

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

ANNA CAROLINA PRAMPERO

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-GITR E ANTI-CD25
ATRAVÉS DE CULTIVO DE HIBRIDOMAS E COMPARAÇÃO DO SEU POTENCIAL
COMO AGENTES ANTITUMORAIS**

**SÃO CARLOS-SP
2017**

ANNA CAROLINA PRAMPERO

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-GITR E ANTI-CD25
ATRAVÉS DE CULTIVO DE HIBRIDOMAS E COMPARAÇÃO DO SEU POTENCIAL
COMO AGENTES ANTITUMORAIS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Genética Evolutiva e Biologia Molecular
para obtenção do título de Mestre em Genética
Evolutiva e Biologia Molecular.**

**Orientador:
Professora Dra. Fernanda de Freitas Anibal
Co orientador:
Professor Dr. Claudio Alberto Torres Suazo**

SÃO CARLOS-SP

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Anna Carolina Prampero, realizada em 24/02/2017:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Profa. Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo
USP

Profa. Dra. Miriane da Costa Gileno
UNIARA

"À mulher que, além da vida, me deu a oportunidade de viver; à minha mãe, Célia, dedico este trabalho."

Agradecimentos

A Deus, pela existência repleta de oportunidades de crescimento e aprendizado que me permitiram chegar até onde cheguei e muito mais longe do que jamais imaginei.

À minha amada mãe, por ser meu porto seguro, meu maior exemplo e minha maior incentivadora! Por tudo que vivemos juntas e por todas e por tudo que ainda viveremos eu agradeço!!! À meu querido pai, que a sua forma sempre me apoiou em minhas escolhas sem julgamentos.

Aos melhores irmãos dos mundo, Eduardo (Deda), André (Gué), Luís (Tenando) e Paulo (para Paulo), eu agradeço a dedicação para ajudar nos cuidados de um bebê chorão e por me ensinarem que com dedicação, esforço e perseverança podemos chegar onde quisermos.

À UFSCar e a cidade de São Carlos, minha segunda família e meu segundo lar, onde fui muito bem recebida, aprendi as alegrias e dores de morar sozinha, aprendi o valor das amizades, o peso do conhecimento e onde conheci pessoas incríveis que ao longo desses oito anos muito contribuíram para formação profissional e pessoal.

À minha orientadora Fernanda, agradeço por acreditar em mim mesmo quando muitos duvidavam, pelos seis anos de orientação acadêmica e pessoal, pela paciência com uma aluna muitas vezes insegura, por estimular em mim o interesse na Imunologia e na pesquisa, mas acima de tudo agradeço por ter me presenteado com esse projeto desafiador, apaixonante e que mudou meu presente e meus planos para o futuro.

Ao meu co-orientador Claudio, agradeço por confiar em mim e em meu trabalho, por me ensinar a delicada arte do Cultivo Celular com uma boa dose de Engenharia Química, agradeço a paciência com que me ensinou lidar com gráficos, células e com o tão falado pH, acima de tudo agradeço pelos ensinamentos de vida e de profissão que certamente levarei comigo para sempre.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que gentilmente cedeu as células para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do LATECC que me acolheram e muito mais que técnicas laboratoriais, me ensinaram também a força da união e do companheirismo. À Thaila, pela paciência com que me ensinou a dar os primeiros passos no desenvolvimento desse trabalho. Ao Diogo, por toda disponibilidade em ajudar e contribuir mesmo que as vezes “tanto faz”. À Ju por sua amizade que foi além do laboratório e que por vezes secou minhas lágrimas e que ao mesmo tempo me fez sorrir e mandar todo mundo “calar essa boquinha”. À Vivi pela alegria contagiante e por me mostrar que é possível conciliar a saudades da família e a realização um

sonho. À Moni nossa Masterchef pelos conselhos e pelo exemplo de dedicação e otimismo. Ao Eric por me ensinar que devo estar sempre alerta, em especial com as tesouras. Ao Marcelo por me acompanhar durante os experimentos e aturar minhas brincadeiras sem graça. À Rebecs agradeço a amizade e o apoio, em alemão ou em italiano, agradeço a companhia no laboratório de madrugada ou na copa para cantar “*we take the world by storm*”. Me orgulho muito de fazer parte desse time e agradeço porque com a ajuda de vocês eu cheguei muito mais longe.

Aos amigos do LAP, que contribuíram para minha formação como pessoa e profissional e para a conclusão desse trabalho. À Cynthia, Carol e Karina pela fundamental contribuição com os resultados desse trabalho e por fazerem os dias de ELISA PRAMPERO muito mais leves com nossas conversas e risadas. À Débora pelas conversas motivadoras. Ao Paulo pela paciência e gentileza mesmo quando o assunto era mais e mais materiais.

Às minhas amigas do coração Camila Pigão e Camila Candido, pelos oito anos de amizade sincera, apoio incondicional, por acreditarem na minha capacidade desde o princípio e por serem presentes na minha vida, mesmo com a distância.

À minha amiga Flavia Lachaine (*In Memoriam*), por ter acompanhado o início da minha jornada no mestrado, me apoiando e confiando na minha capacidade. A sua luta diária contra o câncer me motivou a continuar, hoje concluo mais essa etapa e você não está aqui, mas continua me motivando todos os dias e me dando a certeza que continuarei buscando contribuir de alguma forma com todos que continuam na luta contra essa doença.

Às minhas amigas Fernanda Scarbio, Luciana Lazzarini e Thaiane Robeldo pelo apoio e carinho, ao longo dos últimos anos.

À secretária do PPGGEv, Ivanildes Menezes, por toda compreensão e apoio. Ao técnico Amadeus (DEQ/UFSCar), pelo empenho em desenvolver minhas análises. Agradeço a todos que direta ou indiretamente também a todos aqueles que me oferecem ao menos uma palavra de carinho!

“Leve na sua memória, para o resto da vida, as coisas boas que surgiram nas dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade e lhe darão confiança diante de qualquer obstáculo”

Chico Xavier

RESUMO

O câncer é uma das doenças mais temidas da atualidade, e atinge cada vez mais pessoas em todo o mundo. A importância de pesquisas sobre novos tratamentos na luta contra o câncer é clara e consensual, uma vez que os que vem sendo utilizados, não são muito eficientes, causam resistência à medicação utilizada o que implica na utilização de doses crescentes que por sua vez podem gerar problemas de toxicidade. Os efeitos colaterais e a instabilidade gerada no organismo do paciente, também são fatores da necessidade de pesquisar novos caminhos para o tratamento do câncer. Uma das alternativas de tratamento que tem despertado interesse é a utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) como imunoterápicos, os quais agem estimulando o próprio sistema imune do paciente neutralizando a ação das células tumorais de forma eficiente e específica. A produção de tais anticorpos pode ser feita mediante o cultivo de células animais híbridas, mais conhecidas como hibridomas, sobre condições estritamente controladas para que possam ser estudados e utilizados em humanos. Por essa razão definiu-se como objetivo desse trabalho a produção anticorpos monoclonais murinos por meio de cultivo de hibridomas com a finalidade de estabelecer uma metodologia eficiente de cultivo dos hibridomas PC-61 ou DTA1 secretores dos mAbs anti-CD25 e antiGITR respectivamente, com qualidade e em quantidades suficientes utilizando meios livres de soro fetal bovino (SFB), para a seguir efetuar estudos em modelo animal de seu potencial como agentes terapêuticos no tratamento de câncer. Os dois hibridomas foram cultivados em pequena escala utilizando meio RPMI-1640 e adição de SFB, para fins comparativos e somente um foi selecionado para a próxima etapa. O teste da metodologia de adaptação sequencial, onde houve a redução gradativa da porcentagem de meio RPMI-1640 com 10% de SFB e o aumento da porcentagem de meio comercial sem SFB, e foi selecionado o meio livre de SFB em que o hibridoma melhor se adaptou. Posteriormente foi realizado o cultivo do hibridoma em escala laboratorial em sistema de frasco agitado biorreator do tipo *Spinner* (500 mL) com o meio livre de SFB selecionado na etapa anterior, sob condições bem controladas de temperatura (37°C), pH (7,2). Com base nas análises dos resultados dos cultivos celulares, metabolismo de aminoácidos e quantificação de mAbs, o meio comercial SFM livre de SFB proporcionou melhor resultados para o cultivo do hibridoma PC-61, permitindo que o cultivo em escala laboratorial atingisse densidades celulares ainda maiores que no meio padrão com adição de SFB. Como consequência desse vasto crescimento celular em quantidades abundantes de mAbs foram conseguidas para iniciar num futuro próximo ensaios em modelos animais.

Palavras chaves: Imunoterapia, Câncer, Anticorpos monoclonais, Hibridomas, Cultivo celular livre de soro fetal bovino.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is one of the most feared diseases, affecting each day more and more people worldwide. The importance of new cancer treatment researches is very clear since the ones that has been used are not very effective and may lead to drug resistance, implying in a constant dose increasing which can lead to toxicity issues. Collateral effects and the instability generated in the patient's organism are also reasons why the necessity of discovering new cancer treatments is imminent. A treatment alternative that has aroused interest is the use of monoclonal antibodies as immunotherapies, since they act by stimulating the patient's immune system neutralizing the tumor cells in a very efficient and specific way. This kind of antibody can be produced by culturing hybrid animal cells, better known as hybridoma, under strictly controlled conditions so they can be studied and used in human beings. For this reason, the major goal of this project was the production of murine monoclonal antibodies using hybridoma cell culture in order to establish an efficient culture methodology for hybridomas PC-61 or DTA1 producers of monoclonal antibodies anti-CD25 and anti-GITR, respectively, with high quality and enough amounts using Fetal Bovine Serum (FBS) free medium to, in the future, carry out animal model studies of their potential as therapeutic agents for cancer treatment. Both hybridomas were cultivated on a small scale with RPMI medium and addition of SFB, for comparative purposes and only one was selected for the second step. The sequential adaptation methodology test, consisted in a gradual percent's reduction of medium with serum at the same time that increase the percentage of commercial medium without serum, and was selected the medium without SFB in which the hybridoma was better adapted. After was carried out on a laboratory scale in a system type spinner flask (500 ml) with the commercial medium selected in the previous step, in controlled conditions of temperature (37 ° C) and pH (7.2). Based on analyzes of cell culture results, amino acid consumption and monoclonal antibodies quantification, SFM commercial medium SFB-free provided better results for culturing the PC-61 hybridoma, allowing the pilot scale culture reached even higher cell densities than in the standard medium with addition of FBS.

Key words: Immunotherapy, Cancer, Monoclonal antibodies, hybridoma, fetal bovine serum free medium.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura típica de um anticorpo.	29
Figura 2: Produção de hibridomas.	32
Figura 3: Produção de anticorpos monoclonais <i>in vitro</i> x <i>in vivo</i>	34
Figura 4: Aprovações de mAbs por áreas terapêuticas.	35
Figura 5: Representação esquemática do bloqueio dos receptores GITR.	37
Figura 6: Imagem de cultivo de hibridoma DTA-1 em pequena escala.	38
Figura 7: Imagem de cultivo de hibridoma PC-61 em pequena escala.	39
Figura 8: Ilustração de sistemas de cultivo estático.	40
Figura 9: Ilustração de biorreator do tipo <i>Spinner</i>	41
Figura 10: Ilustração esquemática do biorreator do tipo <i>Spinner</i>	42
Figura 11: Protocolos de adaptação celular a meios livres de SFB.	45
Figura 12: Procedimento padronizado seguido no Exp1.	51
Figura 13: Procedimento padronizado seguido no Exp2.	52
Figura 14: Procedimento padronizado seguido no Exp3.	53
Figura 15: Resultados obtidos no Exp1 de cultivo dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.	55
Figura 16: Resultados de crescimento celular obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.	56
Figura 17: Resultados de viabilidade celular e pH obtidos nos cultivo dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% SFB.	58
Figura 18: Resultados das análises de aminoácidos obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.	61
Figura 19: Resultados das análises de glicose, lactato e glutamina obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.	62
Figura 20: Resultados da produção de mAbs obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T meio RPMI-1640 com 10% de SFB.	64
Figura 21: Resultados obtidos no Exp2 de cultivo do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.	67
Figura 22: Resultados de crescimento celular obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.	68
Figura 23: Resultados de viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.	71

Figura 24: Resultados das análises de aminoácidos obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.	75
Figura 25: Resultados das análises de glicose, lactato e glutamina obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livre de SFB.	76
Figura 26: Resultados da produção de mAb obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.	78
Figura 27: Resultados obtidos no Exp3 de cultivo do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo <i>Spinner</i> em meio RPMI-1640 com 10%.	81
Figura 28: Resultados de crescimento celular obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo <i>Spinner</i> em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.	82
Figura 29: Resultados de viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo <i>Spinner</i> em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.	84
Figura 30: Resultados das análises de aminoácidos obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo <i>Spinner</i> em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.	86
Figura 31: Resultados das análises de glicose, lactato e glutamina obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo <i>Spinner</i> em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.	87
Figura 32: Resultados da produção de mAb nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo <i>Spinner</i> em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.	88
Figura 33: Análise estatística da produção de mAb anti-CD25 nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo <i>Spinner</i> em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária.	23
Tabela 2: Características de moléculas ligantes de antígeno.	28
Tabela 3: Características das diferentes classes de imunoglobulinas, formas de secreção e funções.	30
Tabela 4: Anticorpos monoclonais aprovados em 2016 para tratamentos imunoterápicos.	36
Tabela 5: Velocidades específicas de crescimento (μ) e células viáveis totais obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.	57
Tabela 6: Viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.	59
Tabela 7: Composição do meio de cultivo básico RPMI-1640 com 10% de SFB.	60
Tabela 8: Análises dos aminoácidos obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.	63
Tabela 9: Produção de mAbs obtidos nos cultivos dos hibridoma DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio padrão RPMI-1640 com 10% de SFB.	64
Tabela 10: Velocidades específicas de crescimento (μ) e células viáveis totais obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres SFB.	69
Tabela 11: Viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.	72
Tabela 12: Análise da composição dos meios livres de SFB utilizados na adaptação do hibridoma PC-61.	73
Tabela 13: Produção de mAb nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.	79
Tabela 14: Comparação dos resultados obtidos com dados disponíveis na literatura.	83
Tabela 15: Viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo <i>Spinner</i> em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.	85
Tabela 16: Produção de mAb anti-CD25 obtidos nos cultivos de hibridomas PC-61 em biorreator do tipo <i>Spinner</i> em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.	89

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

Anti- GITR	<i>Anti Receptor de Fator de Necrose Tumoral.</i>
Anti-CD25	<i>Anti CD25.</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin.</i>
Células viáveis	Células viáveis na contagem com tripan em hemancitometro.
Células totais	Número de células totaisno cultivo.
CH	Região constante da cadeia pesada.
CL	Região constante da cadeia leve.
D	Densidade celular.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DTA-1	Hibridoma que produz o anti-GITR.
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.</i>
FAB	Fragmento de ligação do antígeno.
Fc	Fragmento cristalizável.
FDA	<i>Food and Drug Administration.</i>
G	Força centrífuga relativa (RCF) ou Força G.
GITR	<i>Tumour-Necrosis-Factor-Receptor-Related Protein.</i>
h	Horas.
HAT	Meio de cultura seletivo, hipoxantina, aminopterina e timidina.
HEPES	<i>Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)-piperazin-1-il]-etanossulfónico</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography.</i>
IGA	Imunoglobulina A.
IgD	Imunoglobulina D.
IgE	Imunoglobulina E.
IgG	Imunoglobulina G.
IgM	Imunoglobulina M.
IL2	Interleucina- 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer.
L	Litros.
LLC	<i>Leucemia linfocítica crônica.</i>
M	Molar.
mM	Milimolar.

mAb	Anticorpo Monoclonal.
mL	Militros
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade.
Nd	Número de células mortas.
NK	<i>Natural Killer</i>
Nv	Número de células vivas.
PBS	Tampão de Fosfato Salina.
PC-61	Hibridoma que produz o <i>Anti-CD25</i> .
PEG	Polietilenoglicol.
RPM	Rotações por minuto.
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium.
S	Fator de diluição X Volume da câmara.
SFB	Soro fetal Bovino.
TCR	Receptor de célula T
TBS	<i>Tryptic soy broth</i> .
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> .
Treg	Células T regulatório.
VH	Região variável da cadeia Pesada.
VL	Região variável da cadeia Leve.
WHO	World Health Organization.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1- Câncer:	21
3.2 – Imunoterapia:	24
3.2.1 – Tipos mais comuns de imunoterapias contra o câncer:	25
3.3 – Sistema imunológico:	27
3.3.1 – Anticorpos:	28
3.4 – Anticorpos monoclonais e hibridomas:	30
3.4.1 – Produção de hibridomas:	31
3.4.2 – Produção de anticorpos monoclonais:	33
3.5 – Aplicação terapêutica dos anticorpos monoclonais:	34
3.6 – Anticorpo Anti-GITR:	36
3.7 – Anticorpo Anti-CD25:	38
3.8 – Cultivo celular:	39
3.8.1 - Sistema de cultivo celular estático em pequena escala:	40
3.8.2 – Sistema de cultivo celular agitado em escala piloto:	40
3.8.3 – Sistema de cultivo agitado do tipo <i>Spinner</i>:	41
3.8.1 – Meios de cultivo:	43
3.8.2 – Soro fetal bovino:	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 - Meios de cultivo:	46
4.2 - Preservação dos hibridomas:	47
4.4.1 - Cultivo estático em frasco T	48
4.4.2 - Cultivo em sistema agitado tipo <i>Spinner</i>	48
4.5 – Amostragem:	48
4.5.1 - Amostragem do cultivo em frasco T	48
4.5.2- Amostragem do cultivo em biorreator do tipo <i>Spinner</i>	48
4.6 - Métodos analíticos:	49
4.6.1 - Densidade celular e viabilidade e cálculos	49

4.6.2	- Quantificação de aminoácidos em cultivo.....	50
4.6.3	- Quantificação de glicose e lactato.....	50
4.6.4	- Quantificação de anticorpos monoclonais por ELISA.....	50
4.7	- Planejamento dos experimentos desta pesquisa:.....	51
4.7.1	- Experimento 1 (Exp1) em frascos T – estudo comparativo dos hibridomas DTA-1 e PC-61:.....	51
4.7.2	- Experimento 2 (Exp2) em frasco T – definição de procedimento para adaptação a meio livre de SFB do hibridoma PC-61:.....	52
4.7.3	- Experimento 3 (Exp3) em biorreator do tipo <i>Spinner</i> – avaliação da capacidade de produção de mAb em meio comercial livre de SFB daptados a meio comercial livre de SFB do hibridoma PC-61:.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Resultados do Exp 1:	54
5.1.1	Cultivo celular:	56
5.1.2	Metabolismo:	59
5.2	Resultados do Exp 2:	65
5.2.1	Cultivo celular:	68
5.2.2	Metabolismo:	72
5.3	Cultivo em escala piloto do hibridoma PC-61 adaptado em meio livre de SFB - Experimento 3:	79
5.3.1	Cultivo celular:	81
5.3.2	Metabolismo:	85
6	CONCLUSÕES	91
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	92
8	REFÊRENCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

A palavra câncer tem origem no grego *Karkínos*, que significa caranguejo e hoje é utilizada de forma geral para nomear um conjunto com mais de 100 doenças relacionadas ao crescimento celular descoordenado (ALISON, 2001; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008), que pode afetar qualquer tecido do organismo e tem caráter heterogêneo, ou seja, diferentes manifestações clínicas e morfológicas e assim sendo requer diferentes respostas terapêuticas (WHO, 2014). O câncer pode ser caracterizado pelo crescimento celular desenfreado e a propagação de células anormais (neoplasias), que podem levar à morte do indivíduo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008; BRASIL, 2011). Em um organismo normal as células crescem, originam novas células e morrem, o que não ocorre com as chamadas células cancerígenas, que ao invés disso, prosseguem crescendo e originando novas células anormais em um processo rápido e muitas vezes agressivo, degenerativo e incontrolável (ALISON, 2001; WHO, 2014).

As causas associadas ao câncer são inúmeras e podem estar relacionadas a fatores externos e também a fatores internos. Tais fatores podem atuar isoladamente ou de maneira combinada (ALISON, 2001; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008; UMAR *et al.*, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS), divulgou que em 2012, 14 milhões de pessoas no mundo foram diagnosticadas com câncer e 8 milhões de mortes relacionadas ao câncer foram registradas (WHO, 2014). As estatísticas publicadas pelo Ministério da Saúde do Brasil em parceria com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) afirmam que cerca de 576 mil novos casos de câncer foram diagnosticados somente no Brasil em 2014 e que os tipos com maior incidência foram o câncer de pele, próstata e mama (BRASIL, 2015). Dados do Global Cancer Facts & Figures afirmam que, no mundo uma em cada oito mortes registradas é devido ao câncer e alertam que o número de mortes supera os causados pela AIDS, tuberculose e malária combinadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Os tratamentos convencionais para cura do câncer são a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia. O tratamento cirúrgico consiste na retirada de tumores sólidos por meio de cirurgia, porém esse tratamento pode falhar, uma vez que, células tumorais afastadas da região do tumor removido podem permanecer após o procedimento, levando ao desenvolvimento de metástases (MATHEW; VERMA, 2009). A quimioterapia consiste em uma forma sistêmica de tratar o paciente com quimioterápicos, que podem ser aplicados visando a redução de tumores, melhorando o prognóstico, após o procedimento cirúrgico como medida profilática, ou ainda como principal tratamento, visando a eliminação de tumores malignos e podendo ou não ser associada à cirurgia e radioterapia (GOLDENBER, 2007; BRASIL, 2011;

CARVALHO, 2013). A radioterapia é uma outra opção dentre as mais convencionais e utiliza a ação de drogas anticâncer (ALISON, 2001), combinadas com uso de radiação ionizante. Porém, tais, procedimentos geram efeitos danosos as células cancerígenas, bem como para as células saudáveis, pois atuam de forma indiscriminada sobre as células do organismo (MATHEW; VERMA, 2009).

Em função desse ataque indiscriminado é comum que, pacientes submetidos a tais tratamentos sofram com efeitos adversos como queda de cabelos, indisposição, mal estar, problemas no sistema digestório, além de efeitos potencialmente fatais que debilitam e limitam o tratamento, como por exemplo quadros de anemia e susceptibilidade a infecções (ALISON, 2001). Visando o melhoramento do tratamento, novas linhas de pesquisas propõem um conceito diferenciado de terapia contra câncer, a imunoterapia (GOLDENBER, 2007; MATHEW; VERMA, 2009).

O sistema imunológico é um dos principais sistemas de controle e vigilância do desenvolvimento de neoplasias e do câncer, sendo fundamental para a homeostase do organismo. Entretanto, a diversidade de mecanismos de escape que são conhecidas durante o desenvolvimento do câncer dificultam a ação do sistema imune (SAKAGUCHI, 2004; WOOD, 2013). A imunoterapia consiste em utilizar o próprio sistema imune contra a doença que o acomete, ativando as células do próprio sistema a desencadearem respostas imunes contra as células cancerígenas especificamente, a imunoterapia torna-se uma terapia direcionada e não invasiva ao paciente (MURILLO *et al.*, 2003; MELERO *et al.*, 2007).

O sistema imune é controlado pelo balanço entre receptores estimulantes e inibidores, sendo que dentre as formas de controle desses receptores de sinais, podem-se mencionar os anticorpos como a principal classe regulatória do sistema imune (ABBAS; LICHTMAN, 2005; WOOD, 2013). Dentre os anticorpos, destacam-se os anticorpos monoclonais (mAbs) um tipo de anticorpo altamente específico ao seu antígeno, sendo por isso bastante utilizado na imunoterapia contra câncer (SCOTT; WOLCHOK; OLD, 2012; CARVALHO, 2013).

Uma das formas mais conhecidas atualmente de produção de mAbs é a utilização do cultivo de células híbridas ou hibridomas a partir da fusão de células de linfócitos B com células de mielomas, sendo responsáveis pela secreção dos anticorpos monoclonais altamente, específicos e estáveis (KOHLENER; MILSTEIN, 1975). O cultivo de hibridomas em larga escala com auxílio de biorreatores é uma opção efetiva para satisfazer a necessidade de obter mAbs em boa qualidade e quantidade (WADE, 1980; GODING, 1980; PETERSON, 1998). Dentre os alvos específicos dos mAbs temos a porção alfa do receptor de interleucina-2, também

conhecido como CD25 (RECH; VONDERHEIDE, 2009) e o receptor de necrose tumoral induzido por glicocorticoides ou GITR (COE *et al.*, 2010). Cada um dos alvos mencionados tem seus mAbs específicos, sendo nesse caso, o anti-CD25 e o anti-GITR, que são respectivamente sintetizados e secretados pelos hibridomas PC61 e DTA-1 (ONIZUKA *et al.*, 1999; KO *et al.*, 2005) utilizados nesse estudo.

A produção dos mAbs segue duas vertentes básicas, produção *in vivo* e *in vitro*. A produção *in vivo* consiste basicamente em gerar ascite em camundongos que apresentam sistema imune deficientes, injetando os hibridomas secretores dos anticorpos, por via interperitoneal. Dessa forma, formam-se tumores e o líquido (ascite) produzido e secretado por esses tumores contém o mAb (FALKENBERG *et al.*, 1995). Embora a produção *in vivo* seja de fácil execução, baixo custo, mesmo produzido em pequena escala, apresenta desvantagens como a necessidade de aprovação de comitê de ética, eutanásia dos animais, dificultando a industrialização do processo produtivo (BRODEUR; TSANG, 1986).

A produção *in vitro* é um método que soluciona os problemas encontrados na produção *in vivo* (MARX *et al.*, 1997). Os hibridomas secretores dos mAbs são cultivados em meios de cultura industrializado, em condições laboratoriais rigorosamente controladas para o crescimento e produção dos mAbs (FALKENBERG *et al.*, 1995) e o uso de biorreatores nesse processo apresentam cada vez mais resultados favoráveis na produção de tais mAbs em larga escala laboratorial e industrial, possibilitando a produção de lotes uniformes e em quantidades suficientes para atender demandas de diversos tamanhos (MARX *et al.*, 1997). Entretanto, o enriquecimento dos meios de cultura com fontes proteicas, prática bastante comum em cultivos celulares, tem sido cada vez mais fiscalizado pelos órgãos reguladores do mundo inteiro (GSTRAUNTHALER *et al.*, 2013).

O soro fetal bovino (SFB) é um suplemento largamente usado no cultivo de células animais por fornecer fatores de crescimentos, inibidores de proteases, proteínas hidrolisadas entre inúmeras outras moléculas que estimulam o cultivo. Porém aumentam a indefinição do meio de cultura e outras desvantagens como, variação entre os diferentes lotes, alta concentração proteica, elevado risco de contaminação para o ser humano e custo do processo, características que tornam ainda mais relevante a busca por meios de cultura definidos, livre de SFB em sua composição, tais como os utilizados no presente trabalho (ZANATTA, 2009; GSTRAUNTHALER *et al.*, 2013; BIAGGIO, 2014).

Entendendo, a importância do desenvolvimento de linhas de pesquisas que forneçam bases para imunoterapias eficientes no combate ao câncer e reconhecendo a produção de mAbs em larga escala laboratorial como uma importante vertente dentre as pesquisas atuais,

estudos visando a utilização de meios livres de SFB tornam-se muito importantes para viabilizar a produção e estudo de mAbs e seu possível potencial tumoral, para fins terapêuticos. Dessa forma, este trabalho contribuirá para a avaliação de meios de cultivo comerciais livres de SFB no cultivo em escala laboratorial de hibridomas DTA1 e PC-61 e poderá contribuir para o direcionamento do processo de obtenção de mAbs em quantidades suficientes e qualidade apropriada para fins terapêuticos.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estabelecer uma metodologia eficiente de cultivo dos hibridomas DAT-1 ou PC-61 para a produção em escala laboratorial, usando cultivo livre de SFB em biorreator do tipo *Spinner*, para obtenção dos anticorpos monoclonais anti-GITR e anti-CD25, em qualidade apropriadas e suficientes para a utilização em estudos *in vitro* e *in vivo* como potenciais agentes terapêuticos no tratamento de câncer.

Objetivos específicos:

- 1- Seleção de um dos hibridomas DTA-1 ou PC-61 que apresente melhor produção em pequena escala laboratorial e em condições ideais de cultivo;
- 2- Adaptação do hibridoma selecionado aos meios de cultura comerciais FSM hibridoma, CD hibridoma e EXCELL 620, livres de SFB;
- 3- Seleção do meio de cultura a que o hibridoma melhor se adaptou;
- 4- Cultivo em larga escala laboratorial, em biorreator do tipo *Spinner*, do hibridoma com o meio comercial livre de SFB selecionado;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Câncer:

Registros ao longo da história evidenciam que o câncer tem acompanhado a humanidade desde os primórdios dos tempos até a atualidade. A descrição mais antiga sobre a ocorrência de câncer em humanos data do ano 3000 A.C., além de evidências fossilizadas de tumores ósseos em múmias humanas do Egito antigo (HAJDU, 2011). O nome “câncer” tem origem no grego *karkínos*, que significa caranguejo, e foi utilizado pela primeira vez por Hipócrates (460-375 A.C.) para denominação de doenças onde haviam a formação descontrolada de aglomerados celulares (BRASIL, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Seguindo os conceitos de Hipócrates, o médico romano Aulus Celsus (25 A.C. – 50 D.C.) já descrevia alguns conhecimentos sobre a proliferação e migração desordenada de células para outros órgãos como causa de morte entre seus pacientes (HAJDU, 2011).

A divisão celular é um dos processos de fundamental importância para a homeostasia do organismo, a maioria dos tipos celulares do corpo humano são capazes de se multiplicar por esse processo natural, contínuo e ordenado. Diferente das células normais, as células cancerígenas crescem e se proliferam de forma desordenada, dando origem a novas células anormais e formando possíveis tumores (BRASIL, 2011).

Por se tratar de um grupo tão amplo de doenças suas causas podem ser as mais variadas possíveis, e basicamente existem dois grandes grupos de fatores de riscos mais comuns ao desenvolvimento do câncer. Fatores de riscos externos, responsáveis por aproximadamente 80% dos casos de câncer e que podem ser encontrados no meio ambiente em geral, meio ocupacional, meio de consumo e meio social. São exemplos desses fatores: o tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, hábitos sexuais, medicamentos, radiação, entre outros (MALCON,2001; BRASIL, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Fatores de riscos internos, são responsáveis por cerca de 20% dos casos de câncer e podem ser representados pelos casos de mutações genéticas, hereditariedade, alterações hormonais e condições imunes. É importante que fique claro que embora os fatores de riscos para o desenvolvimento de doenças cancerígenas sejam divididos didaticamente em dois grupos, é possível e muito comum que esses fatores atuem associados para a ocorrência do

câncer (MATHEW; VERMA, 2009; BRASIL, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Segundo a edição de 2016 do relatório anual da American Cancer Society, aproximadamente 14,5 milhões de americanos viviam com o diagnóstico de câncer em janeiro de 2014. Nesta mesma edição do relatório a associação americana estima que cerca de 595,690 mortes foram registradas em decorrência de câncer no ano de 2016 e estima que 1,685.210 novos casos serão diagnosticados somente nos Estados Unidos. O câncer é a segunda maior causa de mortes entre norte-americanos, 1 em cada 4 mortes registradas no país são em função do câncer.

O relatório anual com estimativas de incidência de câncer no Brasil, formulado e disponibilizado pelo Ministério da Saúde em parceria com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estima que 600 mil novos casos de câncer sejam diagnosticados no Brasil no período de 2016 a 2017. Ainda segundo o anual do INCA os tipos de câncer que mais devem acometer os homens brasileiros devem ser: (28,6%) próstata, (8,1%) pulmão e (7,8%) intestino, já entre as mulheres brasileiras devem ser: (28,1%) mama, (8,6%) intestino e (7,9%) útero, como é possível observar na Tabela 1 abaixo.

A elevada incidência de novos casos de câncer em todo o mundo bem como as, ainda elevadas, taxas de mortalidade por decorrência do câncer tornam fundamental o estudo e desenvolvimento de novos tratamentos. Os primeiros tratamentos eficientes contra o câncer começaram a surgir no início do século XX e junto com o desenvolvimento desses tratamentos cresciam os conhecimentos sobre a extensão do mal causado pela doença e a importância do diagnóstico precoce bem como a prevenção (BRASIL, 2007; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

Fonte: BRASIL. Ministério da saúde e INCA (2015, p.56).

Os tratamentos convencionais mais amplamente utilizados para combater o câncer atualmente são: tratamento cirúrgico de tumores sólidos, tratamento químico e tratamento radioativo. Não raramente esses tratamentos podem ser combinados para aumentar as chances de sucesso na eliminação do câncer (MATHEW; VERMA, 2009; BRASIL, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

O tratamento cirúrgico consiste na remoção de tumores sólidos localizados em regiões específicas e pode ser realizado de formas diferentes: remoção completa do tumor e de uma margem de segurança ou remoção parcial do tumor, quando a remoção completa pode comprometer algum órgão vital, esse tipo de procedimento em geral é complementado por outros tratamentos. Embora amplamente utilizado, o tratamento cirúrgico não pode ser realizado em casos de metástases ou de leucemia (MATHEW; VERMA, 2009; NACIONAL CANCER INSTITUTE, 2015).

O tratamento químico, também conhecido como quimioterapia, tem como base a administração de substâncias químicas (antineoplásicos) de forma sistêmica com o objetivo de controlar a divisão celular (BRASIL, 2007). Os bons resultados apresentados pela

quimioterapia fez com que esse tratamento se tornasse um dos mais utilizados contra o câncer. Entretanto, mesmo que muitos pacientes respondam inicialmente bem ao tratamento químico, quando esse deve ser administrado por longos períodos, problemas como a quimioresistência e toxicidade periférica podem comprometer a saúde do paciente. Outro problema é a não especificidade das drogas utilizadas, que acabam atacando indiscriminadamente células saudáveis e células tumorais, causando efeitos adversos, muitas vezes, severos aos pacientes (GOLDENBERG, 2007; BRASIL, 2007; MATHEW; VERMA, 2009; BRASIL, 2011).

A radioterapia, outro tratamento convencional bastante utilizado, consiste em aplicação sistêmica de raios X e raios GAMA de forma localizada em regiões específicas previamente demarcadas, visando destruir o DNA das células tumorais. Assim como a quimioterapia, é um tratamento eficaz porém inespecífico, podendo gerar efeitos adversos que fragilizam ainda mais o organismo do paciente. Em função desses graves efeitos atualmente a radioterapia tem sido cada vez menos aplicada em adolescentes e crianças (GOLDENBERG, 2007; MATHEW; VERMA, 2009; NACIONAL CANCER INSTITUTE, 2010; BRASIL, 2011).

Os tratamentos convencionais mencionados, apresentam bons resultados e de forma geral são amplamente utilizados em todo o mundo, ainda que com seus efeitos adversos, porém nem sempre são suficientes na erradicação das células tumorais em estágios avançados. Com o objetivo de superar as dificuldades apresentadas por esses métodos, estudos com enfoque na utilização do sistema imune no combate as células tumorais, são realizados na tentativa de desenvolver novos tratamentos mais específicos e com efeitos adversos atenuados (QIAO, 2016).

3.2 – Imunoterapia:

No final do século XIX os cientistas já acreditavam na capacidade do sistema imune em combater tumores, como postulado por Ehrlich em 1909 (SANTOS *et al.*, 2006). Entre os anos 50 e 60 Thomas e Burnett formularam uma teoria que ficou conhecida como a “*Teoria da vigilância imune*” e que resumidamente aborda a capacidade do sistema imune em identificar a subseqüentemente atacar células cancerígenas. Desde então inúmeros experimentos foram desenvolvidos com o objetivo de estimular o sistema imune contra tumores e células cancerígenas, visando tratamentos eficientes, mais específicos e menos invasivos aos pacientes (GAVIN *et al.*, 2004; ORTÍN, 2005; SITC, 2015).

Atualmente a teoria de Thomas e Burnett foi estudada, confirmada e renomeada pelo Dr. Robert Schreiber, professor da Washington University School of Medicine. A agora denominada “*Cancer Immunoediting theory*” baseia-se em três fases: (1) Primeira fase, chamada de eliminação refere-se ao momento em que surgem as primeiras células tumorais e onde o sistema imune é capaz de identificá-las e eliminá-las. (2) Quando nem todas as células foram devidamente destruídas na fase de eliminação então inicia-se a fase dois, ou fase de equilíbrio onde as células tumorais remanescentes entram em equilíbrio com o sistema imune do paciente, nesse momento o sistema imune mantém o crescimento das células tumorais sob controle porém já não mais consegue destruí-las. (3) Quando esse equilíbrio é rompido inicia-se a terceira fase, chamada de escape onde as células tumorais que até então estavam em equilíbrio passam a “enganar” o sistema imune e iniciam o processo de reprodução desordenado que é característico da doença, nesse momento o sistema imune do paciente entra em imunossupressão e os sintomas típicos do câncer começam a se manifestar (GAVIN *et al.*, 2004; SITC, 2015).

A melhor compreensão sobre a biologia das células tumorais e o funcionamento do sistema imune humano, possibilitou o desenvolvimento de agentes biológicos que mimetizam sinais naturais que o corpo usa para controlar o crescimento celular, alterando o crescimento das células tumorais de forma direta ou indireta. A ação desses agentes influencia as respostas imunes contra as células tumorais, formando-se assim o conceito de imunoterapia aplicada ao tratamento contra o câncer (ORTÍN, 2005; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

O sistema imunológico é regulado por um balanço complexo de sinais emitidos por estimulação ou inibição de receptores celulares, balanço esse que pode ser deslocado pela ação de agentes imunoterápicos, direcionando as células de defesa do organismo para o combate específico de tumores. Ao longo dos anos 90 variadas terapias contra câncer que utilizavam como base o próprio sistema imune do paciente foram desenvolvidas e aprimoradas (MELERO *et al.*, 2007; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

3.2.1 – Tipos mais comuns de imunoterapias contra o câncer:

Vacinas: tem como objetivo principal direcionar as células do sistema imune do paciente em direção ao tumor, visando sua eliminação. São produzidas a partir de uma mistura de inúmeros antígenos, mas também podem ser produzidas a partir do próprio tumor do paciente (SJOERD *et al.*, 2016). Basicamente as vacinas imunoterápicas são sub divididas em duas categorias, as vacinas profiláticas que atuam prevenindo a ação de vírus causadores de câncer,

como por exemplo a vacina do HPV (SITC, 2015). Na outra categoria encontram-se as vacinas terapêuticas, que agem de forma a ativar ou reativar células T tumor-específicas no sistema imune do paciente com o objetivo de desencadear uma cascata de respostas imune-específica contra o tumor (LEE; MARGOLIN, 2011; SITC, 2015; SJOERD *et al.*, 2016).

Estimulação não específica com BCG: foi uma das primeiras imunoterapias aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) e tem sido usada desde os anos 70 para o tratamento contra câncer de bexiga. Baseia-se na utilização da bactéria BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) atenuada e modificada, utilizada no controle da tuberculose. A imunomodulação causada pela administração da BCG gera uma inflamação na bexiga do paciente estimulando as respostas imunes nas células desse órgão e conseguem dessa forma impedir a proliferação do câncer ali presente. Dados do Cancer Research Institute indicam 70% de sucesso na remissão do câncer em pacientes que utilizaram a BCG, entretanto alguns efeitos adversos semelhantes aos causados pela tuberculose podem ser observados, sendo necessário que o paciente realize o tratamento da doença bacteriana após o término da imunoterapia (PETERSON, 1998; SITC, 2015; CANCER RESEARCH INSTITUTE, 2016).

Terapia com células T (Adoptive T cell transfer): é uma imunoterapia focada em potencializar a ação das próprias células T do paciente contra o câncer, é uma técnica bastante promissora que ainda está sendo aprimorada. A primeira forma consiste no isolando células T infiltradas no tumor do próprio paciente e em seguida cultivo e expansão *in vitro* com adição de antineoplásico e posteriormente administração no paciente. A segunda maneira consiste em isolar as células T do próprio paciente e modifica-las geneticamente para expressarem um receptor de membrana específico para o antígeno encontrado nas células tumorais, em seguida cultivar e expandir essas células e administra-las no paciente novamente. Embora apresente bons resultados a terapia de células T ainda está em desenvolvimento e fase de testes clínicos (ROSENBERG *et al.*, 2008; LESTERHUIS *et al.*, 2011; SITC, 2015).

Anticorpo monoclonal (mAb): sendo a produção de anticorpos uma resposta natural do sistema imune para combater substâncias estranhas que penetram no organismo, temos no mAb uma versão laboratorial capaz de marcar porções altamente específicas das células cancerígenas, sendo bastante eficiente como imunoterapia contra câncer (SITC, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). A administração desses anticorpos pode ocorrer sem complementação de outros medicamentos, elevando a capacidade do sistema imune do próprio paciente ou conjugada, que como próprio nome sugere, ocorre uma complementação do uso do anticorpo monoclonal com outras drogas tanto químicas quanto radioativas (ARGYRIOU;

KALOFONOS, 2009; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Essa terapia pode ser administrada com o mAbs não conjugados, quando um único mAbs é utilizado no tratamento ou de forma conjugada quando mais de um mAbs são associados para o desenvolvimento do tratamento (ORTÍN, 2005).

3.3 – Sistema imunológico:

Composto por um conjunto de células, tecidos, órgãos e moléculas, o sistema imune tem como principal função manter a homeostasia do organismo de forma geral (TEVA; FERNANDEZ; SILVA, 2009). Didaticamente o sistema imune tem suas funções divididas em duas classes. Imunidade inata de ação rápida, estereotipada e limitada a um determinado número de estímulos, pode ser representada por barreiras físicas, químicas e biológicas. Imunidade adaptativa de ação dependente de contato prévio com o antígeno, essa representada pela ativação de células especializadas, apresenta alta especificidade, diversidade de reconhecimento e capacidade de memória (CRUVINEL *et al.*, 2010). Os receptores do sistema imune adaptativo são capazes realizar o reconhecimento de proteínas estranhas que diferem das do organismo por apenas um ou dois aminoácidos, enquanto que os receptores do sistema imune inato somente reconhecem moléculas invasoras que sejam muito diferentes das do próprio organismo (WOOD, 2013).

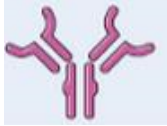


O processo de defesa do organismo é iniciado com a imunidade inata realizando o reconhecimento de focos de infecção, com o auxílio de células do tipo leucócitos que desencadeiam uma resposta imediata e por células da imunidade adaptativa do tipo linfócitos. Para cessar a infecção tipos celulares dos sistemas inato e adaptativo atuam conjuntamente. Um aspecto fundamental durante o processo de defesa pelo sistema imune é a autorregulação do mesmo, uma vez que uma falha nesse quesito pode contribuir para o desenvolvimento de condições auto imune. E por fim a imunidade adaptativa com sua capacidade de formar memória imune, busca maneiras de produzir imunidade de longa duração contra patógenos aos quais já tenha sido exposto (TEVA; FERNANDEZ; SILVA, 2009; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; WOOD, 2013; MURPHY, 2014).

Dentre os principais componentes do sistema imune, apresentam-se as células fagocitárias, células NK (*Natural killers*), mastócitos, basófilos e neutrófilos mediando a imunidade inata. Mediando as imunidade adaptativa podemos elencar os linfócitos T e B e células dendríticas. Além dos tipos celulares já citados, participam ativamente da resposta imune algumas moléculas solúveis como proteínas, citocinas, quimiocinas e anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; MURPHY, 2014).

3.3.1 – Anticorpos:

Os linfócitos são um dos principais tipos celulares do sistema imune adaptativo, produzidos na medula óssea podem concluir sua maturação na mesma e então são denominados linfócitos B ou podem concluir sua maturação no timo sendo denominados linfócitos T. Embora morfologicamente semelhantes possuem funções distintas, os linfócitos T produzem as moléculas do MHC (*Complexo Principal de Histocompatibilidade*) e os receptores de antígenos das células T, enquanto os linfócitos B são os responsáveis por produzirem importantes glicoproteínas capazes de reconhecer moléculas estranhas na superfície de patógenos, os denominados anticorpos. As moléculas originadas tanto pelos linfócitos T quando pelos linfócitos B possuem como principais funções a ligação a antígenos específicos como ilustra a Tabela 2 a seguir (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; WOOD, 2013).

Tabela 2: Características de moléculas ligantes de antígeno.

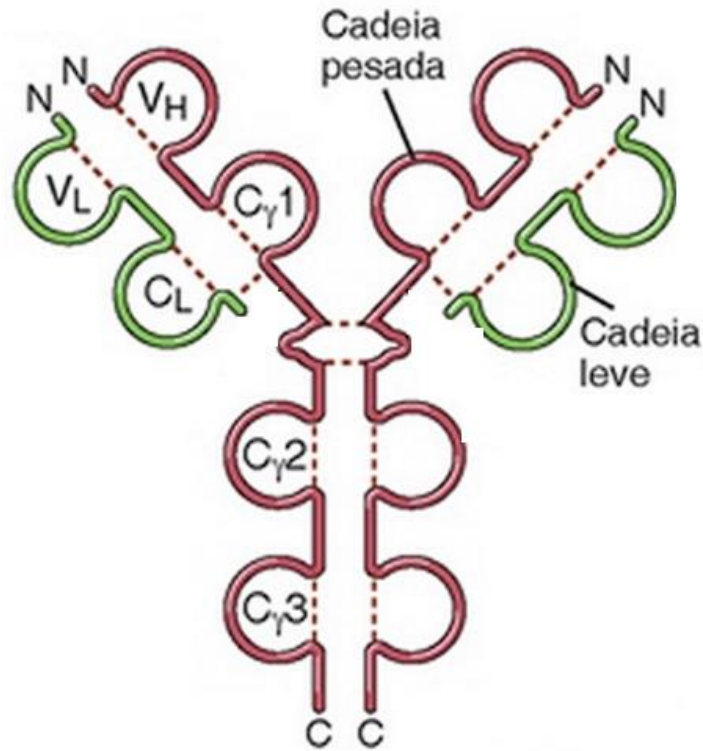
	Imunoglobulinas (IgG)	Receptor de célula T (TCR)	Moléculas de MHC
			
Sítio e ligação com o antígeno	Feito de três CDRs em V_H e três CDRs no domínio V_L	Feito de três CDRs em V_α e três CDRs no domínio V_β	Cavidade ligante de peptídeo formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (classe I) e $\alpha 1$ e $\beta 1$
Natureza do antígeno capaz de se ligar	Macromoléculas (proteínas, lipídeos, polissacarídeos) e pequenas moléculas	Complexos peptídeos-MHC	Peptídeos
Natureza de determinantes no reconhecimento do antígeno	Determinantes lineares e conformacionais de várias macromoléculas	Determinantes lineares de peptídeos, apenas 2 ou 3 resíduos de aminoácidos se ligam à molécula de MHC	Determinantes lineares de peptídeos, apenas alguns resíduos de aminoácidos

Fonte: Adaptado de Abbas; Lichtman. *Imunologia Celular e Molecular*. (2005, p.76).

Anticorpos são glicoproteínas constituídas basicamente por dois fragmentos de cadeia leve, aproximadamente 25 kDa cada e dois fragmentos de cadeias pesadas, aproximadamente 53kDa cada (CASADEVALL; SCHARFF, 1994; ROQUE; LOWE; TAIPA, 2004; WOOD, 2013). Possuem capacidade de detecção, reconhecimento e eliminação de antígenos específicos (MARQUES, 2005; ABBAS, 2012; WOOD 2013). Na estrutura típica dos anticorpos, representado na Figura 1, temos a presença de regiões amino-terminais também conhecidas como domínios variáveis e são essas as regiões destinadas ao reconhecimento dos antígenos e regiões carboxi-terminais ou chamadas domínios constantes com capacidade mediadora de funções biológicas. Como o próprio nome diz, os domínios variáveis das cadeias

leves e pesadas variam sua sequência específica de aminoácidos entre diferentes anticorpos, dando a eles uma maior especificidade no reconhecimento de moléculas estranhas (ABBAS, 2005; WOOD, 2013; MCDONNELL, 2015).

Figura 1: Estrutura típica de um anticorpo.

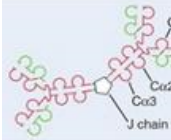
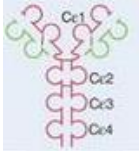
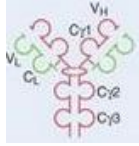
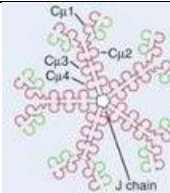


Fonte: Adaptado de Abbas; Lichtman; Pilai. *Imunologia Celular e Molecular*. (2012). Estrutura básica de um anticorpo, com domínios variáveis (V_L e V_H) nas porções N-terminais (N) e domínios constantes (C_L e C_H) tanto das cadeias leves quanto das cadeias pesadas.

Esses anticorpos são denominados de imunoglobulinas (Ig) e são divididas em cinco classes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, de acordo com sua cadeia pesada em α , δ , ϵ , μ e γ , respectivamente (TAMASHIRO; ALARCON; MARIKAWA, 2008; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; WOOD, 2013). Os anticorpos de forma geral neutralizam e opsonizam moléculas e micro-organismos estranhos de diferentes formas e suas funções efetoras variam de acordo com os diferentes isotipos de anticorpos como descritos na Tabela 3 (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; MCDONNELL, 2015). Os anticorpos podem exercer sua função protetora do organismos por diferentes mecanismos de ação, tais como: Neutralização, onde os anticorpos recobre os sítios tóxicos do agente antigênico, neutralizando-o; Opsonização, os anticorpos recobrem o organismo estranho formando um complexo antígeno-anticorpo que possuem receptores que são reconhecidos por células fagocitárias, que fagocitam todo o complexo opsonizado; Citotoxicidade mediada por anticorpos, os anticorpos agem mediando a ligação de células NK

as células invasoras e então inicia-se a destruição citotóxica do organismos estranho com a liberação dos grânulos de perforinas e granzimas das células NK (JANEWAY; TRAVERS, 1997).

Tabela 3: Características das diferentes classes de imunoglobulinas, formas de secreção e funções.

Classe	Concentração (mg/mL)	Meia vida (dias)	Forma secretada		Funções
IgA	3,5	6	IgA (dímero)		Imunidade das mucosas
IgD	Traços	3	Nenhuma		Receptor de antígeno de célula B precoce
IgE	0,05	2	IgE Monômero		Defesa contra parasitas helmintos, hipersensibilidade imediata
IgG	13,5	23	IgG1 Monômero		Opsonização, ativação complementar, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo
IgM	1,5	5	IgM Pentâmero		Receptor de antígeno de célula B precoce, ativação complementar

Fonte: Adaptado de Abbas; Lichtman. *Imunologia Celular e Molecular*. (2008, p.86).

3.4 – Anticorpos monoclonais e hibridomas:

Os primeiros estudos sobre função e estrutura dos anticorpos foram realizados com imunoglobulinas purificadas do sangue de indivíduos imunizados contra vários antígenos, uma metodologia de baixa precisão uma vez que o soro utilizado para os estudos continham uma mistura de imunoglobulinas produzidas a partir de muitos clones de linfócitos B, os chamados anticorpos policlonais (DAVIES; PADLAN, 1990; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012).

Em 1975 o alemão George Köhler e o argentino Cesar Milstein se uniram ao imunologista dinamarquês Niels Jener e juntos desenvolveram uma tecnologia que a princípio possibilitaria a solução do problema de baixa precisão no estudo dos anticorpos e que tempos

depois se tornou uma tecnologia promissora, tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento de doenças, a tecnologia de produção de anticorpos monoclonais a partir do cultivo de hibridomas (PÖRTEN; SCHÄFER, 1996; MARQUES, 2005; PANDEY, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012).

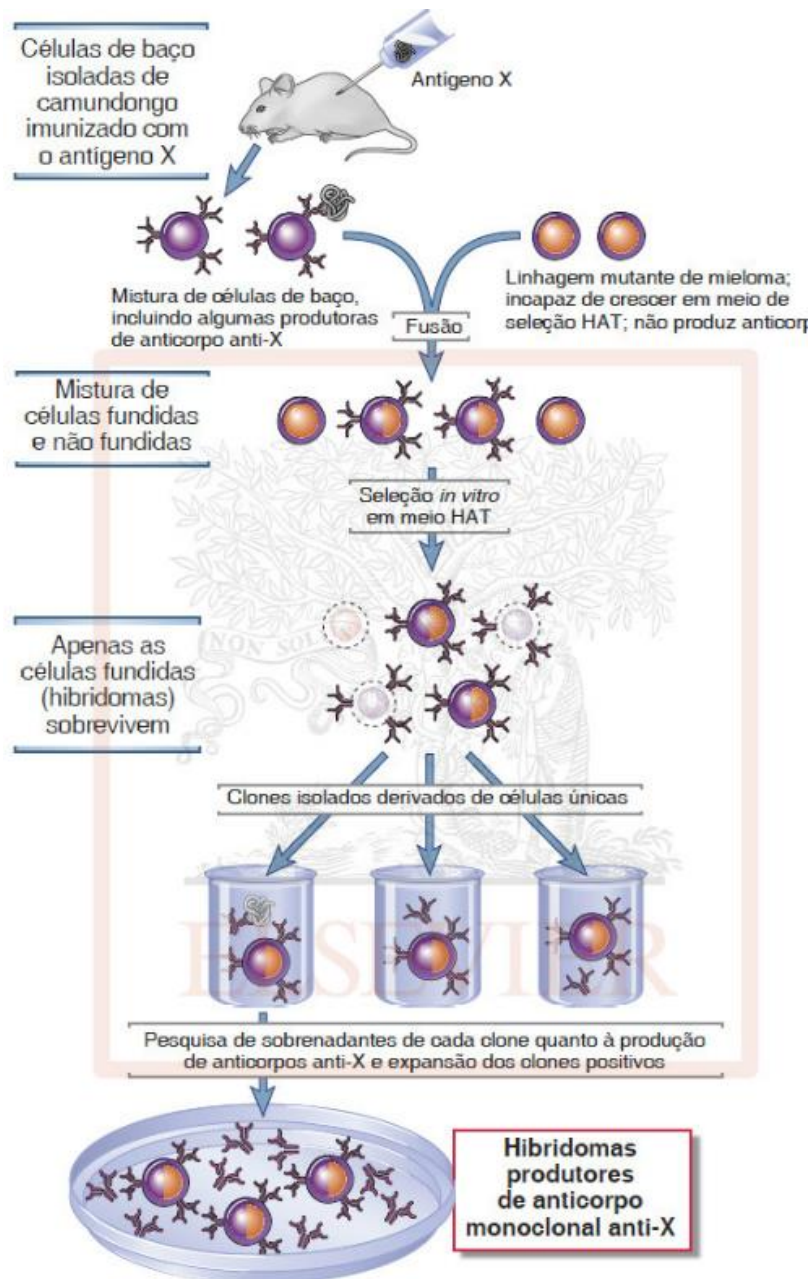
Anticorpos monoclonais são definidos como uma classe de proteínas de elevada especificidade produzidas por clones de células híbridas derivadas da fusão de um único clone de linfócito B e células de mieloma, um câncer de células B, as células B são as únicas capazes de produzir anticorpos quando ativadas (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Essa fusão resulta em uma célula híbrida, chamada hibridoma, que preserva a capacidade produtora de anticorpos dos linfócitos B assim como a capacidade de elevada taxa de multiplicação do mieloma (MARQUES, 2005; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; MOLINARO; CAPITO; AMENDOEIRA, 2009; MCDONNELL, 2015). Os hibridomas foram desenvolvidos com o objetivo de produzirem anticorpos monoclonais em maior escala a partir de um único clone de célula B (PANDEY, 2010).

3.4.1 – Produção de hibridomas:

Feitos exclusivamente em laboratório, os hibridomas são produzidos utilizando PEG (*polietilenoglicol*) para fusionar as células de mieloma com as células B de animais que foram previamente imunizados com o antígeno de interesse, através do qual se deseja produzir os anticorpos. As condições do procedimento devem permitir seletivamente a sobrevivência e o crescimento somente das células híbridas (MOLINARO; CAPITO; AMENDOEIRA, 2009; PANDEY, 2010). Para tal, é utilizado o meio HAT (*hipoxantina, aminopterina e timidina*), onde somente sobrevivem as células híbridas, bloqueando o desenvolvimento das células B e mielomas que não são capazes de sobreviver nesse meio específico e morrem (MARQUES, 2005; PANDEY, 2010; MCDONNELL, 2015). O próximo passo é garantir o isolamento dos clones individuais, usando a diluição limite em um cultivo em placa 96 poços, de forma que cada poço receba uma única célula híbrida. O cultivo dessas células isoladas deve ser monitorado por aproximadamente 2 semanas quando devem atingir aproximadamente 300 células por poço, quando são removidos para criopreservação em nitrogênio líquido e o sobrenadante do cultivo de cada poço é utilizado para teste de quantificação de anticorpos monoclonais produzidos durante o processo como apresentado na Figura 2 (EVEN; SANDUSKY; BARNARD, 2006; SANTOS *et al.*, 2006; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; MCDONNELL, 2015).

Uma vez produzidos, os hibridomas são preservados em meio de congelamento, composto por 90% SFB e 10% DMSO (*Dimetilsulfóxido*), colocados em pequenos frascos e armazenados em nitrogênio líquido, criopreservados estão prontos para serem armazenados até o momento do seu uso para produção de mAbs (LEIJ; POPPEMA, 1983; WINZELER; WANG, 2013). Köhler e Milstein (1975) descreveram duas possíveis formas de cultivar os hibridomas para a produção de anticorpos monoclonais, *in vivo* e *in vitro* (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; CORRÊA, 2013).

Figura 2: Produção de hibridomas.



Fonte: Abbas; Lichtman, Pilai. *Imunologia Celular e Molecular*. (2012). Processo de formação de hibridomas, a partir da fusão de células B e células de mieloma e cultivo em meio HAT.

3.4.2 – Produção de anticorpos monoclonais:

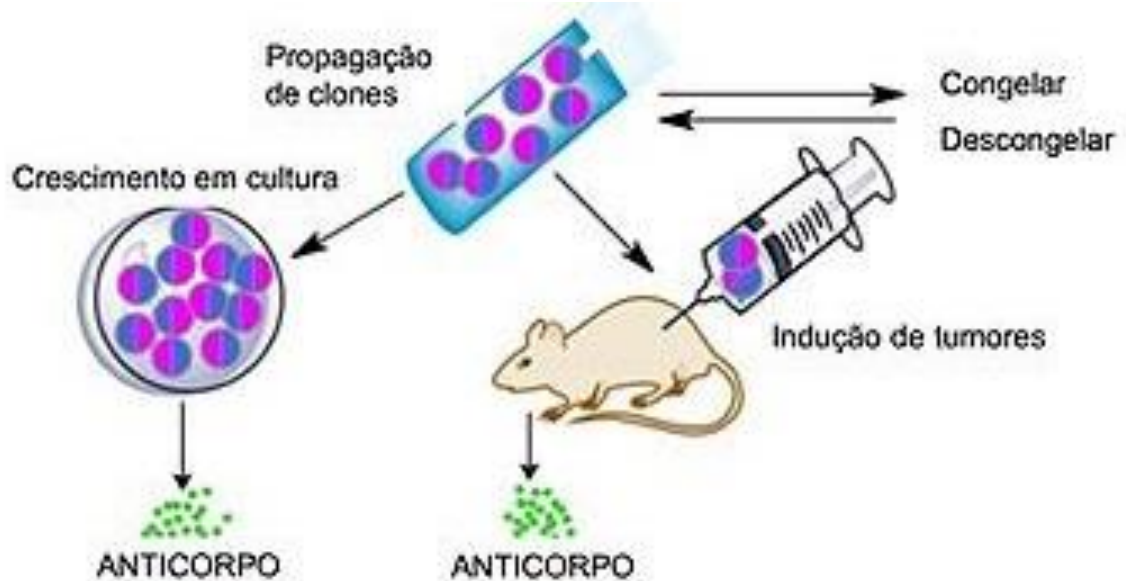
- ***In vivo:***

O processo de produção de mAbs *in vivo* ocorre por meio de formação da chamada ascite peritoneal em modelo animal, como ilustrado na Figura 3 (TREBAK *et al.*, 1999; BRUCE *et al.*, 2002). O primeiro passo é a sensibilização dos animais que recebem injeções por via intra-peritoneal de reagentes estimulantes de reação inflamatória e posteriormente são inoculados os hibridomas de interesse, também por via intra-peritoneal. Os hibridomas produzem e secretam os mAbs no fluido ascítico, produzido pela inflamação na cavidade peritoneal e esses são coletados por drenagens, após o procedimento os animais são eutanaziados. Como o rendimento de fluido peritoneal é pequeno, torna-se necessário fazer um *pool* de fluidos obtidos com a maior quantidade de animais possíveis. Produzir mAbs pelo processo *in vivo* proporciona o microambiente ideal com fatores de crescimento e fontes de nutrientes em quantidades suficientes para o bom desenvolvimento de células animais como o hibridoma, entretanto também apresentam um baixo rendimento, alto custo de produção, manutenção e instalações, alto risco de contaminação, variações significativas entre os diferentes lotes produzidos e sofrimento animal (COMMITTEE ON METHODS OF PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES, 1999; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012).

- ***In vitro:***

A produção de anticorpos monoclonais *in vitro* ocorre pelo cultivo de hibridomas em ambiente laboratorial por cultivo estático ou por cultivo em sistemas agitados. Os hibridomas são cultivado em meios de cultivo comerciais que em geral necessitam de suplementações, como por exemplo adição de SFB, e são mantidos sob condições monitoradas de temperatura e pH, de forma a proporcionar uma ambiente ótimo para a produção e secreção dos mAbs no meio sobrenadante do cultivo (LEGAZPI, 2005; TANG, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012). Atualmente é a forma de produção de mAbs por cultivo de hibridomas mais utilizada, uma vez que soluciona alguns dos problemas da produção *in vivo*, reduzindo a variação e o risco de contaminações, permitindo o aumento da escala de produção e evitando a utilização de modelos animais. Entretanto a produção laboratorial precisa fornecer aos hibridomas todas as condições ideais para seu desenvolvimento e produção e é nesse quesito que encontra-se os desafios do método (COMMITTEE ON METHODS OF PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES, 1999; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012).

Figura 3: Produção de anticorpos monoclonais *in vitro* x *in vivo*.



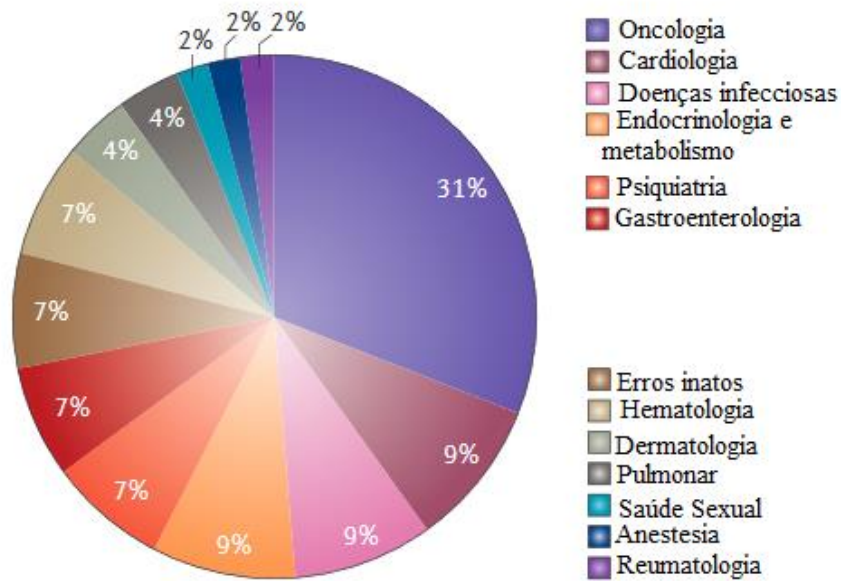
Fonte: Adaptada do wikiciencias/anticorposmonoclonais. Produção de anticorpos monoclonais *in vitro* por cultivo de hibridomas em condições laboratoriais (esquerda) e produção de anticorpos monoclonais *in vivo* por cultivo de hibridomas em ascite peritoneal em modelo animal(direita).

3.5 – Aplicação terapêutica dos anticorpos monoclonais:

Em 1984 os criadores da tecnologia de produção de mAbs a partir do cultivo de hibridomas, Georges Köhler, César Milstein, e Niels Kaj Jerne foram os ganhadores do prêmio Nobel de Medicina (PANDEY, 2010; MCDONNELL, 2015). Em 1992 a FDA, agência reguladora de alimentos e medicamentos do governo federal dos Estados Unidos, aprovou o Muromonab-CD3 (nome comercial; Orthoclone OKT3), primeiro mAbs para tratamento contra rejeição em pacientes transplantados (CAI, 2016).

Desde a primeira aprovação até os dias de hoje, muitos mAbs foram aprovados para tratamentos diversificados, segundo levantamentos recentes as áreas de tratamentos que mais recebem aprovações de mAbs são: tratamentos oncológicos com cerca de 31% das aprovações e tratamentos cardíacos com 9% das aprovações, entre outras como registrados na Figura 4, publicada na Nature Reviews – Drugs Discovery em fevereiro de 2016 (MULLARD, 2017).

Figura 4: Aprovações de mAbs por áreas terapêuticas.



Fonte: Adaptado de MULLARD. Nature Reviews – Drugs Discovery. 2017. Porcentagem de mAbs aprovados por áreas de tratamentos.

O primeiro mAbs aprovado, pela FDA, para imunoterapia contra câncer foi o rituximab, em 1997, aprovado para os tratamentos de linfoma non-Hodgkin e em 2010 também foi liberado para o tratamento de LLC (*Leucemia linfocítica crônica*) (ZHAN *et al.*, 2016). O grande sucesso terapêutico e comercial atingido pelo mAbs rituximab, anti CD-20, inspirou um grande interesse nas pesquisas e desenvolvimento de outros mAbs para fins terapêuticos (CHAMES; BATY, 2009).

Ao longo dos anos novos mAbs foram aprovados pela FDA para o tratamento contra câncer e outras doenças (SANTOS *et al.*, 2006; ZHAN *et al.*, 2016), na Tabela 4 estão relacionados os mAbs aprovados somente no ano de 2016 (MULLARD, 2017). Os hibridomas utilizados no presente trabalho (DTA-1 e PC-61), foram selecionados devido ao grande interesse terapêutico acerca de seus respectivos mAbs (anti-GITR e anti-CD25). Embora ambos ainda não tenham sido aprovados especificamente para o tratamento contra câncer, o anti-CD25 foi recentemente aprovado para o tratamento da Esclerose Múltipla (Tabela 4) e muito se tem estudado sobre seus potenciais antitumorais individuais e combinados como relatado em Coe e colaboradores em 2010.

Tabela 4: Anticorpos monoclonais aprovados em 2016 para tratamentos imunoterápicos.

Nome da droga	Patrocinador	Propriedades	Indicações
Elbasvir plus grazoprevir (Zepatier)	Merck&Co	NS5A inibidor NS3/4A protease inibidor	HCV
Brivaracetam (Briviact)	UCB	Anticonvulsivo com MOA desconhecido, liga-se a SV2A	Convulsões de início parcial
Obiltoximab (Anthim)	Elusys Therapeutics	mAbs contra antrax toxina	Antrax
Ixekizumab (Taltz)	Eli Lilly	IL-17	Psoríase em placas
Reslizumab (Cinqair)	Teva	IL-5	Asma
Defibrotide sodium (Defitelio)	Gentium	Profibrinolítico	Doença hepática
Venetoclax (Venclexta)	AbbVie	Inibidor de BCL-2	Leucemia linfocítica crônica
Pimavanserin (Nuplazid)	Acadia Pharmaceuticals	Antipsicótico atípico	Alucinações associadas com doença de Parkinson
Atezolizumab (Tecentriq)	Genentec	Inibidor de PDL-1	Carcinoma urotelial
Fluciclovine f-18 (Axumin)	Blue Earth	Diagnósticos radioativo	Câncer de próstata recorrente
Daclizumab (Zinbryta)	Biogen	Inibidor de IL-2 (CD25)	Esclerose múltipla
Gallium Ga 68 dotat	Advanced	Diagnósticos radioativo	Tumores neuroendócrinos
Sofosbuvir plus velpatasvir (Epclusa)	Gilead Sciences	Inibidor de NS5A	HCV
Lifitegrast (Xiidra)	Shire Pharmaceuticals	LFA1	Doença ocular
Eteplirsen (Exondys 51)	Sarepta Therapeutics	Pré-mRNA	Distrofia muscular
Olaratumab (Lartruvo)	Eli Lilly	PDGFR Bloqueador	Sarcomas de tecidos moles

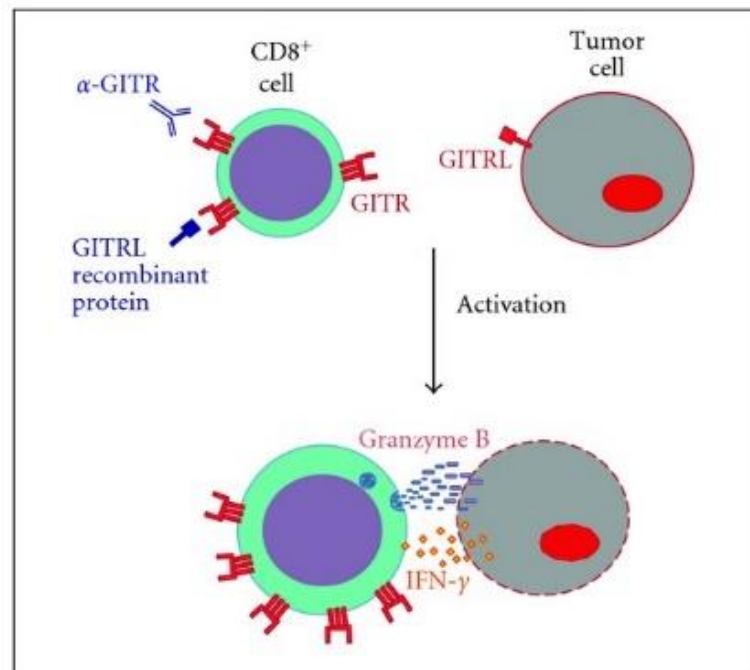
Fonte: Adaptado de MULLARD. Nature Reviews Drug Discovery. (2017 p.73-76).

3.6 – Anticorpo anti-GITR:

O sistema imunológico tem sido estudado exaustivamente nos últimos 50 anos e tem contribuído para o sucesso de diversos tratamentos de doenças letais. A regulação da resposta imune frente a atividade efetora do sistema imune é de fundamental importância para a manutenção e controle da atividade exagerada durante a resposta imune e que poderia favorecer outras doenças, como autoimunidade. As células conhecidas pela regulação da

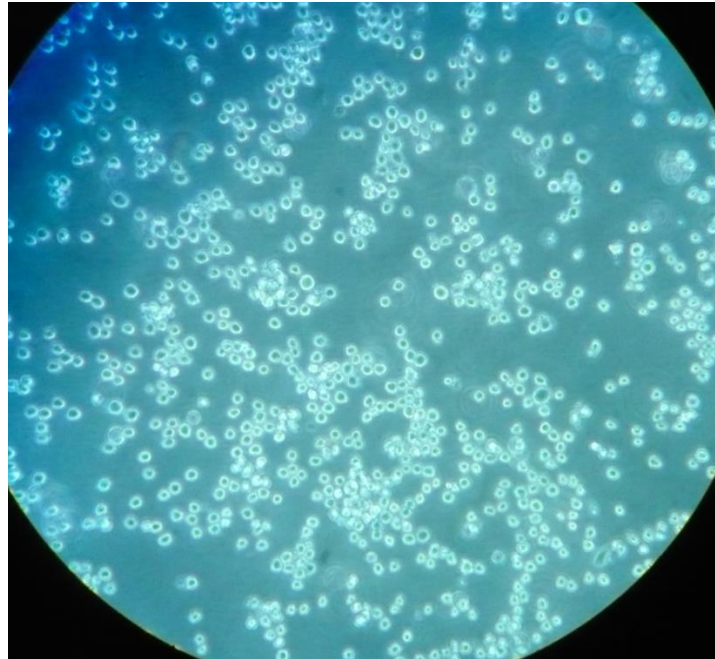
atividade da resposta imune são chamadas Tregs (células T regulatórias) (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; WOOD, 2013). A diminuição de células Treg causa a regressão de tumores e dentre os possíveis receptores da família TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) com função de estimular ou inibir a Treg, temos o GITR (*Glicocorticóide Induzido por TNF Relacionado*), proteína transmembrana do tipo I, que é expressada em grande quantidade nas Treg CD4+CD25+ e em baixas quantidades nas células T efetoras e nas células B. Depois de ativada, a expressão da proteína é controlada com CD4+, CD8+ e células NK (MCHUGH, 2002; CROFT, 2003; KANAMARU, 2004; KNEE, 2016). Assim a resposta imune pode ocorrer utilizando anticorpos monoclonais anti-GITR que farão o bloqueio dos receptores GITR, representado na Figura 5. Os anticorpos anti-GITR são obtidos através do cultivo da linhagem DTA-1, um dos hibridomas utilizados neste trabalho, Figura 6 (SHIMIZU, 2002; KNEE, 2016).

Figura 5: Representação esquemática do bloqueio dos receptores GITR.



Fonte: RONCHETTI et al., "CD8+ T Cells: GITR Matters," *The Scientific World Journal*. (2012, p.7). anti-GITR se ligando aos receptores de GITR ativando a liberação de INF sob as células tumorais.

Figura 6: Imagem de cultivo de hibridoma DTA-1 em pequena escala.



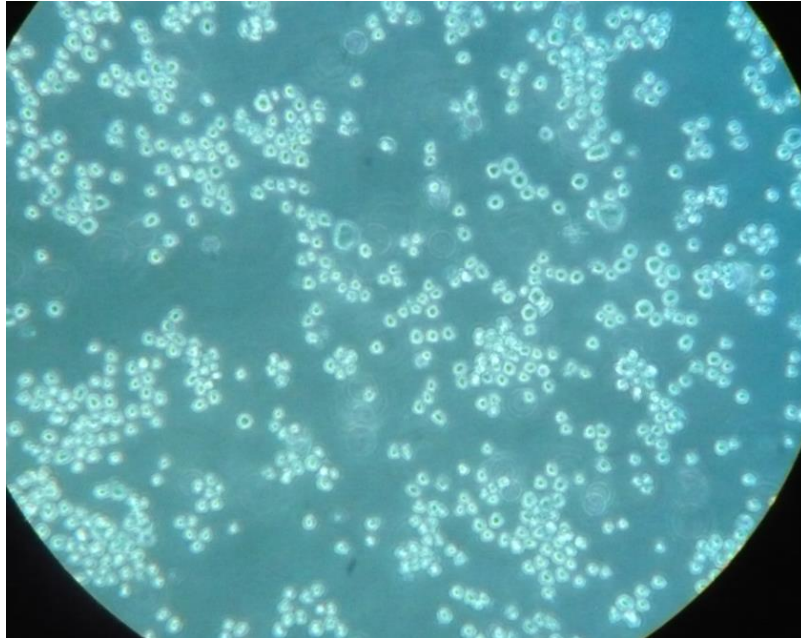
Fonte: Autor. Hibridoma DTA-1, células hibrida, com formato esférico, semi aderente, cultivada em meio padrão RPMI (Aumento de 10X).

3.7 – Anticorpo anti-CD25:

CD25 consiste na unidade alfa do receptor de interleucina-2, presente principalmente em linfócito T, e B ativados. A interleucina-2 é uma citocina predominantemente produzida por linfócitos T ativados, tendo como principal função estimular a proliferação de células ativadas como: CD4⁻ CD8⁻, CD4⁺CD8⁺ e T CD8⁺, proliferação de células NK, eliminação de células T auto-reativas, manutenção de células Treg, entre outros, através da interação com seu receptor (WALDMAN, 2006; MELO; CARVALHO, 2009). Linfócitos Treg contêm CD25⁺ como marcador e são conhecidamente responsáveis pelo controle de resposta autoimune e mesmo desempenhando um papel importante para a resposta imune, a diminuição do número destas células Treg é utilizada em muitos tratamentos de câncer (HOLM, 2004). A ligação do mAbs anti-CD25 aos receptores de interleucina-2 das células Treg inibem as células CD4⁺CD25⁺ e são responsáveis pela redução no crescimento das células CD8⁺, muito importantes para o equilíbrio do sistema imune. A utilização de anticorpos anti-CD25 vem demonstrando grande importância, embora, a ação antitumoral da diminuição de células CD4⁺CD25⁺ ainda não seja completamente elucidada (RECH; VONDERHEIDE, 2009; MELO; CARVALHO, 2009). A produção dos anticorpos anti-25 é realizada pelo cultivo do hibridoma PC-61 ilustrado na Figura 7, um dos hibridomas utilizado nesse estudo. Atualmente o mAbs anti-CD25 é aprovado para o tratamento contra esclerose múltipla, como visto na Tabela 4, seu principal mecanismos de ação no uso terapêutico contra esclerose

múltipla bem como na terapia de transplantes ocorre pelo bloqueio na interação entre IL-2 e o receptor de IL-2 da CD25, inibindo a expansão de células T ativadas (ROLAND, 2012).

Figura 7: Imagem de cultivo de hibridoma PC-61 em pequena escala.



Fonte: Autor. Hibridoma PC-61, células híbrida, com formato esférico, semi aderente, cultivada em meio padrão RPMI. (Aumento de 10X).

3.8 – Cultivo celular:

Harrison e Carrel foram os pioneiros nos estudos de cultivos de células no início do século XX, utilizando-se de técnicas rudimentares, analisavam o comportamento de tecidos mecanicamente fragmentados e armazenados em frascos contendo fluidos dos animais de onde os tecidos foram extraídos (ALVES; GUIMARÃES, 2009). Desde então muito se pesquisou sobre o cultivo de células e suas inúmeras aplicações, mas foi após a Segunda Guerra Mundial que um grande desenvolvimento das tecnologias de cultivos celulares se estabeleceram e atualmente o cultivo de células tem sido amplamente utilizado para síntese de produtos de aplicação industrial e terapêutica (DOYLE; GRIFFITHS, 1998; FRESHNEY, 2010).

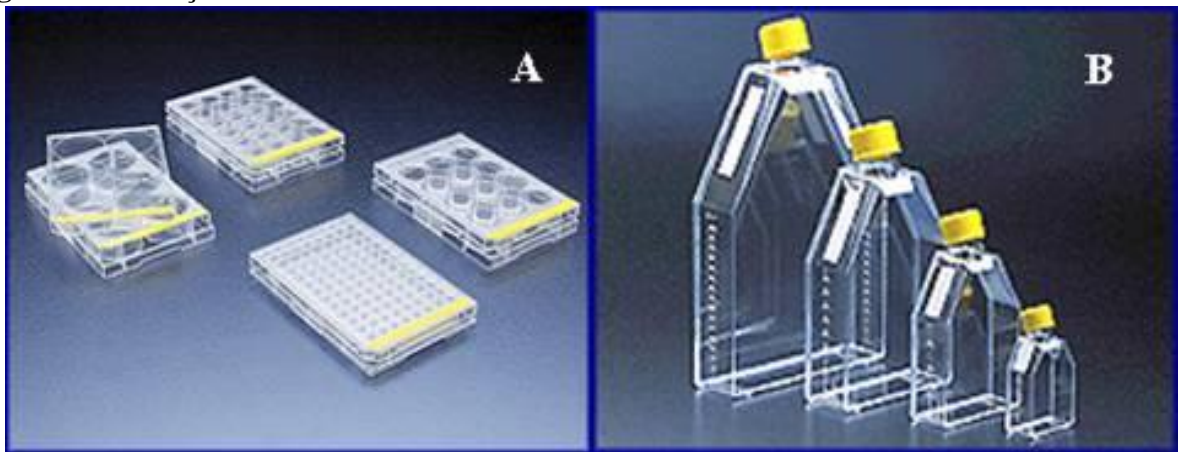
O cultivo celular laboratorial visa estudar o comportamento da célula fora do seu ambiente natural (*in vivo*), ou seja, procura simular o mais próximo possível o modelo *in vivo* de onde a célula foi extraída, porém não consegue reproduzir todas as funções e interações fisiológicas que a célula encontraria em seu ambiente natural (ALVES; GUIMARÃES, 2009). Mesmo não conseguindo reproduzir exatamente o ambiente natural da célula, o cultivo celular possui suas vantagens como o controle das condições de cultivo, pH, temperatura, pressão

osmótica e injeção de O₂ e CO₂, além do controle do ambiente fisiológico e fonte de nutrientes (EIBL *et.al*, 2009; FRESHNEY, 2010; CORRÊA, 2013).

3.8.1 - Sistema de cultivo celular estático em pequena escala:

Para o cultivo de células agitado são utilizados sistemas de estudo do comportamento celular, simples, relativamente econômicos, desprovidos de automação, são caracterizados por sua baixa capacidade de produção e podem ser dos tipos placas de Petri, frascos de cultivo T, placas de poços como os da Figura 8. O cultivo nesse tipo de sistema deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, mantendo a assepsia (GRAMER; POESCHL, 2000; ZANATTA, 2009; FRESHNEY, 2010).

Figura 8: Ilustração de sistemas de cultivo estático.



Fonte: Site do Laboratório Nacional de Células Tronco do Rio de Janeiro. Sistemas de cultivo celular estático. A) placas de poços para cultivos estáticos. B) frascos T para cultivos estáticos.

3.8.2 – Sistema de cultivo celular agitado em escala piloto:

São sistemas fechados que visam uma distribuição uniforme de todos os componentes presentes no cultivos, meio, células, gases, nutrientes e metabólitos devem estar constantemente em movimento (FRESHNEY, 2010). Cultivos em sistemas agitados, geralmente, possuem volume de trabalho maior, elevando a produtividade e facilitando o escalonamento do cultivo. Porém podem favorecer um maior acúmulo de metabólitos que por sua vez podem influenciar negativamente, por tanto exigem um rígido controle e monitoramento das variáveis citadas anteriormente (MORAES *et al.*, 2007; DOYLE; GRIFFITHS, 1998). Dentre os diversos modelos de sistemas de cultivo agitado, um dos recomendados pela literatura para células em suspensão ou semi-suspensas como os hibridomas é o biorreator tipo *Spinner*, ilustrado na Figura 9 (EIBL *et.al*, 2009; FRESHNEY, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2010).

Figura 9: Ilustração de biorreator do tipo *Spinner*.



Fonte: Acervo pessoal.

3.8.3 – Sistema de cultivo agitado do tipo *Spinner*:

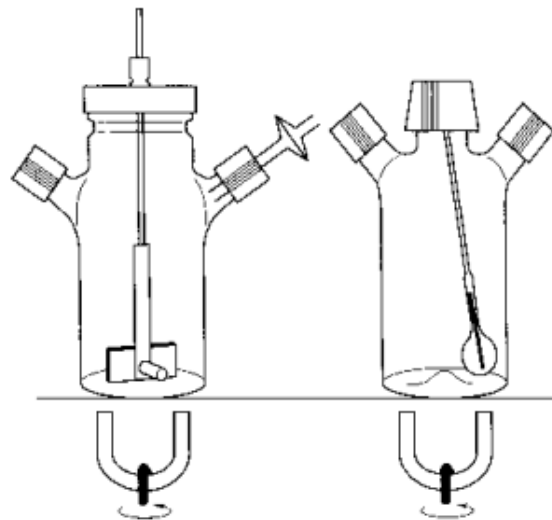
O cultivo de células animais *in vitro* necessita de um conjunto de condições físico-químicas que devem ser monitorados e controlados para o desenvolvimento celular, tais como, temperatura, pH, concentração de O₂ dissolvidos e agitação. O dispositivo que controla e ou monitora esses parâmetros é chamado de biorreator (GODARA, 2008; EIBL *et.al*, 2009; FRESHNEY, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2010). Para garantir o desempenho eficiente dos fenômenos de proliferação das células e obtenção do produto celular de interesse, devem ser asseguradas as seguintes funções (DOYLE; GRIFFITHS, 1998; MORAES *et al.*, 2007):

- Controle do equilíbrio ácido-base (pH) do meio de cultura;
- Controle da temperatura;
- Troca de gases que permitam suprimento adequado de CO₂, assim como a eliminação do excesso de dióxido de carbono;
- Suprimento de nutrientes, utilizando meio de cultivo de formulação adequada;
- Suprimento de suporte para a adesão celular no caso de cultivo de células aderentes;

- Manutenção da assepsia, evitando a contaminação por microorganismos, vírus e outras células.

Os biorreatores do tipo *Spinner*, representado na Figura 10, consistem em recipientes que podem ser fabricados em plástico ou vidro, contendo na posição central um eixo agitador magnético, com braços laterais, cuja função é a retirada ou adição de células e meio. O cultivo de células em *Spinner* pode ser realizado de três formas: células individuais, agregados e células ligadas a microcarregadores ou outros suportes que ancoram as células dependentes de ancoramento (KEHOE *et al.*, 2010).

Figura 10: Ilustração esquemática do biorreator do tipo *Spinner*.



Fonte: DOYLE, GRIFFITHS, 1998. Ilustração de frasco de cultivo celular agitado do tipo *Spinner* de eixo radial (esquerda) e de eixo pendular (direita).

A vasta utilização desse tipo de reator no cultivo de células animais, microbianas e também para a produção em larga escala de anticorpos monoclonais ocorre devido a algumas vantagens (DOYLE; GRIFFITHS, 1998; MORAES *et al.*, 2007) tais como:

- Cultivo de células em suspensão e células dependentes de ancoramento;
- Ambiente homogêneo para o crescimento celular;
- Fácil controle de qualidade do produto;

Para o sucesso do cultivo nesse tipo de biorreator a assepsia é um fator crucial devido ao seu tamanho e as suas partes móveis, sendo assim além da validação funcional, o operador do processo deve avaliar o procedimento de limpeza e estabilização do sistema. (MORAES *et al.*, 2007; FRESHNEY, 2010).

3.8.1 – Meios de cultivo:

O meio de cultura para proliferação celular deve fornecer pH e osmolaridade ótimos de acordo com as necessidades de cada célula, assim como substâncias químicas que as células não conseguem sintetizar e são fundamentais para seu crescimento. Para o funcionamento do metabolismo celular é necessário um meio aquoso que possua dissolvidos sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, ácidos orgânicos, proteínas, hormônios, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, micronutrientes (íons orgânicos e minerais), que são importantes para a definição do melhor meio de cultura e estratégias durante seu cultivo nos biorreatores (MORAES *et al.*, 2007; FRESHNEY, 2010; ARORA, 2013).

Para cumprir sua função o meio de cultura precisa ser constituído por componentes nutritivos que serão consumidos pelas células assim como componentes inorgânicos que participam da regulação do ambiente do cultivo celular (mol). A glicose constitui a maior fonte de carbono presente em um meio de cultura, enquanto que a glutamina a maior fonte de nitrogênio e ambas são, usualmente, os nutrientes limitantes de um cultivo de células animais (ACOSTA *et al.*, 2007). A partir da oxidação incompleta da glicose, pela via glicolítica, ocorre a produção e secreção de lactato e pelo metabolismo de consumo da glutamina ocorre a produção e secreção de amônia, dois dos mais importantes produtos metabólicos de caráter tóxico e/ou inibidor do cultivo de células animais (OZTURK, 1992; PÖRTNER; SCHÄFER, 1996).

Hibridomas são consideradas células bastante resistentes aos efeitos tóxicos dos resíduos do metabolismo tanto da glicose como da glutamina. Sendo seu crescimento celular afetado por esses resíduos somente quando atingem valores críticos próximos a 55mM de lactato e aproximadamente 10mM de amônia (OZTURK, 1992; PÖRTNER; SCHÄFER, 1996).

Além de fontes de carbono, nitrogênio, aminoácidos e componentes inorgânicos, os meios de cultivos são frequentemente suplementados com substâncias que atuem como fonte de fatores de crescimento (BIÁGGIO, 2014). Sendo o SFB a fonte de proteínas e fatores de crescimento para cultivo celular *in vitro* mais amplamente utilizada em cultivos de células animais (TETZNER, 2007; ZANATTA, 2009).

3.8.2 – Soro fetal bovino:

Usualmente o soro fetal bovino é utilizado para suplementar os meios de cultivo por conter grandes quantidades de componentes tais como ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos, vitaminas, hormônios, proteínas e minerais. Entre suas funções

podemos citar: estimular o crescimento e diversas atividades celulares, aumentar a adesão celular e fornecer proteínas (ZANATTA, 2009; FRESHNEY, 2010).

É importante ressaltar, que os animais devem ser isentos de doenças infecciosas como encefalopatia espongiforme bovina, uma vez que foi demonstrado que de 20% e 50% de SFB comercializados podem ser vírus-positivos (WESSMAN; LEVING, 1999). O SFB é um risco potencial para a saúde humana pela possível presença de agentes patogênicos, vírus ou proteínas (príons) no produto final (VALK DER VAN *et al.*, 2010). Outra forte limitação do uso do SFB é por ele não ser quimicamente definido, sua variabilidade é alta com relação aos diferentes lotes (EVEN; SANDUSKY; BARNARD, 2006), o que dificulta a padronização do meio de cultivo, um crescimento celular imprevisível o que leva ao comprometimento da própria reprodutibilidade do cultivo (MORAES *et al.*, 2007; BUTLER, 2015).

Outra desvantagem no uso de SFB no cultivo de hibridomas é a presença de uma elevada concentração de proteínas, entre elas imunoglobulinas que interferem no processo de purificação do mAb, visto que torna o processo de separação das imunoglobulinas obtidas das imunoglobulinas de origem do soro mais difícil (EVEN; SANDUSKY; BARNARD, 2006). Devido às adversidades relacionadas ao uso do SFB, nos últimos anos existe uma tendência de eliminação do soro e de outros componentes de origem animal nos meios de cultura, inclusive encorajada por agências reguladoras, como a FDA, que não mais aprovam biofármacos que contenham SFB no seu processo de produção (VAN DER VALK *et al.*, 2004; FRESHNEY, 2010; BUTLER, 2015).

Dessa forma cada vez mais os cultivos celulares caminham para a adaptação de seus linhagens a meios livre de SFB em sua composição. Variados protocolos de adaptação celular a meios livres de SFB são descritos e tipicamente sugerem que a adaptação deve ser um processo gradual. Quatro desses protocolos estão listados na Figura 11, abaixo (VAN DER VALK *et al.*, 2004; FRESHNEY, 2010; BUTLER, 2015).

Figura 11: Protocolos de adaptação celular a meios livres de SFB.

1. Redução da concentração de SFB:

• Cultivo em meio normal contendo 10% SFB
• Subcultivo em meio livre de SFB com 5% SFB
• Subcultivo em meio livre de SFB com 1% SFB
• Subcultivo em meio livre de SFB com 0,1% SFB
• Cultivo e manutenção em meio livre de SFB

2. Adaptação sequencial:

• Cultivo em meio normal contendo 10% SFB
• Passagem 1: 75% meio normal; 25% meio livre de SFB
• Passagem 2: 50% meio normal; 50% meio livre de SFB
• Passagem 3: 25% meio normal; 50% meio livre de SFB
• Passagem 4: 100% meio livre de SFB

3. Adaptação com meio condicionado:

• Cultivo em meio normal contendo 10% SFB
• Passagem 1: 50% meio condicionado; 50% meio livre de SFB
• Passagem 2: 50% meio condicionado P1; 50% meio livre de SFB
• Passagem 3: 25% meio condicionado P2; 75% meio livre de SFB
• Passagem 4: 100% meio livre de SFB

4. Adaptação "inside":

• Cultivo em meio normal contendo 10% SFB até confluência
• Trocar para meio livre de soro
• Manter em meio livre de SFB até confluência
• Tripsinização da monocamada confluenta
• Subcultivos em meio livre de SFB com densidade de inóculo 2-4x maior

Fonte: Adaptado de Biaggio (2014, p.14). Protocolos de adaptação celular a meios livres de SFB.

Assim, nosso trabalho busca encontrar em cultivo de hibridoma um protocolo que permita que o crescimento das células produtoras de mAbs em meio livre de SFB tenha quantidades suficientes de mAbs para que os mesmo possam ser utilizados em ensaios que comprovem sua eficiência no controle de alguns tipos de câncer. E dessa forma também determinar os principais nutrientes que precisam ser acrescentados no decorrer do cultivo em biorreator do tipo *Spinner*. E futuramente serão realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* para validação do efeito biológico desses mAbs no broqueio do crescimento de células tumorais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Meios de cultivo:

a) Meio RPMI 1640 - Gibco® by Life Technology (nº23400-021)

Meio básico contendo altas concentrações de vitaminas como: biotina, vitamina B12, assim como L- glutamina, vermelho de fenol e HEPES. Requer suplementação de bicarbonato de sódio para ajuste do pH e recomenda-se adição de soro fetal bovino. São disponibilizados em envelopes individuais para a produção de 1 L, tem validade de 12 meses e deve ser armazenado protegido da luz em temperatura entre 2°C e 8°C.

b) *Hybridoma Serum Free Medium (SFM)* – Gibco® by Life Technology (nº catálogo12045-076)

Meio livre de soro fetal bovino, otimizado para o crescimento de hibridomas e produção de anticorpos monoclonais. Constituído com baixo teor proteico (>20µg/mL) o que facilita a purificação dos anticorpos monoclonais. Contém em sua composição L-glutamina, insulina, transferrina, vermelho de fenol e surfactantes (usado como protetor celular contra possíveis efeitos negativos causados pela agitação e atua como um agente anti-formação de espuma). Tem validade de 12 meses e deve ser armazenado protegido da luz em temperatura entre 2°C e 8°C. Não requer suplementação, exceto para linhagens dependentes de colesterol.

c) *CD Hybridoma Medium* – Gibco® by Thermo Fisher Scientific (nº catálogo 11279-023)

Meio quimicamente definido, livre de proteínas, hidrolases ou componentes desconhecidos. É otimizado para o crescimento de uma variedade de hibridomas, células de mielomas e produção de anticorpos monoclonais em sistemas de suspensão agitado. É formulado sem vermelho de fenol para evitar efeitos similares ao estrogênio não contém L- glutamina em sua composição para evitar degradação e produção de amônia em excesso. Contém um transportador de ferro orgânico com uma elevada absorção a 280 nm, fazendo com que protocolos de detecção e purificação de anticorpos sejam projetados para levar isso em conta. Não contém L-glutamina em sua composição para evitar degradação e produção de amônia em excesso, para aplicações que requerem o uso de L-glutamina, suplemento com 8 mM de L-glutamina, de acordo com o fabricante.

d) *Ex-cell 620 HSF Serum-free Medium for Hybridom Cells- Sigma (nº catálogo 14624C)*

Meio livre de soro fetal bovino, com baixo teor proteico (aproximadamente 11mg/L), especificamente desenvolvido para o crescimento a longo prazo de hibridomas e células capazes de expressarem anticorpos monoclonais e produtos proteicos. Não contem L-glutamina em sua composição para evitar degradação e produção de amônia em excesso, para aplicações que requerem o uso de L-glutamina, suplemento com 4 mM de L-glutamina, adicionando 20 ml / L de uma solução com 200 mM antes da utilização, de acordo com o fabricante.

4.2 - Preservação dos hibridomas:

Nos estudos realizados foram utilizadas duas linhagens de hibridomas, DTA-1 e PC-61, cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. João Santana da Silva, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, USP). Os criotubos contendo as linhagens DTA-1 e PC-61 continham volume de 1mL com concentração de 2×10^5 cel.mL⁻¹, mantidos em container (vaso Dewar) contendo nitrogênio líquido à -196°C.

4.3 - Ativação das células:

Para o descongelamento das células o criotubo foi retirado do nitrogênio líquido e colocado em banho termostático à 37°C para rápido descongelamento da suspensão. Quando descongelada, a suspensão foi colocada em um tubo Falcon com 9 mL de meio de cultura e centrifugada em 460 G por 5 minutos. O sobrenadante contendo 10% da solução DMSO (*Dimetilsulfóxido*) foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 fresco e colocadas em um frasco de cultivo de 25cm² (Corning, EUA). As células foram mantidas em incubadora (Thermo Fisher Scientific,EUA) na temperatura de 37°C e 5% de concentração de CO₂ .

4.4 - Cultivo celular:

Todos os cultivos celulares ao longo do presente trabalho foram desenvolvidos no LATECC (Laboratório de Tecnologias e Cultivos Celulares) situado no DEQ (Departamento de Engenharia Química) da UFSCar, campus São Carlos.

4.4.1 - Cultivo estático em frasco T

Inicialmente as células foram cultivadas em frascos T de 75cm² para estudos em pequena escala. Frascos T foram preparados com inoculo inicial de 2×10^5 cel.mL⁻¹ e completados com meios de cultivo padrão RPMI 1640 (Gibco™) até o volume de trabalho de 15mL. Os frascos foram mantidos em incubadora (Thermo Fisher Scientific, EUA) com temperatura controlada a 37°C e 5% de CO₂.

4.4.2 - Cultivo em sistema agitado tipo *Spinner*

Após o cultivo e expansão celular em frascos T atingir a concentração do inoculo inicial de 2×10^5 cel.mL⁻¹ esse inóculo foi transferido para um sistema de cultivo agitado do tipo *Spinner* (Bellco, EUA) de 500ml de volume. Em seguida o volume de trabalho foi completado com meio de cultura e o sistema armazenado em incubadora (Thermo Fisher Scientific, EUA) com agitação magnética a 70 rpm, 37 °C e 5% de CO₂.

4.5 – Amostragem:

4.5.1 - Amostragem do cultivo em frasco T

Com auxílio de uma espátula (TPP, EUA) e movimentos suaves na base inferior da garrafa, as células que estavam aderidas foram liberadas no meio de cultura e transferidas para tubos Falcons estéreis. Os tubos contendo a suspensão celular foram centrifugados por 5 minutos à 460 G. Imediatamente após a centrifugação, uma amostra do meio sobrenadante resultante da centrifugação foi utilizada para aferir o pH do cultivo (SevenCompact- Mettler Toledo, UK) e pequenas alíquotas de 1mL cada foram armazenadas em tubos cónicos estéreis, rotulados e posteriormente congelados para futuras análises. Uma vez retirado todo o sobrenadante, um volume de meio de cultivo, estimado de acordo com o tamanho do pellet celular resultante da centrifugação, foi utilizado para suspender e homogeneizar o pellet celular, para a inoculação em um novo frasco T. Uma alíquota dessa suspensão celular foi utilizada para contagem celular em hemocitômetro e após a contagem e os cálculos, um novo frasco T contendo suspensão celular e meio de cultura novo era produzida de forma a manter a concentração do inóculo 2×10^5 cel/ml⁻¹.

4.5.2- Amostragem do cultivo em biorreator do tipo *Spinner*

Sem troca de meio de cultura, as amostras durante o cultivo em sistema agitado do tipo *Spinner* foram retiradas em intervalos fixos de 12 horas. Com auxílio de uma pipeta histológica uma alíquota de 5 mL de suspensão celular, sendo 1 mL para a contagem celular e

os 4 mL restantes para análises futuras os quais eram transferidas para um Falcon estéril. A amostra armazenada no Falcon era utilizada para aferir o pH do cultivo (SevenCompact-Mettler Toledo, UK), centrifugada por 5 minutos a 460 G e divididas em microtubos rotulados, os quais foram congelados em freezer convencional. A contagem celular era realizada em hemocitômetro.

4.6 -Métodos analíticos:

4.6.1 - Densidade celular e viabilidade e cálculos

Para análise da viabilidade e densidade celular foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan através de contagem em hematocitômetro, que possui duas grades de contagem, com quatro quadrantes de 1mm² cada uma, foram contados 16 quadrantes no total para cada amostra. Com diluição inicial de 20 µL de Tripan, 20µL de suspensão celular foram realizadas contagens de 8 quadrantes e uma segunda diluição partindo da amostra inicial, com nova contagem de 8 quadrantes. Essa medida em dois eventos foi realizada para reduzir os efeitos de erro de contagem e/ou pipetagem, bem como evitar que as células ficassem muito tempo expostas a ação do tripan.

- **Concentração de células viáveis**

$$Cv = \frac{(Mv \times D)}{V} \text{cel.mL}^{-1} \quad \text{Equação 1.}$$

Onde: Mv= média dos números de células viáveis contadas nos 4 eventos de contagem; D= diluição utilizada; V= volume do quadrante (10⁻⁴).

- **Viabilidade celular**

$$V (\%) = \frac{Nv}{Nv+Nd} (100) \quad \text{Equação 2.}$$

Onde: Nv=número total de células viáveis contadas nos 4 eventos de contagem; Nd= número total de células inviáveis contadas nos 4 eventos de contagem.

- **Velocidade específica de crescimento celular (µ)**

$$\mu = \frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N} [\text{h}^{-1}] \quad \text{Equação 3.}$$

Onde μ = velocidade específica de crescimento; N = número de células no instante t; N_0 = número de células no tempo 0.

4.6.2 - Quantificação de aminoácidos em cultivo

As análises de aminoácidos foram executadas por cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), seguindo a metodologia proposta por Henrikson & Meredith, 1984. O método cromatográfico utilizou fase estacionária constituída pela coluna picotag (Waters, IRL), fases móveis A: água ultrapura tipo 1, acetonitrila (Panreac, ESP) trietilamina (Sigma, GER) e acetato de sódio tri-hidratado (Synth, BRA) e fase móvel B: água ultrapura tipo 1 e acetonitrila (Panreac, ESP). Na pré-coluna de derivatização o PITC (Waters, IRL), conhecido como reagente de Edman, foi adicionado para realizar a degradação dos aminoácidos sequencialmente em amins primárias e secundárias em 254 nm à temperatura ambiente. Para quantificação dos aminoácidos foi utilizado o padrão de aminoácidos Waters e também foram preparadas manualmente curvas de calibração dos aminoácidos arginina (Sigma, GER), asparagina (Sigma, GER) e glutamina (Sigma, GER). Para preparação das amostras, foi realizada centrifugação em 9500 G por 5 minutos para retirada de células e debris e alíquotas de 200 μ L do sobrenadante foram reservadas para continuar com a análise. A preparação das amostras incluíram etapas sequenciais de: filtração; secagem em temperatura ambiente; hidratação das amostras (solução preparada a partir de etanol, água ultrapura tipo 1 e trietilamina); secagem em temperatura ambiente; derivatização das amostras (solução preparada a partir de água ultrapura tipo 1, trietilamina e PITC); secagem em temperatura ambiente; adição da solução diluente adequada para análise de aminoácidos livres, Pico-Tag Sample Diluent to Amino Acid analysis (Waters, IRL), e injeção no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Waters, IRL).

4.6.3 - Quantificação de glicose e lactato

A quantificação de glicose e lactato foram realizadas no analisador enzimático YSI 7100 MBS (Multiparameter Bionanalytical System, Yellow Springs Instruments, EUA).

4.6.4 - Quantificação de anticorpos monoclonais por ELISA

As microplacas de alta afinidade foram sensibilizadas com a própria amostra de sobrenadante, não diluídas, foram aplicados 100 μ L por poço em placas de 96 poços EJA/RJA (Costar 3590). As placas foram incubadas por cerca de 12 a 18 horas a 4°C, durante a noite, “*overnight*”. Foi realizado um ciclo de 3 lavagens semiautomáticas, com 300 μ L por poço de

PBS pH 7,2-Tween-20 0,05% (PBS-Tw), com o objetivo de eliminar os anticorpos não aderidos ao suporte sólido. Em seguida foram adicionados 200 μ L por poço de solução bloqueadora contendo Albumina 1% em PBS por 1h, a temperatura ambiente (TA), com o objetivo de fixar os anticorpos sensibilizados na placa durante a sensibilização. Após mais um ciclo de 3 lavagens semiautomáticas (PBS-Tw), foram adicionados aos poços 100 μ L por poço do anticorpo secundário Anti-mouse IgG1 diluído em solução de PBS –Albumina 10%, na proporção 1:10.000. As placas foram mantidas a TA por 2 horas e, em seguida, um novo ciclo de 3 lavagens foi realizado. Foram adicionados 100 μ L por poço da solução reveladora contendo 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB-B&D) na proporção 1:1. As placas foram incubadas no escuro e em TA por no máximo 30 minutos. Por fim a revelação foi parada com adição de 50 μ L por poço de solução stop contendo ácido sulfúrico 1M. E finalmente foi realizada a leitura das placas no espectrofotômetro com absorvância de 450 nm.

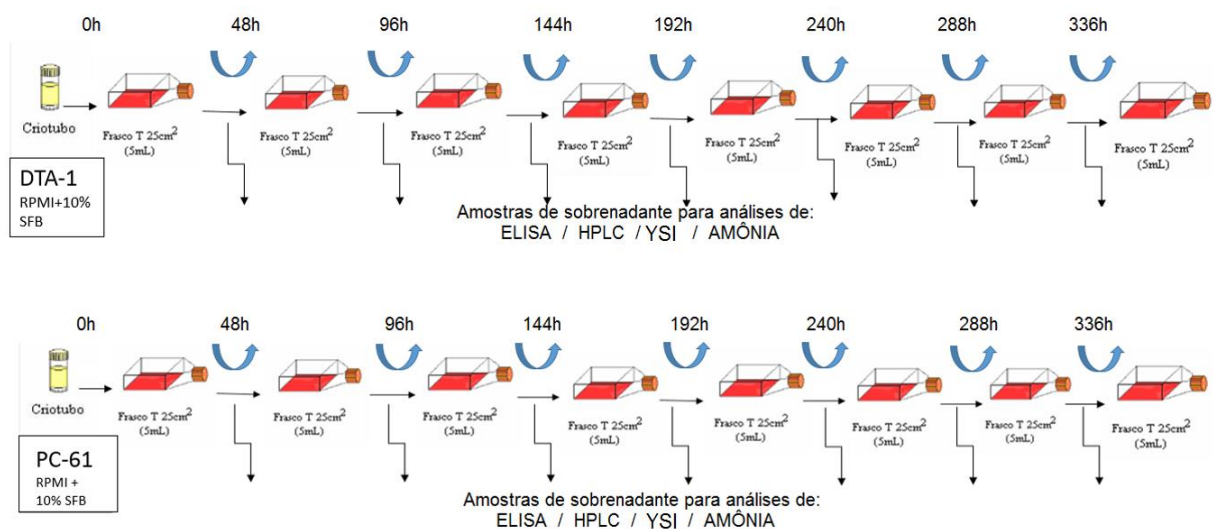
4.7 – Planejamento dos experimentos desta pesquisa:

O conjunto de experimentos programados para atingir os objetivos desta pesquisa pode ser resumido da seguinte forma:

4.7.1 – Experimento 1 (Exp1) em frascos T – estudo comparativo dos hibridomas DTA-1 e PC-61:

O procedimento padrão para o cultivo dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T, para a identificação de qual linhagem era capaz de produzir maior quantidade de mAbs em meio padrão com soro fetal bovino, seguiu as etapas descritas na Figura 12.

Figura 12: Procedimento padronizado seguido no Exp1.

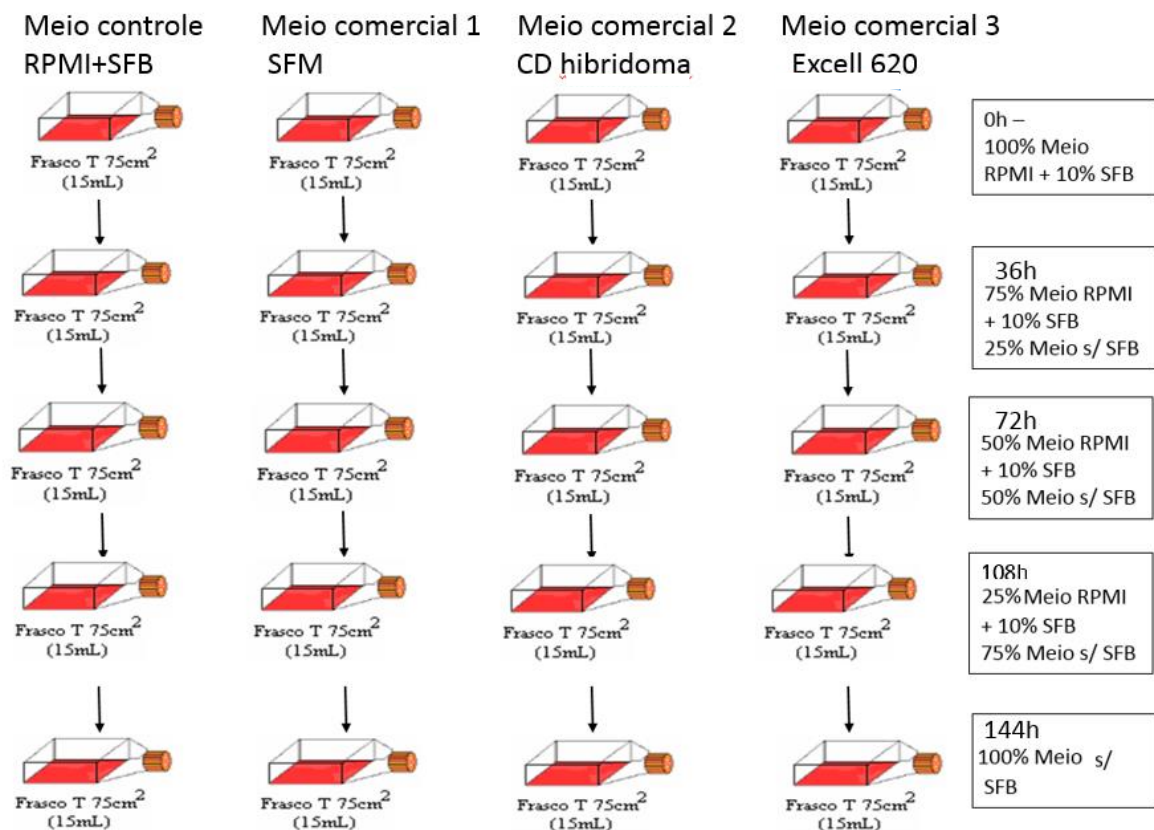


Fonte: Acervo pessoal.

4.7.2 – Experimento 2 (Exp2) em frasco T – definição de procedimento para adaptação a meio livre de SFB do hibridoma PC-61:

Após a escolha do hibridoma PC-61 com base nos resultados do primeiro experimento, iniciou-se o experimento de adaptação dos hibridomas aos meios comerciais livre de SFB. Seguiu-se o mesmo protocolo de amostragem, porém reduzindo o volume de meio RPMI-1640 com 10% de SFB e aumentando o volume de meio comercial livre de soro sequencialmente, seguindo o esquema mostrado na Figura 13. Após a completa adaptação aos meios livres de SFB o cultivo continuou por mais 216 horas para conferir se a adaptação foi efetiva, totalizando 360 horas de experimento.

Figura 13: Procedimento padronizado seguido no Exp2.



Fonte: Acervo pessoal.

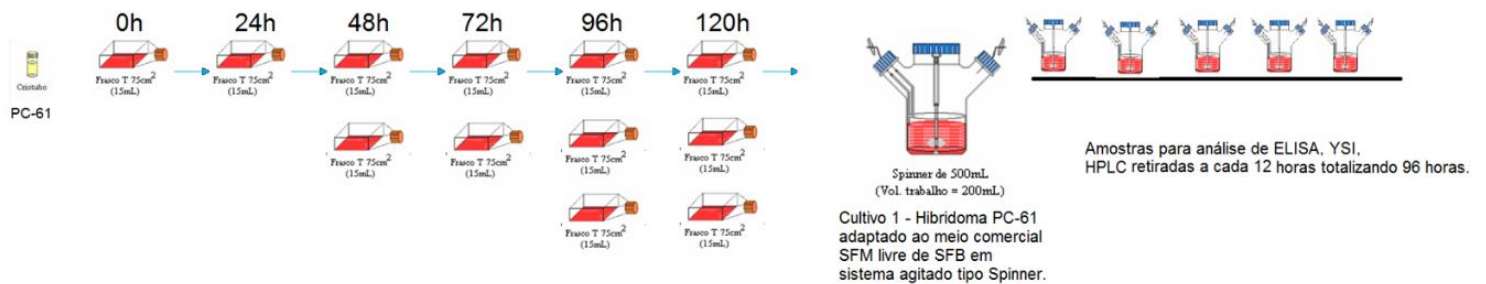
4.7.3 - Experimento 3 (Exp3) em biorreator do tipo *Spinner* – avaliação da capacidade de produção de mAb em meio comercial livre de SFB daptados a meio comercial livre de SFB do hibridoma PC-61:

Seguindo o protocolo descrito no Exp2, a quantidade de células foi expandida e adaptada, ao melhor meio comercial livre de SFB escolhido em frascos T até alcançar 2×10^5

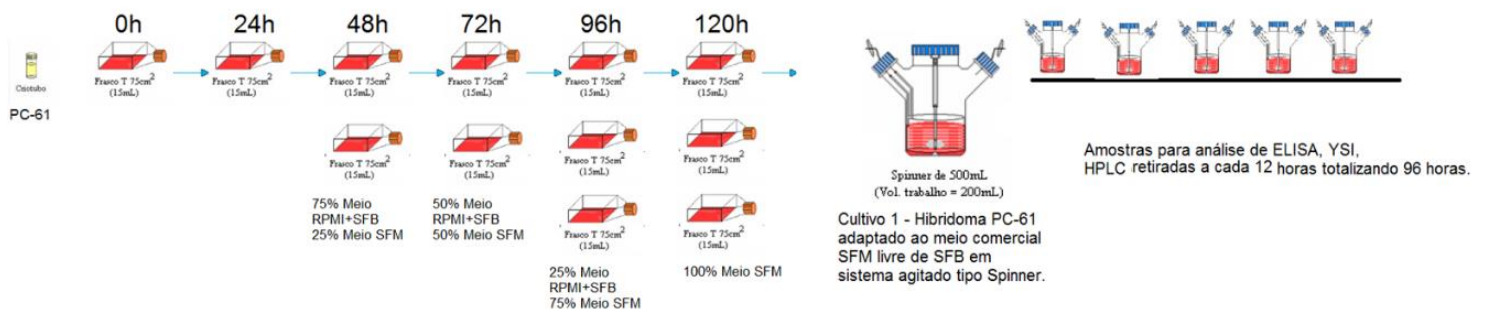
células viáveis por mL que foram inoculadas no biorreator do tipo *Spinner*, com volume de trabalho completado com meio de cultura comercial SFB escolhido. O biorreator *Spinner* iniciou seu funcionamento nas seguintes condições: temperatura de 37°C, 5% de CO₂, pH 7,3 e agitação 70 rpm. O esquema do procedimento padrão para o cultivo do hibridoma PC-61 em frascos T seguiu as etapas mostradas na Figura 14.

Figura 14: Procedimento padronizado seguido no Exp3.

CULTIVO CONTROLE - RPMI +SFB



CULTIVO MEIO COMERCIAL 1 - SFM sem SFB



Fonte: Acervo pessoal.

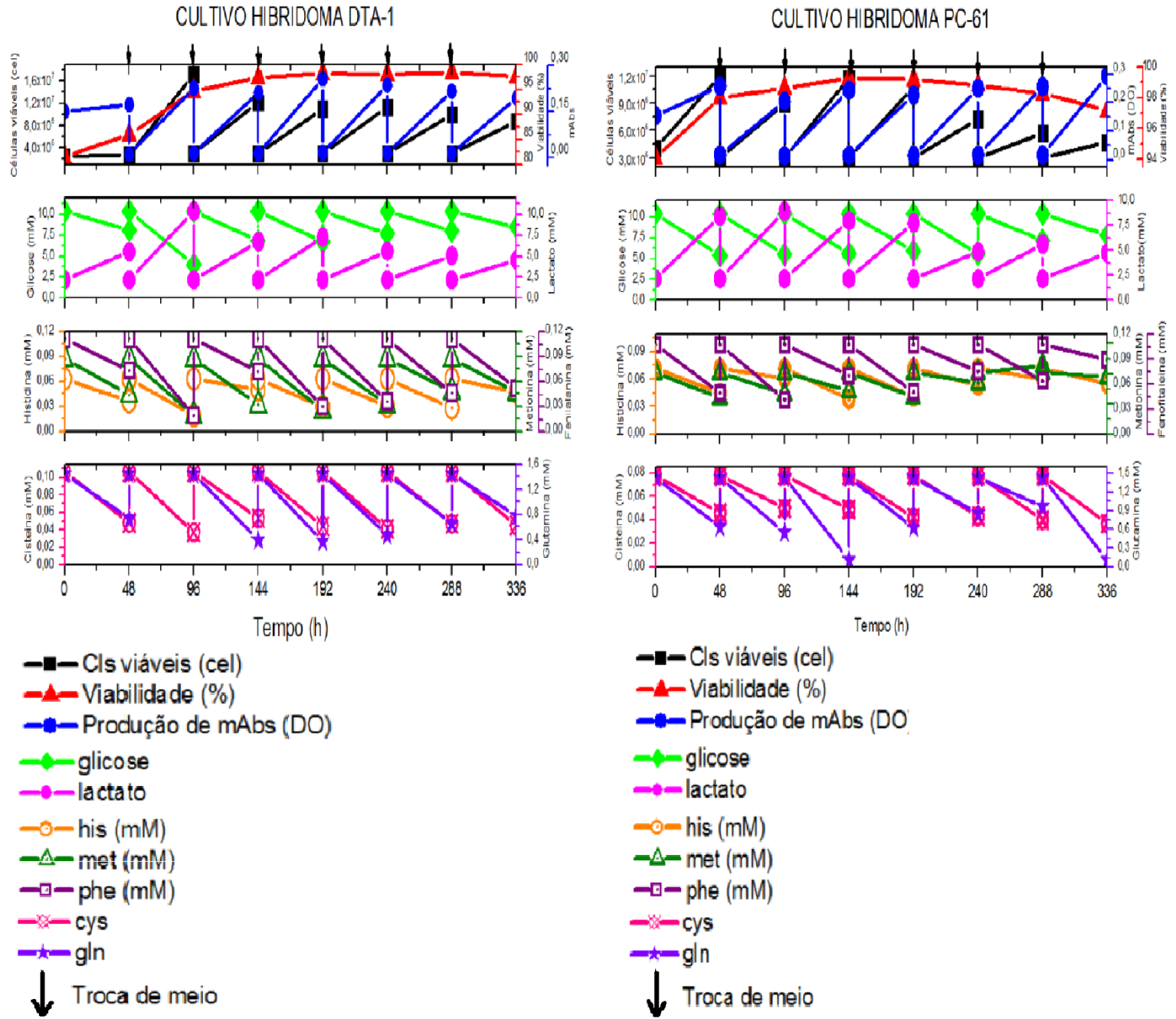
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Resultados do Exp 1:

Esse experimento teve como objetivo analisar de forma comparativa o comportamento dos hibridomas DTA-1 e PC-61 durante o cultivo em meio de cultura padrão RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB em frascos T. Os cultivos dos dois hibridomas foram realizados paralelamente sob mesmas condições de cultivo, ou seja, incubados a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e pH controlado na faixa entre 7,0 e 7,2. As amostras foram coletadas de acordo com o protocolo de amostragem, descrito no item 4.5 deste trabalho, em intervalos de tempo constante de 48 horas em um total de 336 horas de duração do experimento. Vale ressaltar que a cada amostragem todo o meio do cultivo era trocado por um novo meio.

Com as amostras coletadas durante o experimento foram analisadas características da densidade e crescimento celular, bem como consumo e produção de aminoácidos e nutrientes além de produção de anticorpos monoclonais. Na Figura 15, se mostram os resultados obtidos. E observamos que houve um crescimento homogêneo, equilíbrio da viabilidade e consumo de glicose em ambos os cultivos dos hibridoma DTA-1 e PC-61.

Figura 15: Resultados obtidos no Exp1 de cultivo dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.



5.1.1 – Cultivo celular:

- **Densidade celular e velocidade de crescimento:**

Com base nos dados apresentados na Figura 16 e na Tabela 5 pode-se afirmar que em meio RPMI com adição de 10% de SFB, o hibridoma DTA-1 demorou aproximadamente 48 horas para iniciar um crescimento celular expressivo e teve seu maior pico de células viáveis ($1,22 \times 10^7$ células) e velocidade específica de crescimento ($\mu=0,026 \text{ h}^{-1}$) na hora 96 do cultivo, a partir desse ponto a quantidade de células e a velocidade específica de crescimento celular diminuíram e se mantiveram com pequenas oscilações até o final do cultivo na hora 360. Enquanto o hibridoma PC-61 iniciou no cultivo com velocidade específica de crescimento expressivo ($\mu=0,016 \text{ h}^{-1}$) e atingiu sua máxima velocidade de crescimento na hora 144 ($\mu=0,020 \text{ h}^{-1}$) bem como número de células viáveis ($1,18 \times 10^7$ células).

Figura 16: Resultados de crescimento celular obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.

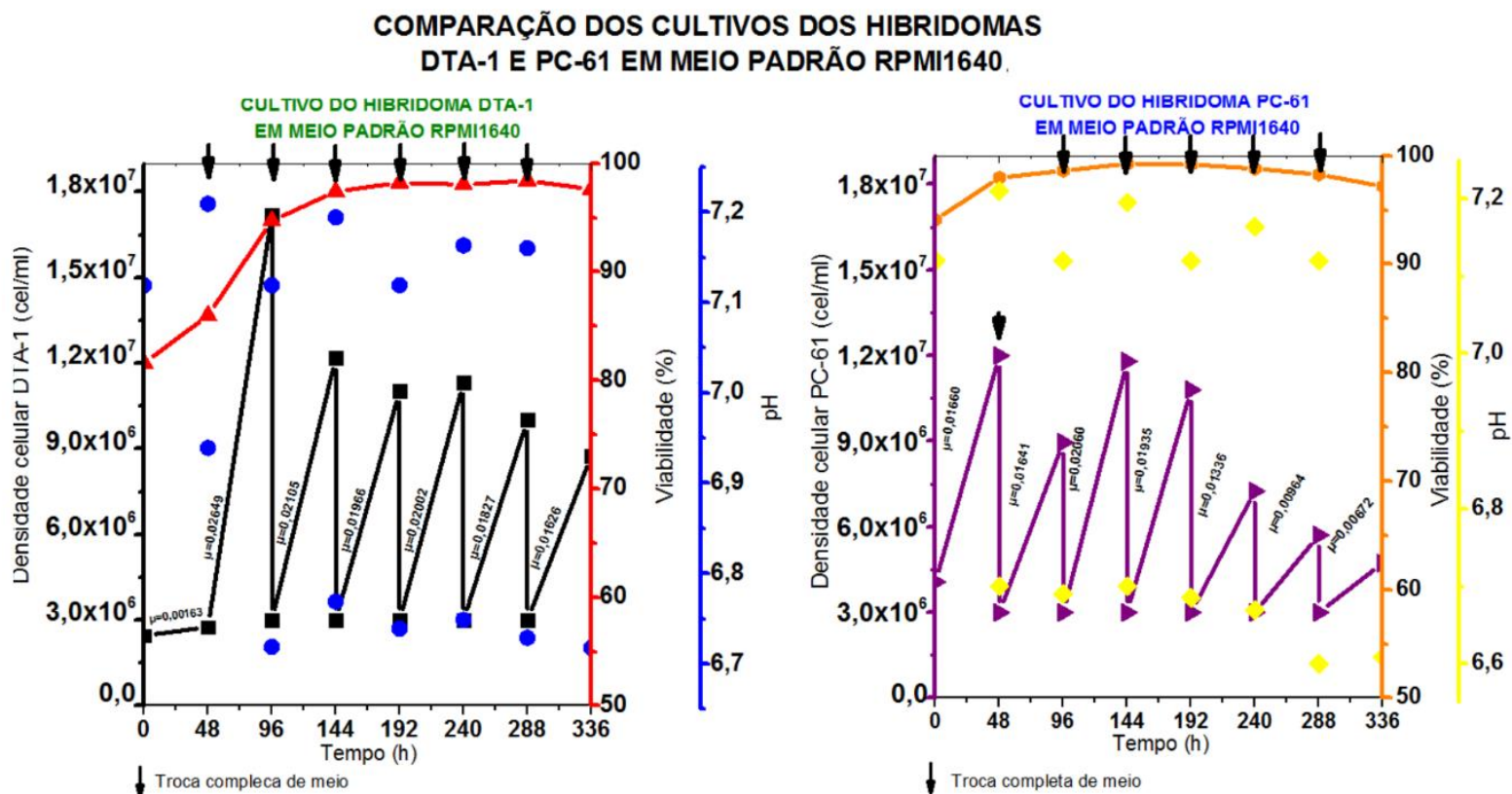


Tabela 5: Velocidades específicas de crescimento (μ) e células viáveis totais obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.

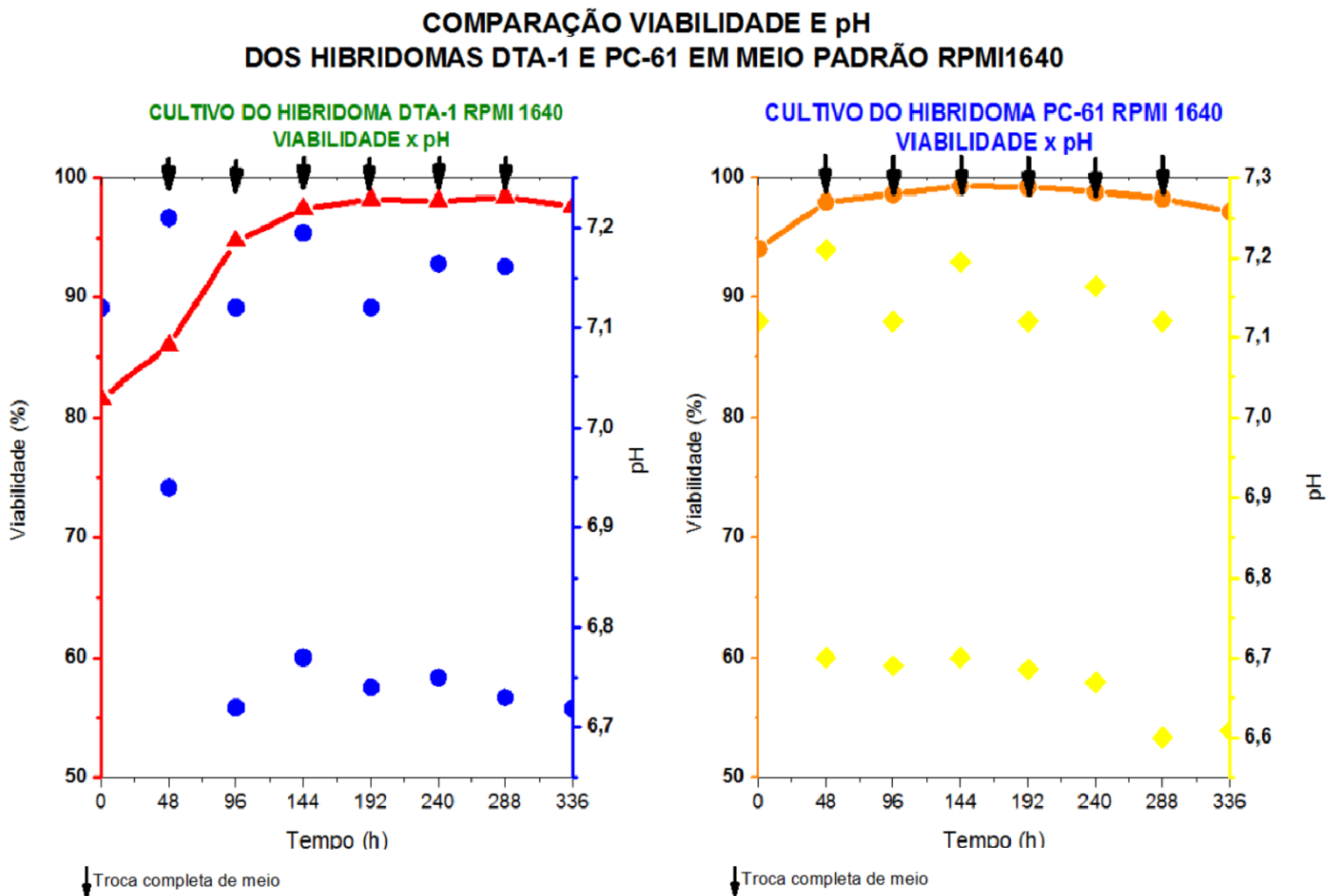
t (h)	μ_{DTA-1} ($\mu=h^{-1}$)	N_{DTA-1} (Células)	μ_{PC-61} ($\mu=h^{-1}$)	N_{PC-61} (Células)
0		$2,46 \times 10^6$		$3,00 \times 10^6$ ^(I)
48	0,001	$2,76 \times 10^6$	0,016	$1,20 \times 10^7$
48^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)
96	0,026*	$1,22 \times 10^7$ *	0,016	$8,96 \times 10^6$
96^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)
144	0,021	$1,10 \times 10^7$	0,020**	$1,18 \times 10^7$ **
144^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)
192	0,019	$1,13 \times 10^7$	0,019	$1,08 \times 10^7$
192^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)
240	0,020	$1,00 \times 10^7$	0,013	$7,25 \times 10^6$
240^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)
288	0,018	$2,46 \times 10^6$	0,009	$5,71 \times 10^6$
288^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)		$3,00 \times 10^6$ ^(I)
360	0,016	$8,76E \times 10^6$	0,006	$4,73 \times 10^6$

Nota: Nas duas primeiras colunas estão os dados do cultivo DTA-1, onde os asteriscos únicos (*) representam os maiores valores de μ e de células totais viáveis no cultivo de DTA-1. As duas últimas colunas contêm os dados do cultivo PC-61, onde os asteriscos duplos (**) representam os maiores valores de μ e de células totais viáveis no cultivo de PC-61. Os dados com a marcação (I) referem-se aos dados do novo inóculo feito após a completa troca de meio a cada 48 horas.

- **Viabilidade celular e pH de cultivo:**

Os dados apresentados na Figura 17 e na Tabela 6 mostram a curva da viabilidade celular e a análise do pH ao longo do cultivo. No cultivo de DTA-1, representado pelo gráfico da Figura 17, a curva de viabilidade celular ao longo das 336 horas de cultivo, tendo sido alcançada a maior viabilidade (98,4% *) na hora 288 do cultivo. Enquanto a maior viabilidade celular atingida pelo cultivo de PC-61 (99,2% **) foi atingido na hora 144 do cultivo. Mesmo com pequenas oscilações, a viabilidade de ambos os hibridomas se mantiveram satisfatória ao longo de todo o cultivo.

Figura 17: Resultados de viabilidade celular e pH obtidos nos cultivo dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% SFB.



Ainda na Figura 17 acima, mostra o resultado da análise de pH, sendo os pontos altos os representantes do pH aqui denominado pH inóculo, ou seja, o valor da aferição do pH do meio inoculado a cada 48 horas nas garrafas e nos pontos baixos o pH aqui denominado sobrenadante, ou seja, o valor da aferição do pH do meio retirado da garrafa após 48 horas de incubação. O pH é uma variável ambiental muito importante, portanto seu monitoramento e controle podem significar o sucesso ou o insucesso para um cultivo celular laboratorial. No experimento em questão, o pH do meio de cultivo foi aferido imediatamente antes de ser colocado em contato com o inoculo celular (pH^I) e novamente aferido após 48 horas de cultivo e incubação monitorada (pH^S). Na Tabela 6 temos as medições dos dois cultivos durante as 336 horas de experimento.

O pH (I) foi o mesmo para os dois cultivos, variando somente o pH (S), sendo que as maiores variações entre pH (I) e pH (S) ocorreram no cultivo do hibridoma PC-61. Na hora 48 do cultivo da DTA-1 o pH (I) = 7,210 foi novamente aferido após 48 horas de cultivo e o valor obtido foi de pH (S) = 6,720, uma redução de aproximadamente 6,8% em relação ao pH(I). Vale a pena notar que nesse caso, a maior redução entre pH (I) e pH (S) ocorreu no mesmo intervalo de tempo que houve a maior velocidade de crescimento ($\mu=0,026 \text{ h}^{-1}$) e resultou na maior densidade de células vivas ($1,22 \times 10^7$ células) do cultivo, como visto na Tabela 5. No cultivo da PC-61 as maiores variações entre pH (I) e pH (S) ocorreram nas horas finais 288 e 336. Onde o pH(I) = 7,16 foi novamente aferido após 48 horas de cultivo e o valor obtido foi de pH (S) = 6,6 uma redução de aproximadamente 7,8% em relação ao pH(I).

Tabela 6: Viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.

T (h)	Viabilidade DTA-1 (%)	pH (I) DTA-1	pH (S) DTA-1	Viabilidade PC-61 (%)	pH (I) PC-61	pH (S) PC-61
0	81,5	7,120		94,0	7,120	
48	85,9		6,94	97,9		6,70
48^(I)		7,210•			7,210	
96	94,7		6,72•	98,6		6,69
96^(I)		7,120			7,120	
144	97,4		6,77	99,2**		6,70
144^(I)		7,195			7,195	
192	98,2		6,74	99,1		6,68
192^(I)		7,120			7,120	
240	98,0		6,75	98,8		6,67
240^(I)		7,164			7,164••	
288	98,4 *		6,73	98,2		6,60••
288^(I)		7,161			7,161••	
360	97,6		6,71	97,1		6,60••

5.1.2 – Metabolismo:

- **Análise de aminoácidos:**

A análise da composição do meio de cultura é muito importante para identificar a necessidade de suplementação do mesmo e para acompanhar o consumo dos aminoácidos

contidos no meio, já que permite um melhor entendimento melhor o comportamento e as necessidades da célula durante seu cultivo. O meio padrão usado neste trabalho foi o meio básico RPMI-1640, foi desenvolvido no ano de 1966 e atualmente é comercializados por diferentes empresas, sendo sua composição conhecida, conforme a Tabela 7.

Tabela 7: Composição do meio de cultivo básico RPMI-1640 com 10% de SFB.

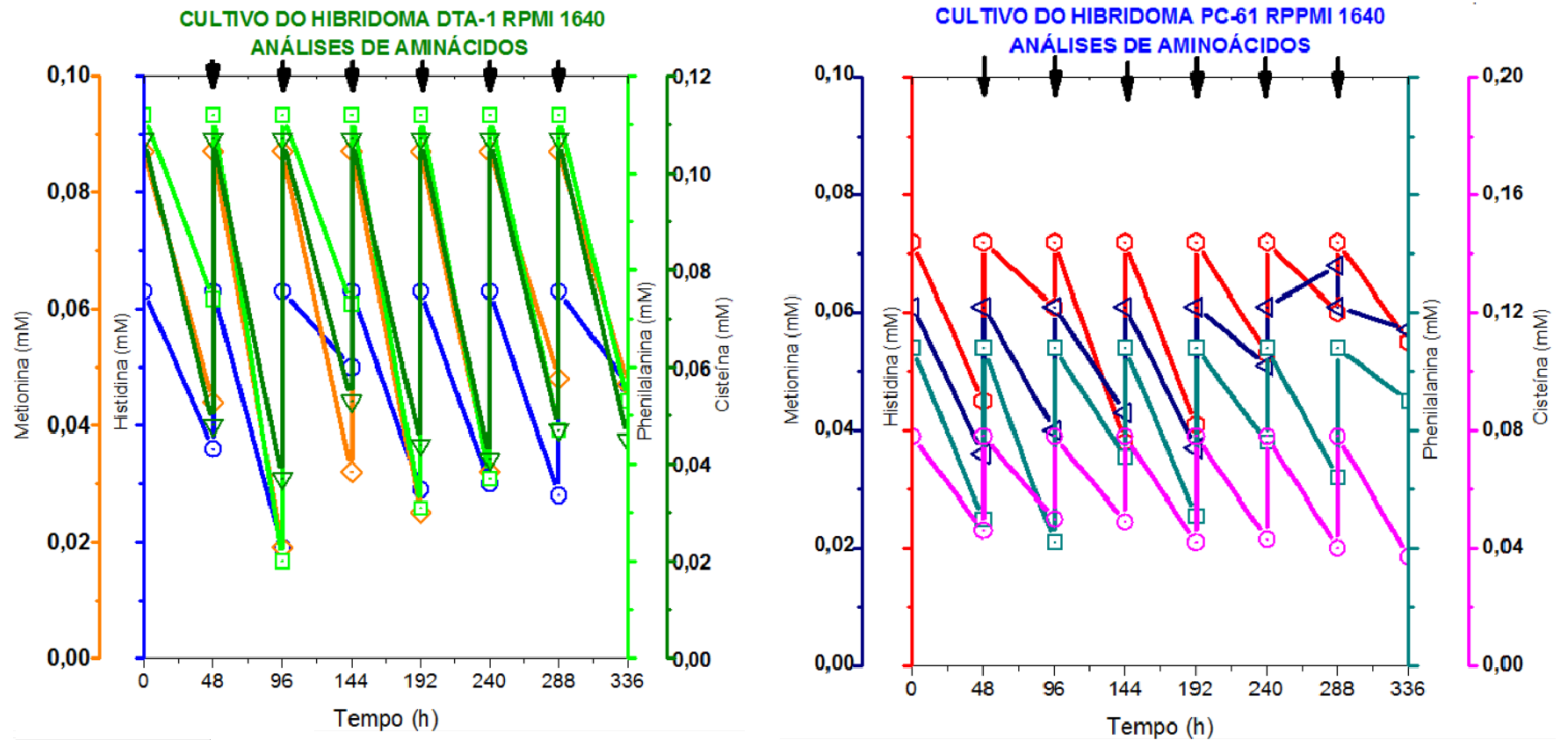
Aminoácido	Sigla	Meio RPMI 1640 (mM)
Ácido aspártico	ASP	0,1503
Ácido glutâmico	GLU	0,136
Asparagina	ASN	0,3787
Serina	SER	0,2857
Glutamina	GLN	2,0547
Glicina	GLY	0,1333
Histidina	HIS	0,0967
Arginina	ARG	1,1494
Trionina	THR	0,168
Alanina	ALA	0,11
Prolina	PRO	0,1739
Tirosina	TYR	0,1286
Valina	VAL	0,1709
Metionina	MET	0,1006
Cisteína	CYS	0,2081
Isoleucina	ILE	0,3816
Leucina	LEU	0,3816
Fenilalanina	PHE	0,0909
Lisina	LIS	0,2739
Glicose	GLI	11,11

Nota: Composição quantitativa em mM dos aminoácidos constituintes dos meios de cultivo RPMI-1640 (fornecido pelo fabricante).

Para analisar o metabolismo foram selecionados os aminoácidos que apresentaram consumo igual ou superior a 50% da concentração inoculada, como é possível observar na Figura 18. Não houve consumo total de nenhum dos aminoácidos em nenhum dos cultivos, sendo que os aminoácidos mais consumidos no Exp1 foram os essenciais histidina, metionina e fenilalanina além do aminoácido não essencial cisteína (Figura 18). Embora não tenham sido exauridos, os aminoácidos em questão participam ativamente da síntese proteica, sendo assim podem estar diretamente associados a produção dos mAbs. Evitar que o consumo atinja níveis críticos pode tornar o cultivo e a produção de mAbs ainda mais efetivos e uma sugestão para atingir tal objetivo seria reduzir o intervalo entre as trocas de meio, fornecendo fonte de nutrientes e aminoácidos às células antes que estes tornem-se escassos.

Figura 18: Resultados das análises de aminoácidos obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.

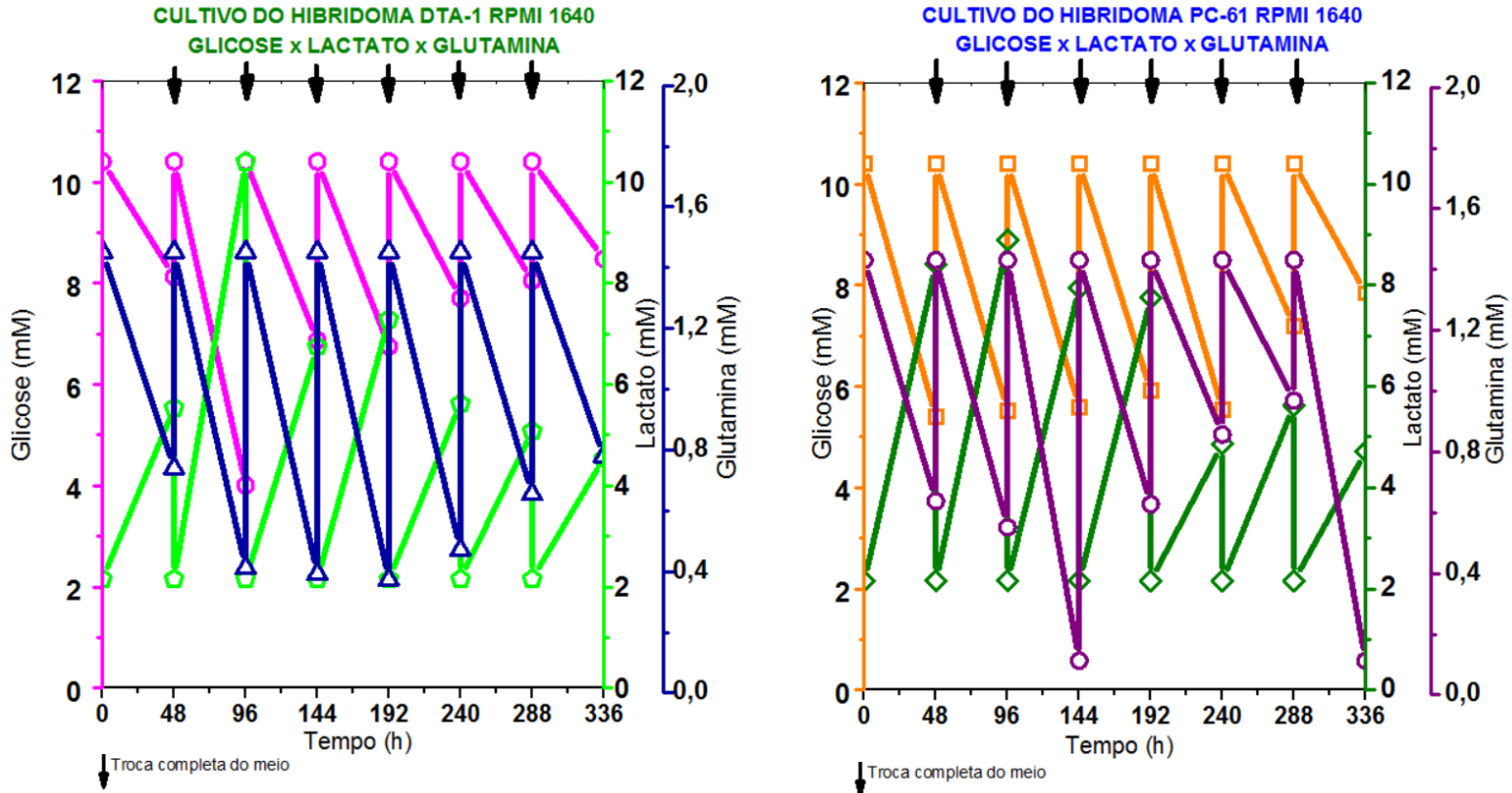
**COMPARAÇÃO DA ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS
DOS HIBRIDOMAS DTA-1 E PC-61 EM MEIO PADRÃO RPMI1640**



Ainda analisando o metabolismo de consumo dos cultivos de hibridomas em meio padrão RPMI-1640 com adição de 10% SFB, é importante a análise do consumo de glicose, produção de lactato e consumo do aminoácido L-glutamina. A Figura 19 nos mostra um consumo de glicose moderado, não atingindo consumo crítico ou esgotamento, assim como a produção de lactato que ocorre proporcionalmente ao consumo de glicose e L-glutamina. Já no cultivo do hibridoma PC-61 podemos observar que na hora 144 e 336 do cultivo a L-glutamina é quase que totalmente consumida o que pode ser um problema uma vez que esse aminoácido é assim como a glicose uma fonte de energia para o ciclo celular. Assim como sugerido para os aminoácidos representados na Figura 18, evitar que a L-glutamina seja esgotada no cultivo é muito importante para tornar o processo de produção de mAbs ainda mais efetivo. Portanto reduzir o intervalo entre as trocas de meio, fornecendo fonte de nutrientes e aminoácidos às células seria uma boa estratégia a ser adotada durante o cultivo.

Figura 19: Resultados das análises de glicose, lactato e glutamina obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.

**COMPARAÇÃO DO GLICOSE x LACTATO x GLUTAMINA
DOS HIBRIDOMAS DTA-1 E PC-61 EM MEIO PADRÃO RPMI1640**



O consumo dos aminoácidos, da glicose e a síntese do lactato representado nos gráficos acima, estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8: Análises dos aminoácidos obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio RPMI-1640 com 10% de SFB.

t (h)	DTA-1							PC-61						
	His mM	Met mM	Phe mM	Cys mM	Gln mM	Glicose mM	Lactato mM	His mM	Met mM	Phe mM	Cys mM	Gln mM	Glicose mM	Lactato mM
0	0,063	0,087	0,112	0,107	1,452	10,4	2,16	0,072	0,061	0,108	0,078	1,431	10,4	2,16
48	0,036	0,044	0,074	0,048	0,74	8,13	5,54	0,045	0,036	0,05	0,046	0,638	5,39	8,41
48 ^(I)	0,063	0,087	0,112	0,107	1,452	10,4	2,16	0,072	0,061	0,108	0,078	1,431	10,4	2,16
96	0,019	0,019	0,02	0,037	0,412	4,01	10,4	0,061	0,04	0,042	0,05	0,552	5,52	8,89
96 ^(I)	0,063	0,087	0,112	0,107	1,452	10,4	2,16	0,072	0,061	0,108	0,078	1,431	10,4	2,16
144	0,05	0,032	0,073	0,053	0,392	6,87	6,75	0,038	0,043	0,071	0,049	0,113	5,59	7,95
144 ^(I)	0,063	0,087	0,112	0,107	1,452	10,4	2,16	0,072	0,061	0,108	0,078	1,431	10,4	2,16
192	0,029	0,025	0,031	0,044	0,373	6,75	7,29	0,041	0,037	0,051	0,042	0,628	5,91	7,75
192 ^(I)	0,063	0,087	0,112	0,107	1,452	10,4	2,16	0,072	0,061	0,108	0,078	1,431	10,4	2,16
240	0,03	0,032	0,037	0,041	0,471	7,7	5,62	0,053	0,051	0,076	0,043	0,857	5,54	4,86
240 ^(I)	0,063	0,087	0,112	0,107	1,452	10,4	2,16	0,072	0,061	0,108	0,078	1,431	10,4	2,16
288	0,028	0,048	0,047	0,047	0,655	8,05	5,08	0,06	0,068	0,064	0,04	0,969	7,19	5,62
288 ^(I)	0,063	0,087	0,112	0,107	1,452	10,4	2,16	0,072	0,061	0,108	0,078	1,431	10,4	2,16
360	0,047	0,047	0,053	0,045	0,779	8,48	4,54	0,055	0,057	0,09	0,037	0,113	7,84	4,72

Nota: Nas sete primeiras colunas estão os dados do cultivo DTA-1 e as sete últimas colunas estão os dados do cultivo PC-61. Os dados com a marcação (I) referem-se aos dados do novo inóculo feito após a completa troca de meio a cada 48 horas.

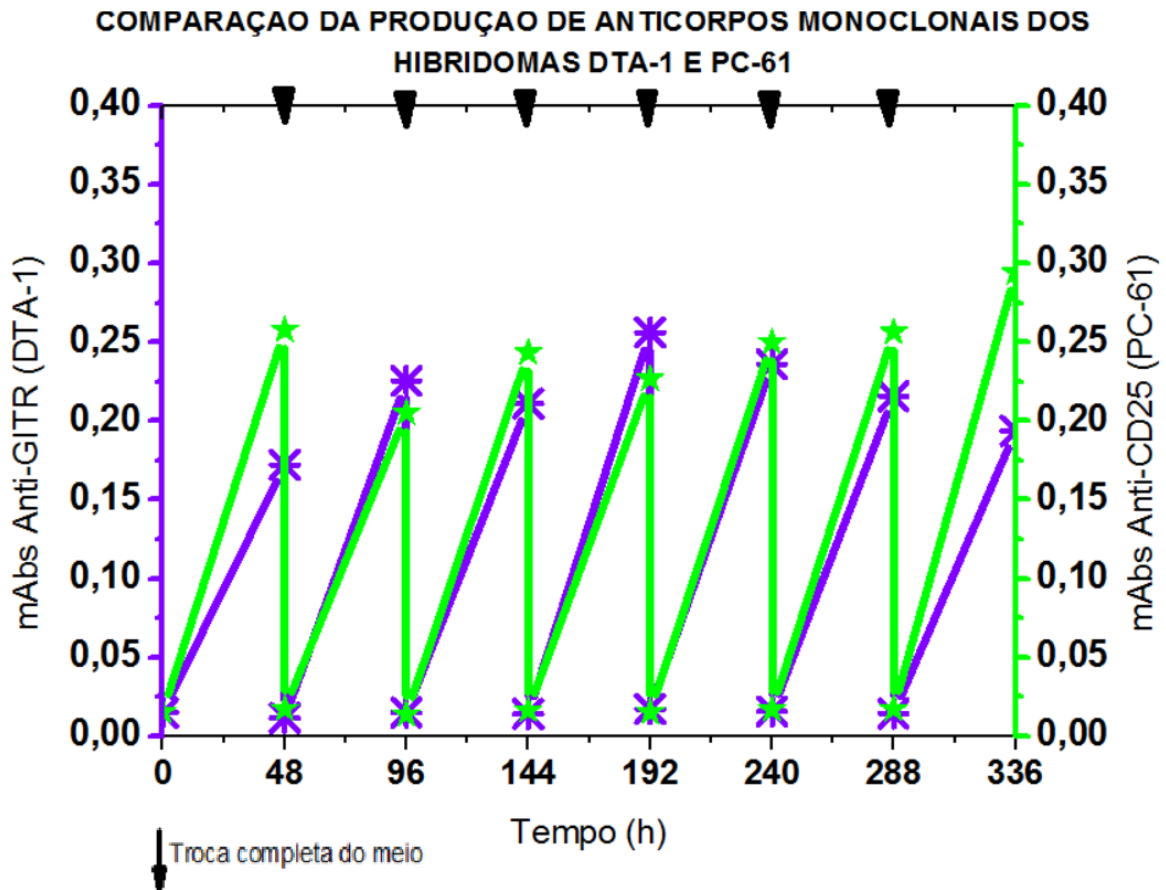
- **Análise de produção de anticorpos monoclonais:**

Os resultados obtidos pela quantificação em densidade óptica da produção de mAbs produzidos por cada um dos cultivos de hibridomas, estão apresentados na Figura 20. A quantificação da produção de mAbs ocorreu de acordo com o protocolo descrito no item 4.6.4 deste trabalho, e os resultados foram medidos em densidade óptica (DO). Como já era esperado, mediante a resultados de estudos anteriores realizados no Laboratório de Tecnologias de Cultivos Celulares (LATECC), ambos os hibridomas em estudos produziam poucas quantidades de mAbs, cultivos em frascos T, como podemos ver nos dados mostrados na Tabela 9.

A quantificação dos mAbs no Exp1 reforçou essa expectativa de baixa produção em frasco T e além disso, demonstrou uma pequena diferença no comportamento de produção de mAbs entre as células. O hibridoma DTA-1 apresenta um sutil aumento na produção nas primeiras horas do cultivo e atinge a sua maior produção na hora 192 (DO=0,256) e desse ponto

até o final do experimento a produção somente reduz até a hora 336 (DO=0,193) final do experimento. No caminho oposto a produção do hibridoma PC-61 não apresenta um padrão muito claro no início do cultivo até a hora 192 (DO=0,226) desse ponto até a hora 336 (DO=0,294) a produção somente aumenta.

Figura 20: Resultados da produção de mAbs obtidos nos cultivos dos hibridomas DTA-1 e PC-61 em frascos T meio RPMI-1640 com 10% de SFB.



Nota: Na esquerda os resultados da análise de produção de mAbs anti-GITR no cultivo do hibridoma DTA-1 e na direita resultados da produção de mAbs anti-CD25 no cultivo do hibridoma PC-61.

Ao longo de todo o experimento a produção do mAb anti-CD25 produzido pelo hibridoma PC-61 foi maior que a produção do mAb anti-GITR produzido pelo hibridoma DTA-1, embora estatisticamente não significativa, essa diferença já havia sido observada em estudos anteriores realizados em nosso laboratório.

Tabela 9: Produção de mAbs obtidos nos cultivos dos hibridoma DTA-1 e PC-61 em frascos T em meio padrão RPMI-1640 com 10% de SFB.

t	DO_{DTA-1}	DO_{PC-61}
(h)		
0	0,014*	0,015
48	0,172*	0,257
48^(I)	0,011	0,017
96	0,225*	0,205
96^(I)	0,015	0,013
144	0,211	0,243
144^(I)	0,014	0,016
192	0,256	0,226**
192^(I)	0,017	0,015
240	0,236	0,250**
240^(I)	0,015	0,016
288	0,215	0,256**
288^(I)	0,014	0,017
336	0,193	0,294**

Nota: Os asteriscos únicos (*) referem-se aos valores de produção que aumentaram sequencialmente na produção do mAb anti-GITR. Os asteriscos únicos (**) referem-se aos valores de produção que apresentaram subsequente aumento na produção do mAb anti-CD25.

Com base nos dados de cultivo apresentados neste item bem como em trabalhos anteriormente realizados em nosso laboratório, o hibridoma selecionado para continuar sendo analisado neste trabalho foi o hibridoma PC-61.

5.2 – Resultados do Exp 2:

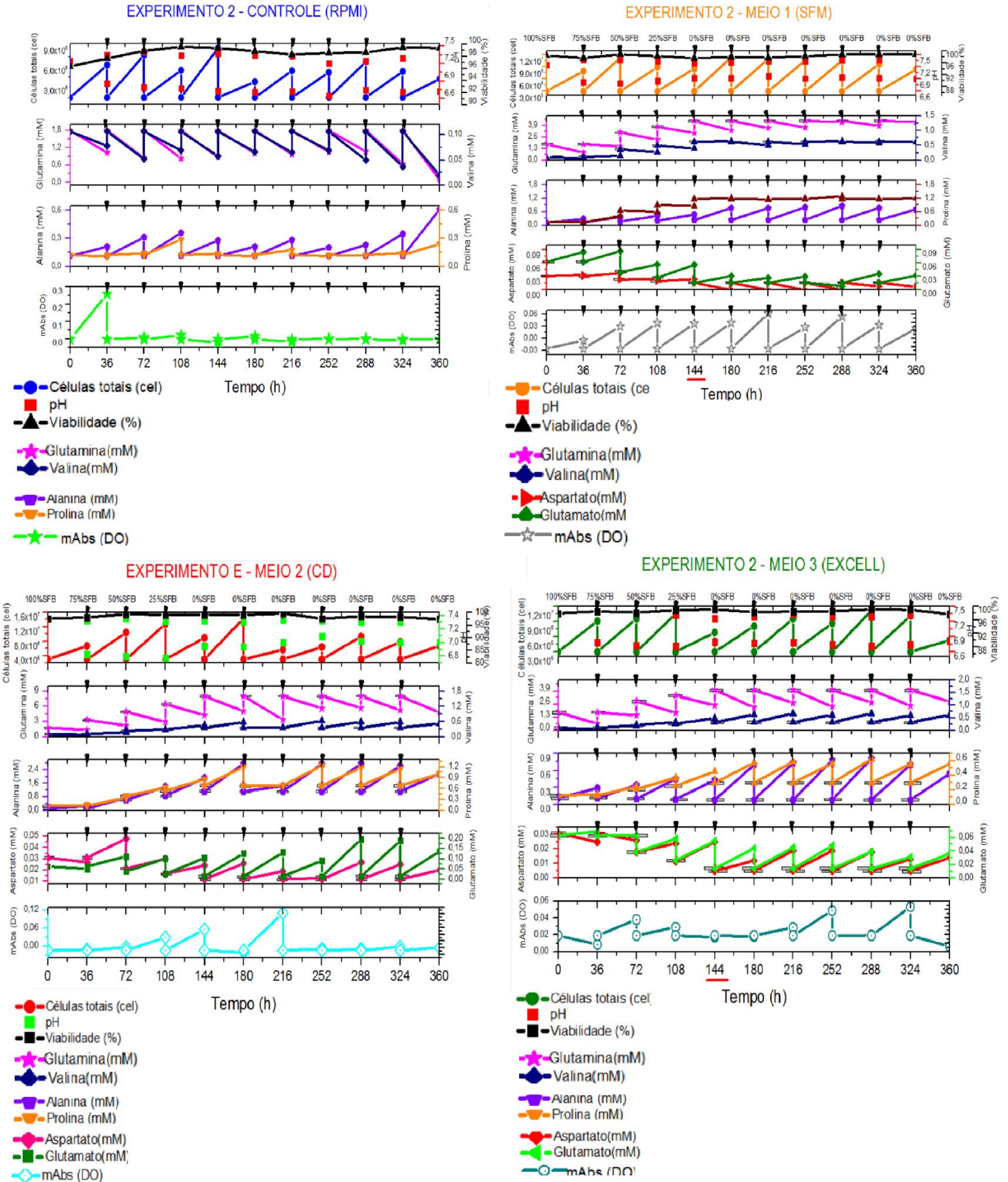
O objetivo principal desse experimento foi analisar uma metodologia eficiente de adaptação do cultivo dos hibridoma PC-61, selecionado no Exp 1 para dar continuidade ao trabalho, utilizando três meios comerciais livres de suplementação com SFB, cultivado em frasco T. Como representado na Figura 13 do item 4.8 deste trabalho, o experimento consistiu na realização simultânea de quatro cultivos do hibridoma PC-61. Inicialmente todos os cultivos com meio de cultura padrão controle RPMI-1640 suplementado com 10% SFB e quando os cultivos destinados a adaptação atingiram 90% de viabilidade celular iniciaram-se as adaptações sequenciais, reduzindo a porcentagem de meio controle e aumentando a porcentagem dos respectivos meios comerciais livres de SFB (SFM, CD e EXCELL620) sob

as mesmas condições de cultivo, ou seja, incubados a 37°C com 5% de CO₂ e pH controlado na faixa entre 7,2 e 7,3.

As amostras foram coletadas de acordo com o protocolo de amostragem, descrito no item 4.5 deste trabalho. Baseado nos resultados obtidos no experimento anterior os intervalos de tempo entre a retirada das amostras foram reduzidos e estipulado a cada 36 horas, em um total de 360 horas de experimento e o valor médio do pH (I) foi estipulado entre 7,2 e 7,3 visando evitar que o pH (S) atingisse valores muito baixos após o cultivo. Vale ressaltar que a cada amostragem todo o meio do cultivo era trocado por um novo meio, seguindo o protocolo de adaptação sequencial.

Com as amostras coletadas durante o experimento foram analisadas características de cultivo como densidade e velocidade específica de crescimento celular, bem como consumo de aminoácidos e nutrientes além de produção de anticorpos monoclonais, como visto na Figura 21 em que se apresenta uma visão geral dos resultados obtidos. E observamos que houve um crescimento homogêneo, equilíbrio da viabilidade e consumo de glicose no cultivo do hibridoma PC-61 em todos os meios analisados. Sendo que a maior variação no comportamento ocorreu no consumo de aminoácidos, como no caso do aspartato esgotado meio SFM e produzido nos meios CD e EXCELL620. A produção de mAb também ocorreu de forma diferenciada entre os três meios livres de SFB.

Figura 21: Resultados obtidos no Exp2 de cultivo do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.



5.2.1 – Cultivo celular:

- **Densidade celular e velocidade de crescimento:**

É possível observar pela Figura 22 que os cultivos em processo de adaptação, passaram a ser cultivados em meios totalmente sem suplementação de SFB a partir da hora 144, entretanto foram mantidos com seus respectivos meios livres de SFB por mais 216 horas com o objetivo de observar o comportamento do hibridoma por um período mais longo de tempo.

Figura 22: Resultados de crescimento celular obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.

ADAPTAÇÃO DO HIBRIDOMA PC-61 AOS MEIOS LIVRES DE SFB ANÁLISE DOS CULTIVOS

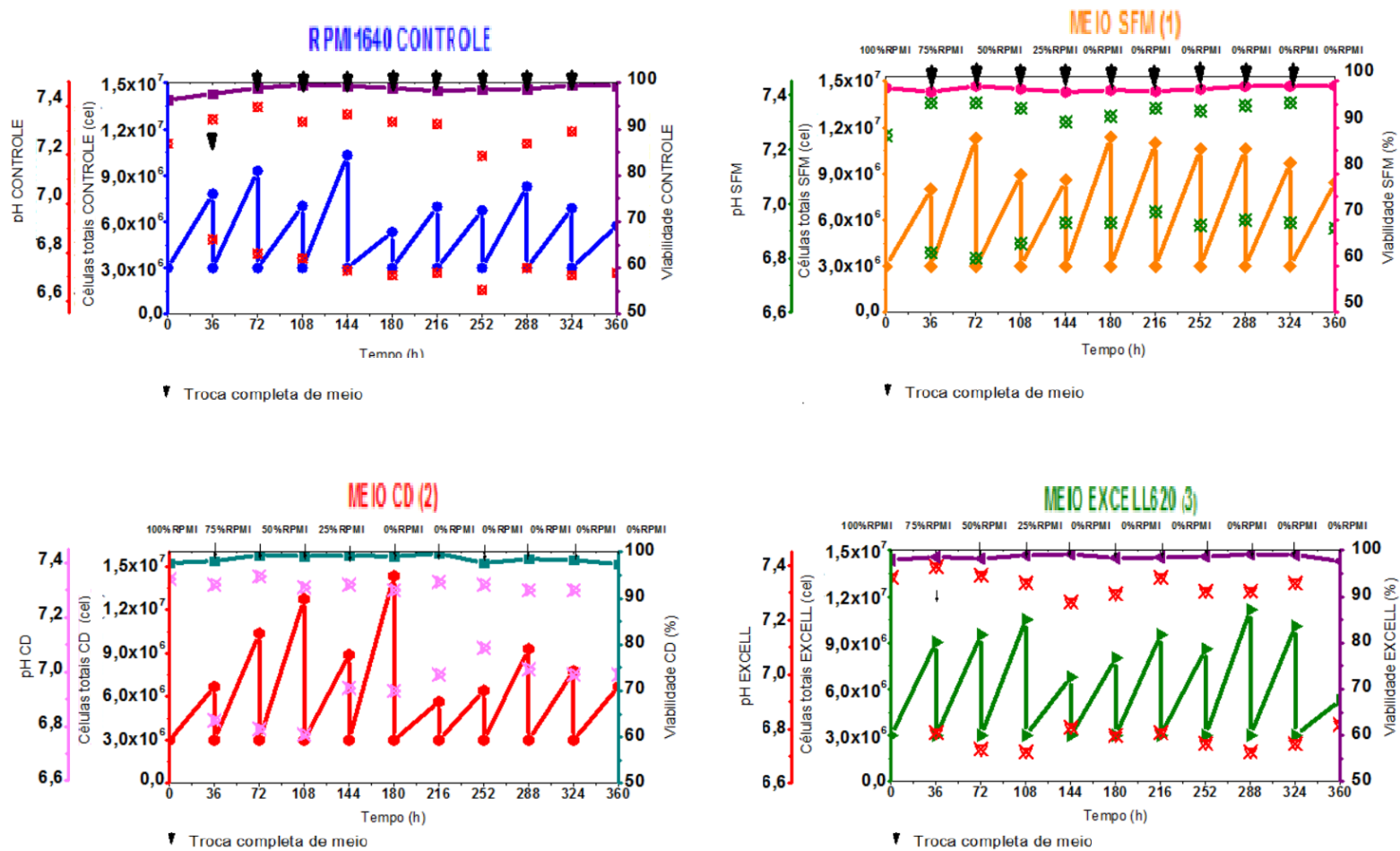


Tabela 10: Velocidades específicas de crescimento (μ) e células viáveis totais obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres SFB.

t (h)	MEIO RPMI (CONTROLE)		MEIO SFM		MEIO CD		MEIO EXCELL620	
	μ (h ⁻¹)	(Células)	μ (h ⁻¹)	(Células)	μ (h ⁻¹)	(Células)	μ (h ⁻¹)	(Células)
0		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
36	0,024	7,80×10 ⁶	0,025	7,99×10 ⁶	0,021	6,68×10 ⁶	0,028	9,03×10 ⁶
36 ^(I)		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
72	0,028	9,29×10 ⁶	0,032*	1,12×10 ⁷ *	0,031	1,03×10 ⁷	0,029	9,52×10 ⁶
72 ^(I)		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
108	0,022	7,02×10 ⁶	0,028	8,91×10 ⁶	0,034	1,27×10 ⁷	0,031	1,05×10 ⁷
108 ^(I)		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
144	0,030*	1,03×10 ⁷ *	0,027	8,5×10 ⁶	0,028	8,89×10 ⁶	0,021	6,78×10 ⁶
144 ^(I)		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
180	0,015	5,33×10 ⁶	0,032*	1,13×10 ⁷ *	0,036*	1,43×10 ⁷ *	0,025	8,02×10 ⁶
180 ^(I)		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
216	0,022	6,97×10 ⁶	0,032	1,09×10 ⁷	0,017	5,65×10 ⁶	0,007	9,52×10 ⁶
216 ^(I)		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
252	0,021	6,73×10 ⁶	0,031	1,05×10 ⁷	0,020	6,41×10 ⁶	0,027	8,59×10 ⁶
252 ^(I)		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
288	0,026	8,28×10 ⁶	0,031	1,06×10 ⁷	0,028	9,3×10 ⁶	0,032*	1,11×10 ⁷ *
288 ^(I)		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
324	0,021	6,87×10 ⁶	0,029	9,67×10 ⁶	0,025	7,77×10 ⁶	0,030	1,00×10 ⁷
324 ^(I)		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶		3,00×10 ⁶
360	0,017	5,74×10 ⁶	0,026	8,43×10 ⁶	0,021	6,69×10 ⁶	0,015	5,28×10 ⁶

Nota: Nas duas colunas seguintes estão os dados do cultivo PC-61 em meio SFM livre de SFB. Nas terceira coluna estão os dados do cultivo PC-61 em meio CD livre de SFB. Na última coluna estão os dados do cultivo PC-61 em meio EXCELL 620 livre de SFB. Os asteriscos (*) representam os maiores valores de μ e de células totais viáveis em cada cultivo. Os dados com a marcação (I) referem-se aos dados do novo inoculo feito após a completa troca de meio a cada 36 horas.

O cultivo controle foi realizado para servir como um parâmetro para os demais cultivos, e nesse cultivo, os resultados mostrados na Figura 22 assim como na Tabela 10, a maior velocidade específica de crescimento ocorreu na hora 144 ($\mu=0,030$ h⁻¹) atingindo a maior quantidade de células viáveis totais no cultivo ($1,03 \times 10^7$ células). No cultivo em adaptação ao meio SFM, as maiores velocidades específicas de crescimento ocorreram na hora 72 ($\mu=0,032$ h⁻¹) ($1,12 \times 10^7$ células) quando o meio de cultivo era constituído de 75% de meio padrão RPMI 1640 com adição de 10% de SFB e 25% de meio SFM livre de SFB. O segundo maior ponto de velocidade específica de crescimento ocorreu na hora 180 ($\mu=0,032$ h⁻¹) e maior quantidade de células viáveis totais no cultivo ($1,13 \times 10^7$ células) 36 horas após a adição de meio de cultura composto exclusivamente por meio SFM livre de SFB.

No cultivo em adaptação ao meio CD, a maior velocidade específica de crescimento também ocorreu na hora 180 ($\mu=0,036$) com maior quantidade de células viáveis totais no cultivo ($1,43 \times 10^7$) 36 horas após a adição de meio de cultura composto exclusivamente

por meio CD livre de SFB. O cultivo em adaptação ao meio EXCELL 620, apresentou maior velocidade específica de crescimento no final do cultivo na hora 324 ($\mu=0,032 \text{ h}^{-1}$) e maior quantidade de células viáveis totais ($1,11 \times 10^7$ células). O hibridoma PC-61 foi cultivado nos três meios de cultivo livres de SFB, e as células se mantiveram crescendo mesmo após a hora 144 quando o SFB foi completamente eliminado dos três cultivos em adaptação.

- **Viabilidade celular e pH de cultivo:**

Na Figura 23 e na Tabela 11 pode-se ver que no cultivo controle a maior viabilidade celular ocorreu na hora 108 (99,5%) e a maior variação entre o pH (I) e o pH (S) ocorreu entre as horas 216 e 252 onde o pH (I)= 7,33 caiu para pH (S)= 6,65. No cultivo em adaptação ao meio SFM, a maior viabilidade celular (98,9%) foi atingida na hora 72 quando o meio de cultivo era constituído de 75% de meio padrão RPMI 1640 com adição de 10% de SFB e 25% de meio SFM livre de SFB. A maior variação de pH ocorreu no mesmo intervalo de tempo, onde o pH (I)=7,37 caiu para pH (S)=6,8. Observando a Tabela 10, percebe-se que foi nesse mesmo intervalo de tempo que o respectivo cultivo atingiu sua maior velocidade específica de crescimento ($\mu=0,032 \text{ h}^{-1}$) e sua maior quantidade de células viáveis ($1,12 \times 10^7$ células).

No cultivo em adaptação ao meio CD, a maior viabilidade também ocorreu na hora 72 (99,3%) com maior variação de pH (I)= 7,36 para pH (S)=6,78 na hora 108 onde o meio de cultura era composto por 50% de meio padrão RPMI-1640 com 10% SFB controle com 50% de meio CD livre de SFB. O cultivo em adaptação ao meio EXCELL 620, teve maior viabilidade celular (99,1%) na hora 288 com maior variação no pH (I)= 7,39 para pH (S)= 6,72 na hora 72.

Figura 23: Resultados de viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.

**ADAPTAÇÃO DO HIBRIDOMA PC-61 AOS MEIOS LIVRES DE SFB
ANÁLISE DE VIABILIDADE x pH**

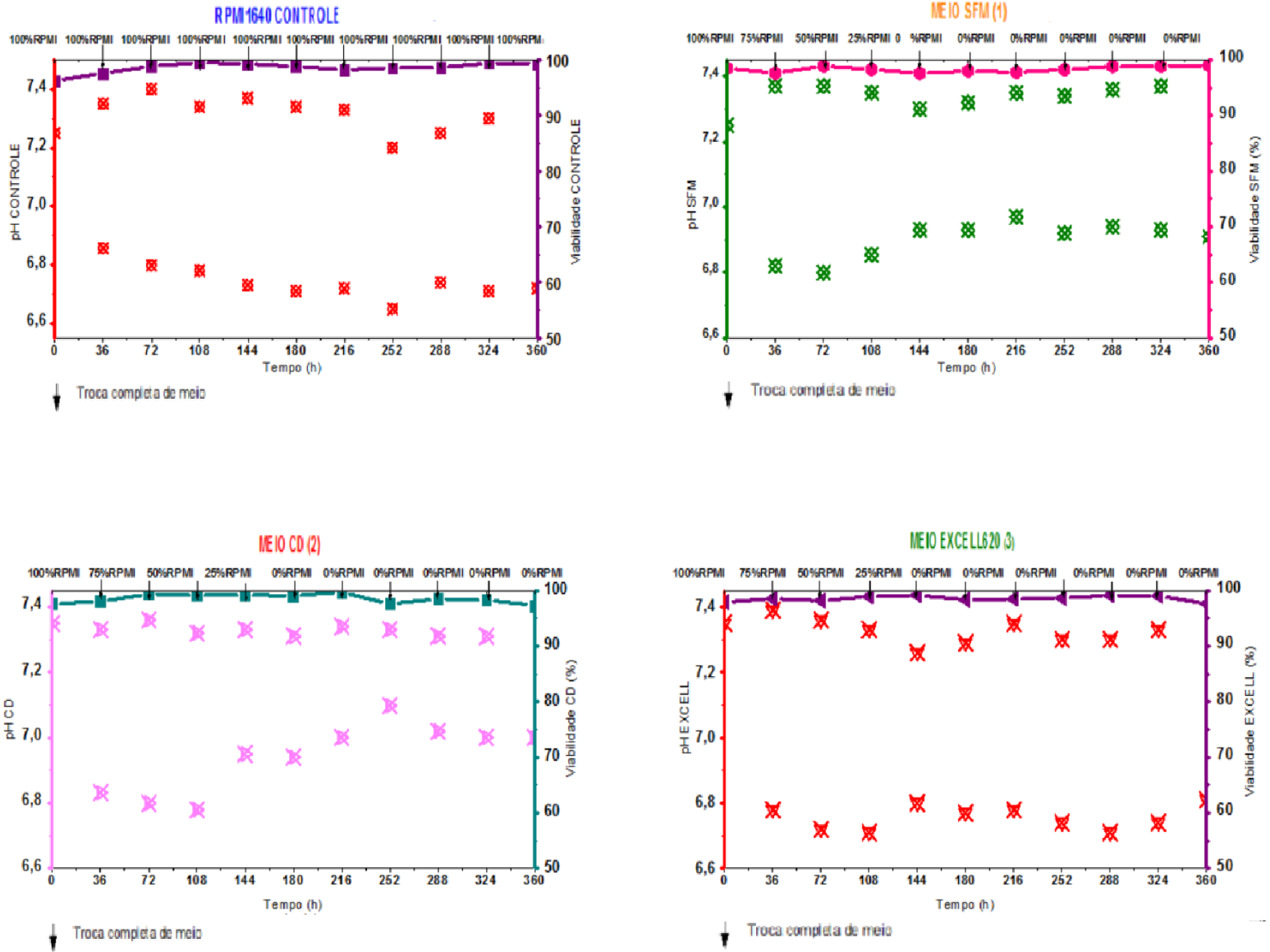


Tabela 11: Viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.

t (h)	MEIO RPMI CONTROLE			MEIO SFM			MEIO CD			MEIO Excell620		
	Viabilidade (%)	pH ^(I)	pH ^(S)	Viabilidade (%)	pH ^(I)	pH ^(S)	Viabilidade (%)	pH ^(I)	pH ^(S)	Viabilidade (%)	pH ^(I)	pH ^(S)
0	96,3	7,25		98,5	7,25		97,6	7,35		97,9	7,35	
36	97,6		6,85	97,6		6,82	98,0		6,83	98,5		6,78
36 ^(I)		7,35			7,37*			7,33			7,39*	
72	98,8		6,79	98,9*		6,8*	99,3*		6,8	98,1		6,72*
72 ^(I)		7,4			7,37			7,36*			7,36	
108	99,5*		6,78	98,3		6,85	99,1		6,78*	98,9		6,71
108 ^(I)		7,34			7,35			7,32			7,33	
144	99,3		6,73	97,6		6,93	99,2		6,95	99,1		6,8
144 ^(I)		7,37			7,3			7,32			7,26	
180	98,8		6,71	98,0		6,93	99,0		6,94	98,3		6,77
180 ^(I)		7,34			7,3			7,31			7,29	
216	98,2		6,72	97,8		6,97	99,6		7	98,4		6,78
216 ^(I)		7,33*			7,35			7,34			7,35	
252	98,5		6,65*	98,2		6,92	97,6		7,09	98,6		6,74
252 ^(I)		7,2			7,34			7,33			7,3	
288	98,6		6,74	98,8		6,94	98,4		7,02	99,1*		6,71
288 ^(I)		7,25			7,36			7,31			7,3	
324	99,4		6,71	98,8		6,93	98,2		7	99,0		6,74
324 ^(I)		7,3			7,37			7,31			7,33	
360	99,3		6,72	98,8		6,91	97,3		7	97,6		6,81

Nota: Onde os asteriscos (*) representam o maior valor de viabilidade celular e de variação do pH nos respectivos cultivos. Os dados com a marcação (I) referem-se aos dados do novo inóculo feito após a completa troca de meio a cada 36 horas. A coluna pH(I) representa os valores de pH aferidos no meio de cultura imediatamente antes a produção do inóculo na garrafa de cultivo, enquanto que pH(S) representa os valores de pH aferidos do meio de cultivo retirado da garrafa após 36 horas de cultivo.

5.2.2 – Metabolismo:

- **Análise de aminoácidos:**

A análise da composição do meio de cultura é muito importante para identificar a necessidade de suplementação do mesmo e para acompanhar o consumo dos aminoácidos contidos no meio entendendo melhor o comportamento e as necessidades da célula durante seu cultivo. O meio padrão usado nesse trabalho foi o meio RPMI-1640, foi desenvolvido no ano de 1966 e atualmente é comercializados por diferentes empresas, sendo sua composição divulgada. Em contrapartida, os demais meios utilizados nesse trabalho, possuem patente em vigência e portanto não tem suas composições divulgadas, dessa forma estimamos sua composição inicial a partir de uma análise de cromatografia líquida de alta performance

(HPLC). Os valores dos aminoácidos analisados e divulgados encontram-se na Tabela 12 a baixo e ajudarão na discussão dos resultados obtidos com as amostras no cultivo de adaptação deste trabalho.

Tabela 12: Análise da composição dos meios livres de SFB utilizados na adaptação do hibridoma PC-61.

Aminoácido	Sigla	Meio RPMI 1640 (mM)	Meio SFM (mM)	Meio CD (mM)	Meio Excell 620 (mM)
Ácido aspártico	ASP	0,1503	0,016	0,012	0,005
Ácido glutâmico	GLU	0,136	0,016	0,014	0,014
Asparagina	ASN	0,3787	0,15	0,506	0,078
Serina	SER	0,2857	0,151	0,482	0,072
Glutamina	GLN	2,0547	4,407	0,06	0,14
Glicina	GLY	0,1333	0,097	0,059	0,063
Histidina	HIS	0,0967	0,093	0,062	0,09
Arginina	ARG	1,1494	0,556	0,372	0,612
Trionina	THR	0,168	0,384	0,178	0,284
Alanina	ALA	0,11	0,224	1,128	0,081
Prolina	PRO	0,1739	1,173	0,684	0,297
Tirosina	TYR	0,1286	0,3	0,124	0,171
Valina	VAL	0,1709	0,621	0,351	0,327
Metionina	MET	0,1006	0,145	0,069	0,061
Cisteina	CYS	0,2081	0,111	0,02	0,046
Isoleucina	ILE	0,3816	0,664	0,358	0,32
Leucina	LEU	0,3816	0,723	0,561	0,363
Fenilalanina	PHE	0,0909	0,364	0,203	0,175
Lisina	LIS	0,2739	0,444	0,267	0,219
Glicose	GLI	11,11	21,0	19,7	18,7

Nota: Composição quantitativa em mM dos aminoácidos constituintes dos meios de cultivo RPMI-1640 (fornecido pelo fabricante), SFM, CD e EXCELL620 (quantificados por cromatografia líquida), utilizados na adaptação dos hibridomas PC-61.

O hibridoma apresentou comportamentos bastante diferentes no consumo de aminoácidos nos diferentes meios analisados neste trabalho, o que pode estar relacionado com a diferenciada composição e concentração de nutrientes em cada um dos meios. Para a análise em gráficos foram selecionados os aminoácidos com maiores consumo em cada um dos quatro meios. Analisando a Figura 24 abaixo, percebe-se que no cultivo controle o aminoácido valina é o que mais se aproxima do esgotamento na última hora do cultivo (0,02mM). O aminoácido aspartato foi produzido ao longo de todo o cultivo, com um grande pico de síntese de aspartato na hora 216.

Os resultados dos cultivos de adaptação aos meios livres de SFB são representados na Figura 24 com símbolos vazios representando a presença de meio padrão RPMI-1640 com 10% SFB e símbolos cheios representando os respectivos meios livres de SFB.

Os símbolos semi preenchidos representam os pontos onde a adaptação estava ocorrendo e haviam misturas de meios (hora 36,72 e 108). A medida em que o meio padrão é reduzido e o meio de estudo é adicionado no cultivo o ponto de partida da análise varia, diferente do cultivo controle que por manter sempre o mesmo meio tem sempre a mesma concentração de aminoácidos sendo adicionado ao cultivo a cada 36 horas.

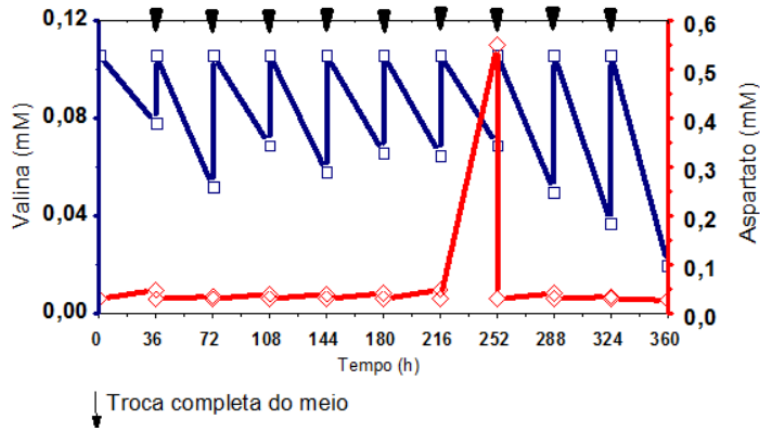
Na hora 144 o cultivo adaptativo do meio SFM tem seu máximo consumo do aminoácido aspartato, que é esgotado por quatro pontos seguidos, da hora 144 até a hora 288, lembrando que o meio é completamente trocado a cada 36 horas portanto todo aminoácido aspartato adicionado foi totalmente consumido nesse intervalo de tempo. Tal comportamento pode estar relacionado ao fato de que o meio SFM, segundo a cromatografia líquida, apresenta em sua composição inicial uma concentração de aspartato cerca de 10 vezes menor que o encontrado na composição do meio padrão RPMI-1640. Uma possível forma de evitar esse alto consumo e tornar o cultivo mais produtivo em termos de mAbs seria suplementar o meio com o esse aminoácido ou reduzir o intervalo de troca de meio renovando assim a fonte desse aminoácido antes que esse se esgote.

No cultivo adaptativo ao meio CD diferente dos cultivos anteriores o hibridoma PC-61 consumiu menos aminoácidos em geral. Não houve esgotamento de nenhum aminoácido durante todo o experimento. O comportamento do hibridoma nesse meio foi bastante diferenciado pois além de não esgotar o consumo de nenhum aminoácido, houve a síntese dos mesmos. Esse comportamento pode ocorrer em função da composição e/ou componentes específicos do meio comercial.

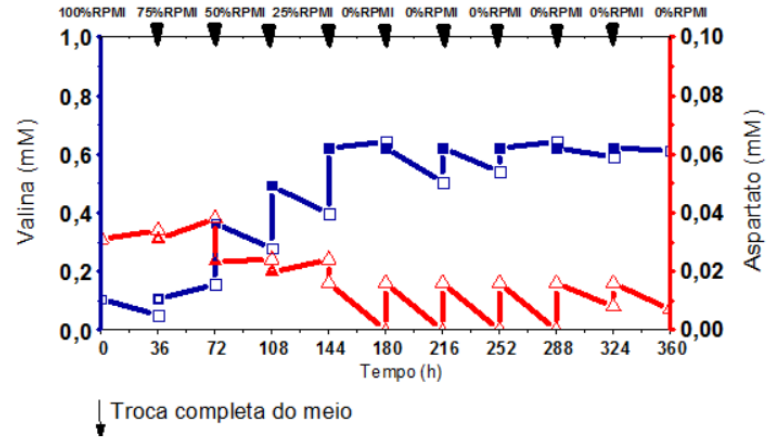
Figura 24: Resultados das análises de aminoácidos obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.

ADAPTAÇÃO DO HIBRIDOMA PC-61 AOS MEIOS LIVRES DE SFB - ANÁLISES DE AMINOÁCIDOS

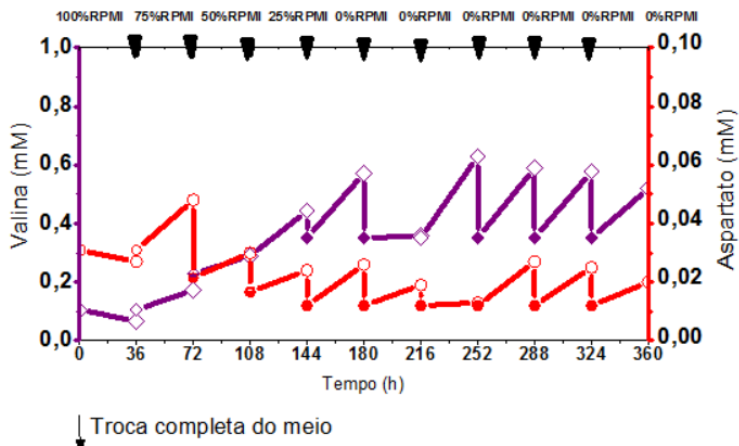
MEIO RPMI1640 CONTROLE



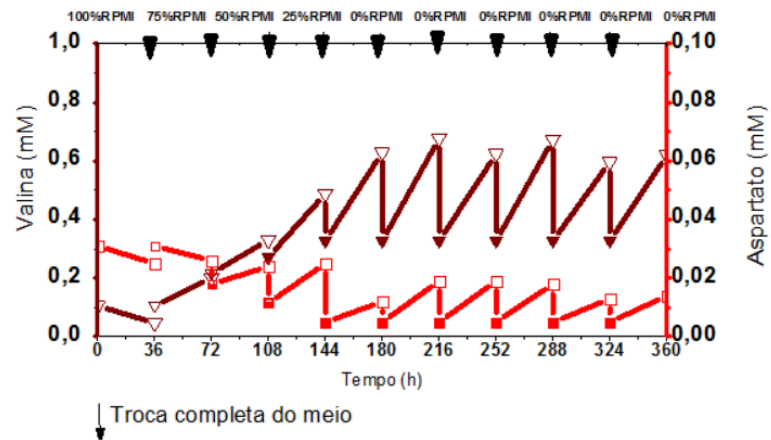
MEIO SFM (1)



MEIO CD (2)



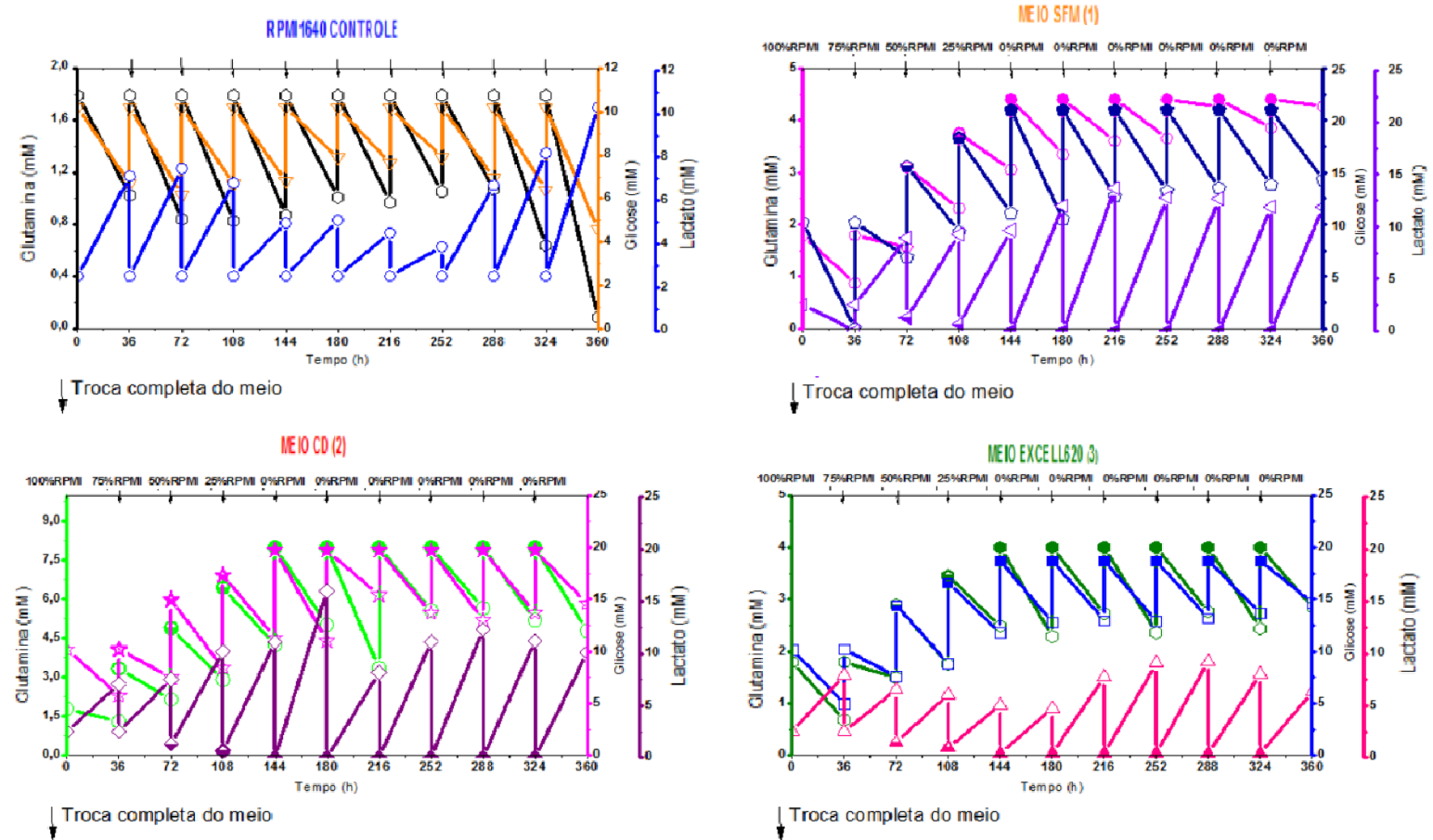
EXCELL620 (3)



O comportamento de consumo e produção de aminoácidos no cultivo do meio Excell 620 foi bastante parecido com o do meio CD, não houve consumo total de nenhum dos aminoácidos em nenhum dos pontos do cultivo, havendo síntese dos mesmo.

Figura 25: Resultados das análises de glicose, lactato e glutamina obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livre de SFB.

**ADAPTAÇÃO DO HIBRIDOMA PC-61 AOS MEIOS LIVRES DE SFB
GLICOSE x LACTATO x GLUTAMINA**



Na Figura 25 acima pode-se perceber que no cultivo controle com meio padrão RPMI-1640 não houve esgotamento de nenhum nutriente nem aminoácido, porém no ponto final da hora 360 o aminoácido L-glutamina foi o que mais chegou próximo do consumo total (0,088mM). No cultivo adaptativo ao meio SFM não houve esgotamento nem de da glutamina nem da glicose, entretanto o esgotamento total do aspartato nas horas (180 até 288) como visto na Figura 24, pode estar relacionado a oxidação parcial da L-glutamina e também a síntese de nucleotídeos.

O meio CD não contém L-glutamina em sua composição, mesmo não sendo um aminoácido essencial, com base nos dados de consumo de L-glutamina do primeiro experimento realizado com o meio padrão RPMI-1640 que já possui o aminoácido em sua

composição optou-se por realizar a suplementação. A suplementação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Assim como o meio anterior, o meio Excell 620 não contém L-glutamina em sua composição e pela mesma razão optamos por suplementar o mesmo de acordo com as instruções do fabricante. E como os outros cultivos em adaptação conforme o meio padrão é reduzido e o meio em estudo é adicionado o ponto de partida da análise varia.

O consumo de glicose e a síntese de lactato também foram analisados, e os resultados estão mostrados na Figura 25. De forma geral, em todos os cultivos, o consumo de glicose se mostrou equilibrado em relação a síntese de lactato, como o esperado. Pontos de maior consumo de glicose apresentaram maior síntese de lactato, a glicose não foi exaurida em nenhum momento nos cultivos. Da mesma forma que a concentração de lactato não atingiu níveis considerados críticos para cultivos de hibridomas, 50 mM a 70 mM conforme Pörtner e Schäfer (1996).

- **Análise de produção de anticorpos monoclonais:**

Por fim analisaremos os resultados obtidos pela quantificação em densidade óptica da produção de mAbs produzidos por cada um dos cultivos de hibridomas, representados na Figura 26. A quantificação da produção de mAbs ocorreu de acordo com o protocolo descrito no item 4.6.4 deste trabalho, e os resultados foram medidos em DO (densidade ótica). Já era esperado, mediante a análise de resultados de estudos anteriores realizados no Laboratório de Tecnologias de Cultivos Celulares (LATECC), onde esse estudo foi desenvolvido, que os hibridomas PC-61 em adaptação produzissem poucas quantidades de mAbs, principalmente em cultivos frasco T, como pode-se verificar nos dados disponíveis também na Tabela 13.

Figura 26: Resultados da produção de mAb obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.

ADAPTAÇÃO DO HIBRIDOMA PC-61 AOS MEIOS LIVRES DE SFB - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-CD25

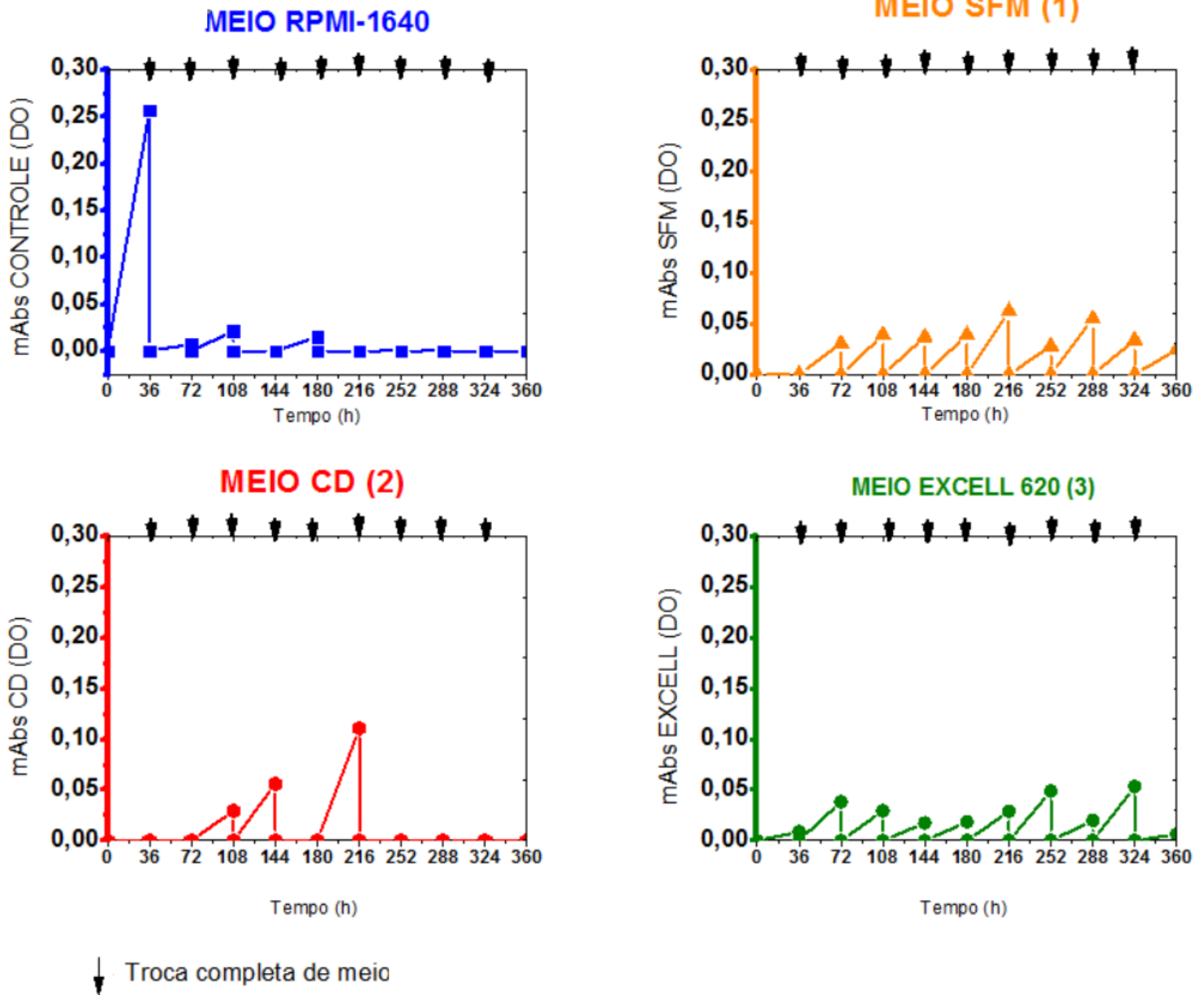


Tabela 13: Produção de mAb nos cultivos do hibridoma PC-61 em frascos T em adaptação aos meios livres de SFB.

t (h)	mAbs anti-CD25 (DO) CONTROLE	mAbs anti-CD25 (DO) SFM	mAbs anti-CD25 (DO) CD	mAbs anti-CD25 (DO) EXCELL620
0	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
36	0,25725*	-0,00475	-0,01225	0,00875
36 ^(I)	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
72	0,00725	0,03025	-0,00325	0,03825
72 ^(I)	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
108	0,02125	0,03875	0,02925	0,02925
108 ^(I)	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
144	-0,02225	0,03675	0,05575	0,01725
144 ^(I)	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
180	0,01475	0,03875	-0,02075	0,01825
180 ^(I)	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
216	-0,01775	0,06225*	0,11075*	0,02875
216 ^(I)	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
252	2,5E-4	0,02775	-0,00925	0,04875
252 ^(I)	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
288	2,5E-4	0,05475	-0,01025	0,01975
288 ^(I)	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
324	-0,00825	0,03375	-0,00225	0,05325*
324 ^(I)	-0,00275	-0,02525	-0,01475	0,01925
360	-0,00125	0,02425	-0,00475	0,00625

Nota: A primeira coluna refere-se aos dados do cultivo em meio padrão RPMI-1640+15%SFB controle, a segunda coluna refere-se aos dados do cultivo em meio SFM, a terceira coluna refere-se aos dados do cultivo em meio CD e a última coluna refere-se ao cultivo em meio EXCELL620. Os dados com a marcação (I) referem-se aos dados do novo inoculo feito após a completa troca de meio a cada 36horas. Os asteriscos (*) referem-se aos maiores valores de produção em cada respectivo cultivo.

Embora sem diferenças significativas entre as produções de mAbs nos diferentes meios de cultivo livres de SFB, o meio selecionado para a fase seguinte de testes foi o SFM. Mesmo havendo esgotamento do aminoácido aspartato em três pontos do cultivo, o meio SFM apresentou maiores valores de velocidade específica de crescimento (μ), atingiu maiores valores de células viáveis totais e manteve a viabilidade elevada mesmo após a remoção completa do SFB na hora 144 do cultivo. Além disso, foi o único meio que mostrou produção de mAbs em todos as amostragens ao longo do cultivo.

5.3 – Cultivo em escala piloto do hibridoma PC-61 adaptado em meio livre de SFB - Experimento 3:

O objetivo principal deste experimento foi comparar o comportamento de cultivo, metabolismo de consumo de nutrientes e produção de mAbs nos meio padrão RPMI-1640 com 10% SFB e meio comercial SFM livre de SFB, pelo cultivo do hibridoma PC-61 em biorreator. Os biorreatores utilizados foram do tipo *Spinner*, de 500mL de volume e com

impelidor esférico de vidro, sendo que o volume de trabalho utilizado nesse experimento foi de 250mL em cada um dos biorreatores.

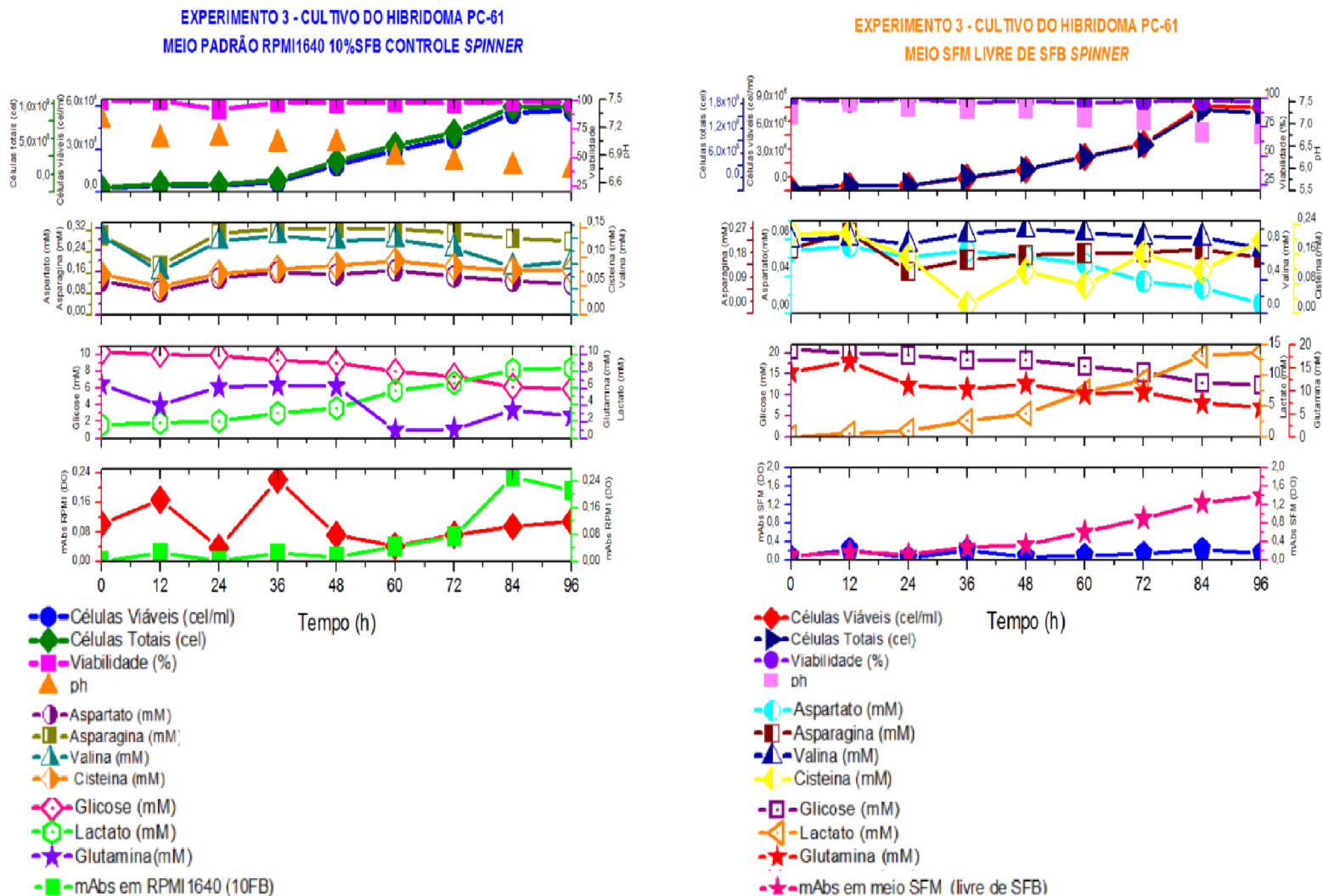
Como representado na Figura 14 do item 4.9 deste trabalho, dois cultivos em garrafas foram iniciados paralelamente. Em um as células foram cultivadas e expandidas em meio padrão RPMI-1640 com adição de 10% de SFB até atingir o valor de concentração celular desejado para realização do inóculo (não adaptado) em biorreator do tipo *Spinner*. O outro cultivo foi iniciado em meio padrão RPMI-1640 com adição de 10% de SFB e foi expandido e adaptado ao meio SFM livre de SFB, conforme a metodologia de adaptação sequencial aplicada no experimento anterior, até atingir o valor de concentração celular desejado para o inóculo (adaptado) em biorreator do tipo *Spinner*.

Com os inóculos produzidos, preparou-se na hora 0 desse experimento, um biorreator *Spinner* com 250mL de meio padrão RPMI-1640 controle e adição de 10% SFB, que recebeu um inóculo do hibridomas PC-61 não adaptados de forma que tivesse a concentração inicial desejada de 2×10^5 cel/ml em 250mL. No segundo biorreator *Spinner* foi preparado com o inóculo do hibridomas PC-61 adaptado em 250mL de meio comercial SFM livre de SFB, de forma que tivessem um a concentração inicial desejada de 2×10^5 cel/ml em 250mL. Ambos foram mantidos sob as mesmas condições de cultivo.

Com base em trabalhos desenvolvidos anteriormente em nosso próprio laboratório (LATECC), a agitação utilizada foi de 70 rpm. O pH de inóculo do meio foi entre 7,2 e 7,3, e mantiveram incubados a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂.

As amostras foram coletadas de acordo com o protocolo de amostragem, descrito no item 4.5 deste trabalho. As amostras eram retiradas a cada 12 horas, em um total de 96 horas de experimento, sempre de forma asséptica em Câmara de Biossegurança Classe II. O meio de cultura retirado na amostragem não foi repostado em nenhum momento do experimento. As amostras coletadas durante o experimento foram utilizadas na análise de características de cultivo como densidade e velocidade específica de crescimento celular, bem como consumo de aminoácidos e nutrientes além de produção de anticorpos monoclonais, na Figura 27 se apresentam os resultados obtidos. um panorama geral dos resultados obtidos.

Figura 27: Resultados obtidos no Exp3 de cultivo do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo *Spinner* em meio RPMI-1640 com 10%.

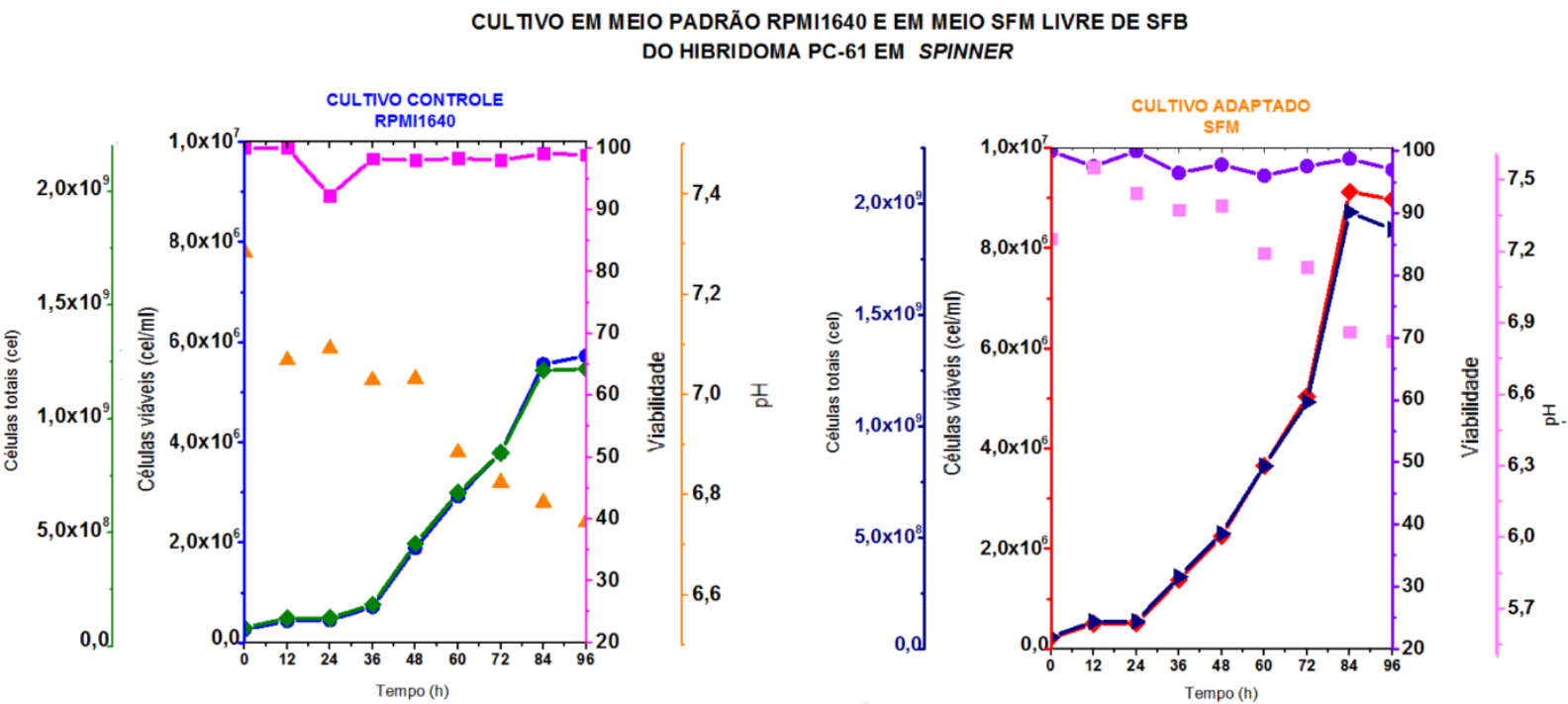


5.3.1 – Cultivo celular:

• **Densidade celular (cel/mL), células totais viáveis e velocidade específica de crescimento:**

Na literatura foram encontrados poucos trabalhos detalhando dados de cultivo como densidade, viabilidade, pH de cultivo entre outros dados, para o cultivo de hibridomas, isso porque em geral o foco de trabalhos com hibridomas está na produção do mAbs produzido e na sua eficiência quando utilizado no tratamento de doenças. Porém consideramos que estudar e entender esses dados de cultivo das células produtoras de mAb pode ser útil para elevar a produtividade das próprias células.

Figura 28: Resultados de crescimento celular obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo *Spinner* em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.



No cultivo controle com meio padrão RPMI-1640 e adição de 10% de SFB a densidade atingiu seu ponto máximo $5,7 \times 10^6$ células viáveis por mL de meio, na hora 96 do cultivo. Um ponto antes, na hora 84 o cultivo registrou o seu maior número de células viáveis totais $1,2 \times 10^9$ células viáveis em 200mL de volume de trabalho, como podemos observar na Figura 28 e na Tabela 14. Esse já se mostra um bom resultado quando comparado com alguns dos poucos dados de cultivo de hibridomas encontrados na literatura, Duval *et. al* 1990, registraram a máxima densidade celular de $1,8 \times 10^6$ células viáveis por mL de meio RPMI-1640 com adição de 10% de SFB no cultivo do hibridoma VO208 em biorreator do tipo *Spinner* com volume de trabalho igual a 250mL e 5%CO₂, porem com agitação de 40 rpm, na hora 80. Zhu e Yang 2004, a partir do cultivo do hibridoma HD24 com meio DME com 10% de SFB em biorreator tipo *Spinner* com 200mL de volume de trabalho, 37°C e agitação de 70 rpm, obtiveram $1,6 \times 10^6$ células viáveis por mL de meio, na hora 100 do experimento. Em trabalho mais recente, Zanatta 2009, registrou a máxima densidade celular de $1,5 \times 10^6$ células viáveis por mL de meio DMEM com adição de 10%SFB no cultivo do hibridoma anti-dengue tipo 2 em biorreator tipo *Spinner*, porem com agitação de 50 rpm, na hora 72.

Tabela 14: Comparação dos resultados obtidos com dados disponíveis na literatura.

Trabalho	Meio de cultivo	Célula	Biorreator	Agitação	Inóculo	Horas	Concentração celular máxima
Durval, <i>et.al</i> ,1990	RPMI-1640 (10%SFB)	Hibridoma VO208	<i>Spinner</i>	40 rpm	2×10^5 células/mL	150horas 80horas	<u>$1,8 \times 10^6$ células/ mL</u>
Zhu;Yang 2004	DME (10%SFB)	Hibridoma HD24	<i>Spinner</i>	70 rpm	$3,2 \times 10^5$ células/mL	200horas 100horas	<u>$1,6 \times 10^6$ células/ mL</u>
Zanatta 2009	DMEM (10%SFB)	Hibridoma anti-dengue2	<i>Spinner</i>	50 rpm	2×10^5 células/mL	120horas ≈ 72 horas	<u>$1,5 \times 10^6$ células/ mL</u>
Neste trabalho	RPMI-1640 (10%SFB)	Hibridoma PC-61	<i>Spinner</i>	70 rpm	$2,2 \times 10^5$ células/mL	96horas 84horas	<u>$5,7 \times 10^6$ células/ mL</u>
Neste trabalho	SFM hibridoma (Livre de SFB)	Hibridoma PC-61	<i>Spinner</i>	70 rpm	$2,2 \times 10^5$ células/mL	96horas 84horas	<u>$9,1 \times 10^6$ células/ mL</u>

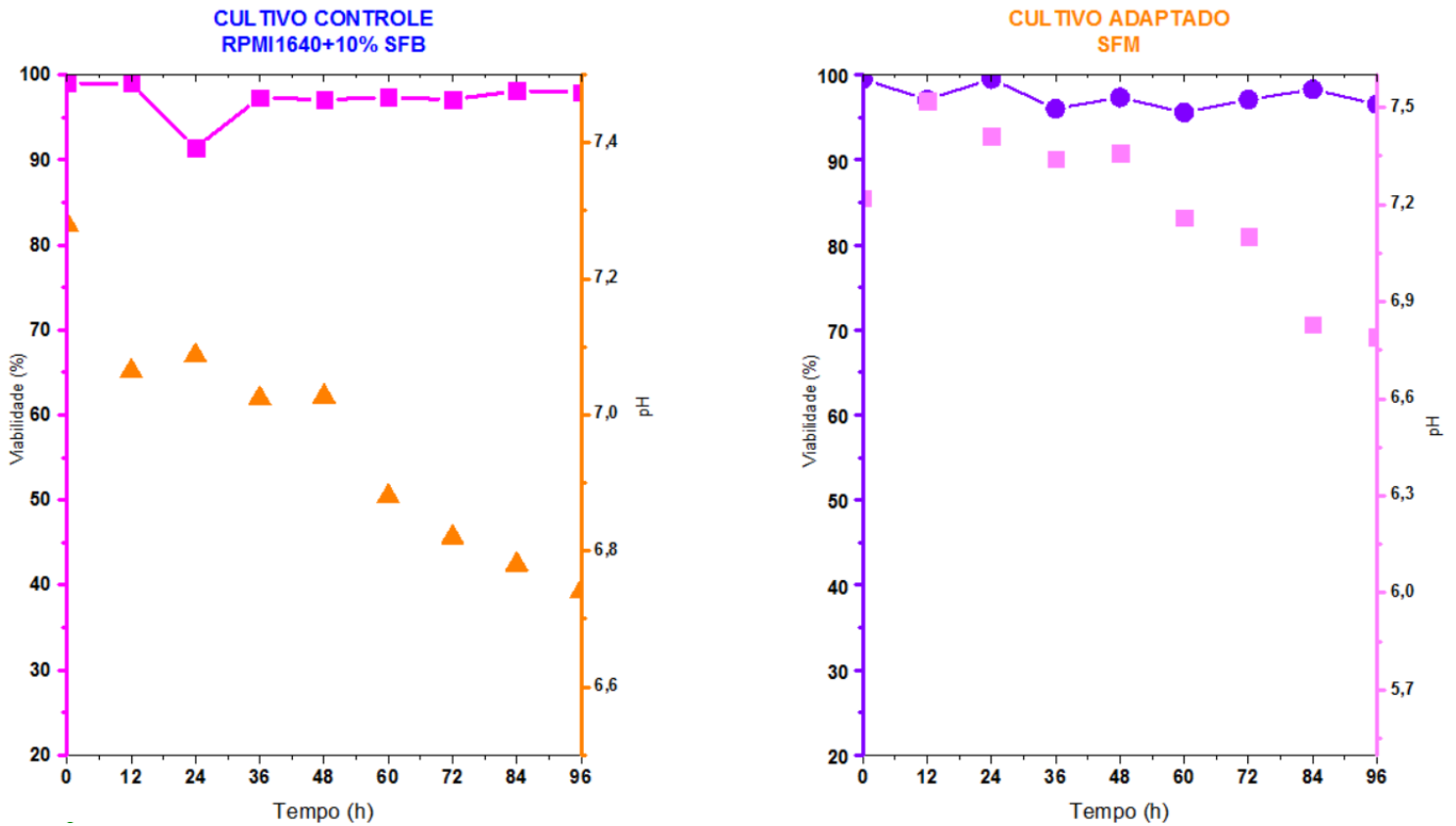
Os dados obtidos no cultivo com meio SFM livre de SFB a máxima densidade celular atingiu o valor de $9,12 \times 10^6$ células viáveis por mL de meio, na hora 84 do cultivo, mesmo momento em que registrou o seu maior número de células viáveis totais igual a $1,96 \times 10^9$ células viáveis em 200mL de volume de trabalho, como representado na Figura 28 e na Tabela 14. Os resultados de crescimento de celular em meio sem SFB foram bastante satisfatórios, demonstrando que a célula se manteve ativa mesmo após a completa remoção do SFB em frascos T e seguiu dessa forma mesmo após 84 horas de cultivo em meio SFM e em meio SFM no biorreator *Spinner*.

- **Viabilidade celular e pH do cultivo:**

Tanto em cultivo controle RPMI-1640 com adição de SFB como no cultivo adaptado ao meio SFM livre de SFB, a viabilidade se manteve sempre elevada. Na Tabela 15 evidencia-se os valores de viabilidade para ambos os cultivos, também representados na Figura 29. Nota-se que no cultivo controle a viabilidade variou entre 92,3% e 100% e no cultivo adaptado a variação ocorreu entre 96,1% e 100%.

Figura 29: Resultados de viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo *Spinner* em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.

**CULTIVO EM MEIO PADRÃO RPMI1640 E EM MEIO SFM LIVRE DE SFB
DO HIBRIDOMA PC-61 EM SPINNER**



O cultivo controle iniciou com meio RPMI-1640 com adição de 10% de SFB com valor de pH igual a 7,28 o qual foi diminuído ao longo do cultivo, atingindo o menor valor de 6,74 na última hora do experimento. Retomando as informações obtidas com o cultivo em frascos T, segunda coluna da Tabela 11 do item 5.2.1, pode-se perceber que a queda no pH do meio no cultivo em biorreator do tipo *Spinner* em 96 horas de cultivo não pode ser considerado prejudicial ao cultivo, uma vez que em frascos T a variação do pH ocorre nas mesmas proporções porém em um intervalo de tempo de 36 horas.

O mesmo se aplica ao cultivo adaptado com meio SFM livre de SFB, Tabela 15 abaixo, em que o cultivo foi iniciado com pH igual a 7,22 e atingiu seu ponto mais baixo na última hora do experimento onde o pH aferido foi igual a 6,79.

Tabela 15: Viabilidade celular e pH obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo *Spinner* em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.

t (h)	MEIO PADRÃO RPMI-1640 (10% SFB)		MEIO SFM LIVRE DE SFB	
	Viabilidade (%)	pH	Viabilidade (%)	pH
0	100*	7,28	100*	7,22
12	100*	7,064	97,6	7,52
24	92,31	7,087	100*	7,41
36	98,28	7,024	96,5	7,34
48	98,05	7,027	97,8	7,36
60	98,32	6,88	96,1	7,16
72	98,06	6,82	97,6	7,1
84	99,11	6,78	98,8	6,83
96	98,92	6,74	97,0	6,79

Nota: Nas duas primeiras colunas estão os dados do cultivo controle, as duas colunas seguintes estão os dados do cultivo em meio SFM. Onde os asteriscos (*) representam o maior valor de viabilidade celular e de variação do pH nos respectivos cultivos.

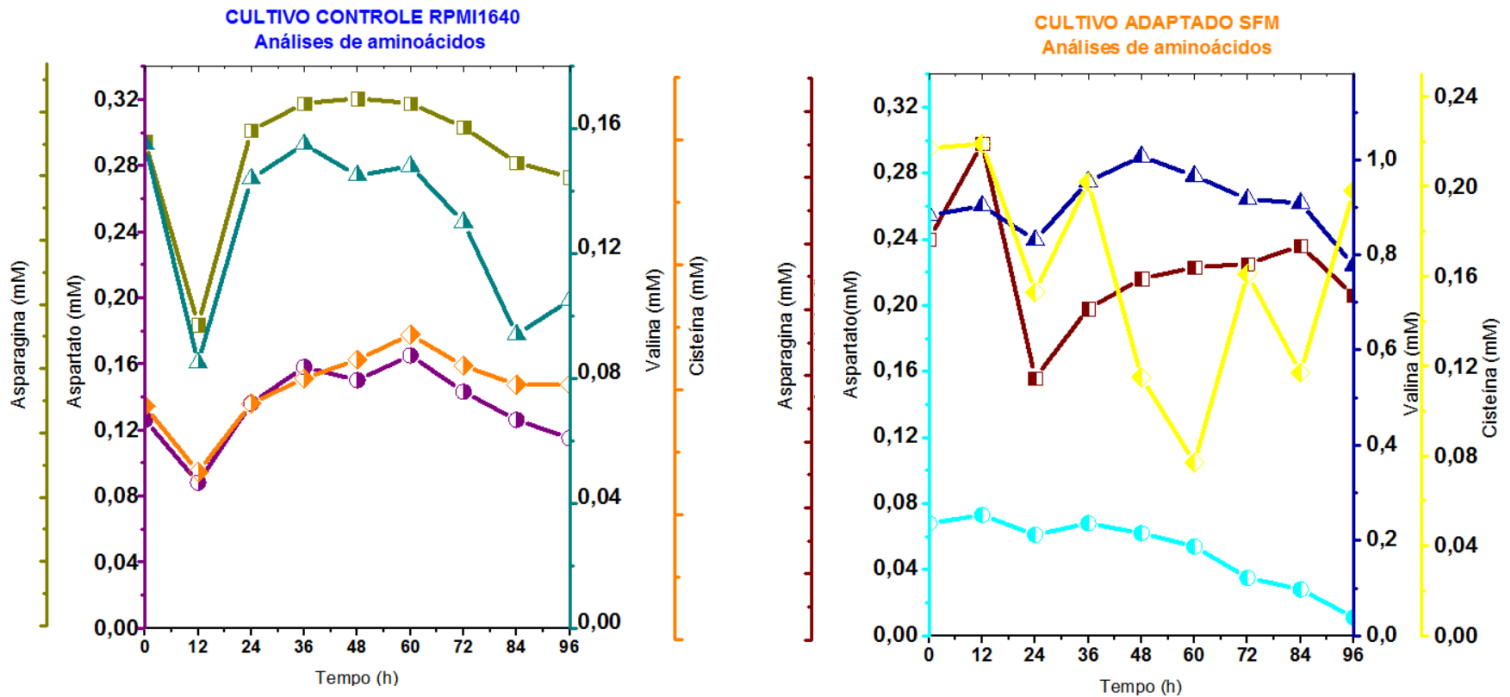
5.3.2 – Metabolismo:

- **Análise de aminoácidos:**

Embora nenhum aminoácido tenha sido esgotado em ambos os cultivos, foram selecionados para análise do metabolismo aqueles que apresentaram maior consumo ao longo do experimento. No cultivo controle, representado na Figura 29, o consumo dos aminoácidos Asparagina, aspartato, valina e cisteína, seguem padrões semelhantes de consumo, porém nunca atingindo o consumo total.

Figura 30: Resultados das análises de aminoácidos obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo Spinner em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.

CULTIVO EM MEIO PADRÃO RPMI1640 E EM MEIO SFM LIVRE DE SFB
DO HIBRIDOMA PC-61 EM SPINNER



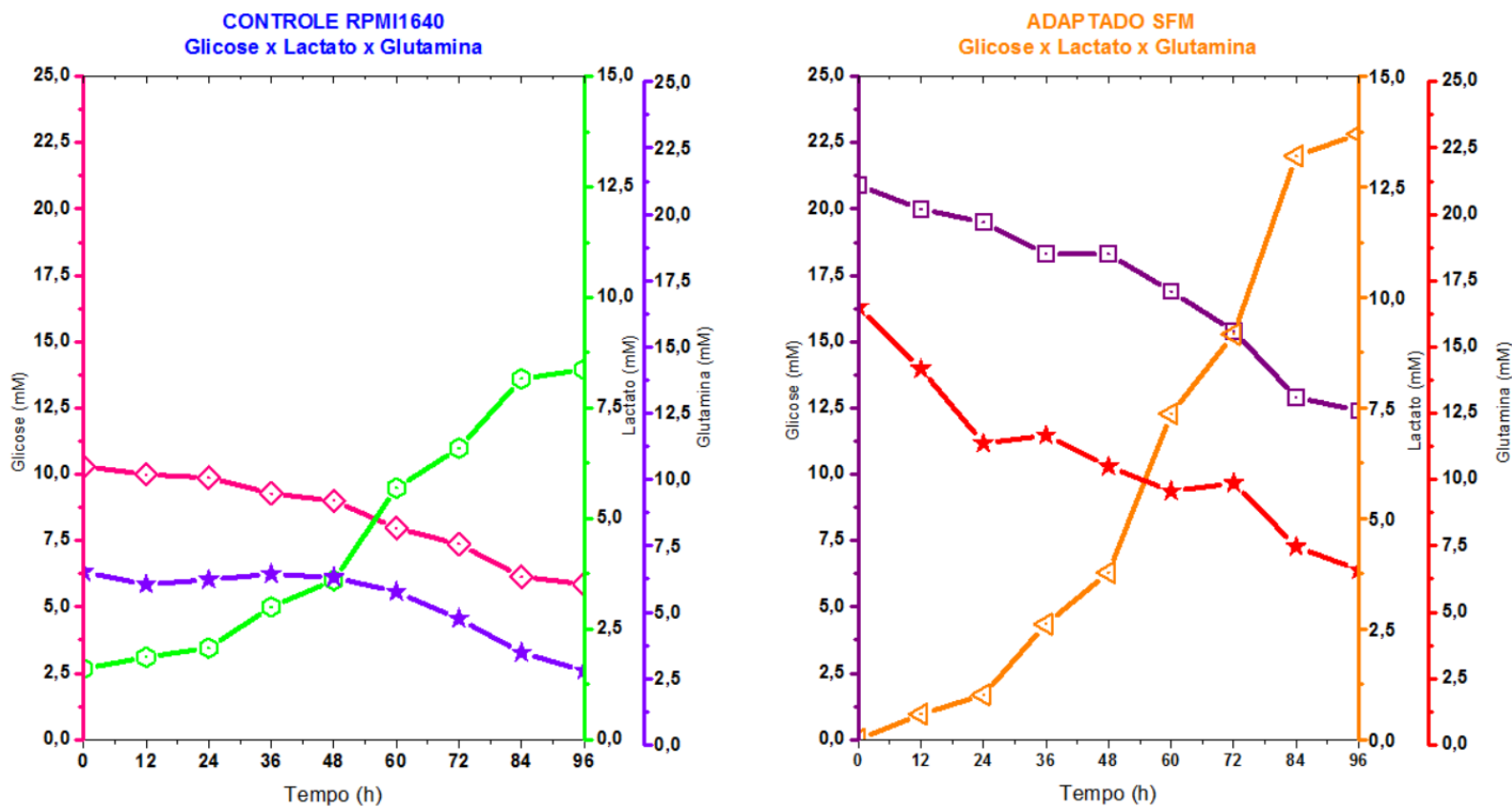
No cultivo adaptado com meio SFM livre de SFB, o metabolismo dos aminoácidos selecionados não segue o mesmo padrão, porém se assemelham aos dados obtidos no Exp2 em frasco T (Figura 24). E neste caso é interessante notar que no cultivo em frasco T do hibridoma PC-61 em meio SFM livre de SFB, o aminoácido aspartato é totalmente consumido a partir da hora 180 do experimento, ou seja 36 horas após a completa eliminação do SFB no cultivo daquele experimento, e mesmo com a troca de meio a cada 36 horas o aminoácido em questão continua se esgotando até a hora 288 do mesmo experimento. Com a Figura 30 podemos observar que no cultivo em biorreator do tipo *Spinner* do hibridoma PC-61 em meio SFM livre de SFB, o aminoácido aspartato é totalmente consumido após 96 horas de cultivo, sem troca de meio.

Embora a composição do meio SFM não seja conhecida, com base nos dados obtidos pela análise de HPLC do meio SFM puro (Tabela 12 do item 5.2.2), acredita-se que o aminoácido aspartato encontra-se em quantidade bastante inferior ao encontrado no meio RPMI-1640. Com função associada a síntese proteica, o aspartato pode estar sendo exaurindo

do cultivo adaptado com meio SFM em momentos de elevada síntese proteica pelas células e dessa forma, a sua reposição nesses pontos de maior consumo possivelmente pode elevar a eficiência do processo como um todo.

O consumo de glicose, glutamina e a síntese de lactato, seguiram os padrões já apresentado no cultivo em larga escala, Figura 31. Tanto no cultivo controle com meio RPMI-1640 com adição de 10% SFB, quanto no cultivo adaptado com meio SFM livre de SFB, não houve esgotamento no consumo da glicose e da glutamina. Também não houve produção de lactato em níveis críticos, aproximadamente 9 mM para o cultivo em meio padrão RPMI 1640 e aproximadamente 14 mM para o cultivo em meio SFM, quando segundo Pörtner e Schäfer (1996), os níveis críticos para células de hibridomas variam entre 50 mM e 70 mM.

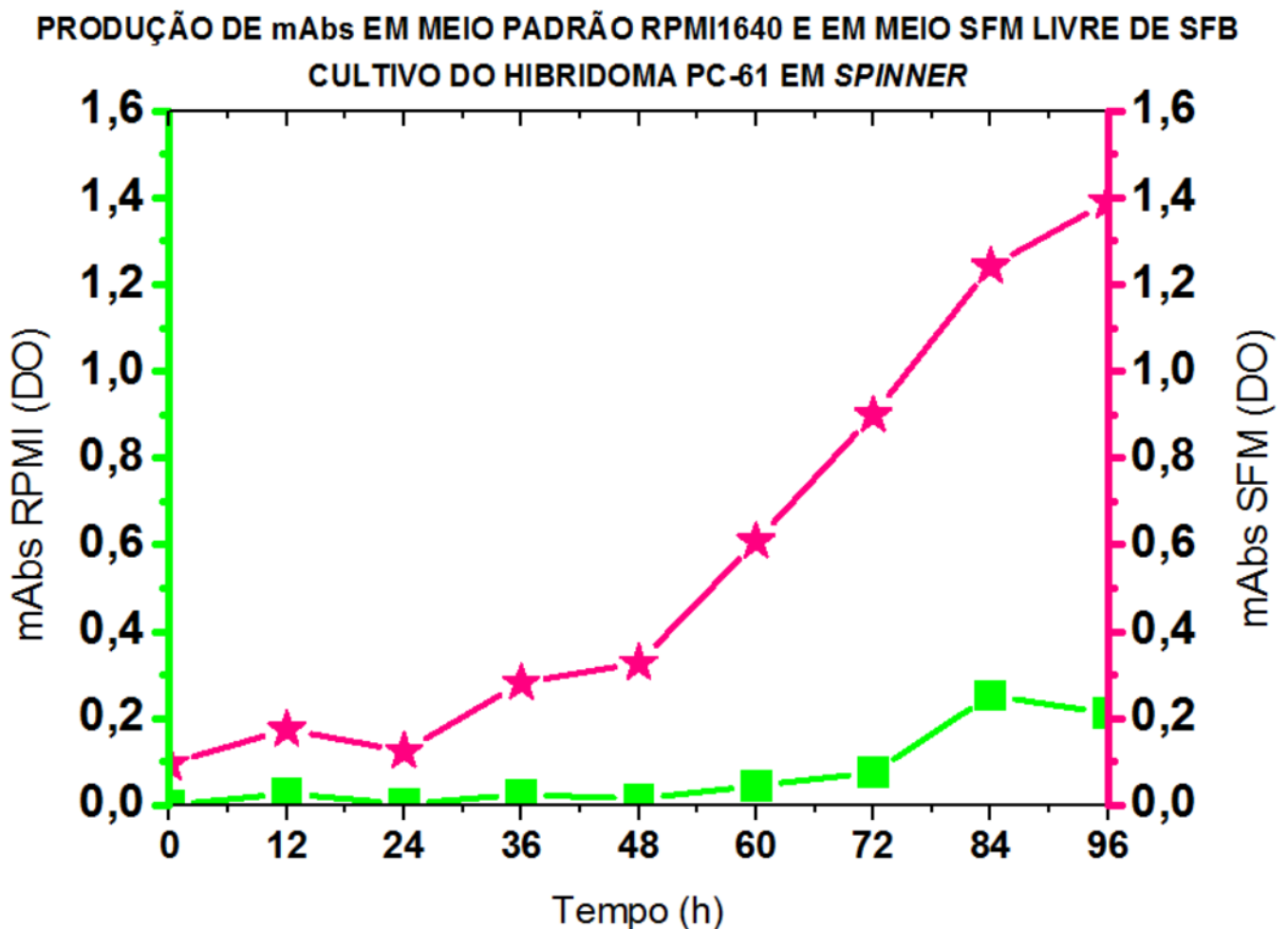
Figura 31: Resultados das análises de glicose, lactato e glutamina obtidos nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo *Spinner* em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.



- **Análise de produção de anticorpos monoclonais:**

A quantificação da produção dos mAb anti-CD25 em DO produzidos por cada um dos cultivos de hibridomas em *Spinner* está representada na Figura 32. A quantificação da produção de mAbs ocorreu de acordo com o protocolo descrito no item 4.6.4 deste trabalho, e os resultados foram medidos em DO. Tanto no cultivo controle com meio RPMI-1640, como no cultivo adaptado com meio SFM livre de SFB, as maiores produções de mAb foram registradas a partir das hora 48 do cultivo.

Figura 32: Resultados da produção de mAb nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo *Spinner* em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.



Segundo os dados da Tabela 16, a maior DO registrada no cultivo controle ocorreu na hora 84 (DO=0,252) e para o cultivo adaptado com meio SFM a maior DO foi registrada na hora 96 (DO=1,391).

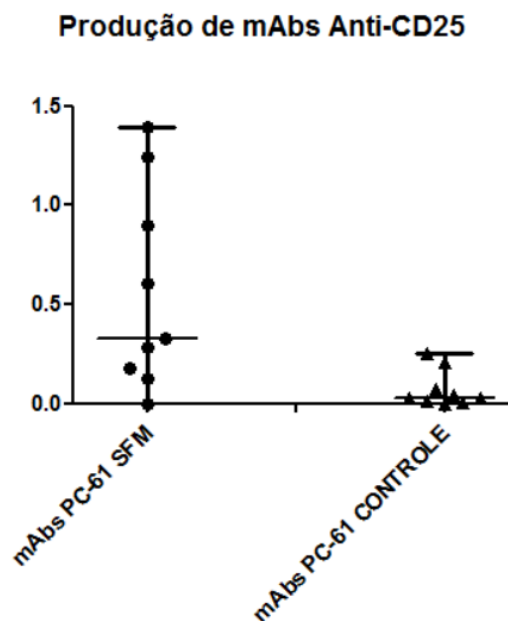
Tabela 16: Produção de mAb anti-CD25 obtidos nos cultivos de hibridomas PC-61 em biorreator do tipo *Spinner* em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.

t (h)	MEIO PADRÃO RPMI-1640 (10% SFB)	MEIO SFM LIVRE DE SFB
0	0	0
12	0,026	0,1745
24	0,0025	0,124
36	0,0245	0,282
48	0,014	0,3275
60	0,0445	0,608
72	0,0755	0,899
84	0,2525*	1,242
96	0,211	1,391*

Nota: Comparação entre a produção de mAbs no cultivo do hibridoma P6-61 ao longo do experimento 3. Na primeira coluna estão os dados do cultivo controle e na segunda coluna estão os dados do cultivo em meio SFM. Onde os asteriscos (*) representam o maior valor de DO nos respectivos cultivos.

Seguindo os bons resultados obtidos ao longo do Exp3, a produção de mAbs anti-CD25, a partir do cultivo dos hibridomas PC-61 em *Spinner*, evidenciam ainda mais a eficiência da metodologia de adaptação sequencial e do cultivo em biorreator empregados neste trabalho.

Figura 33: Análise estatística da produção de mAb anti-CD25 nos cultivos do hibridoma PC-61 em biorreator do tipo *Spinner* em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e meio SFM livre de SFB.



Nota: Análise estatística entre a produção de mAbs no cultivo do hibridoma P6-61 ao longo do experimento 3. Dados obtidos a partir da análise dos valores de DO dos cultivos em meio CONTROLE 1640 com adição de 10% de SFB e em meio SFM livre de SFB. Análise realizada pelo programa Graphpad Prisma. Test T não paramétrico ($P < 0,05$) e P vale = 0,018.

A produção em biorreator do tipo *Spinner* de mAb em meio SFM livre de SFB atingiram valores de DO superiores a produção em meio padrão RPMI-1640 com adição de 10% SFB. A análise estatística feita com o programa Graphpad Prisma confirmou a significativa diferença entre as produções de mAbs em meio RPMI-1640 com 10%SFM e em meio SFM livre de SFB, como representado na Figura 33.

6 CONCLUSÕES

As conclusões sobre o trabalho realizado são:

- Embora não exista diferença significativa entre as produções de mAbs pelo cultivo dos hibridomas DTA-1 e PC-61, em frascos T, o segundo hibridoma apresentou um comportamento relativamente mais estável tanto no cultivo, quanto no consumo e síntese de aminoácidos e outros nutrientes.
- A adaptação sequencial a meios livres de SFB, testada nesse trabalho se mostrou bastante eficiente, pois as células conseguiram se desenvolver e produzir mesmo após a remoção completa do SFB na hora 144, em todos os meios livres de SFB testados.
- Dentre os três meios comerciais livres de SFB, o meio *Hybridoma Serum Free Medium* (SFM) – Gibco® by Life Technology, foi onde os hibridomas PC-61 apresentaram melhores resultados de cultivo, assim como consumo de aminoácidos e outros nutrientes. Embora em frasco T, a produção de mAbs nos diferentes meios comerciais livres de SFB testados, não tenha sido significativa, no meio SFM a produção foi a mais homogênea ao longo do cultivo.
- O cultivo em biorreator do tipo *Spinner*, dos hibridomas PC-61 adaptados ao meio comercial *Hybridoma Serum Free Medium* (SFM) – Gibco® by Life Technology livre de SFB atingiu resultados estatisticamente diferentes de crescimento e produção de mAbs.
- Os dados obtidos durante os experimentos desenvolvidos neste trabalho, fornecem informações relevantes para o desenvolvimento de possíveis trabalhos futuros tanto com os hibridomas PC-61 quanto com hibridomas em geral. Além disso fornecem subsídios para aumentar a produtividade dos hibridomas PC-61 em cultivo adaptativo em biorreator do tipo *Spinner*.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento deste trabalho levantou pontos interessantes para estudos futuros, tais como:

- Análise do comportamento do hibridoma DTA-1 com os mesmos procedimentos desenvolvidos com o hibridoma PC-61 neste trabalho.
- Realização da purificação do mAbs pós cultivo (sobrenadante resultante do cultivo em biorreator do tipo *Spinner*) onde os anticorpos são secretados, material que está adequadamente armazenado.
- Obtenção de quantidade de mAb para realização de testes anti-tumorais em pequena escala.

8 REFÊRENCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**, 5ª edição. Elsevier, 2005.

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**, 7ª edição. Elsevier, 2012.

ACOSTA, M.L. *et.al.* Analysis of kintic, stoichiometry and regulation of glucose and glutamine metabolismo in hybridoma batch cultures using logistic equations. **Cytotechnology**. v 54, n.3, p.3189-200, 2007.

ALISON, M.R. Cancer. **eLS: Encyclopedia of Life Sciences** (DOI: 10.1038/npg.els.0001471). 2001.

ALVES, E.; GUIMARÃES, A. C. Cultivo celular. **In: MOLINATO, CAPUTO, AMENDOEIRA. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.** EPSJV, 2009, p. 216 - 252.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer Fact & Figures 2nd Edition.** Estados Unidos da América, 2008. Disponível em: < <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>>. Acesso em: maio.2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer treatments, monoclonal antibodies to treat cancer.** 2015. Disponível em: < <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/monoclonal-antibodies.html>>. Acesso em maio.2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures**, 2016. Disponível em: < <https://old.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>>. Acesso em dezembro, 2016.

ARGYRIOU, A. A; KALOFONOS, H. P. Recent advances relating to the clinical application of naked monoclonal antibodies in solid tumors. **Molecular Medicine Journal**. v.15, n.5, p. 183-191, 2009.

ARORA, M. Cell Culture Media: A Review. **Materials and Methods**. v3, 2013.

BIAGGIO, R.T. **Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livre de soro fetal bovino.** 2014. 117 p. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **De doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil.** Rio de Janeiro. 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **ABC do Câncer, Abordagens básicas para o controle do câncer.** Rio de Janeiro. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativas 2016 – Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 126p. 2015.

BRODEUR; B.R; TSANG, P.S. High yield monoclonal antibody production in ascites. **Journal of Immunological Methods**. v.86, n.2, p. 239-241, 1986.

BRUCE, M.P *et al.* Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies – alternatives to ascites production in mice. **Journal of Immunological Methods**. v.264, n.1, p.59-68, 2002.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recente achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.68, p.283-291, 2015.

CAI, H. H. Therapeutic monoclonal antibodies approved by FDA in 2016. **MOJ Immunology**. v.5, n.1, 2016.

CANCER RESEARCH INSTITUTE. **Cancer immunotherapy, bladder câncer**. 2016. Disponível em :< <http://www.cancerresearch.org/cancer-immunotherapy/impacting-all-cancers/bladder-cancer>>. Acesso em: maio 2016.

CARVALHO, A.P.F. **Estudos clínicos e patentes de anticorpos monoclonais para o tratamento do câncer: um estudo explanatório**, 2013. 185 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto de tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2013.

CASADEVALL, A.; SCHARFF, M.D. Serum therapy revisited: Animal models of infection and development of passive antibody therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 38, n. 8, p. 1695-1702, 1994.

CHAMES, P.; BATY, D. Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? **mAbs Journal List**. v.1, n.6, 2009.

COE, D. *et al.* Depletion of regulatory T cells by anti-GITR mAb as a novel mechanism for cancer immunotherapy. **Cancer immunol immunother**. v. 59, n. 9, p. 1367-1377, 2010.

COMMITTE ON METHODS OF PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES. **Monoclonal antibody production**. INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH, NATIONAL RESEARCH COUNCIL (ISBN:0-309-51904-7).1999.

CORRÊA, A. L. **Obtenção de anticorpos monoclonais anti-PBP2a de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina através do cultivo de células de hibridomas em frasco do tipo Spinner**. 2013. 101 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto de tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2013.

CROFT, M. Co-stimulatory members of the TNFR family: Keys to effective T-cell immunity? **Nature Reviews Immunology**. v. 3, n.8, p. 609-620, 2003.

CRUVINEL, M. W.*et al.* Sistema imunitário – Parte I fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 50, n.4, p.434-461, 2010.

DAVIES, D.R.; PADLAN, A. E. Antibody-antigen complex. **Annual Review of Biochemistry**. v. 59, p. 439-473, 1990.

DOYLE, A, GRIFFITHS, J. B. (eds.). **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures.** In: Biotechnology, Ed John Wiley & Sons, Ltd, Biffins Lane Chichester West Sussex, England.1998.

DURVAL, D. *et.al.* Comparison of various methods for monitoring hybridoma cell proliferation. **Journal of Immunological Methods.** v.134, p. 177-185, 1990.

EIBL, R. *et.al.* **Cell and tissue reaction engineering.** Ed. Springer, 2009.

EVEN, M. S; SANDUSKY, C.B; BARNARD, N. D. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. **Trends in Biotechnology.** v. 24, n.3, p. 105-108, 2006.

FALKENBERG, F.W. *et al.* In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular mini-fermenter. **Journal of Immunological Methods.** v.179, n. 1, p. 13-29, 1995.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: A manual of basic technique.** 5. ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications.** 6. ed. New York: John Wiley & Sons, 2010.

GAMBHIR, A.; EUROPA, A.; HU, W. S. Alteration o cellular metabolism by consecutive fed-batch culures of mammalian cells. **Biosci. Bioeng Journal.**v.87, n.6, p.805-810, 1999.

GAVIN, P. D; LLOYD, O; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity.** v.21, p.137-148, 2004.

GODARA, P.; NORDON, R.E.; MCFARLAND, C.D. Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology.** v. 83, n. 4, p. 408-420, 2008.

GODING, J.W. Antibody production by hybridomas. **Journal of Immunological Methods.** v. 39, n. 4, p. 285-308, 1980.

GOLDENBER, D.M. Radiolabelled monoclonal antibodies in the treatment od metastatic cancer. **Current Oncology Journal.** v.14, n.1, p.39-42, 2007.

GRAMER, M. J; POESCHL, D. M. Comparison of cell growth in T-flasks, in micro hollow fiber bioreactors, and in an industrial scale hollow fiber bioreactor system. **Cytotechnology.** v.34, n.1, p.111-19, 2000.

GSTRAUNTHALER, G. *el.al.* A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. **Cytotechnology.** v.5, p.791-793, 2013.

HAJDU, S. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer.** v.117, n.5, p.1097-1102, 2011.

HOLM, T.L.; NIELSEN, J.; CLAEISSON, M. H. CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica.** v. 112, n. 10, p. 629-641, 2004.

JANEWAY, C. A; TRAVERS, P. **Imunobiologia: o Sistema immune na saude e na doenca.** 2° Ed . Artmed, Porto Alegre. 1997.

KANAMARU, F. *et al.* Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells. **Journal of Immunology.** v. 172, n. 12, p. 7306-7314, 2004.

KEHOE, D. E.; JING, D.; LOCK, L. T.; TZANAKAKIS, E. S. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. **Tissue Engineering: Part A.** v. 16, n. 2, p. 405-421, 2010.

KNEE, D. A. *et.al.* Rationale for anti-GITR cancer immunotherapy. **European Journal of Cancer.**v.67, p.1-10, 2016.

KO, K. *et al.* Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine.** v. 202, n. 7, p. 885–891, 2005.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature.** v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

LEE, SYLVIA; MARGOLIN, KIM. Cytokines in cancer immunotherapy. **Cancer.** v.3, p.3856-3893, 2011.

LEIJ, L; POPPEMA, S. Cryopreservation of newly formed hybridomas. **Immunol Methods Journal.** v12, n1, p. 69-72, 1983.

LEGAZPI, L. *et al.* Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: Substrate and agitation effects. **Biochemical Engineering Journal.** v.26, n.2, p.22–130, 2005.

LESTERHUIS, W. J. *et.al.* Cancer immunotherapy – revisited. **Nature Reviews drug discovery.** v. 10, p.591-600, 2011.

MARQUES, C. H. **Aspéctos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica.**2005. 126 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de imunobiológicos). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,2005.

MARX, U. *et al.* Monoclonal Antibody Production. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 23. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals.** v. 25, p. 121-137, 1997.

MATHEW, M; VERMA, R. S. Humanized immunotoxins: A new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. **Cancer Science.** v.100, n. 8, p. 1359-1365, 2009.

MCDONNELL, S. Production of antibodies in hybridoma and non-hybridoma cell lines. **In: AL-RUBEAI, M. Animal Cell Culture.** p. 65-88. Springer. 2015.

MCHUGH, R.S. *et al.* CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. **Immunity.** v. 16, n.2, p. 311-323, 2002.

MELERO, I. *et al.* Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 7, n. 2, p. 95-106, 2007.

MELO, K.M; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. v. 32, n5, 2009.

MOLINARO, E. M; CAPITO, L. F. G; AMENDOEIRA, M. R. R. A. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde**. EPSJV,IOC.p .496, 2009.

MORAES, A.M; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais:de biofarmacos a terapia genica**. 1ºed, Sao Paulo: Roca, 2007.

MULLARD, A. FDA drug approvals. **Nature reviews drugs discovery**.v16, p73-76, 2017.

MURILLO, O. *et al.* Potentiation of Therapeutic Immune Responses against Malignancies with Monoclonal Antibodies. **Clinical Cancer Research**. v. 15, n. 9, p. 5454-5464, 2003.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**.8ºed. Artmed.p.888. 2014.

NACIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer treatment, radiotherapy**.2010. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>>. Acesso em: maio.2016.

NACIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer treatment, surgery**. 2015. Disponível em : < <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery#TS>> . Acesso em: maio.2016.

ONIZUKA, S. *et al.* Tumor Rejection by in Vivo Administration of Anti-CD25 (Interleukin-2 Receptor α) Monoclonal Antibody. **Cancer Research**. v. 59, n. 13, p. 3128-3133, 1999.

ORTÍN, M. Immunotherapy of hematological malignancies: whats is new?. **Annal of oncology**. v16, p.53-62, 2005.

OZTURK, S. S. *et.al.* Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolismo, and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**. v39, p.418-431, 1992.

PANDEY, S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. v.1, n.2, p. 88-94, 2010.

PETERSON, N.C. Considerations for in vitro monoclonal antibody production. **Research in Immunology**. v. 149, n. 6, p. 553-557, 1998.

PÖRTNER, R; SCHÄFER, T. Modelling hybridoma cell growth and metabolism a comparison of selected models and data. **Journal of biotechnology**. v49. p. 119-135, 1996.

QIAO, J.; LIU, ZHIDA; FU, Y. Adapting conventional cancer treatment for immunotherapy. **Mol Medicine Journal**. v. 94, p.489-495, 2016.

RECH, A. J; VONDERHEIDE, R. H. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**. v.1174, p. 99-106, 2009.

RODRIGUES, M. E. *et al.* Technological progresses in monoclonal antibody production systems. **Biotechnology Progress**. v26. p. 332-351, 2010.

ROLAND, M. Anti-CD25 (daclizumab) monoclonal antibody therapy in relapsing – remitting multiple sclerosis. **Clin Immuno**. p. 9-14, 2012.

RONCHETTI *et al.* CD8+ T Cells: GITR Matters. **The Scientific World Journal**. p.7, 2012.

ROQUE, A.C.; LOWE, C.R.; TAIPA, M.A. Antibodies and genetically engineered related molecules: Production and purification. **Biotechnology Progress**. v. 20, n.3, p. 639-654, 2004.

ROSENBERG, S. *et al.* Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. **Natura Review Cancer**. v. 8. p. 299-308, 2008.

SANTOS, R. V. *et al.* Aplicação terapêutica dos anticorpos monoclonais. **Rev. Bras. Aler. Immunopatol**. v. 29, n. 2, p. 77-85, 2006.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annual Review of Immunology**. v. 22, p. 531-562, 2004.

SCOTT, A. M.; WOLCHOK. J.D; OLD, L. J. Antibody therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**. v. 12, n.4, p. 278-287, 2012.

SHIMIZU, J. *et al.* Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nature Immunology**. v. 3, n.2, p. 135-142, 2002.

SITC, **Society for Immunotherapy of Cancer**.2015.

SJOERD, H. V. *et al.* Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. **Nature reviews cancer**. v. 16. p. 219-233. 2016.

TAMASHIRO, D.A; ALARCON, V.B; MARIKAWA, Y. Ectopic expression of mouse Sry interferes with Wnt/beta-catenin signaling in mouse embryonal carcinoma cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**. v. 1780, n.12, p. 1395-1402, 2008.

TANG, Y.J; OHASHI, R; HAMEL, JFP. Perfusion culture of hybridoma cells for hyperproduction of IgG2a monoclonal antibody in a wave bioreactor-perfusion culture system. **Biotechnology Progress**.v 2, p.255-264, 2007.

TETZNER, T.A.D. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albuminasérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção in vitro de embriões bovinos**. 2007. 115p. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária) – Faculdade de ciências agrárias e veterinárias. Universidade Estadual de São Paulo (Unesp), Jaboticabal, 2007.

TEVA, A.; FERNANDEZ, J. C. C.; SILVA, V. L. **Imunologia**. In: Molinaro, E. M.; Caputo, L. F. G.; Amendoeira, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio–Instituto Oswaldo Cruz, 2009. p. 19-124.

TREBAK M; CHONG, J.M; HERLYN, D; SPEICHER, D.W. Efficient laboratory-scale production of monoclonal antibodies using membrane-based high-density cell culture technology. **Journal of Immunological Methods**. v.230, p. 59-70, 1999.

UMAR, A; DUNN, B.K; GREENWALD, P. Future directions in cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**. v.12, n.12, p. 835-848, 2012.

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

WADE, N. Hybridomas: A potent new biotechnology. **Science**. v.208, n.4445, p.692-693, 1980.

WALDMAN, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. **Nature Reviews. Immunology**. v. 6, n. 8, p. 595-601, 2006.

WESSMAN, S. J.; LEVING, R. L. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. **Developments in biological standardization**. v. 99, p. 3-8, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Day**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: maio.2015.

WIKICIÊNCIAS. Disponível em: <[wikiciencias/anticorposmonoclonais](http://wikiciencias.org/anticorposmonoclonais)>. Acesso em: maio.2015.

WINZELER, A.; WANG, J. Y. Culturing hybridoma cell lines for monoclonal antibody production. **Cold spring harb protoc**. v.7, p. 640, 2013.

WOOD, P. **Imunologia**. 3ed. Pearson. 2013.

ZANATTA, A. S. **Obtenção de anticorpo monoclonal anti-dengue tipo2 em diferentes meios e sistemasde cultivo**.2009. 110 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de imunobiológicos). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

ZHAN, M. *et al.* From monoclonal antibodies to small molecules: the development of inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 pathway. **Drug discovery today**. v.2, n.6, 2016.

ZHU, H; YANG, S-T. Long-term continuous production of monoclonal antibody by hibridomas cells immobilized in a fibrous-bed bioreactor. **Cytotechnology**. v.44, p.1-14. 2004.