromb Res**, v. 130, n. 5, p. e266-273, Nov 2012.

FALLAUX, F. J. et al. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. **Hum Gene Ther**, v. 9, n. 13, p. 1909-1917, Sep 1 1998.

FITZPATRICK, L.; JENKINS, H. A.; BUTLER, M. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 43, n. 2, p. 93-116, Nov 1993.

FLIEDL, L.; GRILLARI, J.; GRILLARI-VOGLAUER, R. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. **N Biotechnol**, v. 32, n. 6, p. 673-679, Dec 25 2015.

FREYSSINIER, J. M. et al. Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. **Br J Haematol**, v. 106, n. 4, p. 912-922, Sep 1999.

FROUD, S. J. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. **Dev Biol Stand**, v. 99, p. 157-166, 1999.

FUSSENEGGER, M.; MAZUR, X.; BAILEY, J. E. A novel cytostatic process enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. **Biotechnol Bioeng**, v. 55, n. 6, p. 927-939, Sep 20 1997.

GAILLET, B. et al. High-Level Recombinant Protein Production in CHO Cells Using Lentiviral Vectors and the Cumate Gene-Switch. **Biotechnol Bioeng**, v. 106, n. 2, p. 203-215, Jun 1 2010.

GALILI, U. et al. A Unique Natural Human-Igg Antibody with Anti-Alpha-Galactosyl Specificity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 160, n. 5, p. 1519-1531, 1984.

GAMBHIR, A. et al. Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 4, p. 317-327, Apr 2003.

GAWLITZEK, M. et al. Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. **Biotechnol Bioeng**, v. 68, n. 6, p. 637-646, Jun 20 2000.

GHADERI, D. et al. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 8, p. 863-867, Aug 2010.

GHADERI, D. et al. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews Vol 28, Issue 1**, v. 28, n. 1, p. 147-175, 2012.

GOH, J. B.; NG, S. K. Impact of host cell line choice on glycan profile. **Crit Rev Biotechnol**, v. 38, n. 6, p. 851-867, Sep 2018.

GOOCHEE, C. F.; MONICA, T. Environmental-Effects on Protein Glycosylation. **Bio-Technology**, v. 8, n. 5, p. 421-427, May 1990.

GORMAN, C.; BULLOCK, C. Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. **Curr Opin Biotechnol**, v. 11, n. 5, p. 455-460, Oct 2000.

GOTO, M. et al. Production of Recombinant Human Erythropoietin in Mammalian-Cells - Host-Cell Dependency of the Biological-Activity of the Cloned Glycoprotein. **Bio-Technology**, v. 6, n. 1, p. 67-71, Jan 1988.

GRAHAM, F. L. Citation Classic - a New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus-5 DNA. **Current Contents/Life Sciences**, n. 46, p. 16-16, Nov 14 1988.

GRAHAM, F. L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen Virol**, v. 36, n. 1, p. 59-74, Jul 1977.

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

HACKER, D. L.; BALASUBRAMANIAN, S. Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. **Curr Opin Struct Biol**, v. 38, p. 129-136, Jun 2016.

HALDANKAR, R.; KOPCHICK, J. J.; RIDGWAY, D. Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. **Biotechnol Prog**, v. 15, n. 3, p. 336-346, May-Jun 1999.

HARTLEY, J. L. Why proteins in mammalian cells? **Methods Mol Biol**, v. 801, p. 1-12, 2012.

HAYTER, P. M. et al. Chinese-Hamster Ovary Cell-Growth and Interferon-Production Kinetics in Stirred Batch Culture. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 5, p. 559-564, Feb 1991.

HENNECKE, M. et al. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 16, p. 3327-3334, Aug 15 2001.

HENRY, O.; JOLICOEUR, M.; KAMEN, A. Unraveling the metabolism of HEK-293 cells using lactate isotopomer analysis. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 34, n. 3, p. 263-273, Mar 2011.

HOLMLUND, A. C. et al. Growth and Metabolism of Recombinant Cho Cell-Lines in Serum Free Medium Containing Derivatives of Glutamine. **Animal Cell Technology : Developments, Processes and Products**, p. 176-179, 1992.

HU, J. P. et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. **Blood**, v. 121, n. 16, p. 3246-3253, Apr 18 2013.

IRANI, N.; BECCARIA, A. J.; WAGNER, R. Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells. **J Biotechnol**, v. 93, n. 3, p. 269-282, Feb 28 2002.

JAYAPAL, K. R. et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. **Chemical Engineering Progress**, v. 103, n. 10, p. 40-47, Oct 2007.

JELKMANN, W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. **Physiol Rev**, v. 72, n. 2, p. 449-489, Apr 1992.

JELKMANN, W. Molecular biology of erythropoietin. **Intern Med**, v. 43, n. 8, p. 649-659, Aug 2004.

JENKINS, N.; CURLING, E. M. A. Glycosylation of Recombinant Proteins - Problems and Prospects. **Enzyme Microb Technol**, v. 16, n. 5, p. 354-364, May 1994.

KAUSAR, H. et al. Huh-7 cell line as an alternative cultural model for the production of human like erythropoietin (EPO). **Journal of Translational Medicine**, v. 9, Nov 1 2011.

KHAN, K. H. Gene expression in Mammalian cells and its applications. **Adv Pharm Bull**, v. 3, n. 2, p. 257-263, 2013.

KICHLER, A. et al. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. **Journal of Gene Medicine**, v. 3, n. 2, p. 135-144, Mar-Apr 2001.

KIM, J. Y.; KIM, Y. G.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, n. 3, p. 917-930, Feb 2012.

KOHN, D. B.; SADELAIN, M.; GLORIOSO, J. C. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 7, p. 477-488, Jul 2003.

KOURY, M. J.; SAWYER, S. T.; BRANDT, S. J. New insights into erythropoiesis. **Curr Opin Hematol**, v. 9, n. 2, p. 93-100, Mar 2002.

KRANTZ, S. Erythropoietin. **Blood**, v. 77, n. 3, p. 419-434, 1991.

LAI, P. H. et al. Structural Characterization of Human Erythropoietin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 7, p. 3116-3121, Mar 5 1986.

LALONDE, M. E.; DUROCHER, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. **J Biotechnol**, v. 251, p. 128-140, Jun 10 2017.

LAO, M. S.; TOTH, D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. **Biotechnol Prog**, v. 13, n. 5, p. 688-691, Sep-Oct 1997a.

LE FLOCH, F. et al. HPCE monitoring of the N-glycosylation pattern and sialylation of murine erythropoietin produced by CHO cells in batch processes. **Biotechnol Prog**, v. 20, n. 3, p. 864-871, May-Jun 2004.

LEE, C. et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli. **J Biotechnol**, v. 123, n. 3, p. 273-280, May 29 2006.

LEE, J. S. et al. Current state and perspectives on erythropoietin production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 95, n. 6, p. 1405-1416, Sep 2012.

LEFLOCH, F. et al. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. **Cytotechnology**, v. 52, n. 1, p. 39-53, Sep 2006.

LIU, W.; XIONG, Y.; GOSSEN, M. Stability and homogeneity of transgene expression in isogenic cells. **J Mol Med (Berl)**, v. 84, n. 1, p. 57-64, Jan 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

MACHEDA, M. L.; ROGERS, S.; BEST, J. D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. **J Cell Physiol**, v. 202, n. 3, p. 654-662, Mar 2005.

MAO, Y. et al. Lentiviral Vectors Mediate Long-Term and High Efficiency Transgene Expression in HEK 293T cells. **Int J Med Sci**, v. 12, n. 5, p. 407-415, 2015.

MARANGA, L.; AUNINS, J. G.; ZHOU, W. Characterization of changes in PER.C6 cellular metabolism during growth and propagation of a replication-deficient adenovirus vector. **Biotechnol Bioeng**, v. 90, n. 5, p. 645-655, Jun 05 2005.

MARKS, P. A.; RIFKIND, R. A. Erythroleukemic differentiation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 47, p. 419-448, 1978.

MATSUGUCHI, T. et al. Production of interleukin 6 from human liver cell lines: production of interleukin 6 is not concurrent with the production of alpha-fetoprotein. **Cancer Res**, v. 50, n. 23, p. 7457-7459, Dec 1 1990.

MCQUEEN, A.; BAILEY, J. E. Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. **Biotechnol Bioeng**, v. 35, n. 11, p. 1067-1077, May 1990.

MCQUEEN, A.; BAILEY, J. E. Growth-Inhibition of Hybridoma Cells by Ammonium Ion - Correlation with Effects on Intracellular Ph. **Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 1-2, p. 49-61, 1991.

MEI, B. et al. Expression of human coagulation factor VIII in a human hybrid cell line, HKB11. **Mol Biotechnol**, v. 34, n. 2, p. 165-178, Oct 2006.

METTA, M. K. et al. Development of an in vitro Bioassay for Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) Based on Proliferative Stimulation of an Erythroid Cell Line and Analysis of Sialic Acid Dependent Microheterogeneity: UT-7 Cell Bioassay. **Protein Journal**, v. 36, n. 2, p. 112-122, Apr 2017.

MIYAKE, T.; KUNG, C. K.; GOLDWASSER, E. Purification of human erythropoietin. **J Biol Chem**, v. 252, n. 15, p. 5558-5564, Aug 10 1977.

MOIANI, A. et al. Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts. **J Clin Invest**, v. 122, n. 5, p. 1653-1666, May 2012.

MOREADITH, R. W.; LEHNINGER, A. L. The Pathways of Glutamate and Glutamine Oxidation by Tumor-Cell Mitochondria - Role of Mitochondrial Nad(P)⁺-Dependent Malic Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 10, p. 6215-6221, 1984.

MORENO-SANCHEZ, R. et al. Energy metabolism in tumor cells. **FEBS J**, v. 274, n. 6, p. 1393-1418, Mar 2007.

MUFARREGE, E. F. et al. Development of lentiviral vectors for transient and stable protein overexpression in mammalian cells. A new strategy for recombinant human FVIII (rhFVIII) production. **Protein Expr Purif**, v. 95, p. 50-56, Mar 2014.

NADEAU, I. et al. Human 293 Cell Metabolism in Low Glutamine-Supplied Culture: Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis. **Metabolic Engineering**, v. 2, n. 4, p. 277-292, Oct 2000.

NAKABAYASHI, H. et al. Growth of Human Hepatoma-Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. **Cancer Research**, v. 42, n. 9, p. 3858-3863, 1982.

NAKABAYASHI, H. et al. Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. **Gan**, v. 75, n. 2, p. 151-158, Feb 1984.

NALDINI, L.; TRONO, D.; VERMA, I. M. Lentiviral vectors, two decades later. **Science**, v. 353, n. 6304, p. 1101-1102, Sep 9 2016.

NEERMANN, J.; WAGNER, R. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. **J Cell Physiol**, v. 166, n. 1, p. 152-169, Jan 1996.

NIKLAS, J. et al. Quantitative characterization of metabolism and metabolic shifts during growth of the new human cell line AGE1.HN using time resolved metabolic flux analysis. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 34, n. 5, p. 533-545, Jun 2011.

NOGUCHI, A. et al. Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. **J Biochem**, v. 117, n. 1, p. 59-62, Jan 1995.

OBERBEK, A. et al. Generation of stable, high-producing CHO cell lines by lentiviral vector-mediated gene transfer in serum-free suspension culture. **Biotechnol Bioeng**, v. 108, n. 3, p. 600-610, Mar 2011.

OZTURK, S. S.; RILEY, M. R.; PALSSON, B. O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. **Biotechnol Bioeng**, v. 39, n. 4, p. 418-431, Feb 20 1992.

PATNAIK, S. K.; STANLEY, P. Lectin-resistant CHO glycosylation mutants. **Methods Enzymol**, v. 416, p. 159-182, 2006.

PAU, M. G. et al. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2716-2721, Mar 21 2001.

PICANCO-CASTRO, V. et al. Production of recombinant therapeutic proteins in human cells: current achievements and future perspectives. **Protein Pept Lett**, v. 20, n. 12, p. 1373-1381, Dec 2013.

RASHEED, S. et al. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). **Cancer**, v. 33, n. 4, p. 1027-1033, Apr 1974.

ROBINSON, J. et al. Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation. **Nature**, v. 289, n. 5793, p. 68, 1981.

RONZONI, L. et al. Erythroid differentiation and maturation from peripheral CD34+ cells in liquid culture: cellular and molecular characterization. **Blood Cells Mol Dis**, v. 40, n. 2, p. 148-155, Mar-Apr 2008.

RUNKEL, L. et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). **Pharm Res**, v. 15, n. 4, p. 641-649, Apr 1998.

SAINZ, B., JR.; CHISARI, F. V. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. **J Virol**, v. 80, n. 20, p. 10253-10257, Oct 2006.

SCHIEDNER, G. et al. Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for antibiotic selection. **BMC Biotechnol**, v. 8, p. 13, Feb 12 2008.

SCHNEIDER, M.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. **J Biotechnol**, v. 46, n. 3, p. 161-185, May 15 1996.

SCHOOFS, G. et al. A high-yielding serum-free, suspension cell culture process to manufacture recombinant adenoviral vectors for gene therapy. **Cytotechnology**, v. 28, n. 1-3, p. 81-89, 1998.

SKIBELI, V.; NISSEN-LIE, G.; TORJESEN, P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3626-3634, Dec 15 2001.

SOUBA, W. W. Glutamine and cancer. **Ann Surg**, v. 218, n. 6, p. 715-728, Dec 1993.

SWIECH, K. et al. Recombinant glycoprotein production in human cell lines. **Methods Mol Biol**, v. 1258, p. 223-240, 2015.

SWIECH, K.; PICANCO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expr Purif**, v. 84, n. 1, p. 147-153, Jul 2012a.

_____. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expr Purif**, v. 84, n. 1, p. 147-153, Jul 2012b.

TANGVORANUNTAKUL, P. et al. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 21, p. 12045-12050, Oct 14 2003.

TEMPLETON, N. et al. Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. **Biotechnol Bioeng**, v. 110, n. 7, p. 2013+, Jul 2013.

VARKI, A. Colloquium paper: uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107 Suppl 2, p. 8939-8946, May 11 2010.

VARKI, A. et al. Glycosylation Changes in Cancer. In: RD;VARKI, A., *et al* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY), 2015. p.597-609.

VARKI, A.; KANNAGI, R.; TOOLE, B. P. Glycosylation Changes in Cancer. In: ND;VARKI, A., *et al* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY), 2009. ISBN 9780879697709.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks--2003. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 8, p. 865-870, Aug 2003.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2006. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 7, p. 769-776, Jul 2006.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 9, p. 917-924, Sep 2010.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 10, p. 992-1000, Oct 2014.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nat Biotechnol**, v. 36, n. 12, p. 1136-1145, Dec 6 2018.

WHELAN, J. A.; RUSSELL, N. B.; WHELAN, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. **J Immunol Methods**, v. 278, n. 1-2, p. 261-269, Jul 2003.

WILKENS, C. A.; GERDTZEN, Z. P. Comparative Metabolic Analysis of CHO Cell Clones Obtained through Cell Engineering, for IgG Productivity, Growth and Cell Longevity. **PLoS One**, v. 10, n. 3, Mar 13 2015.

WLASCHIN, K. F.; HU, W. S. Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. **J Biotechnol**, v. 131, n. 2, p. 168-176, Aug 31 2007.

YANAGIHARA, S. et al. Measurement of Sialic Acid Content Is Insufficient to Assess Bioactivity of Recombinant Human Erythropoietin. **Biol Pharm Bull**, v. 33, n. 9, p. 1596-1599, Sep 2010.

YANG, M.; BUTLER, M. Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. **Biotechnol Prog**, v. 18, n. 1, p. 129-138, Jan-Feb 2002.

YUEN, C. T. et al. Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. **Glycobiology and Medicine**, v. 564, p. 141-142, 2005.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1158-1170, Sep-Oct 2012.

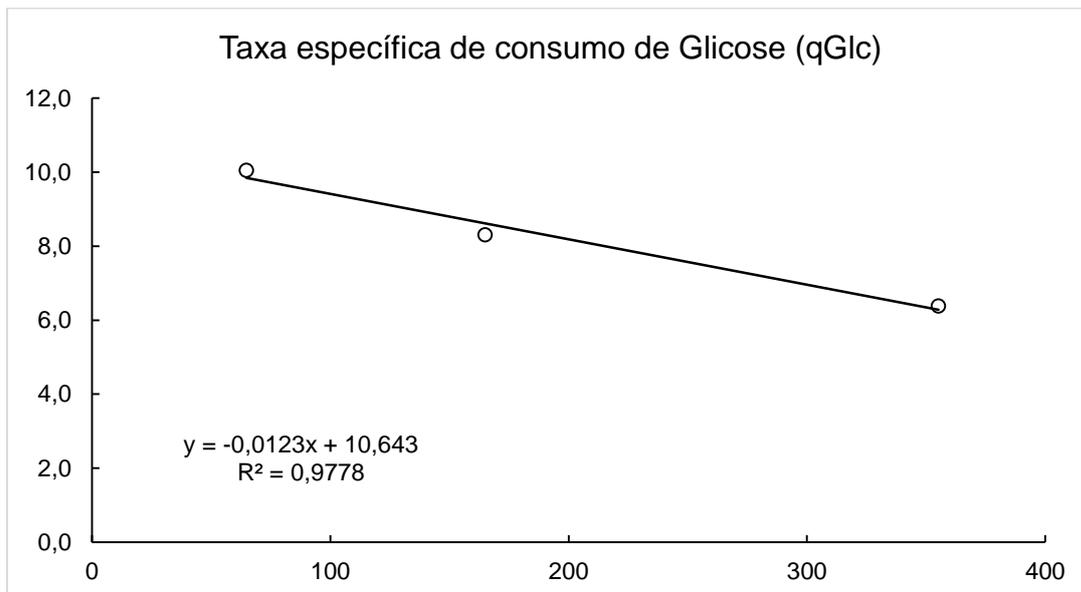
ZUFFEREY, R. et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. **Nat Biotechnol**, v. 15, n. 9, p. 871-875, Sep 1997.

ANEXOS

Cálculos das taxas específicas de consumo de substrato e produção de metabólitos para cada célula

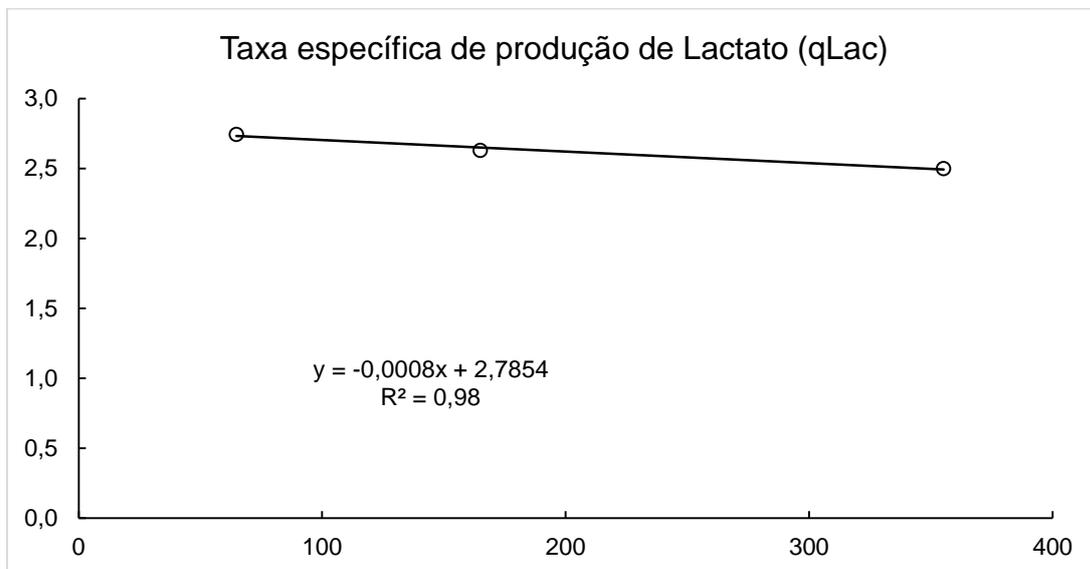
Taxa específica de consumo de glicose para HKB-11 durante cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento ($q_{\text{glc}} = -0,0123 \text{ g} / 10^6 \text{ cel} \cdot \text{h}$)

Tempo (h)	Células Viáveis ($10^6/\text{mL}$)	ICV ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	ICV Acumulado ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	Glicose (g/L)
0	0,500	0,00	0,00	9,97
24	0,965	17,58	17,58	9,63
48	1,505	47,22	64,80	10,05
72	2,910	100,20	165,00	8,31
96	4,595	190,26	355,26	6,39
120	5,740	314,28	669,54	6,30
168	5,475	583,44	1253,98	5,62
216	4,635	826,08	2080,06	4,43
240	4,105	930,96	3011,02	4,16
264	4,050	1028,82	4039,84	5,38
288	3,100	1114,62	5154,46	4,70
312	3,061	1188,55	6343,01	4,23



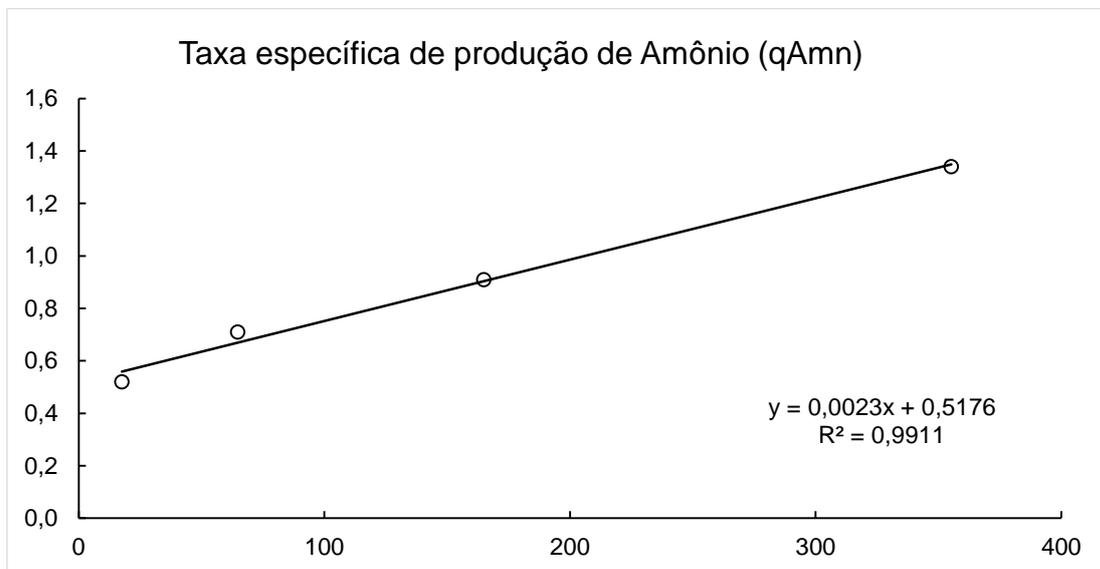
Taxa específica de produção de lactato para HKB-11 durante cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento ($q_{lac} = -0,0008 \text{ g/ } 10^6 \text{ cel} \cdot \text{h}$)

Tempo (h)	Células Viáveis ($10^6/\text{mL}$)	ICV ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	ICV Acumulado ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	Lactato (g/L)
0	0,500	0,00	0,00	0,020
24	0,965	17,58	17,58	1,365
48	1,505	47,22	64,80	2,745
72	2,910	100,20	165,00	2,630
96	4,595	190,26	355,26	2,500
120	5,740	314,28	669,54	2,730
168	5,475	583,44	1253,98	2,880
216	4,635	826,08	2080,06	2,760
240	4,105	930,96	3011,02	3,035
264	4,050	1028,82	4039,84	4,130
288	3,100	1114,62	5154,46	3,750
312	3,061	1188,55	6343,01	3,460



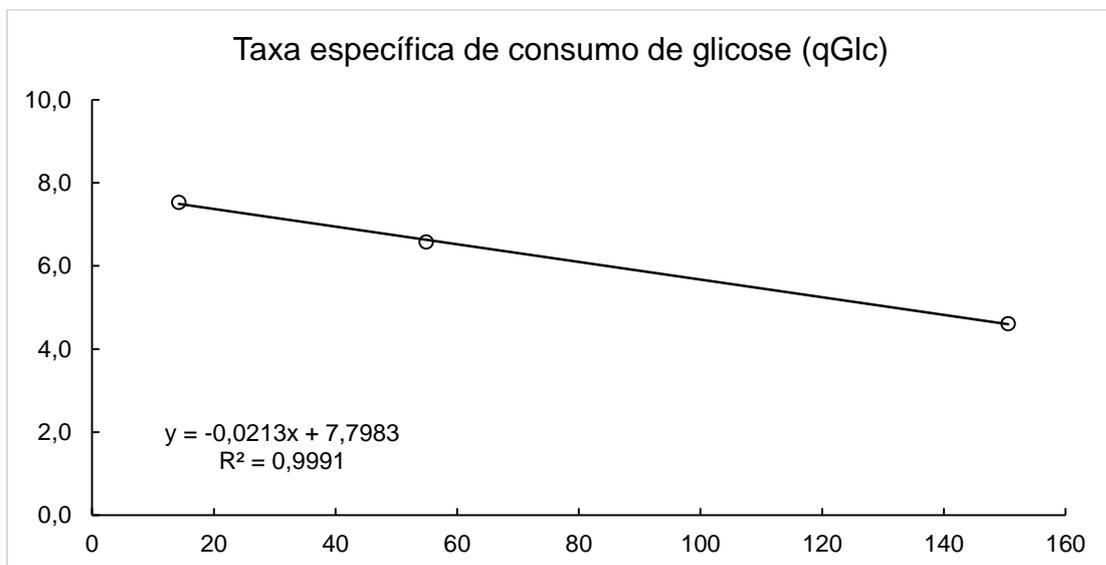
Taxa específica de produção de amônio para HKB-11 durante cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento ($q_{amn} = 0,0023 \text{ mmol}/10^6 \text{ cel} \cdot \text{h}$)

Tempo (h)	Células Viáveis ($10^6/\text{mL}$)	ICV ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	ICV Acumulado ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	Amônio (mmol/L)
0	0,500	0,00	0,00	0,000
24	0,965	17,58	17,58	0,520
48	1,505	47,22	64,80	0,710
72	2,910	100,20	165,00	0,910
96	4,595	190,26	355,26	1,340
120	5,740	314,28	669,54	1,340
168	5,475	583,44	1253,98	1,690
216	4,635	826,08	2080,06	1,520
240	4,105	930,96	3011,02	1,520
264	4,050	1028,82	4039,84	1,460
288	3,100	1114,62	5154,46	2,090
312	3,061	1188,55	6343,01	1,750



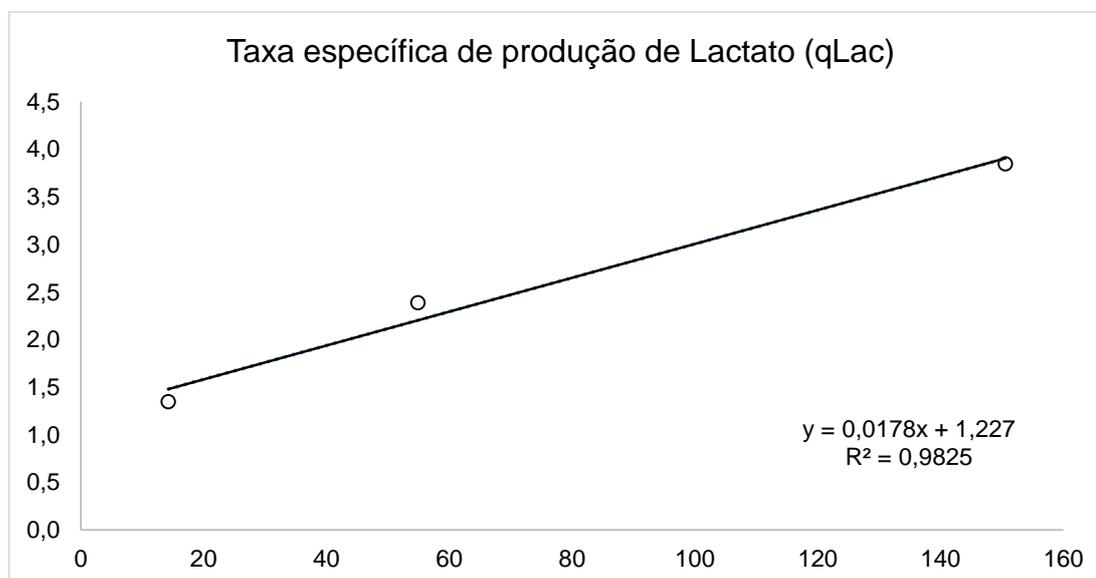
Taxa específica de consumo de glicose para Huh-7 durante cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento ($q_{\text{glc}} = -0,0213 \text{ g/ } 10^6 \text{ cel} \cdot \text{h}$)

Tempo (h)	Células Viáveis ($10^6/\text{mL}$)	ICV ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	ICV Acumulado ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	Glicose (g/L)
0	0,500	0,00	0,00	6,935
24	0,690	14,28	14,28	7,530
48	1,505	40,62	54,90	6,580
72	3,085	95,70	150,60	4,610
96	4,365	185,10	335,70	3,960
120	3,690	281,76	617,46	3,665
168	3,160	446,16	1063,62	1,410
192	3,173	522,16	1585,78	1,180
216	3,085	597,25	2183,03	1,555
240	2,075	659,17	2842,20	0,955
264	2,001	708,08	3550,28	1,600
288	1,615	751,46	4301,74	1,470
312	1,725	791,54	5093,28	1,075



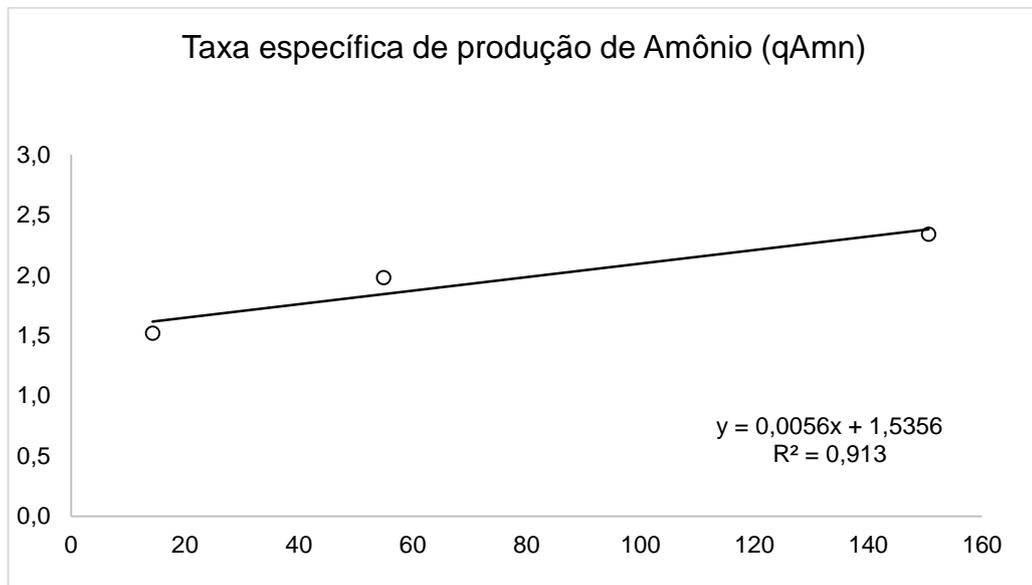
Taxa específica de produção de lactato para Huh-7 durante cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento ($q_{lac} = 0,0178 \text{ g/ } 10^6 \text{ cel} \cdot \text{h}$)

Tempo (h)	Células Viáveis ($10^6/\text{mL}$)	ICV ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	ICV Acumulado ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	Lactato (g/L)
0	0,500	0,00	0,00	0,003
24	0,690	14,28	14,28	1,210
48	1,505	40,62	54,90	2,765
72	3,085	95,70	150,60	3,260
96	4,365	185,10	335,70	3,545
120	3,690	281,76	617,46	2,560
168	3,160	446,16	1063,62	3,710
192	3,173	522,16	1585,78	3,910
216	3,085	597,25	2183,03	3,905
240	2,075	659,17	2842,20	3,265
264	2,001	708,08	3550,28	3,610
288	1,615	751,46	4301,74	3,170
312	1,725	791,54	5093,28	3,710



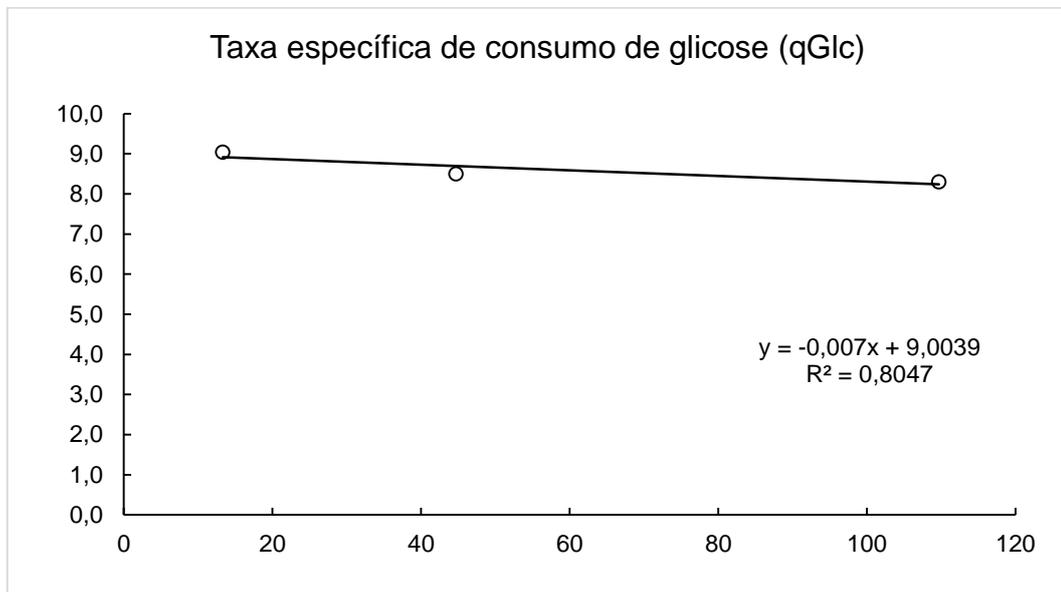
Taxa específica de produção de amônio para Huh-7 durante cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento ($q_{\text{amn}} = 0,0056 \text{ mmol}/10^6 \text{ cel}\cdot\text{h}$)

Tempo (h)	Células Viáveis ($10^6/\text{mL}$)	ICV ($\text{h}\cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	ICV Acumulado ($\text{h}\cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	Amônio (mmol/L)
0	0,500	0,00	0,00	0,000
24	0,690	14,28	14,28	1,460
48	1,505	40,62	54,90	2,040
72	3,085	95,70	150,60	2,270
96	4,365	185,10	335,70	2,280
120	3,690	281,76	617,46	2,340
168	3,160	446,16	1063,62	2,98
192	3,173	522,16	1585,78	2,98
216	3,085	597,25	2183,03	2,92
240	2,075	659,17	2842,20	2,86
264	2,001	708,08	3550,28	2,58
288	1,615	751,46	4301,74	2,27
312	1,725	791,54	5093,28	2,75



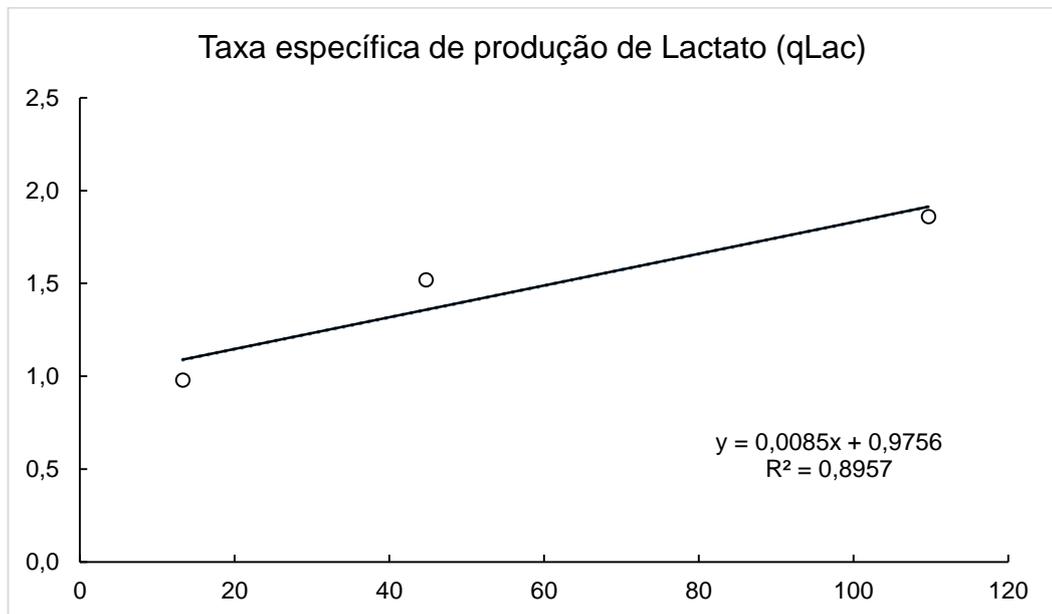
Taxa específica de consumo de glicose para SK-HEP-1 durante cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento ($q_{\text{glc}} = -0,0123 \text{ g/ } 10^6 \text{ cel} \cdot \text{h}$)

Tempo (h)	Células Viáveis ($10^6/\text{mL}$)	ICV ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	ICV Acumulado ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	Glicose (g/L)
0	0,500	0,00	0,00	9,950
24	0,610	13,32	13,32	9,470
48	0,898	31,41	44,73	6,910
72	1,900	64,98	109,71	6,780
96	2,110	113,10	222,81	7,495
144	2,085	213,78	436,59	4,435
168	2,130	264,36	700,95	3,745
192	1,865	312,30	1013,25	4,250
216	2,145	360,42	1373,67	3,840
240	2,015	410,34	1784,01	3,450
264	2,125	460,02	2244,03	3,175
288	1,820	507,36	2751,39	3,700
312	1,780	550,56	3301,95	3,750



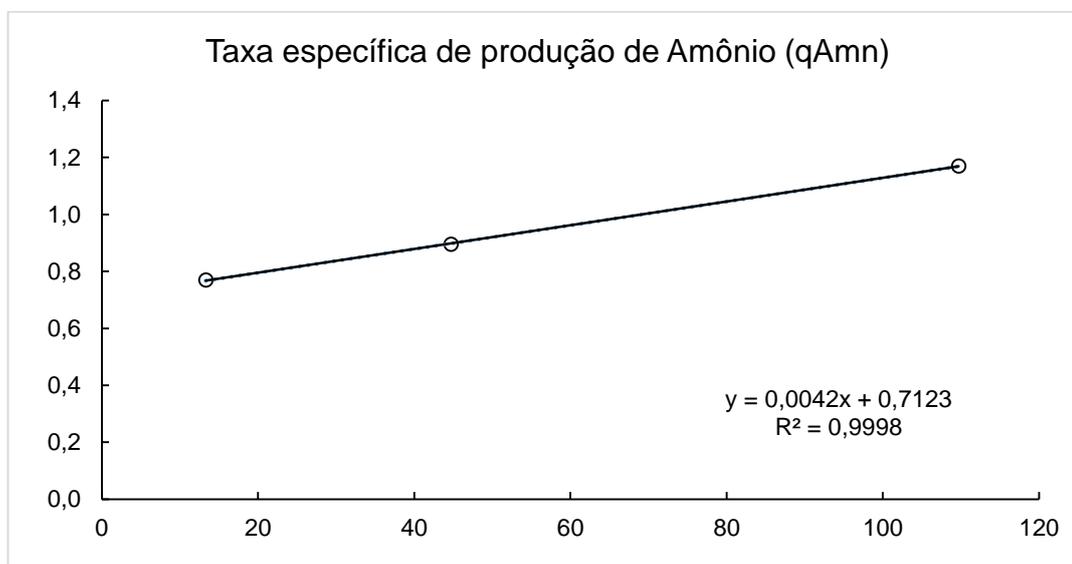
Taxa específica de produção de lactato para SK-HEP-1 durante cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento ($q_{lac} = 0,0085g/10^6\text{ cel}\cdot\text{h}$)

Tempo (h)	Células Viáveis ($10^6/\text{mL}$)	ICV ($\text{h}\cdot 10^6\text{ cel}/\text{mL}$)	ICV Acumulado ($\text{h}\cdot 10^6\text{ cel}/\text{mL}$)	Lactato (g/L)
0	0,500	0,00	0,00	0,002
24	0,610	13,32	13,32	0,980
48	0,898	31,41	44,73	1,520
72	1,900	64,98	109,71	1,860
96	2,110	113,10	222,81	3,150
144	2,085	213,78	436,59	2,130
168	2,130	264,36	700,95	2,135
192	1,865	312,30	1013,25	1,620
216	2,145	360,42	1373,67	2,340
240	2,015	410,34	1784,01	4,605
264	2,125	460,02	2244,03	2,000
288	1,820	507,36	2751,39	2,070
312	1,780	550,56	3301,95	2,905



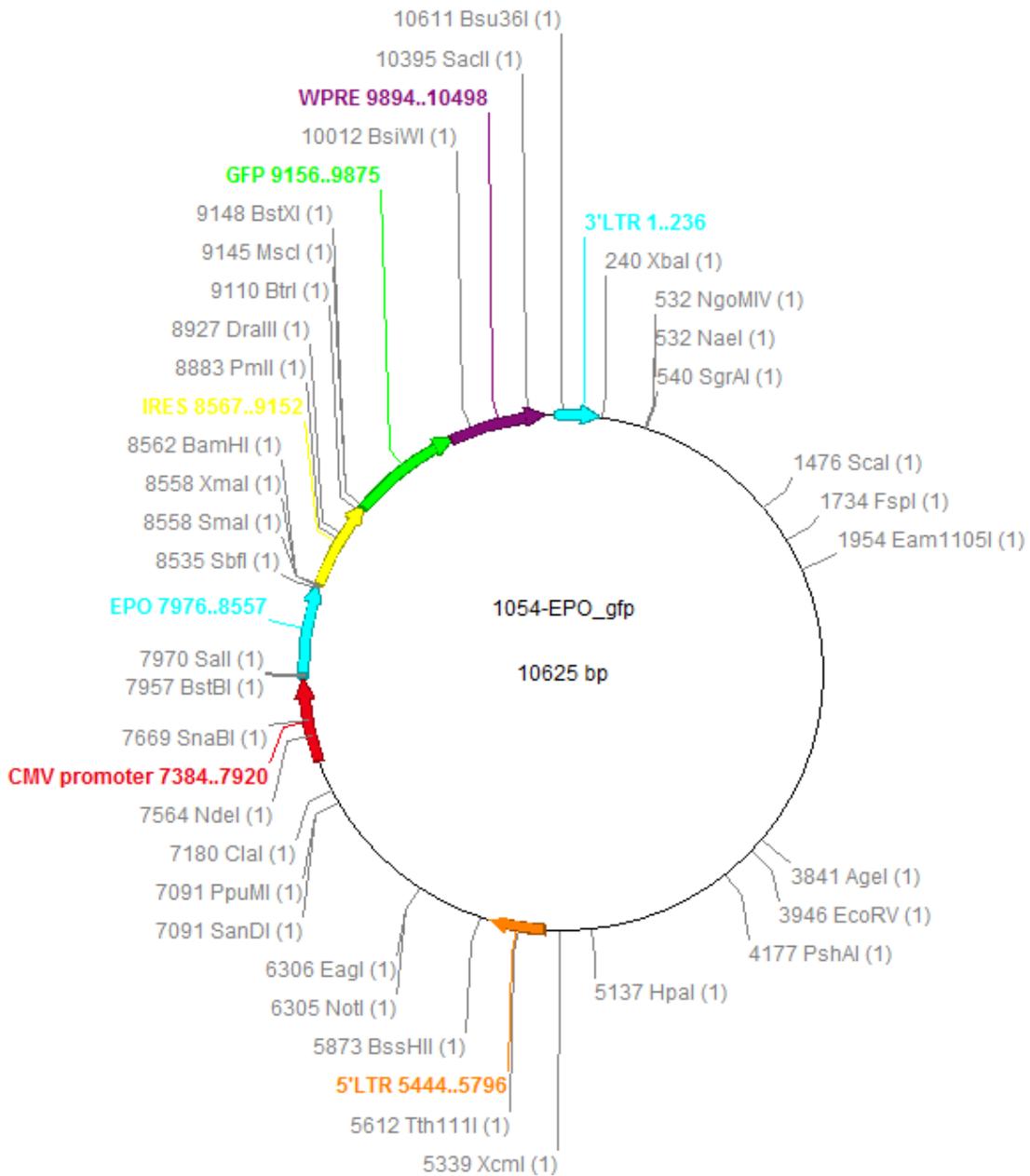
Taxa específica de produção de amônio para SK-HEP-1 durante cultivo, considerando a fase exponencial do crescimento ($q_{\text{amn}} = 0,0056 \text{ mmol} / 10^6 \text{ cel} \cdot \text{h}$)

Tempo (h)	Células Viáveis ($10^6/\text{mL}$)	ICV ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel} / \text{mL}$)	ICV Acumulado ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel} / \text{mL}$)	Amônio (mmol/L)
0	0,500	0,00	0,00	0,000
24	0,610	13,32	13,32	0,770
48	0,898	31,41	44,73	0,895
72	1,900	64,98	109,71	1,170
96	2,110	113,10	222,81	1,910
144	2,085	213,78	436,59	1,620
168	2,130	264,36	700,95	1,970
192	1,865	312,30	1013,25	2,035
216	2,145	360,42	1373,67	2,080
240	2,015	410,34	1784,01	2,320
264	2,125	460,02	2244,03	2,260
288	1,820	507,36	2751,39	2,375
312	1,780	550,56	3301,95	2,545

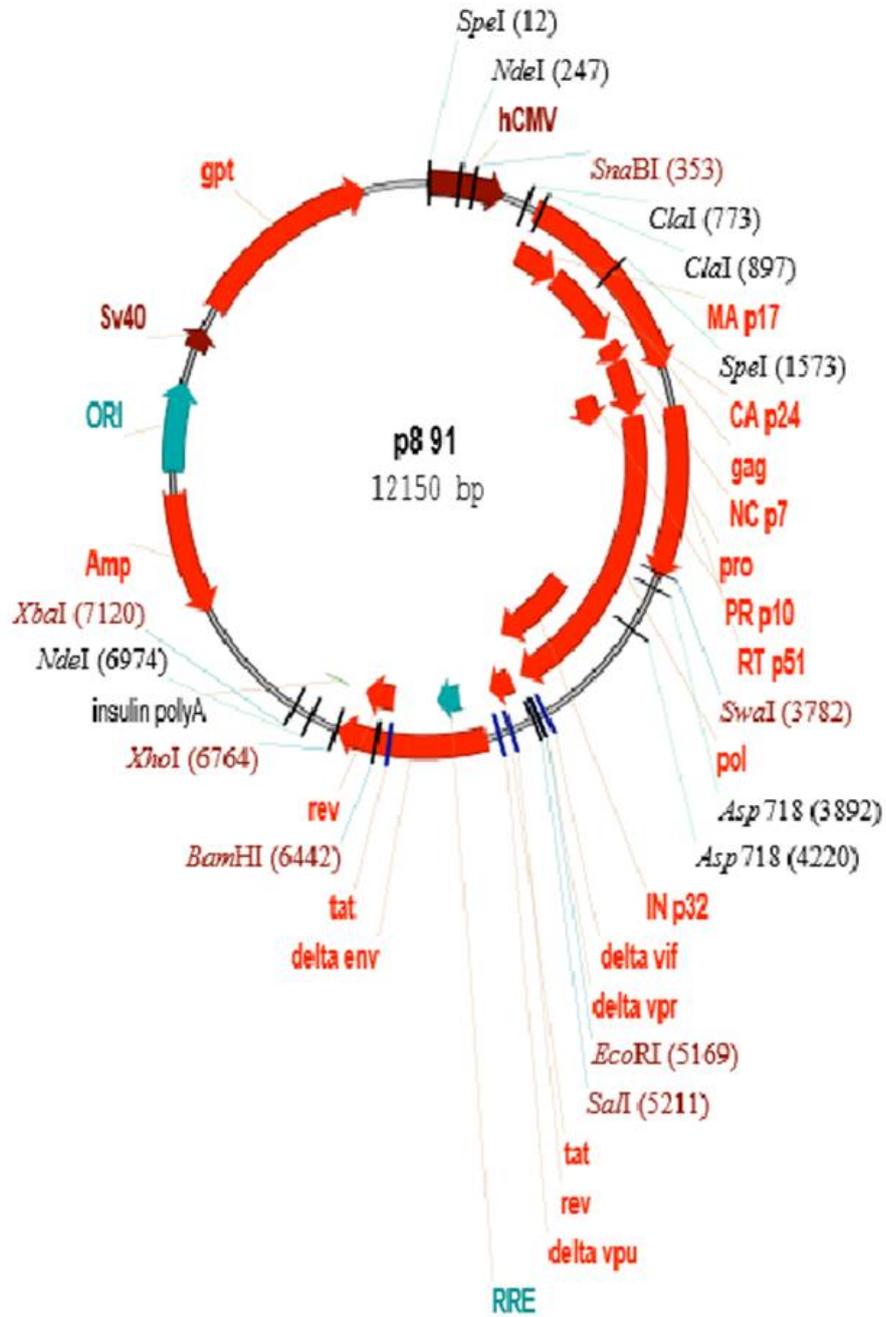


Mapa dos plasmídeos utilizados

1054_GFP:EPO



pCMVΔR 8.91



pMD2.VSV-G

