



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

**OBTENÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL MURINO
ANTI-CD25 ATRAVÉS DO CULTIVO DE HIBRIDOMA PC-61
EM BIORREATORES *SPINNER* EM MEIO LIVRE DE SORO**

PEDRO HENRIQUE DAMADA

São Carlos, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

**OBTENÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL MURINO
ANTI-CD25 ATRAVÉS DO CULTIVO DO HIBRIDOMA PC-61
EM BIORREATORES *SPINNER* EM MEIO LIVRE DE SORO**

PEDRO HENRIQUE DAMADA*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadores:

Prof. Dr. Claudio A. T. Suazo

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

* Bolsista CAPES – nº 1817237

São Carlos, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Pedro Henrique Damada, realizada em 22/03/2019:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius
UFSCar

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann
IFSC/USP

*Dedico este trabalho as pessoas mais importantes
da minha vida, meus pais, Carlos e Luciane.*

Agradecimentos

A Deus, pela existência e pelas incríveis oportunidades e experiências que me ajudaram a chegar aqui, e a me tornar quem sou.

Aos meus pais, Carlos e Luciane, que sempre estiveram ao meu lado, independente da situação, dando apoio e conselhos. Vocês me proporcionaram toda a educação e conhecimento para eu chegar aqui. Tenho muito orgulho e admiração por vocês.

A minha irmã, Gabrieli, pelos conselhos, por me ajudar com os meus textos, por me ouvir e fazer com que eu sempre olhe o lado positivo da situação.

Ao meu namorado, Rafael Dupim, que está sempre comigo, me dando apoio e me aconselhando. Com certeza sem você ao meu lado, me ouvindo e conversando comigo, me fazendo rir, essa jornada não teria sido tão maravilhosa. Obrigado por tudo.

Ao professor Dr. Claudio A. T. Suazo, por ter me aceito como aluno e ter confiado em mim este trabalho. Gostaria de agradecer todo apoio e conhecimento.

A professora Dra. Fernanda F. Anibal, por me auxiliar e me direcionar nas dificuldades que tive durante o desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio, pelo conhecimento e pelas conversas e risadas.

Ao pessoal do LATECC, Ju, Vivi, Jéssica e Eric, por me ajudarem no laboratório e pelas conversas e ótimos momentos de descontração.

A Ana Carolina Prampero, por me motivar e me auxiliar a desenvolver este trabalho, pela ajuda no laboratório e por ter paciência e me aguentar mandando várias mensagens.

A Cynthia de Castro, por me ajudar com o ELISA, nas inúmeras vezes que precisei, pelos conselhos, pelos momentos de descontração, pelas viagens até Ribeirão e por todo o apoio.

Ao pessoal de Ribeirão Preto do Laboratório de Imunologia e Citologia dos Fluídos Biológicos na Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo, em especial a professora Dra. Cleni M. Machado e ao técnico Luiz Fernando F. Tucci, por me auxiliar a realizar a purificação das minhas amostras.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica Celular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos e em especial ao professor Dr. Felipe Roberti Teixeira por me ajudar a realizar a purificação das minhas amostras.

A Sandra Thomas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto por emprestar o material necessário para realizar os procedimentos de purificação.

A secretária do PPGBiotec, Claudia Pastega, por toda ajuda e apoio.

A Marli Dupim e Vital Moreira, por todo o apoio e bons momentos.

Ao Rafael Meneghelli, pelo apoio.

Aos meus amigos, que surgiram nos mais diferentes momentos e desde então, estão sempre ao meu lado: Laila, Vinicius, Mariana, Claus, Helena, Ellen, Marina, Kézia, Giovanni, Tayane, Poli, William, Jéssica e Laís. A amizade de vocês é muito importante para mim.

Aos meus amigos que fiz durante o mestrado, Tathi, Murilo, Yagho, Dani, Mari, Gabi, Ana, pelos ótimos momentos de alegria.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

E por fim, a CAPES, pelo apoio financeiro.

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços
repetidos dia após dia.”*

Robert Collier

Resumo

O câncer é uma das doenças que mais causa mortes no mundo, para seu tratamento se destacam, métodos cirúrgicos, quimioterapêuticos e radioterapêuticos, os quais, nem sempre são eficientes, são de alto custo, de longa duração e podem trazer diversos efeitos adversos ao paciente. Com o intuito buscar novas metodologias, a imunoterapia, tratamento baseado na estimulação do sistema imune para o controle do câncer, tem sido uma das mais interessantes. Um dos métodos imunoterapêuticos mais utilizados é o uso anticorpos monoclonais (mAbs), que são glicoproteínas de alta especificidade, a qual já apresenta resultados positivos para doenças como esclerose múltipla e câncer de mama. Este trabalho teve como objetivo a otimização do cultivo de hibridomas PC-61 em biorreator do tipo spinner para a produção do mAb anti-CD25, com meio comercial livre de soro (SFM - Serum Free Medium) e com meio RPMI, suplementado com soro fetal bovino (SFB), utilizado como controle. Foram utilizados dois modos de operação: batelada e batelada alimentada, a fim de se comparar e propor uma melhor metodologia de cultivo. Além disso, foi feita a purificação desses anticorpos utilizando as técnicas de cromatografia de troca iônica e imunoprecipitação com proteína G em Sepharose. Como resultado, por meio do cultivo em batelada foi possível identificar o comportamento das células e estipular as melhores condições para realizar o cultivo em batelada alimentada. E assim, foi possível prolongar a fase pré-estacionária do cultivo onde observou-se maior produção de anticorpo monoclonal. O meio SFM apresentou os melhores resultados, em comparação ao RPMI (com SFB), no cultivo em batelada, e verificou-se que a produção de mAbs no SFM, foi 3 vezes maior do que no RPMI (com SFB). Além disso, através destes cultivos, notou-se que as células direcionam o seu metabolismo para produzir o anticorpo quando o nível de nutrientes no meio de cultivo é reduzido, e condições de estresse (sem ocasionar a morte celular) podem levar a uma produção maior de anticorpo. Quanto à purificação, a técnica de imunoprecipitação com proteína G se mostrou bastante eficiente, principalmente para a separação dos anticorpos presentes no sobrenadante do cultivo com SFM, que possui baixo teor proteico. Portanto, a utilização do meio SFM é uma ótima alternativa em comparação aos meios de cultivo suplementados com SBF, uma vez que, em determinada condição, permite a obtenção de maiores quantidades de anticorpo, e garante maior facilidade na aplicação de técnicas de purificação, diminuindo os custos da produção.

Palavras-chaves: imunoterapia, anticorpo monoclonal anti-CD25, soro fetal bovino.

Abstract

Cancer is one of the deadliest diseases in the world. Its treatment includes surgical, chemotherapeutic and radiotherapeutic methods, which, although efficient, are expensive, long and can have several side effects to the patient. In order to seek new methodologies, immunotherapy, a treatment based on stimulation of the immune system to control cancer, has been one of the most interesting. One of the most used immunotherapeutic methods for this purpose is based on the use of monoclonal antibodies (mAbs), high specificity glycoproteins that are gaining space and arousing interest due to the positive results have already obtained for different diseases, such as multiple sclerosis and breast cancer. The objective of this work was to optimize the culture of PC-61 hybridomas in spinner flask for the production of the anti-CD25 mAb, with serum free commercial medium (SFM) and with RPMI medium supplemented with fetal bovine serum (FBS), used as control. Two modes of operation were used: batch and fed batch, in order to compare the results and propose a better methodology of cultivation. In addition, the purification of the antibodies was done using the techniques of ion exchange chromatography and immunoprecipitation with protein G in Sepharose. As a result, by batch culture, it was possible to identify the behavior of the cells and to stipulate the best conditions to carry out batch culture. Thus, it was possible to prolong the pre-stationary phase of the culture where a higher production of monoclonal antibody was observed. The SFM medium presented the best results compared to RPMI (with FBS) in batch culture, it was found that the production of mAbs in SFM was 3 times higher than in RPMI (with FBS). Furthermore, through these cultures, cells have been noted to direct their metabolism to produce the antibody when the nutrient level in the culture medium is reduced, and stress conditions (without causing cell death) can lead to increased production of antibody. In relation to purification, the immunoprecipitation technique with G protein proved to be very efficient, mainly for the separation of the antibodies present in the supernatant of the SFM culture, which has low protein content. Therefore, the use of the SFM medium is a great alternative to the culture media supplemented with FBS, since, in certain conditions, it allows the obtaining of larger amounts of antibody, and ensures greater ease in the application of purification techniques, reducing production costs.

Key words: immunotherapy, anti-CD25 monoclonal antibody, fetal bovine serum

Lista de Figuras

- Figura 1:** Linhas de defesa, inata e adaptativa, da resposta imunológica, com destaque para as células e tempo de ação.9
- Figura 2:** Estrutura básica de um anticorpo, em evidencia os domínios varáveis, na imagem VL, referente a porção da cadeia leve e VH, referente a porção de cadeia pesada, nas porções N-terminais (NH_3^+) e domínios constantes, na imagem CL, referente a porção da cadeia leve e CH, referente a porção de cadeia pesada, nas porções C-terminais (COO^-)
As cadeias são unidas por ligações dissulfeto (S – S). 11
- Figura 3:** Classes das imunoglobulinas: IgG (monômero), IgD (monômero), IgE (monômero), IgA (dímero) e IgM (pentâmero)..... 12
- Figura 4:** Ação dos anticorpos policlonais (A) e monoclonais (B). Os anticorpos monoclonais prendem-se a um específico antígeno, enquanto que os policlonais ligam-se a diferentes antígenos. 13
- Figura 5:** Número de anticorpos monoclonais e produtos relacionados aprovados por ano...16
- Figura 6:** Representação esquemática do receptor de interleucina-2 (IL-2), proteína transmembrana presente em células específicas e formado pelas cadeias IL-2R α (CD25), IL-2R β e γ_c 17
- Figura 7:** Esquema simplificado da produção de hibridomas. Um animal é imunizado com um antígeno de interesse, e os linfócitos originados são fundidos com células de mieloma, os hibridomas são selecionados e cultivados para a produção de anticorpos monoclonais de interesse. 19
- Figura 8:** Fases lag, de crescimento, estacionária e de declínio para o crescimento de células híbridas em um gráfico ln da concentração de células viáveis *versus* tempo.....20
- Figura 9:** Ciclo celular, constituído por Interfase, dividida em G1, G2 e S, e Mitose. A mitose, etapa de menor duração, é sub-dividida em prófase, metáfase anáfase e telófase.21
- Figura 10:** Diferenças entre os mecanismos de morte celular, apoptose e necrose, em células animais. Durante a apoptose, a membrana sofre um encolhimento seguido por uma fragmentação, enquanto que durante a necrose, a célula sofre uma ruptura.22
- Figura 11:** Primeira fase da glicólise, fase preparatória, na qual a molécula de glicose é convertida a duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, com o consumo de duas moléculas de ATP.....25
- Figura 12:** Segunda fase da da glicólise, fase de pagamento, na qual duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, produzidas na fase preparatória, são convertidas a duas moléculas de piruvato, com a produção de 4 moles de ATP..... 26

Figura 13: Metabolismo da glutamina, glutaminólise. A glutamina, como mostrado na imagem, pode seguir três caminhos, ser totalmente oxidada a gás carbônico, ou participar do ciclo de Krebs, ou sair da mitocôndria, na forma de malato, e convertida a piruvato.	27
Figura 14: Frasco T, com destaque para a tampa com filtro hidrofóbico.	31
Figura 15: Esquema de um biorreator do tipo <i>spinner</i> utilizado no cultivo de células animais.	32
Figura 16: Biorreatores de 100 e 500 mL de capacidade, do tipo <i>spinner</i> com agitador pendular, utilizados neste trabalho.	33
Figura 17: Modos de operação de biorreatores, da esquerda para a direita, batelada, batelada alimentada, cultivo contínuo simples e tipo perfusão. Com exceção do modo de operação em batelada, é feita a alimentação, e apenas no cultivo contínuo há remoção de volume, sendo feita na mesma razão que a alimentação. No cultivo contínuo de perfusão, há ainda, separação das células.	35
Figura 18: Componentes importantes na análise de ELISA: Placa de poço (A) e Espectrofotômetro (B).	36
Figura 19: ELISA tipo Indireto.	36
Figura 20: ELISA tipo Sanduíche.	37
Figura 21: ELISA tipo Competitivo.	37
Figura 24: Equipamento de baixa rotação para promover interação entre resina e anticorpos.	48
Figura 25: Câmara de Neubauer para contagem de células, com destaque para uma grade de contagem.	50
Figura 26: Gráficos para o cultivo celular em meio RPMIS: A) Concentração de células viáveis e viabilidade vs. tempo. B) Número total de células viáveis e pH vs. tempo.	56
Figura 27: Gráfico de consumo de glicose e glutamina e produção de lactato por unidade de tempo pelas células PC-61 no meio de cultivo RPMIS.	58
Figura 28: Gráfico ln (concentração de células viáveis) vs. tempo para o crescimento das células no meio de cultivo RPMIS. As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial e FE, Fase Estacionária. A linha (—) corresponde a regressão linear para o cálculo de $\mu_{m\acute{a}x}$, em evidência. O traço (---) determina o início da FE.	59
Figura 29: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e Densidade Ótica vs. tempo para o cultivo com o meio de cultivo RPMIS. As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial e FE, Fase Estacionária. O traço (---) determina o início da FE.	59
Figura 30: Gráficos para o cultivo celular em meio SFM: A) Concentração de células viáveis e viabilidade vs. tempo. B) Número total de células viáveis e pH vs. tempo.	61

Figura 31: Gráfico de consumo de glicose e glutamina e produção de lactato por unidade de tempo pelas células PC-61 no meio SFM.....	62
Figura 32: Gráfico ln (concentração de células viáveis) vs. tempo para o crescimento das células no meio de cultivo SFM. As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial, FE, Fase Estacionária e FD, Fase de Declínio. A linha (—) corresponde a regressão linear para o cálculo de $\mu_{m\acute{a}x}$, em evidência. O primeiro traço (---) determina o início da FE as 72 horas, e o segundo traço (---), o possível da FD as 84 horas.	63
Figura 33: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e DO_{mAb} vs. tempo para o cultivo com o meio de cultivo SFM. As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial, FE, Fase Estacionária e FD, Fase de Declínio. O primeiro traço (---) determina o início da FE as 72 horas, e o segundo traço (---), o início da FD as 84 horas.	63
Figura 34: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e DO_{mAb} vs. tempo para os cultivos com os meios: RPMIS (A) e SFM (B). As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial, FE, Fase Estacionária e FD, Fase de Declínio. O primeiro traço (---), da esquerda para a direita em (A) e (B) determina o início da FE, e o segundo traço (---), da esquerda para a direita, em (B), o início da FD.	65
Figura 35: Gráfico do tipo barra da taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) por intervalo de tempo, onde 1 representa o intervalo entre 0 e 24 h, 2, 24 e 48 h, 3, 48 e 72 h e 4, 72 e 96 h. Dados para o cultivo com o meio RPMIS.	66
Figura 36: Gráfico do tipo barra da taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) por intervalo de tempo, onde 1 representa o intervalo entre 0 e 24 h, 2, 24 e 48 h, 3, 48 e 72 h e 4, 72 e 96 h. Dados para o cultivo com o meio SFM.	66
Figura 37: Gráfico concentração de células viáveis e viabilidade vs. tempo (A) e ln (concentração de células viáveis) vs. tempo (B) para os biorreatores Sr1 e Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.	68
Figura 38: Gráfico número total de células viáveis e pH do sobrenadante vs. tempo para os biorreatores Sr1 e Sr2 como o meio de cultivo RPMIS.	69
Figura 39: Gráfico de consumo de glicose e glutamina e produção de lactato por unidade de tempo pelas células nos biorreatores Sr1 e Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.....	70
Figura 40: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e DO_{mAb} vs. tempo para os biorreatores Sr1 e Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.....	71
Figura 41: Gráfico do tipo barra da taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para Sr1 (A) e Sr2 (B), por intervalo de tempo, onde 1 representa o intervalo entre 0 e 24 h, 2, 24 e 48 h,	

3, 48 e 72 h, 4, 72 e 96 h, 5, 96 e 120 h e 6, 120 e 144 h. Dados para o cultivo com o meio RPMIS.	72
Figura 42: Gráfico concentração de células viáveis e viabilidade vs. tempo (A) e ln (concentração de células viáveis) vs. tempo (B) para os biorreatores S1 e S2 com o meio de cultivo SFM.	73
Figura 43: Gráfico número total de células viáveis e pH do sobrenadante vs. tempo para os biorreatores S1 e S2 com o meio de cultivo SFM.	74
Figura 45: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e Densidade Ótica vs. tempo para os biorreatores S1 e S2 com o meio de cultivo SFM.	76
Figura 46: Gráfico do tipo barra da taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para S1 (A) e S2 (B), por intervalo de tempo, onde 1 representa o intervalo entre 0 e 24 h, 2, 24 e 48 h, 3, 48 e 72 h, 4, 72 e 96 h, 5, 96 e 120 h e 6, 120 e 144 h. Dados para o cultivo com o meio SFM.	77
Figura 47: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e Densidade Ótica vs. tempo para o meio RPMIS (A) e meio SFM (B).....	77
Figura 48: Gráfico de absorvância (280 nm) vs. número de tubo de coleta para o meio RPMIS (A) e para o meio SFM (B)	80
Figura 49: Gráfico de absorvância (280 nm) vs. número de tubos de coleta para o meio RPMIS (A) e para o meio SFM (B). O tubo 0 corresponde ao sobrenadante, dos tubo 1 ao 7, as soluções de lavagem e dos 8 ao 14, as amostras eluidas.	81
Figura 50: Gel de poliacrilamida (10%) obtido a partir da eletroforese com as amostras em meio RPMIS (A) e em meio SFM (B) obtidas após a purificação. As numerações abaixo da figura correspondem, para ambos os meio de cultivo a: 1, padrão ThermoFisher, 2, sobrenadante, 3, solução de lavagem e 4 – 10, frações das eluições. No lado esquerdo da Figura (A) estão disponíveis as massas moleculares das proteínas presentes na solução padrão em kDa.....	82
Figura 51: Gráficos de Densidade ótica vs. diluição para o meio RPMIS(A) e meio SFM (B). No gráfico A, 1 corresponde a :100; 2 a 1:400; 3 a 1:800 e 4 a 1:1600. No gráfico B, 1 corresponde a 1:1000, 2 a 1:2000, 3 a 1:4000, 4 a 1:8000 e 5 a 1:16000.	83

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estimativa dos casos novos de câncer no Brasil para 2018.....	5
Tabela 2: Estimativa da Incidência de diferentes cânceres no Brasil para 2018.....	5
Tabela 4: Anticorpos monoclonais aprovadas para uso no tratamento de diferentes doenças.	15
Tabela 5: Biorreatores do tipo homogêneo e heterogêneo.	31
Tabela 6: Descrição dos experimentos realizados neste trabalho para atingir os objetivos propostos.....	54
Tabela 7: Valores de taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para o cultivo com os meios RPMIS e SFM a cada 24 h.	66
Tabela 8: Valores de taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para o cultivo com os meios RPMIS e SFM a cada 24 h.	72
Tabela 9: Valores de taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para o cultivo com os meios RPMIS e SFM a cada 24 h.	76
Tabela 10: Maiores valores de absorvância para os tubos de amostras eluídas dos meios RPMIS e SFM.	81
Tabela 11: Valores de concentração proteína em amostras purificadas para os meios RPMIS e SFM.	84
Tabela A-1: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada com o meio RPMIS.....	95
Tabela A-2: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada com o meio RPMIS.	95
Tabela A-3: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada alimentada para o Sr1 co o meio de cultivo RPMIS.	96
Tabela A-4: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada alimentada para o Sr1 co o meio de cultivo RPMIS.	97
Tabela A-5: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada alimentada para o Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.	98
Tabela A-6: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada alimentada para o Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.	99
Tabela B-1: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada com o meio de cultivo SFM. .	100
Tabela B-2: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada com o meio de cultivo SFM.	100
Tabela B-3: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada alimentada para o S1 com o meio de cultivo SFM.	101

Tabela B-4: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada alimentada para o S1 com o meio de cultivo SFM.	102
Tabela B-5: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada alimentada para o S2 com o meio de cultivo SFM.	103
Tabela B-6: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada alimentada para o S2 com o meio de cultivo SFM.	104

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ACS – American Cancer Society;

ADP – Adenosina difosfato;

ATP – Adenosina trifosfato;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DO – Densidade ótica;

ELISA – Enzyme-Linked ImunoSorbent Assay, ensaio imunoenzimático;

ERB – Experimento de cultivo celular com o meio RPMIS em biorreator operado em Batelada;

ESB – Experimento de cultivo celular com o meio SFM em biorreator operado em Batelada;

ERBA – Experimento de cultivo celular com o meio RPMIS em biorreator operado em Batelada Alimentada;

ESBA – Experimento de cultivo celular com o meio SFM em biorreator operado em Batelada Alimentada;

EPR – Experimento de Purificação dos anticorpos monoclonais obtidos do cultivo com RPMIS;

EPS – Experimento de Purificação dos anticorpos monoclonais obtidos do cultivo com SFM;

FCE – Fase de crescimento exponencial;

FD – Fase de declínio;

FDA – Food and Drugs Administration;

FE – Fase estacionária;

HACA – Anticorpo Humano Anti-Quimérico;

HAMA – Anticorpo Humano Anti-camundongo;

CDR – Complementarity Determining Region;

HAT – Hipoxantina, Aminopterina e Timidina, meio de cultivo para seleção de hibridomas;

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography, instrumento de cromatografia líquida;

Ig – Imunoglobulina;

IL-2R – Receptor de Interleucina – 2;

INCA – Instituto Nacional do Câncer;

LATECC – Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular;

mAb – anticorpo monoclonal;

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade;

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adeninda;

NK – Natural Killer, células apresentadoras de antígenos;

ONU – Organização das Nações Unidas;

q_{gli} – Taxa específica de consumo/produção de glicose;

RPMI – 1640 – Roswell Park Memorial Intitute, meio de cultivo celular para hibridomas;
RPMIS – Meio de cultivo RPMI suplementado com 10% (v/v) de SFB;
RS – Remoção de excesso de volume para os biorreatores com o meio SFM;
RSr – Remoção de excesso de volume para os biorreatores com o meio RPMI;
S – Biorreator com o meio SFM;
SFB – Soro Fetal Bovino;
SFM – Serum Free Medium, meio de cultivo sem soro para hibridomas;
Sr – Biorreator com o meio RPMI;
TA – Temperatura ambiente;
Td – Tempo de duplicação;
TFS – ThermoFisher Scientific;
NAD⁺ - Nucleótideo de difosfopiridina
V_H – Domínio da região variável da cadeia pesada;
V_L – Domínio da região variável da cadeia leve;
 $\mu_{\text{máx}}$ – Taxa máxima de crescimento específico.

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Câncer e os seus Números.....	4
2.2 Tratamentos para o Câncer.....	5
2.3 Imunoterapia.....	6
2.3.1 Sistema Imune	7
2.3.2 Anticorpos.....	10
2.3.3 Anticorpos monoclonais	13
2.3.3.1 Anticorpos Monoclonais no Mercado Mundial.....	14
2.3.3.2 Anticorpo Monoclonal Murino Anti-CD25	16
2.4 Cultivo Celular de Hibridomas.....	18
2.4.1. Cultivo in vivo e in vitro de Hibridomas	19
2.4.2 Crescimento Celular de Hibridomas.....	20
2.5 Meios de Cultivo	23
2.6. Metabolismo de Hibridomas	25
2.6.1 Glicose e Aminoácidos Essenciais	25
2.6.2 Oxigênio e Gás Carbônico.....	28
2.6.3 Metabólitos	29
2.7. Cultivo em Escala Laboratorial.....	30
2.7.1. Cultivo em Sistema Estático.....	30
2.7.2. Cultivo em Biorreator Spinner.....	31
2.8 Detecção, Quantificação e Purificação de Anticorpos Monoclonais para Testes Antitumorais	35
2.8.1 ELISA.....	35
2.8.2. Purificação de Anticorpos Monoclonais.....	37
2.9. Justificativa.....	39
3. Objetivos.....	41
4. Material e Métodos	42
4.1 Linhagem Celular e Preservação	42
4.2 Meios de Cultivo	42
4.2.1 Meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) - 1640.....	42
4.2.2 Meio Hybridoma Serum Free Medium (SFM).....	43
4.3. Cultivo celular	43

4.3.1	Descongelamento dos Hibridomas PC-61	43
4.3.2	Expansão Celular em Frascos T	43
4.3.3	Expansão Celular em Biorreator do Tipo Spinner em Batelada.....	44
4.3.4	Expansão Celular em Biorreator do Tipo Spinner em Batelada Alimentada.....	45
4.4	Purificação dos Anticorpos Monoclonais.....	46
4.4.1	Cromatografia de Troca Iônica.....	47
4.4.2	Imunoprecipitação com Proteína G em Sepharose.....	47
4.4.2.1	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	48
4.4.2.2	Método de Bradford	49
4.5	Métodos Analíticos Utilizados neste Trabalho	49
4.5.1	Densidade Celular e Viabilidade	49
4.5.2	Taxa Máxima de Crescimento Celular Específica ($\mu_{\text{máx}}$).....	51
4.5.3	Análise de Glicose e Lactato	51
4.5.4	Quantificação de Aminoácidos em Cultivo.....	52
4.5.5	Método ELISA para Detecção de Anticorpos Monoclonais	53
4.6	Delineamento Experimental de Pesquisa	54
5	Resultados e Discussão	56
5.1	Cultivo de Hibridomas em Modo de Operação do Tipo Batelada	56
5.1.1	Cultivo em Meio RPMIS (ERB).....	56
5.1.2	Cultivo em Meio SFM (ESB).....	60
5.1.3	Comparação Entre os Cultivos em Batelada em Meio RPMIS e SFM	64
5.2	Cultivo de Hibridomas em Modo de Operação do Tipo Batelada Alimentada... 67	
5.2.1	Cultivo em Meio RPMIS (ERBA).....	67
5.2.2	Cultivo em Meio SFM (ESBA)	72
5.2.3	Comparação Entre os Cultivos em Batelada Alimentada em Meio RPMIS e SFM	77
5.3	Comparação Entre os Cultivos em Batelada e Batelada Alimentada.....	79
5.4	Purificação (EPR e EPS)	79
5.4.1	Cromatografia de Troca Iônica.....	79
5.4.2	Imunoprecipitação com Proteína G em Gel de Sepharose	80
6	Conclusão	85
7	Referências	86
	APÊNDICE A – Cultivo em RPMIS.....	95

APÊNDICE B – Cultivo em SFM	100
--	------------

1. INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, em 2015 foi responsável por 8,8 milhões de mortes, ficando atrás apenas das doenças cardíacas (ONUBR, 2018). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que até o final de 2018, cerca de 600 mil casos de câncer sejam diagnosticados no ano, sendo os cânceres de próstata e mama os mais incidentes (INCA, 2018). Estes números mostram que a luta contra câncer está longe de terminar e novas pesquisas são de extrema importância afim de se obter novos tratamentos que possam beneficiar o maior número de pessoas.

Um dos tratamentos alternativos para câncer que vem se destacando é a imunoterapia, tratamento biológico que visa potencializar o sistema imunológico de maneira que este possa combater infecções e outras doenças (DOUGAN e DRANOFF, 2009; MELLMAN *et al.*, 2011). A imunoterapia na última década tem mostrado resultados muito promissores para o tratamento e cura de diversas doenças, como Linfoma não-Hodgkin e esclerose múltipla (ROLAND, 2012) e por isso vem sendo bastante noticiada nos meios de comunicação nos últimos anos (DINE *et al.*, 2017; OISETH *et al.*, 2017). Entretanto, mesmo com os avanços em relação a imunoterapia, são necessários mais estudos neste campo, visto que o sistema imune é muito complexo e sua compreensão ainda é incompleta (DINE *et al.*, 2017).

As duas doenças anteriormente citadas, linfoma não-Hodgkin e esclerose múltipla, têm o seu tratamento baseado no uso de anticorpos monoclonais (mAbs), um dos métodos da imunoterapia mais utilizados e investigados atualmente (GRANIER *et al.*, 2016; REICHERT e DHIMOLEA, 2012; SAEED *et al.*, 2017).

Os mAbs são glicoproteínas, de alta especificidade e produzidos a partir de hibridomas, células híbridas formadas pela fusão entre células do mieloma e de linfócitos B proveniente de um animal previamente imunizado com o antígeno de interesse. Esta técnica foi desenvolvida por Kohler e Milstein em 1975, e permitiu o aumento e o aperfeiçoamento de diversas técnicas e aplicações na área biomédica (KOHLE E MILSTEIN, 1975).

O surgimento dos hibridomas engrenou um grande número de estudos, permitindo que os mAbs fossem colocados no mercado no início de 1990, e espera-se que até 2020, esteja disponível 70 produtos para uso, para diferentes tratamentos, entre câncer e rejeição de transplantes (ECKER *et al.*, 2015; SHEPARD *et al.*, 2017)

Um mAb que vem recebendo notável interesse na terapia do câncer é o anti-CD25 (BIELEKOVA *et al.*, 2011; RECH *et al.*, 2012; WALSH *et al.*, 2013). Este mAb apresenta um papel importante em estudos sobre a função das células T regulatórias (T_{reg}) em imunoterapias dirigidas para o tratamento de tumores e doenças autoimunes (FLYNN e HARTLEY, 2017)

O mAb anti-CD25 se mostrou capaz de promover a regressão de diferentes tumores por causar, *in vivo*, a depleção de células T_{reg} $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (HONG *et al.*, 2010; ONIZUKA *et al.*, 1999; ZOU, 2006) por meio do bloqueio da porção alfa do receptor de interleucina - 2 (IL-2) presente na membrana plasmática destas células (HONG *et al.*, 2010; ONIZUKA *et al.*, 1999; SETIADY, *et al.*, 2010; RECH *et al.*, 2012).

As células T_{reg} $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ estão presentes em grandes quantidades em microambientes tumorais e são responsáveis pela imuno homeostase, assim a ausência destas células provocada pelo mAb, ocasiona um desequilíbrio e permite que o sistema imune reconheça as células anormais e as ataque (BETTS *et al.*, 2006; HUSS *et al.*, 2016; SEATIADY, *et al.*, 2010). Mesmo com potencial antitumoral, o uso do mAb possibilita o aparecimento de doenças auto-imunes, o que se faz necessários mais estudos sobre os efeitos colaterais e como contorná-los (ELLIS e BRALEY-MULLEN, 2017).

Mesmo com o progresso nas pesquisas com mAbs anti-CD25 em aplicações imunoterapêuticas há pouca informação de domínio público disponível sobre técnicas de biologia molecular, cultivo de células, produção, purificação e avaliação terapêutica desse mAb. Nesse cenário de carência de informações surgem oportunidades de grande interesse para pesquisadores da área acadêmica e industrial em temáticas que vêm oferecendo proeminentes inovações, como: novas linhagens celulares produtoras de mAbs anti-CD25, meios de cultura livres de soro fetal bovino (SFB), técnicas e equipamentos para cultivos celulares, técnicas de purificação de proteínas e novos tipos de tumores para ampliar as aplicações de imunoterapias dirigidas para CD25.

Para fins de pesquisa, a linhagem celular mais utilizada para produção do mAb murino anti-CD25, visando estudos de seu efeito anticancerígeno, tem sido o hibridoma PC-61. No que se refere a meios de cultura para cultivo de hibridomas, existem várias opções comerciais, porem, é recomendável que primeiro seja feita uma triagem mediante o cultivo do hibridoma para garantir uma escolha adequada. Os hibridomas, devido a sua natureza híbrida e disponibilidade de grande número de linhagens, apresentam demandas nutricionais muito diversas.

Com relação aos equipamentos disponíveis para o cultivo de hibridoma em suspensão, sobressai-se o biorreator do tipo *spinner*, este é o mais apropriado para a produção padronizada na ordem de miligramas de mAb (DUVAL *et al.*, 1990; MARX *et al.*, 1997; PRAMPERO, 2017; ZANNATA, 2009). Deve-se destacar que para o uso de mAbs é necessário um alto grau de pureza e a cromatografia de afinidade tem conduzido a resultados bastante satisfatórios (AYBAY e IMIR 2000; MANNA *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2014).

Neste trabalho, hibridomas PC-61 foram cultivados em meio livre de SFB em biorreatores do tipo *spinner* com o objetivo de obter mAbs anti-CD25. O SFB é bastante utilizado em cultivos celulares por conter fatores de crescimento e outras proteínas que favorecem a ativação e a expansão celular, mas o seu uso vem sendo desestimulado por agências reguladoras, como a FDA (Food Drugs Administration – USA), uma vez que este componente pode trazer algumas desvantagens, como: alto risco de contaminação, dificuldades na etapa de purificação devido a presença de múltiplas proteínas provenientes do SFB, entre outras (VAN DER VALK *et al*, 2018). Por estas razões, e por haver estudos em nosso laboratório (Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares - LATECC) em relação ao uso, foi utilizado o meio SFM (Serum Free Medium), meio sem SFB.

Os modos de operação utilizados foram batelada e batelada alimentada, afim de averiguar o comportamento das células, assim como garantir elevada produção do mAb, e ainda, reprodutibilidade e possibilidade de ser escalonável. Além da produção do anti-CD25, foi feita a purificação do anti-CD25, com a proteína “G” para estipular um procedimento eficiente e simples. A metodologia de cultivo seguida foi desenvolvida no LATECC na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) por Prampero (2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer e os seus Números

Câncer é o nome utilizado para descrever mais de 100 diferentes tipos de doenças, que se assemelham por falhas em mecanismos que controlam o crescimento e a proliferação celular (LODISH, *et al.*, 2014). A palavra “câncer”, foi primeiramente utilizado por Hipócrates, o pai da medicina, e vem do grego *Karkinos*, que significa, caranguejo (INCA, 2011).

O aparecimento e desenvolvimento do câncer acontecem em várias etapas e deve-se a mutações no genoma das células que levam a modificações de suas atividades. Destacam-se duas grandes classes de genes, os protooncogenes e os genes supressores tumorais. Os protooncogenes são responsáveis por promover o crescimento celular, mutações em suas estruturas os transformam em oncogenes, que leva ao crescimento excessivo, já os genes supressores tumorais, ao contrário, tem como função, limitar o crescimento, a sua inativação por alguma modificação leva a divisões erradas (LOEB, 2001; WADDELL, *et al.*, 2015; VOGELSTEIN, *et al.*, 2013). Há ainda, um outro grupo de genes, que pode levar ao câncer, trata-se dos caretakers, que tem como papel manter a integridade do genoma, garantindo o reparo e evitando a desregulação do crescimento e proliferação celular. As mutações em sua maioria, ocorrem em células somáticas e não em células germinativas, logo, não transmitidas a próxima geração, mas algumas mudanças hereditárias, presentes nas células germinativas, aumentam a probabilidade de se desenvolver a doença, em algum período da vida (CHAE, *et al.*, 2016).

A longa exposição e a utilização à carcinogênicos (substância com potencial cancerígeno), é responsável por aproximadamente 80% dos casos de câncer, como exemplo, têm-se: tabagismo, má-alimentação, poluição ambiental, radiação, entre outros. (LOEB, 2001).

Em relação ao número de casos de câncer, no mundo, cerca de 14 milhões de pessoas, são diagnosticadas a cada ano, no Brasil, o INCA estima que até o final de 2018, o número de casos chegue a 600.000, sendo o maior número na região sudeste (Tabela 1), possivelmente o grande número de habitantes e de pessoas com idade avançada justifiquem esses números. E dentre os diferentes tipos, os cânceres de mama e o de próstata são os mais incidentes, em todas as regiões, como mostrado na Tabela 2 (INCA, 2018).

Tabela 1: Estimativa dos casos novos de câncer no Brasil para 2018.

Região	Estimativa dos Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Norte	11.590	11.770	23.360
Nordeste	58.770	58.510	117.280
Centro-Oeste	21.630	21.980	43.610
Sul	72.560	53.170	125.730
Sudeste	135.590	137.020	275.610
Brasil	300.140	282.450	582.590

Fonte: INCA, 2018.

Tabela 2: Estimativa da Incidência de diferentes cânceres no Brasil para 2018.

Localização Primária	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sul	Sudeste
Próstata	2.700	15.820	5.330	14.290	30.080
Mama Feminina	1.730	11.860	4.200	11.030	30.880
Colo do Útero	2.300	6.030	1.490	2.130	4.420
Traqueia, Brônquio e Pulmão	1.340	5.230	2.300	8.460	13.940
Cólon e Reto	1.110	5.060	2.820	6.730	20.640

Fonte: INCA, 2018.

2.2 Tratamentos para o Câncer

Atualmente, os tratamentos mais indicados e utilizados para o câncer são os métodos cirúrgicos, quimioterápicos e radioterápicos (INCA, 2011). A cirurgia é utilizada para diversos fins, como realizar diagnósticos, verificar o estágio do câncer, corrigir desconfortos causados pela doença e também promover a remoção do tumor.

O tumor pode ser tirado completamente, isso quando o tumor é localizado em apenas uma parte do corpo e sua remoção não acarreta em nenhum dano aos órgãos ou tecidos próximos; ou ainda, parcialmente, neste caso, as técnicas de quimioterapia e radioterapia são necessárias (ACS, 2018; GUO e TSUNG, 2017).

A radioterapia é um método que são utilizadas partículas ou ondas de alta energia, como raios-X, raios gama, feixes de elétrons ou prótons, com o intuito de destruir ou danificar células cancerosas. A radiação provoca pequenos cortes no DNA, o que impede o crescimento das células fazendo com que elas morram. Vale observar que a radioterapia é um tratamento local, direcionado e afeta apenas uma parte do corpo (ACS, 2018; GUO e TSUNG, 2017).

A quimioterapia, ao contrário da cirurgia e da radioterapia, afeta todo o corpo, podendo assim atingir células que tenham se desprendido e migrado para outras partes do corpo. O tratamento é realizado por meio de drogas e apresenta três objetivos principais, cura, quando, a princípio, pode-se destruir todas as células cancerígenas; controle, para restringir o avanço da doença e paliativa, para aliviar os sintomas causados pelo câncer. É importante observar que as drogas a serem administradas dependem do tipo de câncer do paciente, assim como a idade, o peso, o estágio do câncer, entre outros fatores (ACS, 2018; GUO e TSUNG, 2017).

Os métodos acima mencionados apresentam eficiência no tratamento do câncer, todavia podem causar diversos efeitos colaterais ao paciente, influenciando na qualidade de vida, e ainda ser de longa duração e de alto custo (GUO e TSUNG, 2017). Com o intuito de contornar essas dificuldades, novos procedimentos vêm sendo pesquisados, como por exemplo a imunoterapia.

2.3 Imunoterapia

Segundo o INCA (2011), a imunoterapia é um tratamento que visa promover a estimulação do sistema imunológico, através do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica. Este tipo de tratamento vem sendo bastante pesquisado e empregado no tratamento do câncer, uma vez que se mostrou capaz de limitar ou até mesmo eliminar tumores, de forma rápida e com menos efeitos colaterais aos pacientes (MELLMAN *et al.*, 2011; ROCHE, 2017). Tanto é que em 2016, os resultados positivos já obtidos permitiram que a imunoterapia fosse eleita como o maior avanço contra o câncer pela Sociedade Norte-Americana de Oncologia Clínica (ASCO, sigla em inglês). Portanto, trata-se de um grande campo de pesquisa e com um grande futuro (HOFF e MUNHOZ, 2016)

Historicamente, o primeiro tratamento imunoterapêutico para o tratamento de câncer foi feito por William Coley em 1890, o qual utilizou as toxinas de dois diferentes tipos de bactérias, *Streptococcus erysipelatis* e *Bacillus prodigiouis*, em um jovem paciente com sarcoma (BICKELS *et al.*, 2002). De lá para cá, o entendimento em relação aos mecanismos do sistema imune se tornou mais claro, o que possibilitou que diversas vias imunes ser tornassem alvos atraentes, para obtenção de respostas antitumorais em pacientes com câncer (BORGHAEI *et al.*, 2009).

Atualmente, diferentes métodos imunoterapêuticos já estão disponíveis para uso, sendo a maioria classificados em ativo e passivo, de acordo com as substâncias utilizadas e seus mecanismos de ação (CARVALHO *et al.*, 2016). Na imunoterapia ativa, são utilizadas substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica, com o intuito de intensificar a resistência ao crescimento tumoral, por meio da criação de memória imunológica. Tem-se como

exemplo, vacinas de células tumorais, capazes de promover a mobilização de células do sistema imunológico, assim como, a amplificação de respostas imunes para que haja o reconhecimento do tumor e posterior eliminação (AROSA *et al.*, 2012).

Na imunoterapia passiva são administrados anticorpos antitumorais ou células mononucleares exógenas para proporcionar capacidade imunológica de combate a doença, o que gera uma imediata e limitada proteção (CARVALHO *et al.*, 2016). Como exemplo têm-se os anticorpos monoclonais (mAbs), os quais são produzidos de forma específica para antígenos expressos por células tumorais (AROSA *et al.*, 2012), e o uso destes vem crescendo de forma exponencial, principalmente pelos resultados satisfatórios já obtidos (NEVES e KWOK, 2015; SHUPTRINE *et al.*, 2012).

2.3.1 Sistema Imune

O sistema imune tem como função manter a homeostase e proteger o organismo contra agentes estranhos (também chamados de antígenos), incluindo macromoléculas, pequenas moléculas e microrganismos, infecciosos ou não. A entrada destes antígenos, no organismo, pode desencadear uma resposta imunológica (Figura 1), esta função de defesa é essencial contra o desenvolvimento de infecções e tumores (ABBAS *et al.*, 2015; MURPHY *et al.*, 2010; YATIM, K e LAKKIS, 2015)

A primeira linha de defesa recebe o nome de imunidade natural ou inata, trata-se de uma resposta rápida e abrange um conjunto de mecanismos de defesas físicos, celulares e bioquímicos. Os principais componentes são: barreiras físicas e químicas (epitélio e agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais), células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos), células NK (do inglês, *Natural Killer*), células dendríticas, consideradas as principais células apresentadoras de antígenos, algumas células linfóides, proteínas do sangue, incluindo mediadores de inflamação e citocinas, responsáveis pelo controle das atividades celulares (YATIM e LAKKIS, 2015; CRUVINEL *et al.*, 2010). É importante considerar que estes componentes estão presentes em todos os indivíduos, mesmo antes do estabelecimento de uma infecção, e pode ser modulado e regulado qualitativa ou quantitativamente após o contato (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Após o rompimento das barreiras epiteliais pelos microrganismos, a resposta imune se dá por meio de duas reações, inflamação e defesa antiviral (ABBAS *et al.*, 2015; YATIM e LAKKIS, 2015). A inflamação se caracteriza pelo recrutamento e ativação de leucócitos e extravasamento de proteínas plasmáticas no local da infecção com o intuito de eliminar o agente estranho. Este processo ocorre graças a citocinas, moléculas sinalizadoras produzidas por células dendríticas, macrófagos e outros tipos de células. Os principais leucócitos recrutados

são os fagócitos, neutrófilos e monócitos, que posteriormente desenvolvem-se em macrófagos teciduais. Os fagócitos ingerem os microrganismos e células mortas, destruindo-os nas vesículas intracelulares, fenômeno conhecido como fagocitose. Já a defesa antiviral acontece por meio de uma reação mediada por citocina na qual as células adquirem resistência às infecções virais e também pela morte das células infectadas por vírus pelas células NK (ABBAS *et al.*, 2015; JANEWAY e MEDZHITOV, 2002).

Os microrganismos que resistem a reações de defesa nos tecidos podem entrar no sangue, onde são reconhecidos pelas proteínas plasmáticas, sendo as proteínas do sistema complemento as mais importantes. As proteínas do complemento, após o contato com as proteínas nas superfícies microbianas, dão origem à produtos da quebra proteolítica que medeiam as respostas inflamatórias, recobrem (opsonizam) os microrganismos para aumentar a fagocitose e eliminam diretamente os microrganismos (ABBAS *et al.*, 2015; JANEWAY e MEDZHITOV, 2002).

A segunda linha de defesa, resposta imune adquirida, acontece através da ativação de células especializadas chamadas de linfócitos, as quais são capazes de reconhecer e distinguir antígenos, de forma específica (ABBAS *et al.*, 2015; AROSA *et al.*, 2012). A ativação acontece por meio do contato com os antígenos, intermediado por células apresentadoras de antígenos profissionais, as quais recebem este título por expressarem o complexo de histocompatibilidade do tipo II (MHC –II), local onde proteínas do antígeno são “postas” e levadas até as células. O MHC – II são exclusivos à APCs, já o MHC – I é expresso por todas as células e apresentam antígenos proteicos endógenos, originados no citoplasma, o que ajuda o sistema imunológico a discriminar corpos exógenos (NICHOLSON, 2016).

Há dois tipos de resposta imune adquirida, são elas, imunidade humoral e imunidade mediada por célula. A imunidade humoral é uma resposta mediada por moléculas no sangue e secreções mucosas (anticorpos) produzidos exclusivamente pelos linfócitos B ou células B após sua ativação específica. Vale destacar que a produção de anticorpos por estas células se inicia quando elas entram em contato com os antígenos extracelulares solúveis ou com peptídeos de agentes estranhos presentes na superfície celular de células apresentadoras de antígeno e se diferenciam em plasmócitos secretores de anticorpos (KRÄUTLER *et al.*, 2017; SHINNAKASU e KUROSAKI, 2017).

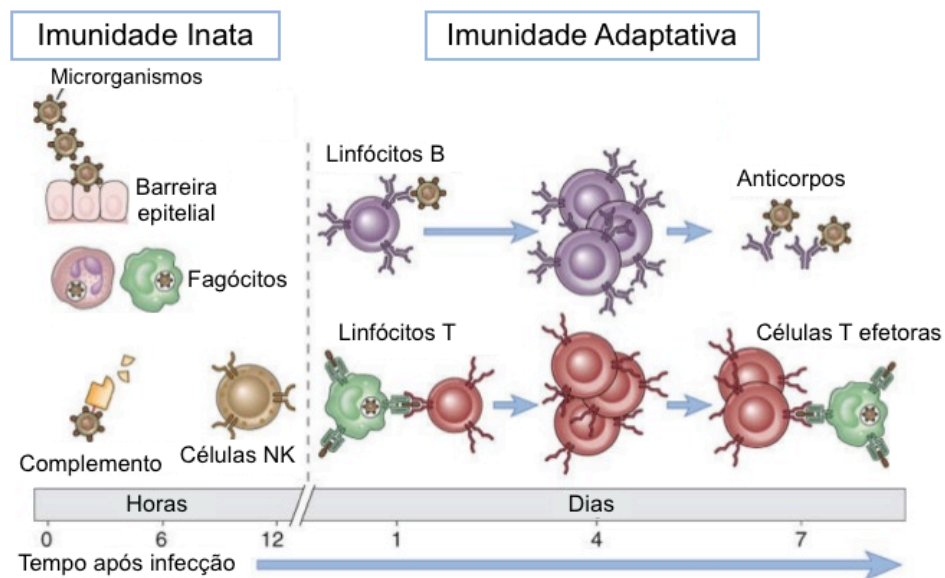
A imunidade mediada por célula, também denominada imunidade celular, é mediada pelos linfócitos T ou células T que reconhecem os antígenos dos microrganismos intracelulares e auxiliam os fagócitos a destruir esses microrganismos ou matam as células infectadas. O reconhecimento é feito a partir de peptídeos derivados das proteínas estranhas presentes, também, em células dendríticas. Portanto, estes linfócitos T reconhecem e respondem apenas

aos antígenos associados à superfície celular (MURPHY *et al.*, 2010; PLITAS e RUDENSKY, 2017).

Os linfócitos T consistem em populações funcionalmente distintas, têm-se os linfócitos T auxiliares e os linfócitos T citotóxicos (ou citolíticos). Em resposta à estimulação antigênica, as células T auxiliares secretam citocinas, que estimulam a proliferação e diferenciação das próprias células T e ativam outras células, incluindo células B, macrófagos e outros leucócitos. Os linfócitos T citotóxicos matam as células que produzem antígenos estranhos, tais como células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares. Ainda tem os linfócitos T regulatórios, que atuam, principalmente, para inibir/controlar as respostas imunes (ABBAS *et al.*, 2015; PLITAS e RUDENSKY, 2017).

Uma porção dos linfócitos B e T, ainda, se diferenciam em células de memória, cuja função é produzir imunidade de longa duração, contra antígenos já expostos (MUELLER *et al.*, 2013). Assim, as principais características da resposta adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória e especialização de resposta (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Figura 1: Linhas de defesa, inata e adaptativa, da resposta imunológica, com destaque para as células e tempo de ação.



Fonte: ABBAS *et al.*, 2015

Em relação as células tumorais, quando estas surgem, o sistema imune as reconhece e a primeira linha de ação, a resposta inata, se inicia, na qual um grupo de células do sistema imune, principalmente as células NK, entram em ação após a ativação por citocinas inflamatórias, liberadas pelas crescentes células tumorais e macrófagos. As células NK matam as células tumorais por mecanismos citotóxicos e liberam antígenos tumorais, o que dá início a

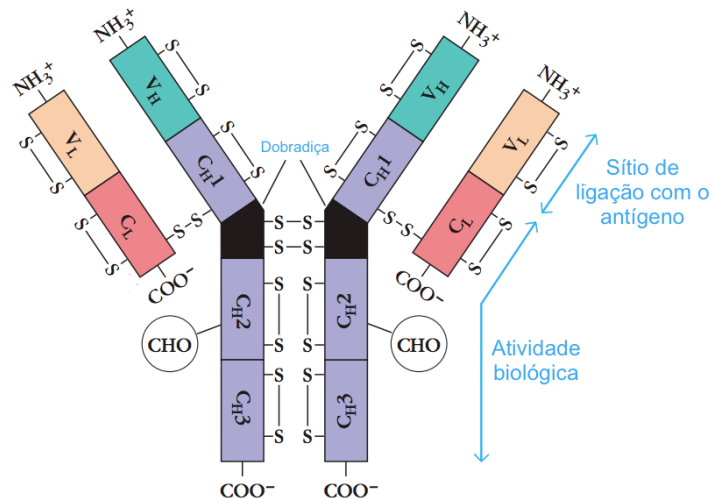
resposta adaptativa, através de células T auxiliares e citotóxicas, que também contribuem para a morte celular. A maioria das células tumorais é destruída nesta fase, mas algumas delas sobrevivem e são capazes de alcançar o equilíbrio com o sistema imunológico, este processo leva à seleção imune de células tumorais com imunogenicidade reduzida. (CALÌ *et al.*, 2017; DUNN *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2007).

Quando o equilíbrio é rompido, o que pode levar anos, as células passam a driblar o sistema imune e iniciam o processo de reprodução desordenado, característico da doença (CALÌ *et al.*, 2017). Um dos principais mecanismos de evasão corresponde as alterações ocorridas na expressão das moléculas de MHC que promove uma falha na resposta imune mediada por linfócitos T citotóxicos (DUNN *et al.*, 2002; LAW *et al.*, 2017; VINAY *et al.*, 2015). Além disso, há um grupo de células responsáveis por regular a resposta imunológica, estas células são definidas como linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3, e suprimem a ativação e proliferação de células T por meio da produção de citocinas, o que permite o estabelecimento do tumor (BETTS *et al.*, 2006).

2.3.2 Anticorpos

Anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas, com alta diversidade e especificidade, que apresentam as seguintes características estruturais (Figura 2): duas cadeias leves idênticas, com, aproximadamente, 24 kDa cada uma, e duas cadeias pesadas idênticas, com cerca de 55 a 70 kDa cada uma, ligadas entre si por ligações dissulfeto e formando uma estrutura globular. As cadeias pesadas são formadas por um domínio N-terminal variável (Fab – do inglês, *Fragment antigen-binding*), diferente de molécula para molécula de anticorpo, seguido por três ou mais domínios constantes (Fc – do inglês, *Fragment crystallizable*). As cadeias leves também são formadas por um domínio N-terminal variável e por apenas um domínio C-terminal constante (HANACK *et al.*, 2016). O sítio de ligação com o antígeno acontece nos domínios N-terminais, assim, cada monômero de imunoglobulina possui dois sítios combinatórios para cada antígeno específico. As regiões carboxiterminais, que não entram em contato com o corpo estranho estão associadas às funções efetoras, como neutralização de microrganismos e ativação do sistema complemento. Destaca-se que as regiões carboxiterminais nas cadeias leves não realizam funções efetoras, apenas as presentes nas cadeias pesadas (ABBAS *et al.*, 2015; AROSA *et al.*, 2012).

Figura 2: Estrutura básica de um anticorpo, em evidência os domínios variáveis, na imagem VL, referente a porção da cadeia leve e VH, referente a porção de cadeia pesada, nas porções N-terminais (NH_3^+) e domínios constantes, na imagem CL, referente a porção da cadeia leve e CH, referente a porção de cadeia pesada, nas porções C-terminais (COO^-). As cadeias são unidas por ligações dissulfeto (S – S).



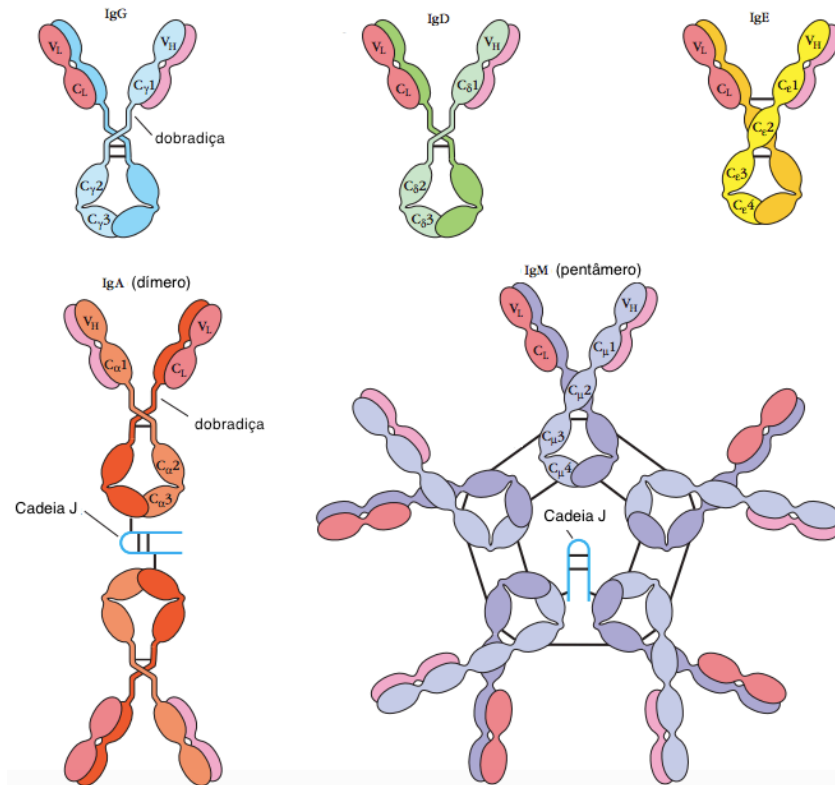
Fonte: Adaptado de GOLDSBY *et al.*, 2000.

A região variável, que pode ser classificada em λ e κ , de acordo com a sequência de aminoácidos na região constante da cadeia leve, recebe esse nome por conta de a sequência de aminoácidos ser diferente para os anticorpos produzidos por um clone de células B em relação aos anticorpos produzidos por outros clones. Essa variedade garante as características antes descritas, diversidade e especificidade ao anticorpo. A diferença entre as sequências acontece em três pequenas extensões, as quais são chamadas de segmentos hipervariáveis, ou ainda, regiões determinantes de complementaridade (CDRs – do inglês *Complementarity Determining Region*) e apresentam, aproximadamente, 10 aminoácidos (ABBAS *et al.*, 2015).

Com base nas diferenças em sequências de aminoácidos na região constante das cadeias pesadas, as moléculas de imunoglobulinas podem ser classificadas em classes. As classes, ou isotipos, são IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Figura 3), e as cadeias, são designadas com letras do alfabeto grego de acordo com o isotipo, logo, α , δ , ϵ , γ e μ , e cada classe desempenha uma função efetora diferente, como ilustrado na Tabela 3. As imunoglobulinas das classes G e E são secretadas como monômeros, as moléculas IgA, como dímeros, e as moléculas IgM, como pentâmeros. As moléculas IgD e IgM de membrana (IgM monomérica) nunca são secretadas, elas fazem parte dos receptores de antígenos (BCR – do inglês, *B cell receptor*) do linfócito B maduro (GUTZEIT *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2015; LOUIS e GUPTA, 2014; SINGH *et al.*, 2014 e VIDARSSON *et al.*, 2014).

As moléculas de IgG podem ser ainda subdivididas em subclasses, sendo denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, a IgA, também apresenta subclasses, sendo denominadas IgA1 e IgA2. (VIDARSSON *et al.*, 2014 e SINGH *et al.*, 2014).

Figura 3: Classes das imunoglobulinas: IgG (monômero), IgD (monômero), IgE (monômero), IgA (dímero) e IgM (pentâmero).



Fonte: Adaptado de GOLDSBY *et al.*, 2000

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

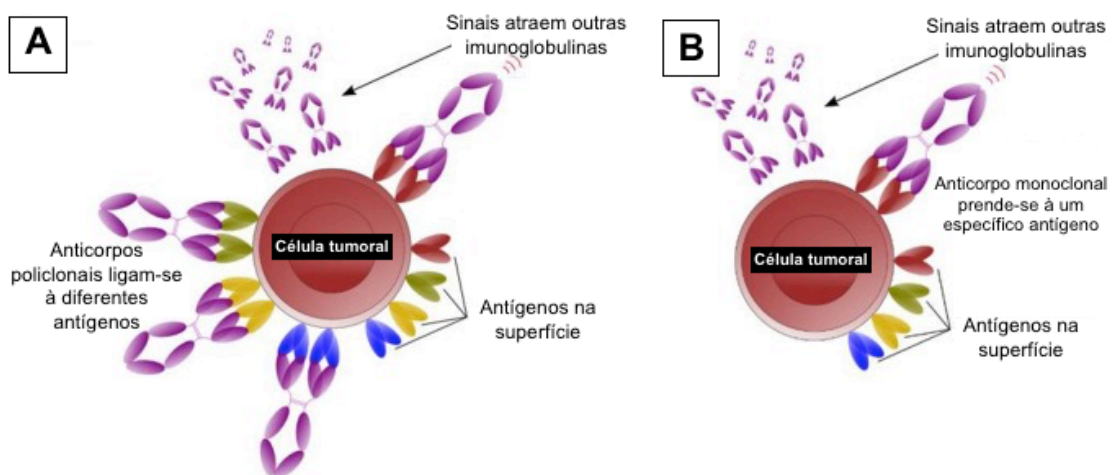
Isótipo de Anticorpo	Cadeia	Funções
IgA	α (1 ou 2)	Imunidade mucosa
IgD	δ	Receptor a antígeno de linfócito B naives
IgE	ε	Defesa contra parasitas helmínticos, hipersensibilidade imediata
IgG	γ (1, 2, 3 ou 4)	Opsonização (aumento da fagocitose), ativação complementar, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo
IgM	μ	Receptor de antígeno de linfócito B naives, ativação complementar

Fonte: Adaptado de ABBAS *et al.*, 2015

2.3.3 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais são proteínas produzidas por clones de células híbridas formadas pela fusão entre uma única cópia de linfócito B e mieloma, apresentam elevada especificidade, uma vez que a interação acontece com apenas um único epítipo do antígeno. Os anticorpos produzidos pelo sistema imune são anticorpos policlonais, possuem vários clones e são originados a partir de diferentes linfócitos B, o que implica na interação destes com vários epítipos do antígeno, como é mostrado na Figura 4 (SAEED *et al.*, 2017).

Figura 4: Ação dos anticorpos policlonais (A) e monoclonais (B). Os anticorpos monoclonais prendem-se a um específico antígeno, enquanto que os policlonais ligam-se a diferentes antígenos.



Fonte: Adaptado de SAEED *et al.*, 2017.

Com o surgimento do hibridomas em 1975, iniciou-se um grande número de estudos clínicos envolvendo anticorpos monoclonais murinos, formados a partir de células de camundongos. Todavia, o seu uso em aplicações terapêuticas em humanos teve de ser restringido em decorrência da elevada imunogenicidade que era ocasionada, o que limitou o seu uso apenas em testes *in vitro* (BUTLER, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2014). Anticorpos monoclonais murinos desencadeiam uma resposta do sistema imune por serem reconhecidos como antígenos, logo são formados anticorpos humanos antianticorpo murino, conhecidos como HAMA (do inglês, *Human Antimouse Antibodies*) para neutralizar os anticorpos de camundongo. (CORDEIRO *et al.*, 2014; REICHERT *et al.*, 2005).

Com o intuito de contornar os problemas causados pela imunogenicidade, surgiram os anticorpos quiméricos e humanizados. Os anticorpos quiméricos são formados pela fusão entre os genes codificadores das cadeias leves e pesadas das regiões variáveis (Fab) dos anticorpos murinos com genes codificadores da região variável (Fc) do anticorpo humano. Estas

modificações genicas podem ser inseridas em uma célula animal, que em um sistema de cultivo adequado irá expressar e produzir a proteína de interesse. Como resultado tem-se uma diminuição da imunogenicidade, e mesmo com uma semelhança de 70% com os anticorpos humanos, o seu uso pode ainda gerar uma resposta imune, por meio da formação de um antianticorpo, o HACA (do inglês, *Human Anti-Chimeric Antibody*), entretanto, a resposta é de menor proporção, característica que possibilitou o sucesso no tratamento de diversos tratamento clínicos (CORDEIRO *et al.*, 2014; REICHERT *et al.*, 2005).

Anticorpos humanos são obtidos a partir através de uma recombinação genética, pela qual as regiões determinadoras de complementariedade (CDR) dos genes humanos são substituídas pelo equivalente murino, procedimento que garante a especificidade do anticorpo produzido pelo hibridoma, e preserva as propriedades do anticorpo humano, logo, uma resposta adversa de menor intensidade (BENJOUAD, 2009).

2.3.3.1 Anticorpos Monoclonais no Mercado Mundial

Os anticorpos monoclonais, tem cada vez mais se mostrado ferramentas importantes em diversas aplicações médicas, desde tratamento terapêutico até para diagnóstico de doenças (BRUCE *et al.*, 2002; SHUPTRINE *et al.*, 2012).

A aprovação do uso de anticorpos monoclonais como tratamento aconteceu em 1986, mas só ganharam espaço no mercado após 1990, quando surgiram os anticorpos quiméricos, seguidos pelos humanizados e totalmente humanizados. O aumento nas vendas como na aprovação fez com que, em 2013, a receita mundial chegasse próximo de US\$ 75 bilhões, representando quase a metade do número total de vendas de produtos bio-farmacêuticos. Na Figura 5 é mostrado um gráfico com o número de anticorpos monoclonais e produtos relacionados aprovados, assim como os removidos do mercado até 2014 (ECKER *et al.*, 2015).

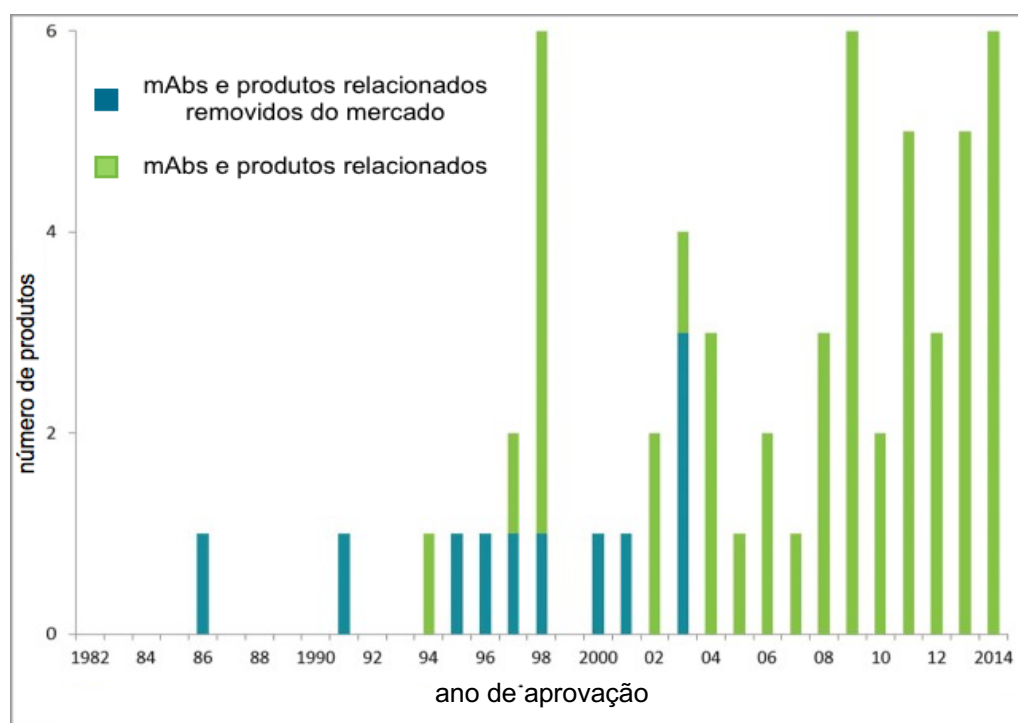
Vale salientar que o primeiro anticorpo monoclonal aprovado para uso terapêutico foi o Ortoclone OKT3 (IgG2a anti-CD3), sendo utilizado para evitar a rejeição de transplantes cardíacos e hepáticos, mas já foi removido do mercado por trazer diversos efeitos colaterais ao paciente como hipertensão arterial e edema pulmonar (SANTOS *et al.*, 2006). E o Rituxan (rituximab) foi o primeiro a ser aprovado para o tratamento do câncer, em 1997, sendo específico para Linfoma não-Hodgkin (PODHORECKA *et al.*, 2014)

Atualmente há 47 produtos disponíveis e aprovados para comercialização pelas principais agências reguladoras do mundo (alguns estão listados na Tabela 4), e este número tende só a aumentar, espera-se que até 2020, 70 produtos já estejam no mercado, o que geraria uma receita mundial de US\$ 125 bilhões, aproximadamente (ECKER *et al.*, 2015, SANTOS *et al.*, 2006).

Tabela 4: Anticorpos monoclonais aprovadas para uso no tratamento de diferentes doenças.

Nome comercial	Ano de aprovação	Tratamento
Rituxan (rituximab)	1997	Linfoma não-Hodgkin
Simulect (basiliximab)	1998	Prevenção à rejeição de órgãos transplantados
Remicade (infliximab)	1998	Doença de Crohn
Herceptin (trastuzumab)	1998	Câncer de mama e estômago
Erbitux (cetuximab)	2004	Câncer metastático colorretal, câncer de pulmão de células não pequenas metastáticos, câncer de cabeça e pescoço
Nplate (romiplostimab)	2008	Contagem baixa de plaquetas no sangue
Removab (catumaxomab)	2009	Ascites malignas
Actemra (tocilizumab)	2009	Moderada à severa artrite Reumatoide
Xgeva (denosumab)	2010	Prevenção de fraturas ósseas e outras condições por conta de tumor ósseo
Abthrax (raxibacumab)	2012	Antraz por inalação
Gazyva (obinutuzumab)	2013	Leucemia linfocítica crônica
Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine)	2013	Câncer de mama metastático
Keytruda (pembrolizumab)	2014	Melanoma
Cyramza (ramucirumab)	2014	Câncer gástrico e câncer de pulmão de células não pequenas

Fonte: Adaptado de SAEED *et al.*, 2017

Figura 5: Número de anticorpos monoclonais e produtos relacionados aprovados por ano.

Fonte: ECKER *et al.*, 2015.

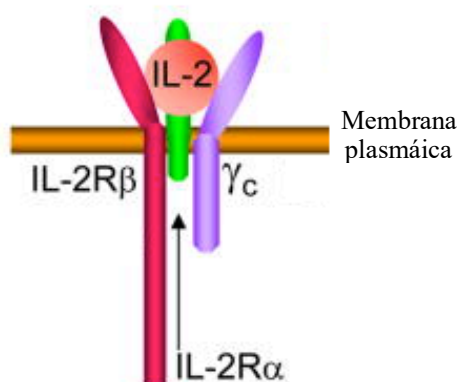
2.3.3.2 Anticorpo Monoclonal Murino Anti-CD25

Os anticorpos a serem obtidos neste trabalho são os anticorpos monoclonais murinos anti-CD25, classificado como IgG1, por meio do cultivo de hibridomas PC-61.

CD25 corresponde a unidade alfa do receptor da citocina interleucina-2 (IL-2R α), o qual é ainda formado por outras duas cadeias: IL-2R β e γ c (Figura 6), e quando expressas juntas formam um complexo de alta afinidade à citocina. O receptor é uma proteína transmembrana presente em células T e B ativadas, principalmente (HUSS, *et al*, 2016).

Este receptor está presente em diferentes tipos celulares, inclusive nas células T reguladoras (Treg) CD4⁺CD25⁺ Foxp3, as quais são encontradas no sangue periférico e em órgãos linfóides secundários, e são responsáveis, por intermédio da interleucina-2, pela manutenção da resposta-imune (imune homeostase) (ODEH e SIMECKA, 2016; WILKINSON *et al.*, 2017) inibindo células T auto-reativas (ABBAS *et al.*, 2015), além disso caracterizam-se por expressarem constitutivamente CD25 e Foxp3 (do inglês, *Forkhead box p3*) (LISTON e GRAY, 2014), o qual é o marcador específico da célula e o responsável pela atividade reguladora (FONTENOT *et al.*, 2005 e WILKINSON *et al.*, 2017)

Figura 6: Representação esquemática do receptor de interleucina-2 (IL-2), proteína transmembrana presente em células específicas e formado pelas cadeias IL-2R α (CD25), IL-2R β e γ_c .



Fonte: Adaptado de LIAO *et al.*, 2011.

O fato das células Treg CD4⁺CD25⁺ Foxp3 serem observadas em grandes quantidades no tumor, sejam infiltradas ou em torno, suprimido a imunidade antitumoral (JOYCE e FEARON, 2015; LINDAU *et al.*, 2013), tem despertado o interesse por compostos que possam influenciar em suas atividades e que permita que o sistema imune ataque as células tumorais, como é o caso dos anticorpos monoclonais anti-CD25 que são altamente específicos e já se mostraram capazes, *in vivo*, de promoverem a depleção de células Treg CD4⁺CD25⁺ Foxp3 por meio do bloqueio da porção alfa do receptor, diminuindo a afinidade com a interleucina (HONG *et al.*, 2010; ONIZUKA *et al.*, 1999; ZOU, 2006).

Um dos principais problemas abordados em alguns estudos em relação ao uso dos mAbs anti-CD25 para o tratamento de câncer é o desenvolvimento de doenças auto-imunes (TAGUCHI e TAKAHASHI, 1996; ELLIS e BRALEY-MULLEN, 2017) como gastrite autoimune (BIZZARO *et al.*, 2018) e diabetes do tipo 1 (YU *et al.*, 2018), e uma das justificativas utilizadas é que após um período de tempo as Tregs CD4⁺CD25⁺ Foxp3 têm sua população reestabelecida, porém, com expressão significativamente menor do gene Foxp3, mas ainda, constando o fenótipo do gene, o que pode causar dificuldades na manutenção da homeostase, e o aparecimento de tais doenças, como reportado por HUSS (2016), SETOGUCHI *et al.* (2005) e ZHOU *et al.* (2009).

Atualmente, mAbs anti-CD25 para o tratamento de câncer, não estão disponíveis no mercado, uma vez que são necessários mais investigações acerca de seu mecanismo de ação e possíveis efeitos colaterais. O único mAb anti-CD25 disponível e liberado pela FDA é o Daclizumab, utilizado para o tratamento de esclerose múltipla (PFENDER E MARTIN, 2014; ROLAND, 2012), e também em pacientes que se submeteram a um transplante de rim, com o intuito de evitar a rejeição do novo órgão, que acontece por intermédio do bloqueio na interação entre IL-2 e o receptor CD25, que inibe a expansão de células T ativadas (ROLAND, 2012).

2.4 Cultivo Celular de Hibridomas

Em 1975, os pesquisadores Georges Kohler e Cesar Milstein desenvolveram a primeira técnica para a produção de anticorpos monoclonais com especificidades bem definidas. O domínio dessa técnica rendeu a esses pesquisadores um prêmio Nobel em 1984, que revolucionou a imunologia, sendo ainda hoje muito utilizada. Este método é baseado no fato de que cada linfócito B produz anticorpos de especificidade única, mas que não crescem indefinidamente. Para contornar essa dificuldade, Kohler e Milstein, por meio de uma fusão celular, entre um linfócito B de um animal previamente imunizado com o antígeno de interesse, e uma célula do mieloma, imortalizaram as células B. Essas células passaram a ser chamadas de hibridomas (KOHLER e MILSTEIN, 1975).

O linfócito B normalmente é retirado do baço ou de linfonodos de animais, como o camundongo, e as células do mieloma são criadas induzindo-se defeitos nas vias de síntese de nucleotídeos (ABBAS *et al.*, 2015; MURPHY *et al.*, 2010).

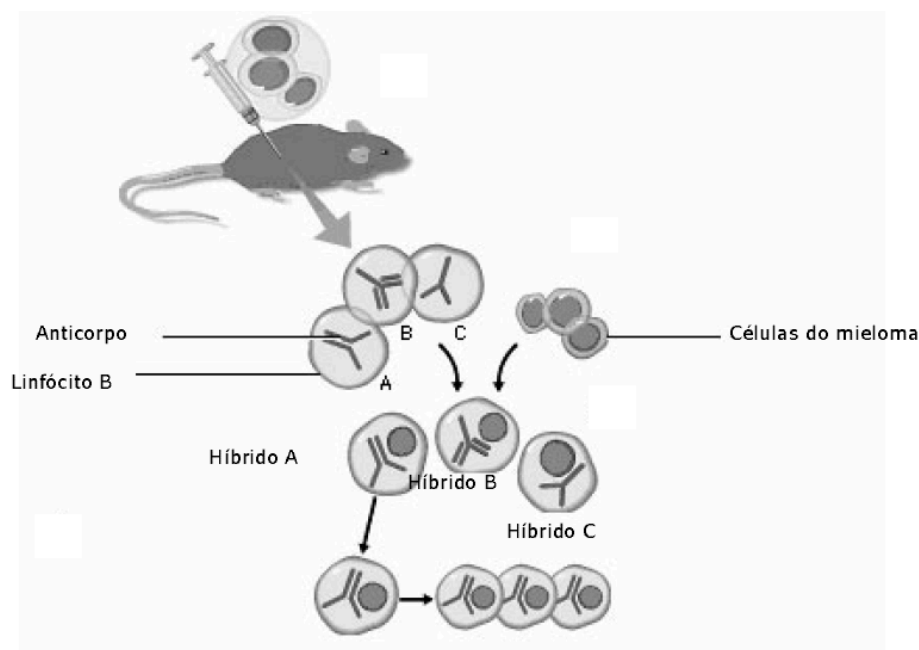
O fusógeno utilizado para a produção de hibridomas é o polietilenoglicol, o qual promove a fusão das membranas plasmáticas, produzindo uma simples célula com dois ou mais núcleos (NRC, 1999). Após este estágio, ocorre a fusão das membranas nucleares e a formação de heterocáριο e, durante a mitose, o DNA é então passado para as células filhas. Três diferentes tipos celulares são obtidos após tal procedimento: esplenócitos, que morrem depois de um tempo, células do mieloma e células híbridas. Estas últimas, são selecionadas pela utilização do meio HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina) (HARLOW e LANE, 1988), a seleção acontece por meio do bloqueio de uma das vias de síntese de purina nas células.

Há duas vias de síntese, a via *de novo*, que usa o tetraidrofolato, e a *via de salvação*, que é mediada pela enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), na presença de aminopterina, o tetraidrofolato não é produzido, o que resulta em defeito na síntese de nucleotídeos (BENJOUAD, 2009). As células híbridas recebem a HGPRT dos esplenócitos e do mieloma a capacidade para proliferação descontrolada; além disso, a hipoxantina e a timidina permitem que essas células produzam DNA na ausência de tetraidrofolato. Conseqüentemente, somente as células híbridas sobrevivem no meio HAT (ABBAS *et al.*, 2015; MURPHY *et al.*, 2010).

Para o isolamento dos clones individuais, utiliza-se a diluição limite em um cultivo em placa 96 poços, de forma que cada poço receba uma única célula híbrida. O cultivo é monitorado por duas semanas, e finalizado quando se é obtido, cerca de, 300 células por poço, as quais são então, transferidas para criopreservação em nitrogênio líquido. O sobrenadante do cultivo de cada poço é utilizado em teste de quantificação de anticorpos monoclonais (AL-RUBEAI,

2015; PANDEY, 2010; WINZELER, 2013). As etapas, de forma simplificada, estão representadas na Figura 7.

Figura 7: Esquema simplificado da produção de hibridomas. Um animal é imunizado com um antígeno de interesse, e os linfócitos originados são fundidos com células de mieloma, os hibridomas são selecionados e cultivados para a produção de anticorpos monoclonais de interesse.



Fonte: SANTOS *et al.*, 2006.

2.4.1. Cultivo *in vivo* e *in vitro* de Hibridomas

Os hibridomas crescem em suspensão, ou seja, não necessitam de nenhum suporte de ancoramento para se desenvolverem, podendo ser expandidos *in vivo* ou *in vitro*, segundo Kohler e Milstein (1975). Para o cultivo *in vivo*, primeiramente, são injetados reagentes estimulantes de reação inflamatória, seguido pelas células híbridas diretamente na região peritoneal de mamíferos histocompatíveis, e a obtenção dos anticorpos, é feita pela retirada do fluído ascítico (líquido peritoneal) produzido pela inflamação na cavidade peritoneal, sendo o abate do animal necessário (HANACK *et al.*, 2016). Todavia o rendimento é baixo, o custo é elevado, e ainda há alto risco de contaminação, além da questão ética em relação ao uso do animal. Mesmo que células estejam presentes em um ambiente mais favorável ao seu crescimento, com todos os nutrientes necessários, as desvantagens tem tornando o cultivo *in vivo* uma opção desfavorável (FRESHNEY, 2010; MORAES *et al.*, 2008).

Já para o cultivo *in vitro*, as células são cultivadas em meios de cultivo contendo soro fetal bovino ou em meios livres de soro, mas com fatores de crescimento (PANDEY, 2010). Sendo necessário o controle de alguns parâmetros, como pH e temperatura, para que seja criado

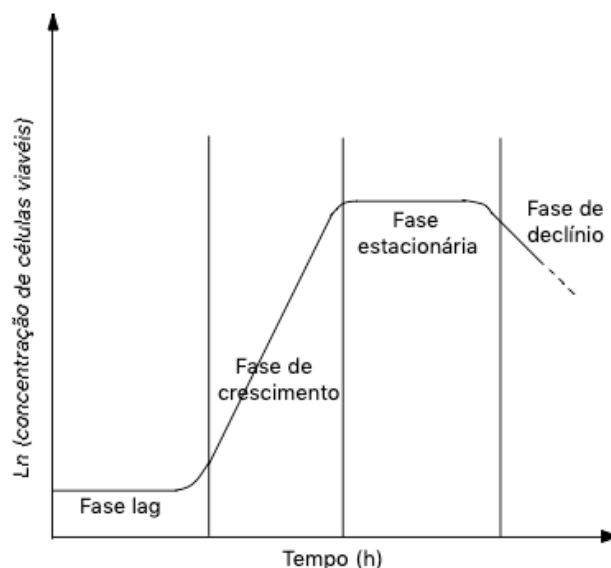
um ambiente semelhante ao natural para a célula, como será mostrado nos próximos tópicos (FRESHNEY, 2010).

Neste trabalho as células foram expandidas em cultivo *in vitro*, uma vez que é um método bastante utilizado para o cultivo celular. Além disso, não é necessário o uso de animais e conseqüentemente realizar o abate destes, e ainda é possível obter bons rendimentos, mesmo que em condições diferentes das normais.

2.4.2. Crescimento Celular de Hibridomas

O crescimento de hibridomas deve seguir um crescimento padrão assim como a maioria das células animais, esse crescimento apresenta diferentes fases e é mostrado na Figura 8 (BUTLER, 2005).

Figura 8: Fases lag, de crescimento, estacionária e de declínio para o crescimento de células híbridas em um gráfico ln da concentração de células viáveis *versus* tempo.



Fonte: Autoria própria.

No gráfico observa-se as seguintes fases: lag, de crescimento exponencial, estacionária, de declínio. A primeira fase, se caracteriza por um crescimento baixo ou quase nulo das células, neste momento ocorre a síntese de fatores de crescimento, cuja concentração é determinante para o início do crescimento. A duração depende da densidade celular do inóculo, assim como da viabilidade da célula, pH, temperatura, e outros fatores (BUTLER, 2005).

A fase de crescimento é representada por uma curva exponencial, e pode ser representada pelas seguintes equações:

$$X = X_0 \cdot 2^n$$

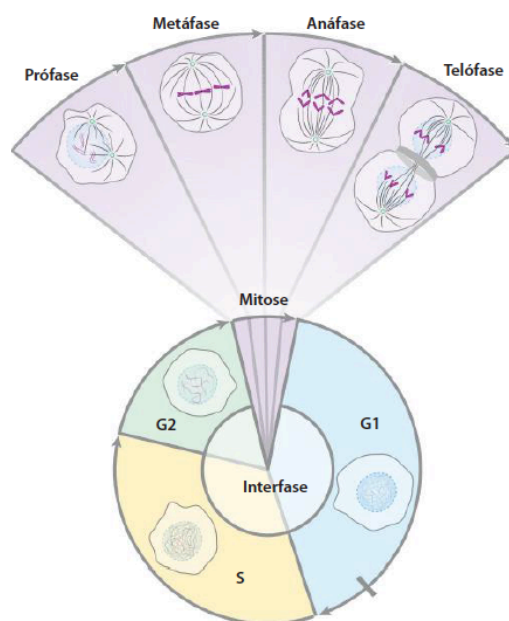
ou

$$\log X = \log X_0 + n \cdot \log 2$$

onde, X é a concentração final de células, X_0 , a concentração inicial de células e “ n ” o número de gerações. Nesta fase, as células começam a se dividir cumprindo o ciclo celular, o qual é dividido em Interfase e Fase Mitótica (Figura 9). A Interfase é dividida em G_1 , etapa em que a célula aumenta de tamanho e passa produzir componentes essenciais para a sua divisão; S , na qual a célula faz uma cópia de seu material genético e G_2 , na qual a célula aumenta ainda mais de tamanho e se prepara para a próxima fase, a divisão (BUTLER, 2005)

Na Fase Mitótica, a célula divide seu DNA, o qual foi duplicado durante a Interfase, o núcleo e o citoplasma, para formar uma nova célula, em fenômenos conhecidos como mitose, cariocinese e citocinese, respectivamente. A divisão acontece em um tempo relativamente curto, se comparado a Interfase e apresenta quatro estágios: prófase (ruptura da membrana nuclear e duplicação e espiralização dos cromossomos), metáfase (migração dos cromossomos para a placa equatorial), anáfase (duplicação dos centrômeros, porção central do cromossomo, e migração dos cromossomos para os polos da célula) e telófase (desespiralização dos cromossomos, formação da membrana nuclear e estrangulamento para a formação de duas células filhas), como mostrado também na Figura 9 (BUTLER, 2005).

Figura 9: Ciclo celular, constituído por Interfase, dividida em G_1 , G_2 e S , e Mitose. A mitose, etapa de menor duração, é sub-dividida em prófase, metáfase anáfase e telófase.



Fonte: NELSON e COX, 2011.

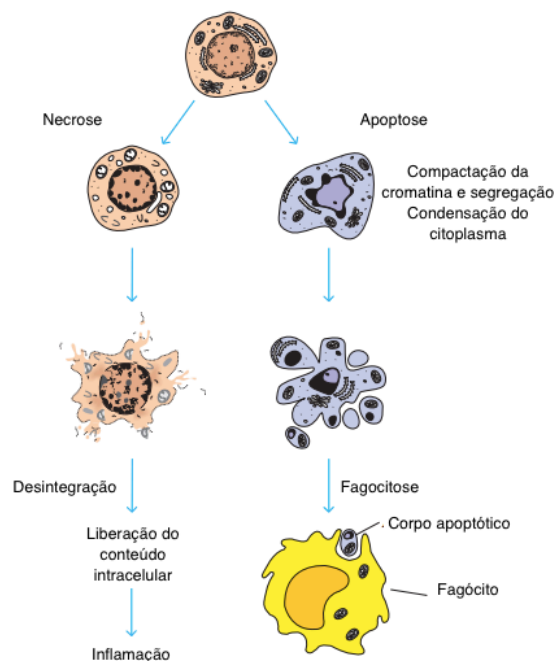
Na fase estacionária, a concentração de células se mantém constante, uma vez que o número de células se multiplicando, nesta fase, é igual ao número de células morrendo, o que pode ser justificado por diferentes razões, como depleção de nutrientes, acúmulo de metabólitos (substâncias tóxicas para as células), entre outras (BUTLER, 2005).

E por último tem-se a fase de declínio, na qual a viabilidade das células é extremamente baixa e determinada pela morte celular.

Há dois mecanismos que promovem a morte da célula, a apoptose e a necrose (Figura 10). O primeiro, acontece quando anormalidades são produzidas durante a divisão, e com o intuito de evitar a proliferação, a própria célula programa a sua morte, com a produção de endonucleases, cujo papel é “cortar” o DNA em diversos fragmentos, seguido pelo encolhimento da membrana, condensação do núcleo e fragmentação em pequenas estruturas chamadas de corpos apoptóticos. Este mecanismo também foi observado em situações de depleção de nutrientes em cultura de hibridomas (BUTLER, 2005; GOLDSBY *et al.*, 2000).

Ao contrário da apoptose, que trata-se de uma condição fisiológica normal, a necrose acontece quando a célula é exposta a situações de grande estresse, e promove o rompimento da membrana plasmática, vazamento de seu conteúdo, seguido pela ruptura (BUTLER, 2005; GOLDSBY *et al.*, 2000).

Figura 10: Diferenças entre os mecanismos de morte celular, apoptose e necrose, em células animais. Durante a apoptose, a membrana sofre um encolhimento seguido por uma fragmentação, enquanto que durante a necrose, a célula sofre uma ruptura.



Fonte: GOLDSBY *et al.*, 2000.

2.5 Meios de Cultivo

As células quando cultivadas *in vitro* necessitam que o ambiente possua todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, como por exemplo, carboidratos, aminoácidos, vitaminas e sais inorgânicos. Estes componentes são encontrados em meios de cultivo basais, os quais devem ser escolhidos de acordo com o interesse no cultivo das células. Os meios de cultivo mais utilizados para o cultivo de hibridomas incluem o Meio Eagle modificado por Dullbecco (DMEM) e RPMI 1640, os quais podem ser acrescidos de Soro Fetal Bovino (SFB), por conta de possuir fatores de crescimento e hormônios. Costuma-se adicionar, também, tampões, antibióticos, antifúngicos e indicadores de pH (ALVES e GUIMARÃES, 2010; MORAES *et al.*, 2008).

O soro, porção sobrenadante de sangue coagulado, é um suplemento utilizado para promover o crescimento celular, sendo constituído por um complexo de proteínas úteis para nutrição, hormônios, inibidores, entre outros componentes; normalmente é adicionado ao meio de cultura numa concentração de 10% (v/v). Os soros de bovino ou equino são os mais empregados, e comumente usados com o soro fetal de vitelo, devido ao alto teor de fatores de crescimento embrionário (BUTLER, 2005).

Apesar de promover uma alta eficiência no cultivo de células, o uso do SFB em meios de suplementação apresenta algumas desvantagens: pode ser uma fonte de contaminações por parasitas, bactérias, fungos, micoplasmas, vírus e príons; é de alto custo, e devido a sua alta concentração proteica, pode haver o comprometimento nos processos de extração e purificação das proteínas de interesse. Além disso, tem-se a variabilidade de lote para lote, isso implica em dificuldade na padronização do meio de cultura, assim como na reprodutibilidade do cultivo (BUTLER, 2005; FRESHNEY, 2010).

Atualmente, existe uma pressão, principalmente, por parte das agências reguladoras, como a FDA (Foods and Drugs Administration, USA), pela eliminação do SFB e de outros componentes de origem animal, da composição de meios de cultura celular para a produção de produtos de uso humano, devido ao risco de contaminação, e também por conta das questões éticas, já que é necessário o sacrifício de animais para sua obtenção (MORAES *et al.*, 2008). Assim, vários estudos vêm sendo realizados visando a eliminação ou a redução do uso de SFB, por meio da utilização de outros componentes de natureza quimicamente definida, ou que não sejam de origem animal (FRESHNEY, 2010). Os meios livres de soro podem ser quimicamente definidos livre de proteínas, ou contendo suplementos proteicos em baixas concentrações, e ainda, meios quimicamente não definidos (BUTLER, 2005; VAN DER VALK *et al.*, 2010).

O uso de meios livre de soro apresenta como vantagens a não formação de espuma pelo baixo teor proteico e o controle sobre o crescimento celular, com a possibilidade de fazer um

meio seletivo para um tipo celular específico. Além disso, tem-se a facilidade de realizar a troca de meio visando a expansão das células (MORAES, 2008).

Como desvantagem tem-se que para a confecção de meios livre de soro é necessário a utilização de reagentes com alto grau de pureza, já que não há mais proteínas séricas, as quais são responsáveis pela ação protetora. E ainda, a proliferação celular em meios livres de soro é mais lenta, um problema no cultivo de linhagens finitas (MORAES, 2008; VAN DER VALK *et al.*, 2010).

É importante observar que as vantagens superam as desvantagens, assim sendo, o uso de meios livres de soro, é uma ótima alternativa para o cultivo de células.

Para o cultivo de hibridomas diversas pesquisas foram e estão sendo feitas em relação a produção de meios livres de soro para a produção de anticorpos monoclonais. Os principais meios livres de soro, para o cultivo de hibridomas, atualmente disponíveis no mercado são:

- CD Hybridoma Medium (TFS, 2018): meio quimicamente definido, sem proteína e L-glutamina, sendo otimizado para a produção de anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes.
- PFHM-II (TFS, 2018): otimizado para o crescimento de hibridomas e mielomas humanos e de ratos e para produção de anticorpos monoclonais. Não apresenta polipeptídios como fatores de crescimento ou de adesão.
- Ex-cell Serum-free Medium (SIGMA, 2018): meio livre de soro fetal bovino, com baixo teor proteico (11mg/L), não contém L-glutamina em sua composição e especificamente desenvolvido para o crescimento a longo prazo de hibridomas e células capazes de expressarem anticorpos monoclonais e produtos proteicos.
- Hybridoma-SFM (TFS, 2018): apresenta concentração proteica baixa (20 µg/mL), e também é otimizado para o crescimento de hibridomas e mielomas de humanos e ratos e a produção de anticorpos monoclonais (mAb).

Apoiando-se no estudo de Prampero (2017), no qual foram testados quatro diferentes meios, sendo obtido um melhor resultado para o meio SFM (Serum Free Media - Gibco), e por isto este meio foi escolhido para este trabalho. O meio SFM mostrou capacidade de fornecer excelentes condições para o crescimento de hibridomas com rendimentos melhores para a produção de anticorpos monoclonais.

O meio SFM não possui BSA (albumina de soro bovino), esteroides e imunoglobulina bovina endógena, o que facilita o processo de purificação de mAbs específicos (TFS, 2018). Além disso, o seu uso é fácil e a maioria dos hibridomas requer adaptação sequencial com menos etapas (BUTLER, 2005; MORAES *et al.*, 2008). Outra justificativa para o uso desse meio é que há poucos trabalhos voltados na produção de anticorpos anti-CD25 em meio sem

SFB, logo, novos dados poderão ser fornecidos neste trabalho e assim contribuir com novas pesquisas.

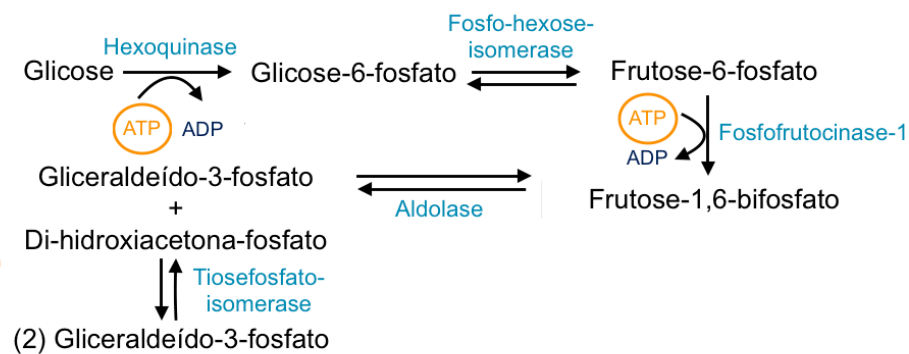
2.6. Metabolismo de Hibridomas

2.6.1 Glicose e Aminoácidos Essenciais

As células híbridas apresentam como principais fontes de carbono e energia a D-glicose e a L-glutamina, portanto, requeridos para o crescimento celular (MORAES *et al.*, 2008). A glicose é transportada para o interior da célula por meio da difusão facilitada, por meio de diferentes proteínas, sendo a GLUT1 a principal (GÒDIA e CAIRO, 2006; MORAES *et al.*, 2008).

O processo de quebra da glicose recebe o nome de glicólise e é dividida em 2 fases, a primeira fase é chamada de preparatória, e apresenta as seguintes etapas: a glicose, uma vez dentro da célula, é fosforilada, e origina a glicose 6-fosfato (G6P), a qual é rapidamente convertida à frutose-6-fosfato (F6F) e esta também fosforilada, para produzir a frutose-1,6-bifosfato, molécula que é quebrada em outras duas de gliceraldeído-3-fosfato (G3F), sendo esta a última etapa (Figura 11). Vale observar que durante esta fase há um consumo de 2 moles de adenosina trifosfato (ATP) por mol de glicose.

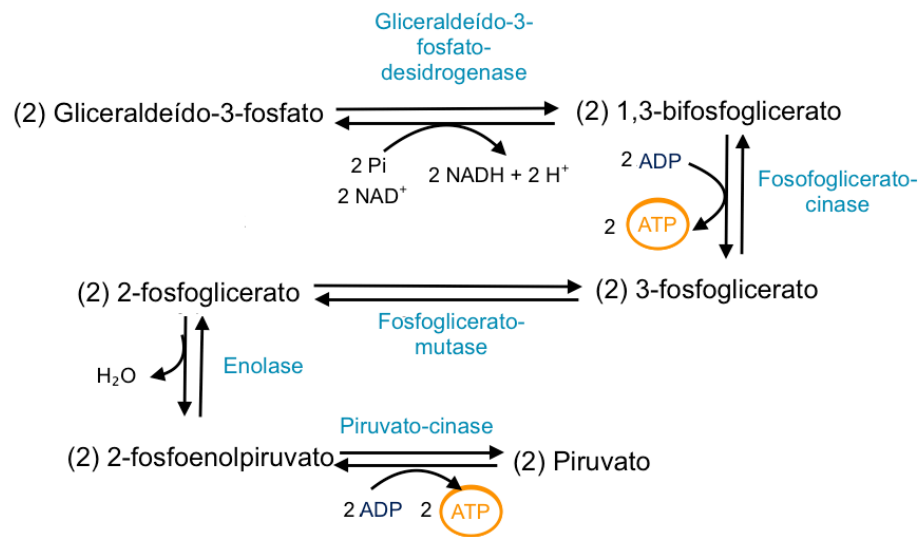
Figura 11: Primeira fase da glicólise, fase preparatória, na qual a molécula de glicose é convertida a duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, com o consumo de duas moléculas de ATP.



Fonte: Autoria própria.

Na segunda fase, chamada de pagamento, as duas moléculas de G3F são oxidadas, fosforiladas e convertidas à 2 moléculas de piruvato. Durante essa conversão são produzidos 4 moles de ATP e 2 moles de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) por mol de glicose, logo, o resultado líquido da glicólise é de 2 moles de ATPs e 2 moles de NADHs, estas etapas são mostradas na Figura 12 (GÒDIA e CAIRO, 2006).

Figura 12: Segunda fase da da glicólise, fase de pagamento, na qual duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, produzidas na fase preparatória, são convertidas a duas moléculas de piruvato, com a produção de 4 moles de ATP.

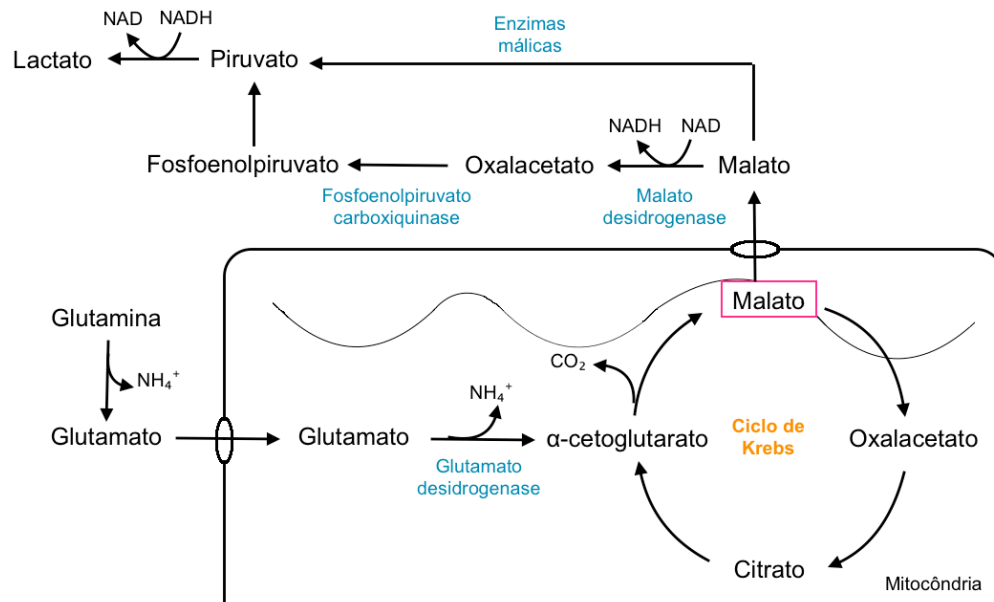


Fonte: Autoria própria.

Após o fim da glicólise, o piruvato pode entrar no ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de Krebs) sendo o piruvato convertido a acetilCoA, os elétrons remanescentes são transferidos para o oxigênio por meio de uma cadeia de proteínas transportadoras, na mitocôndria, e a energia liberada durante esta transferência, permite a síntese de 36 moles de ATPs (MORAES *et al.*, 2008). O piruvato ainda pode ser metabolizado de uma forma diferente, podendo ser convertido à lactato em ambientes de baixa ou sem oxigenação (BUTLER, 2005).

A glutamina, é a segunda fonte de carbono e energia da célula como também é a principal fonte de geração de amônio, a sua decomposição se inicia fora da célula, com a produção de ácido pirrolidina carboxílico e amônio, o restante é transferido para o interior da célula por meio de proteínas transmembranas específicas (MORAES *et al.*, 2008). O processo de quebra de glutamina é denominado glutaminólise (Figura 13) e se inicia pela conversão enzimática da glutamina à glutamato, o qual pode seguir três caminhos, o primeiro é ser desaminado à alfa-cetoglutarato, com a liberação do segundo grupo amônio, seguido por incorporação ao ciclo do ácido cítrico, onde há liberação de metabólitos, como o oxalacetato; o segundo é ser completamente oxidado à CO₂, e o último é deixar a mitocôndria na forma de malato e ser, posteriormente, convertido em piruvato. Vale considerar que na via em que a glutamina é completamente oxidada, um mol do aminoácido resultada 27 moles de ATPs, enquanto que quando convertida à malato e depois piruvato, há produção de 9 moles de ATPs. A via a ser escolhida depende das necessidades energéticas da célula (GÒDIA e CAIRO, 2006; MORAES *et al.*, 2008).

Figura 13: Metabolismo da glutamina, glutaminólise. A glutamina, como mostrado na imagem, pode seguir três caminhos, ser totalmente oxidada a gás carbônico, ou participar do ciclo de Krebs, ou sair da mitocôndria, na forma de malato, e convertida a piruvato.



Fonte: Autoria própria.

Foi observado, por alguns autores, que a concentração de glicose regula inversamente o metabolismo de glutamina, então se houver um aumento na concentração de glicose no meio de cultura, o consumo de glutamina sofre uma redução, do mesmo jeito, se houver uma diminuição na concentração de glicose, o consumo da glutamina, aumenta (MILLER *et al.*, 1988; JEONG e WANG, 1995).

É importante destacar que a diminuição da concentração de L-Glutamina poder levar a morte celular, uma vez que é principal fonte de nitrogênio pra a síntese de nucleotídeos, e já foi demonstrado que, em cultivos de hibridomas, concentrações menores que 1-2 mM de glutamina, ocorre a inibição do crescimento celular (JEONG e WANG, 1995), assim, a concentração deste aminoácido sempre deve ser observada e controlada, nunca deixando chegar ao fim, com o objetivo de garantir alta viabilidade celular.

As células eucarióticas não apresentam a capacidade de sintetizar alguns aminoácidos essenciais para o seu desenvolvimento, por isso, estes são necessários estar presentes nos meios de cultura. Para hibridomas, a L-Cisteína, um dos aminoácidos não sintetizados, se mostrou bastante importante para o seu crescimento, tanto que para algumas linhagens de hibridomas é o primeiro a ser esgotado e a sua ausência tem sido motivo para a inibição do crescimento celular. A cisteína é responsável pela conformação de várias proteínas, graças a formação de ligações dissulfeto (SANFELIU *et al.*, 1996).

2.6.2 Oxigênio e Gás Carbônico

Além dos nutrientes já mencionados, as células precisam de oxigênio para se desenvolver; este elemento é o receptor final de elétrons da cadeia respiratória, e permite a estocagem de energia por meio da formação de moléculas de ATP, assim como a re-oxidação de coenzimas essenciais para a glicólise e Ciclo de Krebs, logo sua presença é de extrema importância.

Para a oxidação de 1 mol de glicose são necessários 6 moles de O₂, o que se torna um problema, já que a solubilidade deste componente é extremamente baixa, em condições normais de cultivo, chega a ser inferior a 10 mg L⁻¹, logo a melhor maneira de suprir as necessidades metabólicas da célula é possibilitar o fornecimento contínuo desse gás (GÒDIA e CAIRO, 2006; MORAES *et al.*, 2008).

Quanto ao gás carbônico, este apresenta grande influência sobre o pH e a osmolalidade do meio, fatores que devem ser controlados para garantir a sobrevivência das células (DEZENGOTITA, *et al.*, 2002b), e também é um dos maiores sub-produtos do metabolismo de células animais, sendo que para cada mol de O₂ consumido, um mol de CO₂ é liberado.

O CO₂ quando dissolvido no meio, reage com a água para formar ácido carbônico (H₂CO₃), ácido fraco, que se dissocia predominantemente em bicarbonato (HCO₃⁻) em pH igual a 7,2, reação mostrada pela equação química abaixo (MORAES *et al.*, 2008):



Um aumento na pressão parcial do CO₂ (pCO₂) e/ou do pH, segundo a reação, promove a acidificação do meio, assim como a do espaço intracelular, uma vez que o CO₂ é um gás que se difunde facilmente pela membrana celular. A diminuição do pH pode afetar o crescimento celular, a glicosilação e as vias de transporte de proteínas, e com o intuito de controlar a acidez, prótons são eliminados ou HCO₃⁻ são trazidos para o interior da célula (DEZENGOTITA, *et al.*, 1998; SCHMELZER, *et al.*, 2001).

O controle do pH é feito pela adição de base, como o NaOH, o que resulta em um aumento de cátions, assim como de HCO₃⁻, e conseqüentemente no aumento da osmolalidade. Todavia, um aumento na osmolalidade, independentemente da pCO₂, pode promover a apoptose da célula, segundo DEZENGOTITA *et al.* (2002a).

Vale destacar que com o objetivo de reduzir os danos as células por conta do aumento da osmolalidade, existem estudos sobre a utilização osmoprotetores como a glicina-betaine e a prolina, os quais se mostraram bastante eficientes em restaurar o crescimento celular

(DEZENGOTITA, *et al*, 2002b). Os osmoprotetores se acumulam dentro do células estressadas por conta da osmolalidade, e atingem concentrações intracelulares que parecem equilibrar em relação às extracelulares (ØYAAS, *et al*, 1995).

Øyaas *et al* (1994), verificaram ainda que para hibridomas sob condições de estresse por conta do aumento da osmolalidade, na presença de osmoprotetores, podem produzir maiores quantidades de anticorpos monoclonais. Entretanto, vale considerar que estes estudos foram feitos para algumas linhagens celulares, logo estes resultados podem variar e novos estudos podem ser necessários. Antes de tudo, é sempre importante ter um controle rigoroso do pH e das condições de cultivo.

O pH ótimo para o crescimento de hibridomas é por volta de 7,2. Entretanto, estas células são capazes de manter o pH intracelular em valores controlados, mesmo quando o pH externo esteja em valores próximos a 6,5, e caso o pH seja menor, a acidificação do meio intracelular acontece e provoca a morte ou o estado de repouso das células (OZTURK *et al.*, 1992). O pH pode ser uma importante ferramenta para averiguar o crescimento celular, uma vez que no aumento da biomassa há geração de ácido láctico, e como mostrado, o pH sofre redução (HANSON *et al*, 2007).

2.6.3 Metabólitos

Existem dois fatores que podem inibir o crescimento de células: ausência de nutrientes e acúmulo de metabólitos, sendo os mais importantes a amônia e o lactato (MORAES *et al.*, 2008 (OZTURK *et al.*, 1992).

O lactato tem como origem a oxidação incompleta da D-glicose, assim como de outros açúcares e aminoácidos, entre eles, a L-glutamina. O acúmulo de lactato provoca uma diminuição no pH e um aumento na osmolalidade do meio, que podem afetar o metabolismo da célula e diminuir a viabilidade celular. Valores entre 20-60 mM de lactato, dependendo da linhagem celular, pode ser considerado prejudicial para a cultura (GÒDIA e CAIRO, 2006; MORAES *et al.*, 2008).

A amônia provem, principalmente, do metabolismo de aminoácidos, dentre eles a L-glutamina, aminoácido comumente adicionado ao meio de cultivo, por conta de ser uma excelente fonte de energia e por participar da síntese de nucleotídeos. Todavia, a quebra deste composto se inicia antes mesmo de entrar na célula, com a formação de ácido pirrolidina carboxílico e amônio, após entrar na célula, a parte restante é catabolizada, e são produzidos 2 moles de amônia por mol de glutamina, somando-se a isso, o SFB, comumente suplementado em meios de cultivo, apresenta em sua composição 0,5 mM NH₄OH. A amônia é metabólito

mais tóxico se comparado com o lactato e concentrações entre 2 e 3 mM se mostraram ser prejudiciais para o crescimento celular (GÒDIA e CAIRO, 2006; NELSON e COX, 2011).

Desenvolvimento de técnicas para evitar a formação de metabolitos se tornam, portanto, necessárias. Com o intuito de acompanhar o crescimento das células, neste trabalho é observado o consumo dos nutrientes disponíveis, assim como a produção de metabólitos, com o intuito de controlar e fornecer as melhores condições para a célula. Além disso, a não utilização de SFB neste trabalho também contribui para a redução de amônio no meio.

2.7. Cultivo em Escala Laboratorial

O cultivo celular laboratorial tem como intuito fornecer todas condições necessárias para que a célula cresça em um ambiente diferente do seu natural, ou seja, procura simular o modelo *in vivo* de onde a célula foi extraída. Mesmo que o modelo construído esteja próximo da realidade, o processo *in vitro* ainda causa problemas para o desenvolvimento celular, uma vez que as células passam a crescer em um meio que favorece o espalhamento, a migração e a proliferação, em oposição ao crescimento tridimensional *in vivo*. Apesar disso, o uso de cultura celular tem suas vantagens, como controle do microambiente que circunda a célula, homogeneidade da amostragem e baixo custo. (ALVES e GUIMARÃES, 2010).

Os sistemas de produção em pequena escala se caracterizam por serem simples, baratos e pouco automatizados, o que explica o grande uso, todavia, são pouco indicados para a obtenção de anticorpos em grande escala, uma vez que são desprovidos de um sistema de controle de parâmetros físico-químicos e de agitação capaz de manter a homogeneidade do sistema (BUTLER, 2005; MORAES, *et al.*, 2008).

Neste trabalho, o cultivo *in vitro* é realizado através de frascos T e principalmente, em biorreatores, para ativação e expansão das células, afim de se obter dados escalonáveis.

2.7.1. Cultivo em Sistema Estático

O frasco T, mostrado na Figura 14, é o sistema de cultivo, *in vitro*, mais utilizado. São garrafas de poliestireno com tampas rosqueáveis, podendo estas apresentarem ou não, filtros hidrofóbicos com 0,22 µm de poro. Para o cultivo, estes frascos, são mantidos dentro de uma incubadora, na posição horizontal, para promover o crescimento no meio de cultivo adicionado (ZANATTA, 2009). É de extrema importância que a manipulação dos frascos T sejam feitas em câmara de biossegurança com fluxo laminar para garantir a assepsia e segurança do operador (BUTLER, 2005).

Figura 14: Frasco T, com destaque para a tampa com filtro hidrofóbico.

Fonte: Green BioResearch, 2018.

Frascos T são de baixo custo e de fácil uso, o que justifica seu amplo uso, entretanto, apresenta limitações de uso que incluem: a formação de um ambiente heterogêneo que culmina em gradientes de concentração de metabólitos e substratos (nutrientes); excessiva manipulação, conseqüentemente, alto risco de contaminação; ausência de controles dos parâmetros importantes para o crescimento celular (ZANATTA, 2009).

2.7.2. Cultivo em Biorreator Spinner

Biorreatores surgiram a partir de estudos que se iniciaram em 1970, com o intuito de fornecer condições físico-químicas semelhantes às dos seres vivos para o cultivo celular. Desde então uma variedade de biorreatores surgiram, e atualmente, os biorreatores disponíveis para o cultivo de células animais podem ser classificados de diferentes formas, sendo a homogeneidade do ambiente a característica mais utilizada para tal fim. Assim, têm-se os biorreatores homogêneos e heterogêneos, os quais são apresentados na Tabela 5 (MORAES *et al.*, 2008).

Tabela 5: Biorreatores do tipo homogêneo e heterogêneo.

Classificação	Biorreator
Homogêneo	Do tipo tanque-agitado, do tipo air-lift, de ondas.
Heterogêneo	Sistemas com microcarregadores, de leito empacotado, de leito fluidizado, de fibras ocas; com crescimento sobre superfícies.

Fonte: Moraes *et al.* 2008.

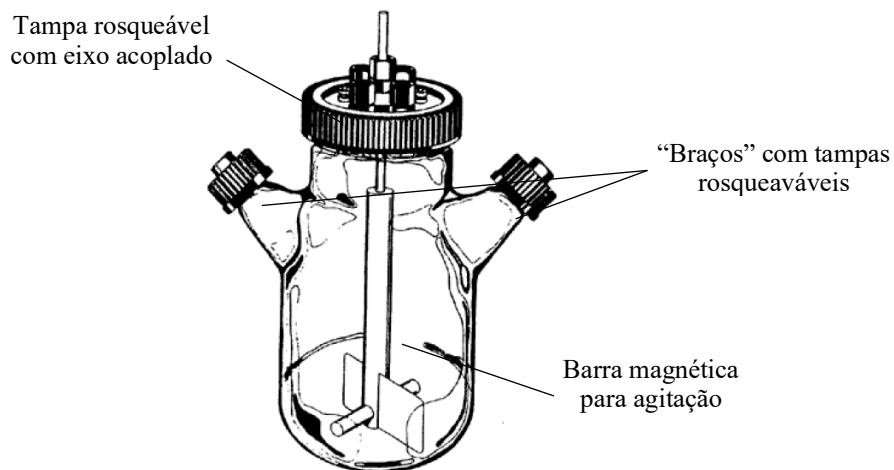
Os biorreatores do tipo homogêneo promovem a distribuição uniforme de todos os componentes (meio, células, gases dissolvidos, nutrientes e metabólitos) em todo volume de

cultivo, para isso o meio de cultivo deve estar em constante movimento, o que não acontece em biorreatores heterogêneos. Nestes, as células são dispostas em um compartimento e aderidas à uma superfície ou imobilizadas no interior de um leito de partículas biocompatíveis e o meio de cultivo é bombeado através do leito para que as células tenham acesso aos nutrientes e o oxigênio dissolvido (MORAES *et al*, 2008).

Os hibridomas utilizados neste trabalho foram cultivados em biorreator homogêneo do tipo *spinner*, por apresentarem um sistema de agitação bem semelhante aos encontrados em biorreatores de tanque agitado, tradicionalmente utilizados para cultivo de microrganismos, razão pela qual são considerados bastante apropriados para o cultivo de células animais em suspensão (BUTLER, 2005).

O frasco do tipo *spinner* (Figura 15) normalmente é feito de vidro borosilicato com tampa rosqueável que pode ou não apresentar um filtro hidrofóbico, e um eixo acoplado a esta tampa que em sua outra extremidade, alguns podem apresentar uma barra magnética agitadora central, ou ainda, um sistema pendular de agitação. No vidro, ainda, pode existir mais uma ou duas aberturas (braços), os quais são também tampados e utilizados para troca de meio, retirada de amostras, introdução do inóculo e outras funções (FRESHNEY, 2010). O frasco *spinner*, assim como o frasco T, deve ser colocado em um incubadora para controle de umidade, temperatura e CO₂ (BUTLER, 2005).

Figura 15: Esquema de um biorreator do tipo *spinner* utilizado no cultivo de células animais.

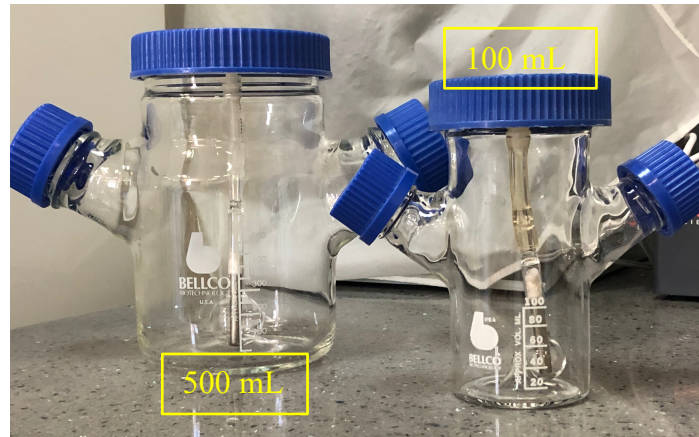


Fonte: BUTLER, 2005.

Como principal vantagem em relação ao uso de biorreatores pode se citar a utilização de um volume de cultivo maior, o que pode garantir maior produtividade em relação a produção de anticorpos monoclonais, entretanto, pode favorecer o acúmulo de metabólitos e causar danos ao cultivo. (MORAES *et al*, 2008).

Há um grande número de modelos de frascos *spinner* no mercado, com diferentes volumes de trabalho e sistemas de agitação, na Figura 16, é mostrado os biorreatores utilizados neste trabalho, um com 100 mL de capacidade e outro com 500 mL, ambos com sistema pendular de agitação.

Figura 16: Biorreatores de 100 e 500 mL de capacidade, do tipo *spinner* com agitador pendular, utilizados neste trabalho.



Fonte: Autoria própria

A agitação é implementada com o objetivo de manter as células em suspensão e ainda favorecer o transporte de gases e nutrientes para as células, e garantir a remoção, de forma mais eficiente, de gás carbônico. Num sistema agitado, a energia mecânica promovida pela agitação é transferida para o líquido e então dissipada na forma de energia térmica, o que pode causar um estresse hidrodinâmico na célula e causar a sua morte por necrose. O estresse hidrodinâmico pode ser de maior ou menor intensidade de acordo com alguns fatores como idade da cultura, taxa de crescimento celular, composição do meio de cultivo entre outros. Por conta disso, algumas substâncias são adicionadas ao meio de cultivo, como é o caso do SFB e de surfactantes (BUTLER, 2005; MORAES, 2008)

Dentre os modos de operação para o biorreator se destacam: cultivo descontínuo (batelada ou batch), cultivo descontínuo alimentado (batelada alimentada ou fed-batch) e cultivo contínuo (MORAES *et al.*, 2008). O cultivo em batelada se caracteriza por ter volume constante e não haver suplementação adicional de meio de cultura, assim o substrato é metabolizado e convertido à metabolitos e produtos até o fim do cultivo, enquanto as células crescem. Trata-se do modo de operação mais simples e também o mais utilizado em frascos de cultivo estacionário e biorreatores de pequena escala, apresenta baixo risco de contaminação e tem como ponto negativo a baixa produtividade (FENGE e LULLAU, 2006).

Uma possibilidade para aumentar a produtividade é adicionar ao reator os nutrientes mais consumidos pelas células, de forma gradual, a medida que são consumidos pela célula,

neste caso o modo de operação recebe o nome de batelada alimentada. Este modo de operação, inicia-se como uma batelada com o volume de trabalho reduzido, a alimentação inicia-se com o início da fase exponencial, na qual o consumo de nutrientes é grande, o que possibilita o prolongamento das fases exponencial e estacionária do processo, e, conseqüentemente, a obtenção de maiores concentrações de células viáveis e de concentrações de produto superiores em relação à batelada (WLASCHIN e HU, 2006). A adição pode ser por pulso, segundo perfis escalonados ou ainda segundo um perfil de vazão exponencial. A produtividade é maior em relação ao modo de batelada, mas também apresenta desvantagens como risco de contaminação moderado e tempo de permanência no frasco elevado, o que pode promover em alguns casos o acúmulo de metabólitos secundários tóxicos e inibir o crescimento celular. (FENGE e LULLAU, 2006; MORAES *et al*, 2008).

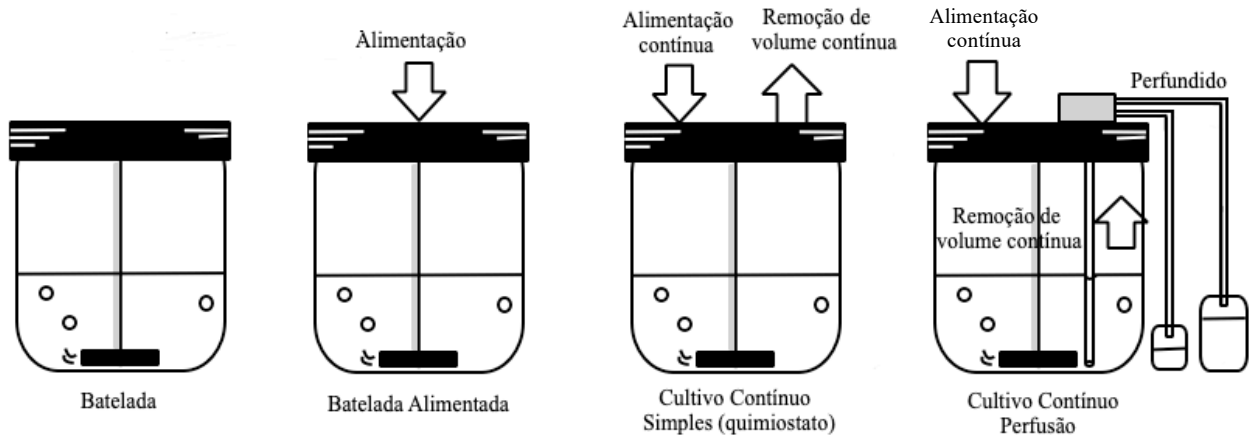
Finalmente, no cultivo contínuo há contínua adição de meio de cultivo novo e remoção de meio de cultivo contendo células na mesma vazão, afim de se manter o volume constante e prolongar o cultivo por longos períodos de tempo. Há dois tipos: cultivo em quimiostato e em perfusão, no primeiro as células são retiradas numa taxa igual à de crescimento, mantendo a concentração celular constante no biorreator. No segundo, as células na corrente de saída do meio de cultura com teor reduzido de nutrientes são quase totalmente removidas e realimentadas ao biorreator por meio de técnicas e dispositivos específicos (FENGE e LULLAU, 2006; MORAES *et al*, 2008), atingindo altos valores de concentração de células e de produto.

A perfusão surgiu como uma solução para aumentar a produtividade volumétrica do quimiostato. A contínua renovação do meio somada a remoção pequena e controlada de células, gera um ambiente estável às células, garantindo o fornecimento de produtos com alta produtividade e baixa variabilidade (BETTINARDI, 2016).

Os dispositivos utilizados para retenção das células são baseados em separação por centrifugação ou filtração, e dependentes do tamanho e densidade da célula. Estes dispositivos estão suscetíveis ao entupimento por acúmulo de célula e/ou adesão celular, por isto são utilizados sistemas de refrigeração que induzem a formação de agregados celulares, para facilitar a sedimentação das células e estruturas pulsantes, que previnem a adesão celular (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

Na Figura 17, são apresentados os modos de operação descritos anteriormente.

Figura 17: Modos de operação de biorreatores, da esquerda para a direita, batelada, batelada alimentada, cultivo contínuo simples e tipo perfusão. Com exceção do modo de operação em batelada, é feito a alimentação, e apenas no cultivo contínuo há remoção de volume, sendo feita na mesma razão que a alimentação. No cultivo contínuo de perfusão, há ainda, separação das células.



Fonte: Autoria própria.

Neste trabalho, os modos de operação utilizados foram batelada e batelada alimentada uma vez que são simples, apresentam baixo risco de contaminação e com custo baixo de utilização.

2.8 Detecção, Quantificação e Purificação de Anticorpos Monoclonais para Testes Antitumorais

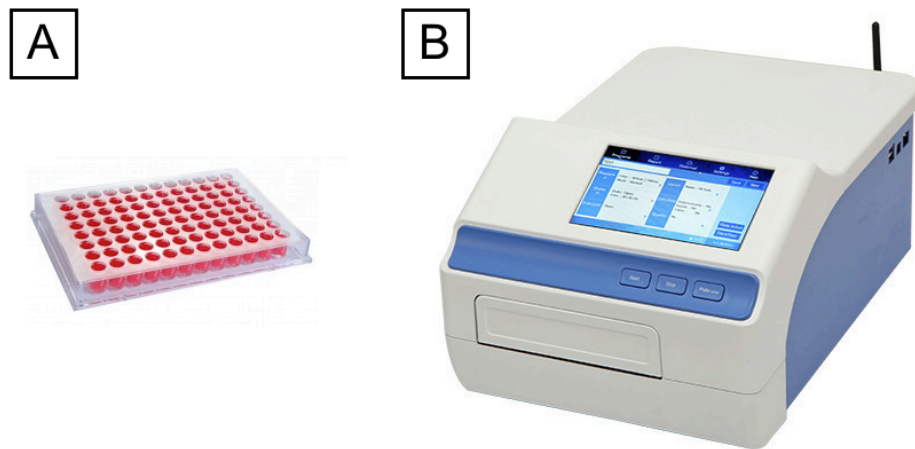
Após a obtenção dos anticorpos torna-se necessário a sua detecção e quantificação, a qual pode ser feita por meio do ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) e purificação, a qual pode ser realizada através da cromatografia, como a de troca iônica e a de afinidade.

2.8.1 ELISA

O ELISA é um ensaio imunoenzimático, e baseia-se na interação antígeno-anticorpo, a qual é identificada através de reações enzimáticas. Este ensaio caracteriza-se por apresentar grande sensibilidade e especificidade, e é tido como ideal para realizar a quantificação da concentração de antígenos e anticorpos (ABBAS *et al.*, 2015).

Nesse método, uma enzima é covalentemente ligada a um anticorpo específico e este então, reconhece o antígeno alvo, se este estiver presente. Com o reconhecimento, a enzima irá reagir com um substrato incolor, chamado substrato cromogênico e irá dar origem a um produto colorido. Há um grande número de enzimas que pode ser utilizado, incluindo fosfatase alcalina, peroxidase de rábano e β -galactosidase. O ensaio é realizado em uma placa de poços e a quantificação do produto colorido lido em um equipamento especializado, por exemplo, um espectrofotômetro, como mostrado na Figura 18 (GOLDSBY *et al.*, 2000).

Figura 18: Componentes importantes na análise de ELISA: Placa de poço (A) e Espectrofotômetro (B).

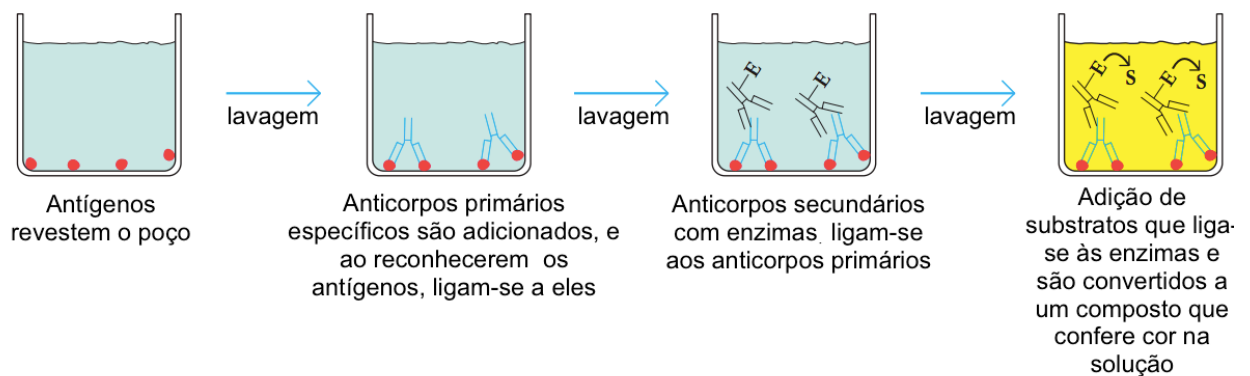


Fonte: INDIANMART, 2018.

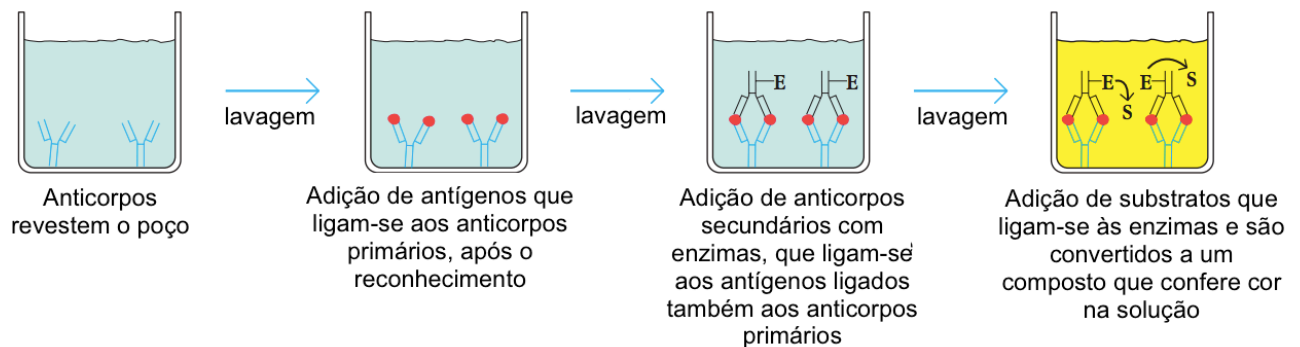
Trata-se de um método eficiente, pois permite detectar quantidades de proteína da ordem de nanogramas (10^{-9} g), além disso é seguro, de simples uso e de baixo custo, em comparação com outras técnicas (GIL *et al.*, 1999).

Os principais tipos de ELISA são: indireto, sanduiche e competitivo (GOLDSBY *et al.*, 2000), e são descritos nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente.

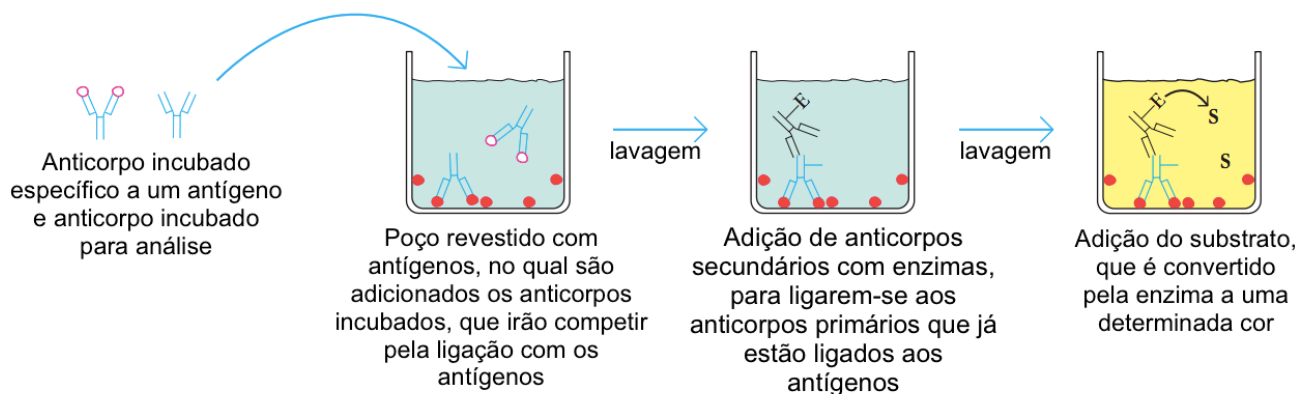
Figura 19: ELISA tipo Indireto.



Fonte: GOLDSBY *et al.*, 2000.

Figura 20: ELISA tipo Sanduíche.

Fonte: GOLDSBY *et al.*, 2000

Figura 21: ELISA tipo Competitivo

Fonte: GOLDSBY *et al.*, 2000.

2.8.2. Purificação de Anticorpos Monoclonais

Para o uso clínico de biomoléculas é de extrema importância a obtenção de um elevado grau de pureza, sendo necessário uma variedade de técnicas para se obter o grau desejado (GANGNON, 2012).

Para os anticorpos monoclonais, é feito uma pré-purificação seguida pela purificação propriamente dita. Tais compostos são recuperados de meios complexos (grandes quantidades de proteínas e células), o que faz necessário o uso de processos de clarificação, filtração e/ou ainda, a centrifugação (GANGNON, 2012).

Para a purificação, existem diferentes técnicas, como a cromatografia de troca iônica, uma das primeiras técnicas a serem utilizadas para esse fim (KARLSSON *et al.*, 1998), e a qual permite a separação de proteínas baseado nas diferenças entre as cargas líquidas das proteínas. As proteínas apresentam uma carga em sua superfície que interage com a carga oposta presente no meio cromatográfico. A carga superficial das proteínas pode ser alterada por meio de

alterações no pH, de acordo com o ponto isoelétrico (pH em que a carga líquida da proteína é igual a zero). Se a proteína está presente em um ambiente cujo pH é superior ao de seu ponto isoelétrico (pI), sua carga é negativa, o que permite a utilização de resinas de troca aniônicas, caso o pH do ambiente seja inferior ao de seu pI, a carga será positiva e a resina será de troca catiônica (GAGNON, 2012).

Um outro tipo de cromatografia que se costuma utilizar são as que se baseiam nas características hidrofóbicas dos componentes. Os mAbs apresentam uma grande quantidade de aminoácidos em sua composição, e muitos desses apresentam tais características. Para este tipo de cromatografia normalmente utiliza-se um sal, como o sulfato de amônio, para remover a camada de solvatação e expor os grupos hidrofóbicos, o que permite então realizar o procedimento em uma coluna adequada, na qual proteínas menos hidrofóbicas tendem a eluir primeiro (GAGNON, 2012).

Tem-se ainda a cromatografia por afinidade, um método, altamente seletivo, que explora a interação reversível entre a proteína alvo e um ligante imobilizado à matriz cromatográfica. Neste caso, existe a possibilidade de utilizar duas estratégias, a primeira é relacionada com a região Fab do anticorpo, que apresentam especificidade na ligação com antígenos, e a segunda, explora as partes constantes, a região Fc do anticorpo, regiões que apresentam interação com diversas proteínas, aminoácidos e outras moléculas específicas. Os ligantes de afinidade podem ser classificados em bioespecíficos e pseudoespecíficos. (GAGNON, 2012; LOW *et al.*, 2007)

Os ligantes bioespecíficos interagem com a proteína através dos seus sítios de ligação, esta interação é muito forte e específica, o que confere elevado grau de pureza. Quando se utiliza antígenos ou anticorpos como ligantes, obtêm-se ótimos valores em relação a purificação, todavia há algumas limitações, dentre as quais se destacam a grande quantidade de ligantes purificados à serem acoplados à matriz e um grande número de eluições, por conta das fortes interações, o que pode diminuir a vida útil das colunas (ROQUE *et al.*, 2007). Uma alternativa a esses desafios, vem sendo utilizar as proteínas “A”, “G” ou “L” como ligantes para a purificação de anticorpos. A proteína “A” é secretada por linhagens de bactérias *Staphylococcus aureus* e apresenta alta afinidade com a região Fc das imunoglobulinas, característica que permite o seu uso em técnicas de purificação de proteínas com fins terapêuticos e testes clínicos. A proteína “G”, também apresenta afinidade pela região Fc, isolada de linhagens de *Streptococcal*, e difere da proteína A, na intensidade das ligações. Já a proteína “L”, isolada da bactéria *Peptostreptococcus magnus*, apresenta afinidade pelas cadeias leves do tipo κ das imunoglobulinas. Mesmo apresentando melhores resultados, há algumas dificuldades em utilizar estas proteínas, como o desprendimento das proteínas da coluna por

conta das repetições do procedimento que pode levar a contaminação e também à alto custo (LOW *et al.*, 2007).

Os ligantes pseudobiospecíficos, por outro lado, não possuem interação biológica, as interações que ocorrem são do tipo hidrofóbicas, eletrostáticas ou de ligações de coordenação com as proteínas, logo apresentam afinidade estrutural. Vale considerar que estes ligantes podem ser de origem biológica ou não, e ainda podem gerar ótimos resultados (LOW *et al.*, 2007).

Dentro da cromatografia de afinidade, ainda se enquadra a IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography), que é feita pela interação reversível entre proteínas e íons metálicos por meio de ligações de coordenação, sendo utilizada na purificação de proteínas, como anticorpos de diversas fontes, entre elas hibridomas (GAGNON, 2012).

Há poucos dados específicos na literatura para os mAbs anti-CD25 a respeito do melhor método, mas para alguns mAbs, há estudos que utilizam cromatografia de troca iônica, ou ainda, cromatografia de afinidade com proteínas “A”, “G” ou “L”, ou com íons metálicos. A cromatografia de afinidade está sendo bastante utilizada por conta dos altos valores de recuperação que estão sendo obtidos, acima de 95% (AYBAY e IMIR 2000; OLIVEIRA, 2014), todavia é um método ainda caro, e tem como outras desvantagens, o alto número de eluições necessárias, por conta das fortes interações, a necessidade de ligantes com alto grau de pureza e ainda, o desprendimento de metal, no caso da IMAC.

2.9. Justificativa

A busca por tratamentos alternativos para o câncer vem crescendo nos últimos anos, com o objetivo de fornecer tratamentos menos agressivos, de menor duração e mais baratos, o uso de anticorpos monoclonais vem ganhando bastante espaço neste campo, uma vez que já se mostraram capazes de auxiliar o tratamento de alguns tumores, como o trastuzumab (Herceptin®), utilizado para o câncer de mama.

Em relação ao anticorpo anti-CD25, o seu uso já é aprovado no tratamento de esclerose múltipla, e atualmente é estudado acerca de sua ação contra tumores. Sabe-se que este promove, *in vivo*, a depleção de células T regulatórias CD4+CD25+Foxp3, responsáveis pela imune homeostase, cuja ausência permite que o sistema imune reconheça as células anormais e as elimine. Visando conhecer o seu potencial no tratamento de câncer, a otimização de sua produção é de extrema importância, logo logo, este trabalho tem como intuito otimizar o cultivo de hibridomas PC-61 para obter anticorpos anti-CD25 em biorreatores do tipo *spinner*, obtendo grandes quantidades, utilizando-se um volume menor de meio de cultivo, e ainda, sem soro fetal bovino, que é um composto com inúmeras desvantagens.

Na literatura há um grande número de trabalho mostrando a ação deste anticorpo, mas quase nenhum indicando as condições de cultivo, metabolismo, métodos de purificação, assim este trabalho busca preencher esta lacuna e fornecer novos dados para novos estudos.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos, a otimização do cultivo de hibridomas PC-61 em biorreator do tipo *spinner* em meio livre de Soro Fetal Bovino (SFB) para a obtenção de anticorpos monoclonais (mAb) anti-CD25 (IgG1) e a realização da purificação destes anticorpos.

Os objetivos específicos foram:

- Realizar o cultivo dos hibridomas em meio de cultivo com e sem SFB, afim de se comparar o crescimento celular e a produção de mAbs anti-CD25;
- Definir as melhores condições para o cultivo do hibridoma PC-61 em meio de cultura livre de SFB e em biorreator do tipo *spinner* nos modos de operação batelada e batelada alimentada, visando a produção do mAb anti-CD25 em escala laboratorial (escalonável para garantir produtibilidade em larga escala);
- Estabelecer um protocolo simples e eficiente para a purificação dos mAbs anti-CD25 utilizando proteínas bioespecíficas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Linhagem Celular e Preservação*

Para o início dos estudos sobre anticorpos mAbs anti-CD25, classificados como IgG1, foi utilizado a linhagem de hibridoma PC-61, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. João Santana da Silva, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo - USP).

Prampero (2017), em seu trabalho, ativou e expandiu uma porção destas células em meio RPMI-1640 contendo 10% (v/v) de SFB, e então, congelou-as em SFB e DMSO (Dimetilsulfóxido – meio de congelamento Sigma, nº D2650), na proporção 9:1 (v/v) e as manteve em criotubos de 1 mL em vaso Dewar contendo nitrogênio líquido à -196 °C. Num outro momento, outra porção foi ativada em meio RPMI-1640 com SFB, todavia, durante a expansão, as células foram adaptadas ao meio SFM (Serum Free Medium – meio livre de soro) de maneira sequencial, adicionando-se este meio ao cultivo de forma gradual até total exclusão do meio RPMI. As células foram, então, congeladas em criotubos com SFM e DMSO (9:1, v/v) e mantidas em nitrogênio líquido.

Neste trabalho, os criotubos preparados por Prampero (2017) foram retirados do nitrogênio líquido, e as células presentes, foram descongeladas e expandidas para a formação de um novo banco, o qual foi utilizado como lote de trabalho. As células congeladas com o meio SFM e DMSO, foram expandidas e novamente congeladas com o meio SFM, e as células congeladas com SFB, foram expandidas com o meio RPMI-1640 (10% SFB) e congeladas com SFB e DMSO.

4.2 *Meios de Cultivo*

4.2.1 *Meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) - 1640*

Trata-se de um meio básico, produzido por Gibco® Life Technology (nº 23400-021) com altas concentrações de vitaminas, como biotina, vitamina B12, assim como de L- glutamina, vermelho de fenol e HEPES (composto orgânico que funciona como agente tamponante, quando na forma de zwitteriônica). É suplementado com bicarbonato de sódio, para ajuste do pH, e SFB. É disponibilizado nas formas de líquido ou pó, apresenta validade de 12 meses e deve ser armazenado em temperatura entre 2°C e 8°C.

O meio RPMI – 1640 suplementado com SFB e bicarbonato de sódio é abreviado como RPMIS neste trabalho.

4.2.2 Meio Hybridoma Serum Free Medium (SFM)

Meio livre de soro, produzido por Gibco® Life Technology (n° 12045-076), com baixo teor proteico, cerca de 20 µg mL⁻¹, e que possui em sua composição, L-glutamina, insulina, transferrina, vermelho de fenol (indicador colorido de pH) e surfactantes, compostos que tem como função proteger a célula contra possíveis danos causados pela agitação e evitar a formação de espuma. É disponibilizado, também, nas formas de líquido ou pó, e deve ser armazenado em temperatura entre 2°C e 8°C.

4.3. Cultivo celular

Os cultivos celulares feitos neste trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular (LATECC), o qual é localizado no Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar – Campus São Carlos). Os experimentos de cultivo do hibridoma PC-61 feitos neste trabalho seguiram procedimentos listados a seguir.

4.3.1 Descongelamento dos Hibridomas PC-61

As células de hibridomas foram descongeladas, sempre que necessário, da seguinte maneira: um criotubo, com SFM, foi retirado do tanque de nitrogênio líquido, e colocado em um banho termostático à 37 °C. Após rápido descongelamento, seu conteúdo foi transferido para um tubo cônico (Corning, USA) de 15 mL, contendo 9 mL de meio SFM, e submetido à centrifugação a 1150 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado, ressuspenso em 5 mL de meio SFM. A suspensão celular formada, foi transferida para um frasco T de 75 cm² (Corning, USA), e este colocado em uma incubadora (Thermofisher Scientific, USA) à 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para expansão celular. O mesmo procedimento foi feito para o meio RPMIS, sendo utilizado um criotubo com SFB.

4.3.2. Expansão Celular em Frascos T

Após o descongelamento, as células foram cultivadas em frascos de cultivo do tipo T 75cm² e mantidos em uma incubadora à 37°C e atmosfera úmida de 5% de CO₂.

A transferência de células de um frasco para outro para aumentar a densidade celular, etapa conhecida como passagem, foi realizada da seguinte forma: o conteúdo de um frasco foi transferido para um tubo cônico de 15 mL, com o auxílio de pipetas e de um “rodinho” (Corning, EUA), o qual foi utilizado para remover as células que estavam semi-aderidas na base inferior do frasco. O tubo foi submetido a centrifugação à 1150 rpm por 5 minutos, em seguida, o sobrenadante formado foi descartado e o pellet ressuspenso em, aproximadamente, 3 mL

meio de cultivo fresco, esta suspensão foi então utilizada como inóculo para novos frascos T 75 cm². As quantidades de células a serem inoculadas eram calculadas a fim de garantir sempre uma concentração inicial de inóculo igual a 2×10^5 células mL⁻¹ em cada frasco T para cada passagem. Este procedimento fora repetido, tanto para os frascos com SFM assim como para os com RPMIS.

As passagens foram feitas a cada 48 horas, para evitar o acúmulo de metabólitos e diminuição do pH e assim possibilitar a inoculação do biorreator com os hibridoma PC-61 no meio da fase exponencial.

4.3.3. *Expansão Celular em Biorreator do Tipo Spinner em Batelada*

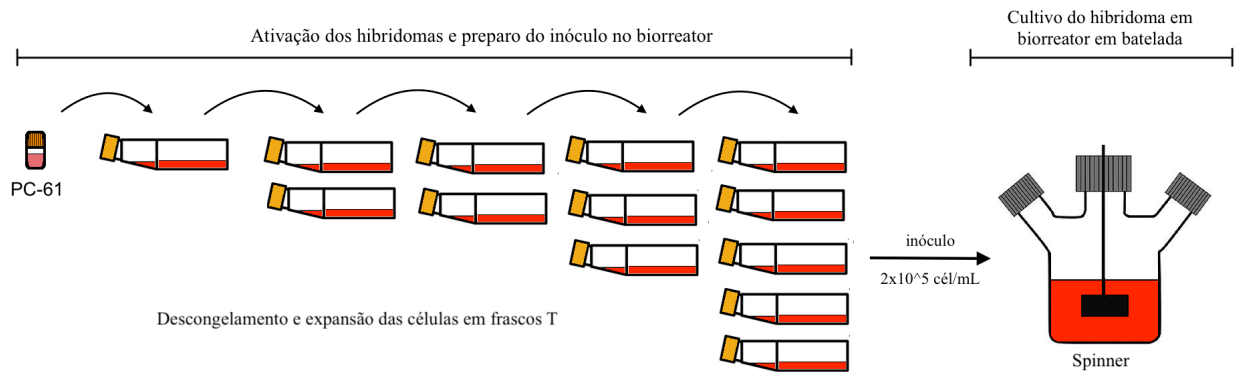
As células dos hibridomas PC-61 após serem descongeladas e expandidas em frascos T foram utilizadas para preparar dois biorreatores do tipo *spinner* (Bellco, USA) em de 500 mL de capacidade em operação batelada, sendo um com o meio SFM, e outro com o meio RPMIS (experimento controle). O inóculo feito em cada biorreator foi de 2×10^5 cel mL⁻¹ e o volume de trabalho igual à 200 mL.

Os biorreatores foram mantidos, durante 96 horas, em uma incubadora (Thermofisher Scientific, USA) com agitação magnética à 70 rpm, 37 °C e atmosfera úmida de 2 - 5% de CO₂ para o biorreator com RPMIS e 3 - 5% de CO₂ para o biorreator com SFM. A diferença no nível CO₂ para cada biorreator foi feita para o controle de pH. A cada 12 horas, foram retiradas pequenas alíquotas para análises bioquímicas.

No final dos cultivos, o conteúdo de cada biorreator foi centrifugado (1150 rpm por 5 min), e o sobrenadante transferido para tubos cônicos (Corning, USA) de 50 mL e congelados à -80 °C.

As condições de cultivo seguiram as já utilizadas em nosso laboratório (LATECC) e que tiveram resultados positivos (FERREIRA, 2007; PRAMPERO, 2017). O procedimento é ilustrado na Figura 22.

Figura 22: Esquema do procedimento de ativação e expansão do hibridoma PC-61 em frascos T de 75 cm² para realizar um inóculo de 2×10^5 cel mL⁻¹ em biorreatores do tipo *spinner* com os meios de cultivo RPMIS e SFM, com o volume de trabalho igual a 200 mL e operados em batelada. Para monitorar a evolução dos cultivos, a cada 12 horas eram retiradas amostras para fazer análises bioquímicas.



Fonte: Autoria própria.

4.3.4. Expansão Celular em Biorreator do Tipo Spinner em Batelada

Alimentada

Foram preparados dois biorreatores *spinner*, de 100 mL de capacidade, para cada meio de cultivo RPMIS e SFM, com inóculo de 2×10^5 cel mL⁻¹ e volume de trabalho igual à 50 mL. Neste caso, os biorreatores foram mantidos, durante 144 horas, em uma incubadora com agitação magnética à 70 rpm, 37 °C e atmosfera úmida de, 1,5-5% de CO₂ para o biorreator com RPMIS e 3-5% de CO₂ para o biorreator com SFM. Mesmas condições utilizadas para o modo de operação em batelada.

Os biorreatores foram operados em batelada por aproximadamente 55 horas, e então alimentados manualmente com meio de cultivo fresco a cada 8 horas.

O crescimento celular em um biorreator em batelada alimentada segue a Equação 1:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_{m\acute{a}x} - D) \cdot X \quad \text{Equação 1}$$

onde X é a concentração celular (células mL⁻¹), t, tempo (h), $\mu_{m\acute{a}x}$, taxa máxima de crescimento celular específico na fase exponencial (h⁻¹) e D a taxa de diluição, definida como a razão entre a vazão volumétrica adicionada de meio de cultivo fresco (F) em mL e o volume total (V_T) no biorreator em mL, como mostrado na Equação 2:

$$D = \frac{F}{V_t} \quad \text{Equação 2}$$

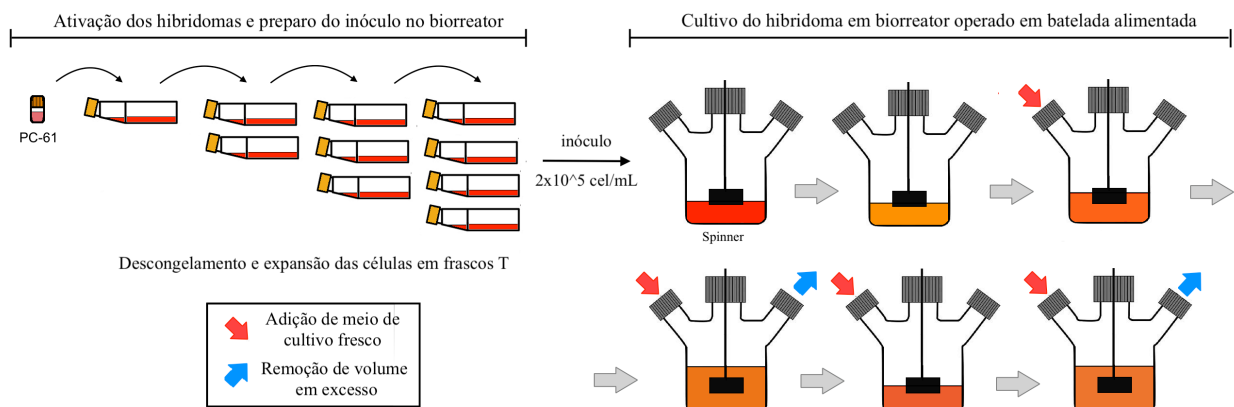
No estado pré-estacionário, ou seja, quando a concentração celular tende a ficar constante, pela Equação 1, $\frac{dX}{dt} = 0$, logo $\mu_{\text{máx}} = D$, e a Equação 2, pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$F = \mu_{\text{máx}} \cdot V_t \quad \text{Equação 3}$$

Empregando-se a Equação 3, foi possível determinar o volume de meio de cultivo fresco a ser adicionado em cada momento, até o final do cultivo. Vale observar que para evitar que o volume no biorreator superasse sua capacidade durante o cultivo foram retirados dos biorreatores volumes de 50 mL (volume do tubo de armazenamento), armazenados em tubos cônicos e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O procedimento de cultivo em biorreator operado em batelada alimentada é ilustrado na Figura 23.

Figura 23: Esquema do procedimento de ativação e expansão do hibridoma PC-61 em frascos T de 75 cm^2 para realizar um inóculo de $2 \times 10^5\text{ cel mL}^{-1}$ em biorreatores do tipo *spinner* com os meios de cultivo RPMIS e SFM, com o volume de trabalho igual a 50 mL e operados em batelada alimentada. Antes das células entrarem na fase estacionária, meio de cultivo fresco era adicionado e o excesso de volume retirado. E a cada 12 horas eram retiradas amostras para fazer análises bioquímicas.



Fonte: Autoria própria.

4.4. Purificação dos Anticorpos Monoclonais

Para a purificação dos anticorpos obtidos pelo cultivo dos hibridomas nos meios RPMIS e SFM, foram utilizadas as técnicas de cromatografia de troca-iônica e de imunoprecipitação.

4.4.1. Cromatografia de Troca Iônica

O procedimento de cromatografia de troca-iônica foi realizado no Laboratório de Imunologia e Citologia dos Fluidos Biológicos na Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, com a supervisão da Professora Dra. Cleni M. M. Machado.

Para esta etapa foi utilizado o sobrenadante obtido por Prampero (2017) em seu trabalho. As amostras de cada meio foram concentradas, e então, adicionado (gota a gota) sulfato de amônio até corresponder a 40% do volume final da solução com o intuito de promover a precipitação das proteínas.

As suspensões foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado resultante foi ressuspenso em uma solução de sulfato de amônio 40% saturada. Novamente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi, então, ressuspenso em tampão fosfato de sódio 0,2 M, e pH 7,2, e dialisado por 3 dias com o mesmo tampão.

Após a diálise, o material foi colocado em uma coluna CM-sepharose de 3 cm de diâmetro por 10,5 cm de altura, o fluxo foi ajustado para 1 mL min⁻¹. Tubos de coleta foram preenchidos com 3 mL, e então submetidos a leitura em um espectrofotômetro UV/vis, a 280 nm.

4.4.2. Imunoprecipitação com Proteína G em Sepharose

O procedimento de imunoprecipitação foi realizado no Laboratório de Bioquímica Celular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, sob supervisão do Professor Dr. Felipe Roberti Teixeira.

Para a purificação, foram utilizados os sobrenadantes obtidos pelo cultivo em batelada em ambos os meios de cultivo deste trabalho. Além disso, por conta da dificuldade de se encontrar uma coluna com a proteína empacotada, foi utilizada a técnica de imunoprecipitação, na qual o mAb anti-CD25 (IgG1) se liga a proteína G presente no gel de Sepharose (escolhida por apresentar melhor interação com o anticorpo de interesse) e precipita, como é descrito a seguir.

Uma alíquota do sobrenadante de cada meio de cultivo (13 mL para o meio RPMIS e 4,3 mL para o meio SFM, a diferença nos volumes foi feita para equiparar as quantidades de anticorpo, como é mostrado no tópico 5.4.2) foi separada e transferida para um tubo cônico de 15 mL. Então, para realizar o ajuste de pH, em cada tubo, foi adicionado tris-HCl 100 mM pH 8,0, sendo o volume de tris-HCl colocado igual a 1/10 do volume da alíquota do sobrenadante separada.

Nos tubos foram adicionados 50 μ L da resina de proteína G em Sepharose, em seguida, estes foram postos em um equipamento de rotação, para promover a interação entre a proteína e o mAb. Os tubos ficaram sob baixa rotação (15 rpm) durante 2 horas à 4°C em um equipamento (Phoenix Luferco) como mostra a Figura 24.

Figura 24: Equipamento de baixa rotação para promover interação entre resina e anticorpos.



Fonte: Autoria Própria.

Logo após este passo, os tubos foram centrifugados (ThermoFisher, USA) à 2500 rpm por 1 min, a resina de cada meio de cultivo, foi separada e armazenada em microtubos de 1,5 mL e o sobrenadante armazenado para análises futuras. Depois disso, foi iniciada a etapa de lavagem, procedimento repetido 7 vezes, e seguiu-se a seguinte ordem: adicionou-se 400 μ L de fosfato de sódio 100 mM pH 8,5 aos tubos com a resina de proteína, e então, ressuspendeu-se a resina, e colocou-se o tubo para centrifugação (Eppendorf, Alemanha) à 1150 rpm por 30 s, o sobrenadante foi separado e armazenado.

Após realizar as lavagens, foi feita a eluição com uma solução de 50 mM de glicina (pH 2,3): em cada tubo adicionou-se 50 μ L da solução eluente, e então, ressuspendeu-se a resina, e colocou-se o tubo para centrifugação à 1150 rpm por 30 s, o sobrenadante foi separado e transferida para tubos contendo 6 μ L de Tris-HCL 1 M pH 8, para neutralização, este procedimento foi repetido 7 vezes. Todos os tubos, então, foram submetidos a leitura um espectrofotômetro Nanovue® GE (USA) em 280 nm.

4.4.2.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Com o intuito de verificar a eficiência da purificação foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo Dodecil sulfato de Sódio (SDS-PAGE-Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Eletroforesis), utilizando-se gel de resolução de 10% de acrilamida e gel de empacotamento de 5% de acrilamida. A eletroforese foi conduzida em equipamento

MiniProtean II (BioRad, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A corrente foi ajustada para 25 mA e a corrida foi realizada em cerca de duas horas. Como referência, foi utilizado um padrão (ThermoFisher Scientific Unstained Protein Molecular Weight) contendo as proteínas: β -galactosidase (116 kDa), soro albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa) e β -lactoglobulina (18 kDa). As amostras foram diluídas (v/v) com tampão de amostra 2x (1 mM EDTA, 2% (m/v) de SDS, 50% (v/v) glicerol, 50 mM DTT, 30 mM NaCl, 1mM NaN₃, 0,001% azul de bromofenol e 62,5 mM Tris-HCl pH6,8 - ThermoFisher), e então, aquecidas, para desnaturar as proteínas, durante 5 minutos a 95°C e aplicadas no gel. Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Blue por 30 min, e descorados em solução aquosa de etanol 12,5% (v/v) e ácido acético 12,5% (v/v) até a completa visibilidade das bandas.

4.4.2.2 Método de Bradford

As concentrações proteicas nas diferentes amostras foram determinadas através do método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão uma curva de 10 a 100 μ g/mL de albumina do soro bovino (BSA). As leituras das amostras foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando-se como branco a solução de PBS 0,02M pH 7,2. As amostras foram corridas em triplicata e os resultados das concentrações calculadas a partir da regressão linear da curva padrão.

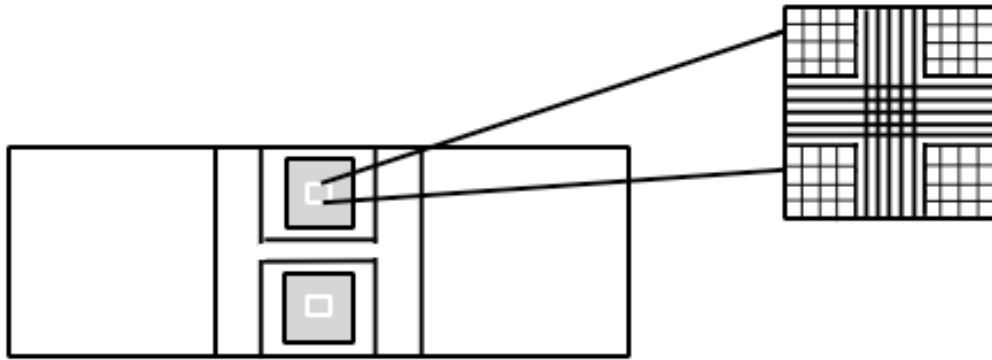
4.5 Métodos Analíticos Utilizados neste Trabalho

Para a caracterização dos cultivos quanto ao crescimento celular, quantificação de aminoácidos, detecção de mAbs e controle de pH, foram retiradas alíquotas de 3 mL dos cultivos a cada 12 horas, sendo estas centrifugadas, e o sobrenadante separado em microtubos de 1,5 mL, e então, congelado e armazenado a -80 °C.

4.5.1 Densidade Celular e Viabilidade

A densidade e a viabilidade celular foram determinadas pelo método de exclusão do corante azul de Tripán, através da contagem em hematocitômetro (câmara de Neubauer), um instrumento de análise que possui duas grades de contagem com quatro quadrantes com 1mm² de área, cada um, como mostrado na Figura 25.

Figura 25: Câmara de Neubauer para contagem de células, com destaque para uma grade de contagem.



Fonte: Autoria própria.

Para realizar a contagem dos hibridomas nos cultivos, 20 μ L de amostra de cultivo foi retirada e em seguida, misturada com 20 μ L de uma solução aquosa 0,4 % de Trypan Blue. Com o auxílio de uma micropipeta, uma alíquota da amostra corada foi colocada numa câmara de Neubauer, previamente montada, e a contagem feita por meio de um microscópio ótico (Olympus, Japão). As células eram classificadas como viáveis, quando não coradas, e inviáveis quando coradas.

A partir da contagem, a concentração celular foi determinada pela Equação 4, e a viabilidade, pela Equação 5:

$$C = n_v \cdot D \cdot V_Q \quad \text{Equação 4}$$

$$V = \frac{n_v}{n_v + n_d} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

onde, C é a concentração celular (células mL⁻¹), n_v é o número de células viáveis, n_d , número de células inviáveis, D, fator de diluição, V_Q , o volume do quadrante e V, a viabilidade celular (%). O volume do quadrante no hemacitômetro utilizado para a contagem de células foi de 10⁻⁴ mL, e o fator de diluição igual a 2.

As contagens foram feitas em triplicata, e os resultados obtidos são apresentados da seguinte forma: média dos valores para C e V \pm desvio padrão.

4.5.2 Taxa Máxima de Crescimento Celular Específica ($\mu_{m\acute{a}x}$)

Com os dados obtidos nos cultivos dos hibridomas, foram construídos gráficos de logaritmo neperiano da concentração celular *versus* tempo para determinar a taxa de crescimento celular específica, μ .

O valor de μ pode ser definido pela Equação 6:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{Equação 6}$$

onde, X é a concentração de células viáveis (em células mL⁻¹) e t (em horas) é tempo de cultivo.

Na região onde o crescimento celular ocorre de forma exponencial, o valor de μ é constante e máximo, logo:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = cte = \mu_{m\acute{a}x} \quad \text{Equação 7}$$

Integrando-se a Equação 7, obtém-se a Equação 8, a qual permite calcular o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ por regressão linear:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{m\acute{a}x} \cdot t \quad \text{Equação 8}$$

onde, X₀ é o número de células viáveis no início da fase exponencial de crescimento celular.

Com o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ foi possível determinar o tempo de duplicação (T_d), visto que quando X = 2 · X₀, t = T_d, e a Equação 8 pode ser substituída pela Equação 9:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad \text{Equação 9}$$

4.5.3. Análise de Glicose e Lactato

A concentração de glicose e lactato foi determinada por meio do analisador enzimático YSI 7100 MBS (Multiparameter Bionanalytical System, Yellow Springs Instruments, EUA) do LATECC.

Para a determinação da concentração de glicose, o equipamento possui um biossensor contendo a enzima glicose oxidase. A reação enzimática gera peróxido de hidrogênio, o qual é detectado em um eletrodo de platina, sendo proporcional à concentração de glicose na amostra.

Já para a determinação da concentração de lactato, há um biossensor contendo a enzima lactato oxidase. A reação enzimática gera peróxido de hidrogênio, da mesma maneira, é detectado em um eletrodo de platina, sendo proporcional à concentração de lactato na amostra.

A concentração para glicose e lactato foram lidas em única vez no equipamento, e por isso, no resultado não é apresentado o erro das medidas.

O consumo de glicose pelas células por unidade de tempo, foi calculado a partir da Equação 10.

$$q_{gli} = -\frac{1}{(X_t; X_{t-1})} \cdot \frac{\Delta S}{\Delta t} \quad \text{Equação 10}$$

onde, q_{gli} é a taxa específica de consumo por célula, X_t , a concentração celular no tempo t (em células mL^{-1}), X_{t-1} , a concentração celular no tempo $t-1$ (em células mL^{-1}), ΔS , a variação de consumo de glicose (em mol) e Δt , a variação de tempo (em h).

4.5.4. Quantificação de Aminoácidos em Cultivo

As análises de aminoácidos foram executadas por cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).

Para realizar a cromatografia, utilizou-se uma coluna picotag 60 Å, 4 μm , 3,9 mm x 300 mm (Waters, Irlanda) empacotada com sílica, além de duas fases móveis: a primeira, fase A, foi preparada com água ultrapura tipo 1, acetonitrila (Panreac, Espanha) trietilamina (Sigma, USA) e acetato de sódio tri-hidratado (Synth, Brasil) e, a segunda, fase B, foi preparada com água ultrapura tipo 1 e acetonitrila (Panreac, Espanha). Para averiguar o funcionamento da coluna utilizou-se o padrão de aminoácidos Waters (WAT088122), e além disso, foi preparado manualmente curvas de calibração dos aminoácidos prolina (Sigma, USA), arginina (Sigma, USA), asparagina (Sigma, USA) e glutamina (Sigma, USA).

O preparo das soluções para serem injetadas na coluna foi feito na seguinte ordem: para cada amostra, uma alíquota de 200 μL foi retirada e transferida para um filtro Amicon® Ultra-0.5 3K, disposto em um microtubo de 2 mL. O tubo, com o filtro, foi centrifugado à 10000 rpm por 10 minutos, e logo após, 15 μL do filtrado foi separado e transferido para um pequeno tubo cilíndrico de vidro com tampa. O material foi colocado para secar, durante 15 minutos, sendo utilizado o gás nitrogênio, o qual é inerte, para o procedimento. Em seguida, foi adicionado ao tubo 10 μL da solução de hidratação (solução preparada a partir de etanol, água ultrapura tipo 1 e trietilamina), e a amostra foi colocada para secar, novamente, por mais 15 minutos. Após a segunda secagem, foi adicionado 20 μL da solução de derivatização (solução

preparada a partir de água ultrapura tipo 1, trietilamina e isotiocianato de fenilo - PITC), e esperou-se por 20 minutos para completar a reação e poder realizar uma nova secagem. Após a amostra estar seca, foi adicionado a solução diluente Pico-Tag Sample Diluent to Amino Acid analysis (Waters, Irlanda), e por fim a amostra foi injetada no cromatógrafo (Waters, Irlanda).

A concentração de aminoácidos foi determinada apenas uma vez, e por isso, o erro não é apresentado junto ao resultado.

4.5.5. Método ELISA para Detecção de Anticorpos Monoclonais

Para verificar a produção de mAbs foi realizado o teste de ELISA Indireto: uma placa de alta afinidade com 96 poços (Costar 3590) foi sensibilizada com a própria amostra, não diluída, de sobrenadante, adicionando-se, 100 µL/poço da amostra. A placa foi incubada por 16 horas à 4 °C, e então, logo após a incubação, foi feito um ciclo de 3 lavagens automáticas (ThermoPlate – TP-Washer), com 300 µL/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 µL/poço de solução bloqueadora contendo Albumina 1% em PBS por 1h, à temperatura ambiente (TA), para impedir a ligação inespecífica, e mais um ciclo de 3 lavagens automáticas (PBS-Tw) foi realizada, seguida pela adição de 100 µL/poço do anticorpo secundário Goat Anti-mouse IgG1 conjugado com a enzima HRP (Bethyl Laboratories, USA), previamente diluído em solução de PBS –Albumina 1%, na proporção 1:10000. As placas foram mantidas a TA por 1 hora e meia, e novamente, um novo ciclo de lavagens foi realizado, sendo feito 4 ao invés de 3, como recomenda o fabricante. Logo após, foram adicionados 100 µL/poço da solução reveladora contendo 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB-B&D) na proporção 1:1, e a placa foi incubada no escuro e em TA por 20 minutos. Para parar a reação e realizar a leitura no espectrofotômetro (ThermoPlate), em cada poço foi adicionado 50µL de ácido sulfúrico 2 N. A absorbância utilizada na leitura foi de 450 nm.

As amostras foram lidas em duplicata, e os resultados obtidos são apresentados da seguinte forma: média dos valores para $DO_{mAb} \pm$ desvio padrão.

4.6 Delineamento Experimental de Pesquisa

Na Tabela 6 são apresentados os experimentos realizados com o propósito de atingir os objetivos deste trabalho.

Tabela 6: Descrição dos experimentos realizados neste trabalho para atingir os objetivos propostos.

Experimento	Finalidade	Condições experimentais
<i>Cultivo em meio RPMIS e SFM em biorreator Spinner em batelada</i>		
ERB: Experimento com meio de cultivo com soro, RPMIS, em biorreator operado em batelada	Caracterizar a cinética de crescimento dos hibridomas PC-61 e a produção de anti-CD25 no meio de cultivo controle, RPMIS.	Foi feito o cultivo de hibridomas em biorreator <i>Spinner</i> por 96 horas com retirada de alíquotas a cada 12 horas. O inóculo no biorreator foi de 2×10^5 células mL^{-1} e o volume de trabalho utilizado no biorreator foi de 200 mL.
ESB: Experimento com meio livre de soro, SFM, em biorreator operado em batelada.	Caracterizar cinética de crescimento da célula PC-61 e de produção de anti-CD25 em meio de cultivo livre de soro, SFM.	Foi feito o cultivo de hibridomas em biorreator <i>Spinner</i> por 96 horas com retirada de alíquotas a cada 12 horas. O inóculo no biorreator foi de 2×10^5 células mL^{-1} e o volume de trabalho utilizado no biorreator foi de 200 mL.
<i>Cultivos em meio RPMIS e SFM em biorreator Spinner em batelada alimentada</i>		
ERBA: Experimento com meio de cultivo com soro, RPMIS, em biorreator operado em batelada alimentada.	Aumentar a produtividade do anti-CD25 baseado nas características cinéticas determinadas no biorreator em batelada com o meio de cultivo RPMIS	Foi feito o cultivo de hibridomas em biorreator <i>Spinner</i> por 144 horas com retirada de alíquotas a cada 12 horas e adição de meio fresco a cada 8 horas, após as células entrarem em estado pré-estacionário. O inóculo no biorreator foi de 2×10^5 cél mL^{-1} . O volume de trabalho utilizado no biorreator foi de 50 mL.

<p>ESBA: Experimento com meio livre de soro, SFM, em biorreator operado em batelada alimentada.</p>	<p>Aumentar a produtividade do anti-CD25 baseado nas características cinéticas determinadas no biorreator em batelada com o meio SFM, para averiguar as vantagens hipotéticas sobre o meio com soro RPMIS.</p>	<p>Foi feito o cultivo de hibridomas em biorreator <i>Spinner</i> por 144 horas com retirada de alíquotas a cada 12 horas e adição de meio fresco a cada 8 horas, após as células entrarem em estado pré-estacionário. O inóculo no biorreator foi de 2×10^5 cél mL⁻¹. O volume de trabalho utilizado no biorreator foi de 50 mL.</p>
<p><i>Purificação do mAb</i></p>		
<p>EPR: Experimento de purificação do sobrenadante do cultivo celular com o meio de cultivo RPMIS.</p>	<p>Avaliar a eficácia das técnicas de cromatografia de troca iônica e imunoprecipitação para purificar o mAb anti CD-25 presente no sobrenadante do cultivo com o meio RPMIS.</p>	<p>Para a cromatografia de troca iônica, o sobrenadante foi dialisado e passado em uma coluna CM – celulose. Na imunoprecipitação, foi adicionado ao sobrenadante a proteína G em Sepharose para promover a interação com o anticorpo.</p>
<p>EPS: Experimento de purificação do sobrenadante do cultivo celular com o meio de cultivo SFM.</p>	<p>Avaliar a eficácia das técnicas e cromatografia de troca iônica e imunoprecipitação para purificar o mAb anti CD-25 presente no sobrenadante do cultivo com o meio SFM.</p>	<p>Para a cromatografia de troca iônica, o sobrenadante foi dialisado e passado por uma coluna CM – celulose. Na imunoprecipitação, foi adicionado ao sobrenadante a proteína G em Sepharose para promover a interação com o anticorpo.</p>

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo de Hibridomas em Modo de Operação do Tipo Batelada

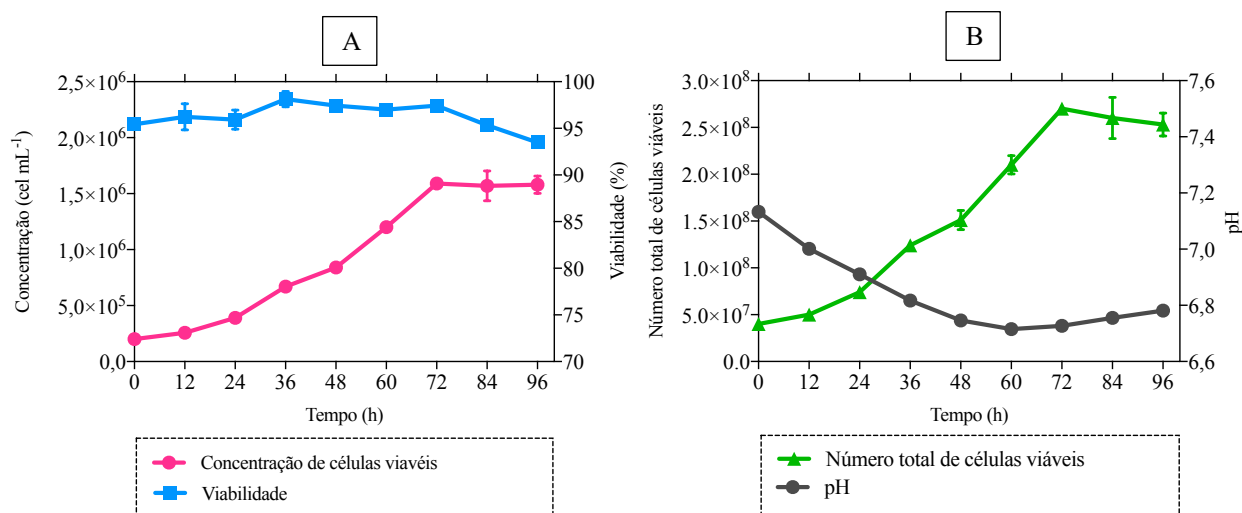
Esta etapa teve como intuito averiguar e caracterizar o crescimento dos hibridomas em biorreatores do tipo *spinner* operados em batelada, com dois meios de cultivos (SFM e RPMIS), assim como a produção de mAbs. O inóculo de 2×10^5 cel mL⁻¹ para um volume de trabalho de 200 mL, assim como agitação de 70 rpm foram reproduzidas por conta dos bons resultados obtidos em nosso Laboratório (LATECC) por Ferreira (2007) e Prampero (2017).

5.1.1. Cultivo em Meio RPMIS (ERB)

No Apêndice A - Parte 1 estão disponíveis todos os dados obtidos durante este cultivo.

Para o cultivo com o meio RPMIS, foram construídos dois gráficos (Figura 26) a partir da contagem das células, realizada como descrita em 4.3.4.1 a cada 12 horas. O gráfico A mostra a concentração de células viáveis (células mL⁻¹) e a viabilidade (%) por unidade de tempo (h), enquanto que o gráfico B, mostra o número total de células viáveis e o pH vs. tempo.

Figura 26: Gráficos para o cultivo celular em meio RPMIS: A) Concentração de células viáveis e viabilidade vs. tempo. B) Número total de células viáveis e pH vs. tempo.



O maior valor obtido para a concentração celular foi cerca de $1,59 \pm 0,02 \times 10^6$ cel mL⁻¹, 72 horas após o inóculo, em seguida a este período os valores para a concentração celular se mantiveram próximos ao do pico, indicando, possivelmente, que as células estavam na fase estacionária.

A maior quantidade de células viáveis foi obtida após 72 horas, e foi cerca de $2,70 \pm 0,03 \times 10^8$ células. Nas horas seguintes, os valores diminuíram, sendo que na última hora, o número total de células era de $2,53 \pm 0,12 \times 10^7$.

A viabilidade ficou acima de 97% até as 72 horas quando os valores começaram a diminuir, ficando igual a 93,48% as 96 horas.

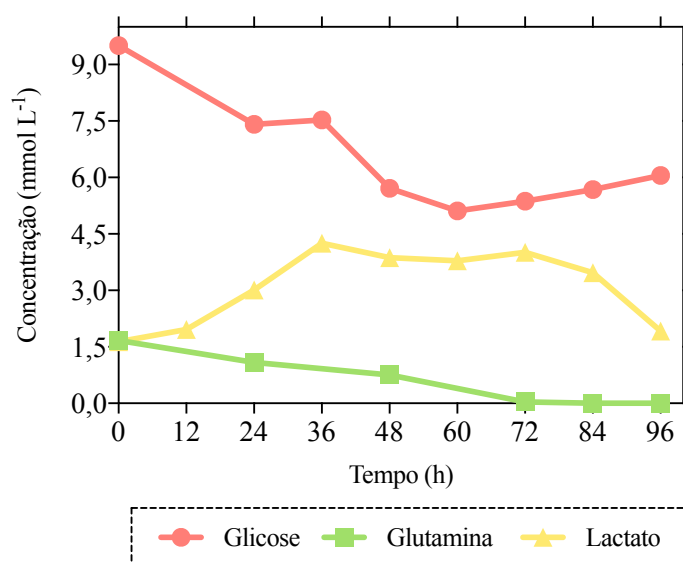
Tanto a queda no número total de células viáveis, como na da viabilidade indiciam o aumento no número de morte de células, o suficiente para ocasionar uma mudança na concentração, que provavelmente, se o cultivo se prolongasse, entraria em declínio.

Em relação ao pH do sobrenadante, o valor sofreu redução com o aumento de células, possivelmente por conta da produção de lactato. Para evitar que o meio de cultivo ficasse ácido e impedisse o crescimento celular, a concentração de CO₂ foi restringida do ambiente de forma gradual, ficando próximo do 2% no final do cultivo.

Nas últimas 48 horas do cultivo, provavelmente, por conta da morte das células, o pH começou a aumentar, de forma lenta. O valor mais baixo para o pH medido foi de 6,727, as 72 horas. Butler (2005) verificou que as células de hibridoma tem um crescimento ótimo em pH igual a 7,2, mas Godia e Cairo (2006) mostraram que hibridomas podem crescer em ambientes cujo pH seja próximo de 6,5, logo, o pH medido pode não ter atrapalhado o crescimento, mas um controle mais efetivo do parâmetro, poderia acarretar em uma melhoria no crescimento celular.

A diminuição no crescimento celular observada pode ter sido ocasionada, principalmente, pelo acúmulo de metabólitos e depleção de nutrientes, portanto com o intuito de averiguar o metabolismo das células foram feitas análises para construir o perfil de consumo dos principais nutrientes, e da produção de lactato. Na Figura 27, tem-se um gráfico mostrando o consumo de glicose e glutamina, principais fontes de energia e carbono e a produção de lactato por unidade de tempo (h).

Figura 27: Gráfico de consumo de glicose e glutamina e produção de lactato por unidade de tempo pelas células PC-61 no meio de cultivo RPMIS.



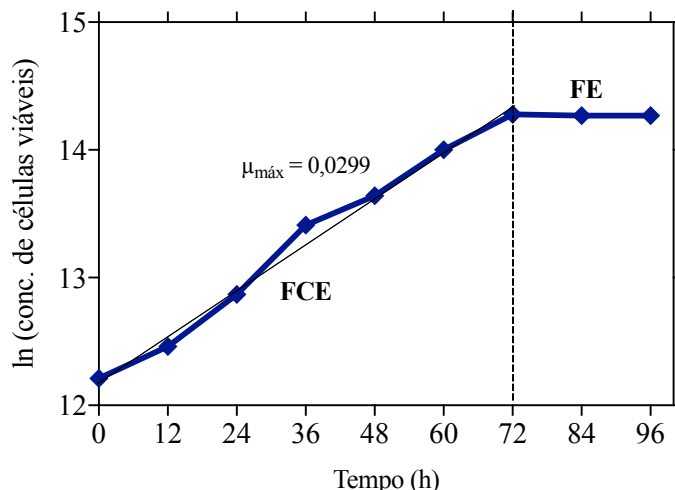
Como é observado na Figura 27, a glutamina é totalmente exaurida do cultivo celular a partir das 72 horas, o que pode explicar a diminuição na quantidade de células viáveis. A glutamina como já investigado (MERCILLE e MASSIE, 1994) é um aminoácido essencial para o crescimento e sua ausência implica em morte celular.

A concentração de lactato aumentou de forma gradual até as 36 horas, e então ficou quase que constante por, aproximadamente, 48 horas, em seguida, começou a diminuir. Possivelmente, com a morte das células e a retirada de alíquotas para análises pode ter ocasionado esta redução, assim como erros durante a leitura pode ter contribuído.

Em relação ao consumo dos outros aminoácidos, os únicos que se percebeu uma diminuição na concentração foram a isoleucina e a lisina, característico para células animais (BUTLER, 2005).

A taxa máxima de crescimento celular específica ($\mu_{\text{máx}}$) foi obtida através da regressão linear da fase de crescimento exponencial (FCE) no gráfico de logaritmo neperiano da concentração de células viáveis por tempo (h), mostrado na Figura 28. O valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi igual a $0,0299 \pm 0,0013 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,9905$) e o tempo de duplicação foi de 23,2 h.

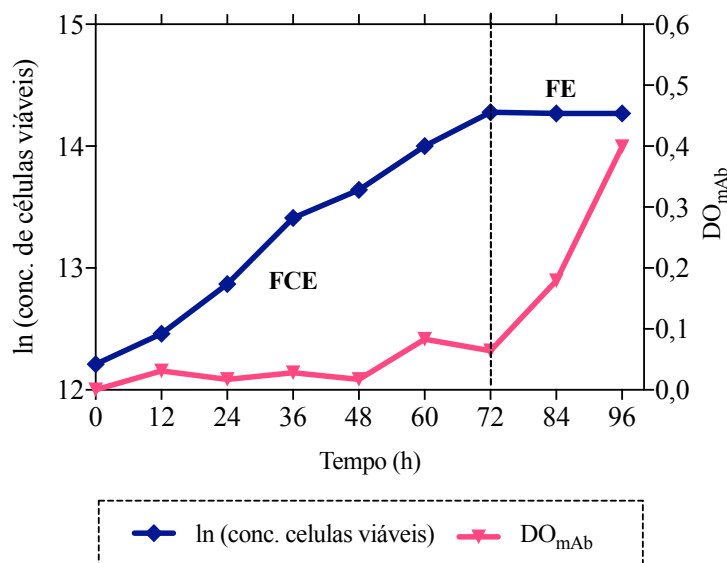
Figura 28: Gráfico \ln (concentração de células viáveis) vs. tempo para o crescimento das células no meio de cultivo RPMIS. As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial e FE, Fase Estacionária. A linha (—) corresponde a regressão linear para o cálculo de $\mu_{\text{máx}}$, em evidência. O traço (---) determina o início da FE.



No intervalo entre 72 e 96 horas, verifica-se que a $\mu_{\text{máx}}$ ficou próxima de zero, confirmando que as células estavam no estado estacionária (FE) a partir das 72 horas.

E por último, foi feito o ELISA para a detecção dos mAbs anti-CD25, os valores foram obtidos em densidade ótica (DO_{mAb}). E para conferir em qual fase houve maior produção de anticorpos, foi construído um gráfico \ln (concentração de células viáveis) e DO_{mAb} vs. tempo (h), o qual é mostrado na Figura 29.

Figura 29: Gráfico \ln (concentração de células viáveis) e Densidade Ótica vs. tempo para o cultivo com o meio de cultivo RPMIS. As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial e FE, Fase Estacionária. O traço (---) determina o início da FE.



Pela Figura 29, a maior produção de mAb anti-CD25 aconteceu durante a fase estacionária, sendo o maior valor de DO_{mAb} obtido igual a 0,399, as 96 horas.

Prampero (2017) em seu trabalho, cuja condições de cultivo e linhagem celular foram as mesmas que este, obteve a maior concentração celular para o meio RPMI-1640 (10% SFB) as 96 horas, que foi de, aproximadamente, $5,7 \times 10^6$ cel mL^{-1} . Prampero (2017) não observou o esgotamento de nenhum aminoácido durante o cultivo o que deve ter contribuído para o prolongamento do crescimento das células, e a um maior número de células viáveis nas últimas horas.

Em um outro trabalho, Duval e colaboradores (1990), cultivaram hibridomas V0208 em RPMI (10% SFB) e em batelada em biorreator do tipo *spinner* durante 6 dias. O inóculo foi igual ao utilizado neste trabalho e por Prampero (2017), todavia com agitação menor, 40 rpm, e o volume trabalho igual a 250 mL. A maior concentração celular foi obtida após 70 horas de cultivo, e foi igual a $1,8 \times 10^6$ cel mL^{-1} , em seguida, as células entraram na fase estacionária, e rapidamente passaram para a fase de declínio. Duval e colaboradores, assim como neste trabalho, observou que as células entraram na fase estacionária, no momento em que a glutamina foi exaurida do meio. Além disso, a maior concentração de anticorpo monoclonal foi observada, também, nas últimas horas do cultivo.

E Zannata (2009) realizou o cultivo dos hibridomas anti-dengue 2 em biorreatores *spinners*, com o meio DMEM suplementado com 10% SFB durante 9 dias sob agitação de 50 rpm. O inóculo foi de 2×10^5 cel mL^{-1} e o volume de trabalho igual a 300 mL. A maior concentração celular foi 2×10^6 cel mL^{-1} , 72 horas após o inóculo, após este período, a concentração diminui, indicando as fases estacionária e de declínio, mesmo momento em que não havia mais glutamina no meio. A maior produção de anticorpo aconteceu ainda durante a fase de crescimento, a utilização do meio DMEM (10% SFB) pode ter contribuído para isto.

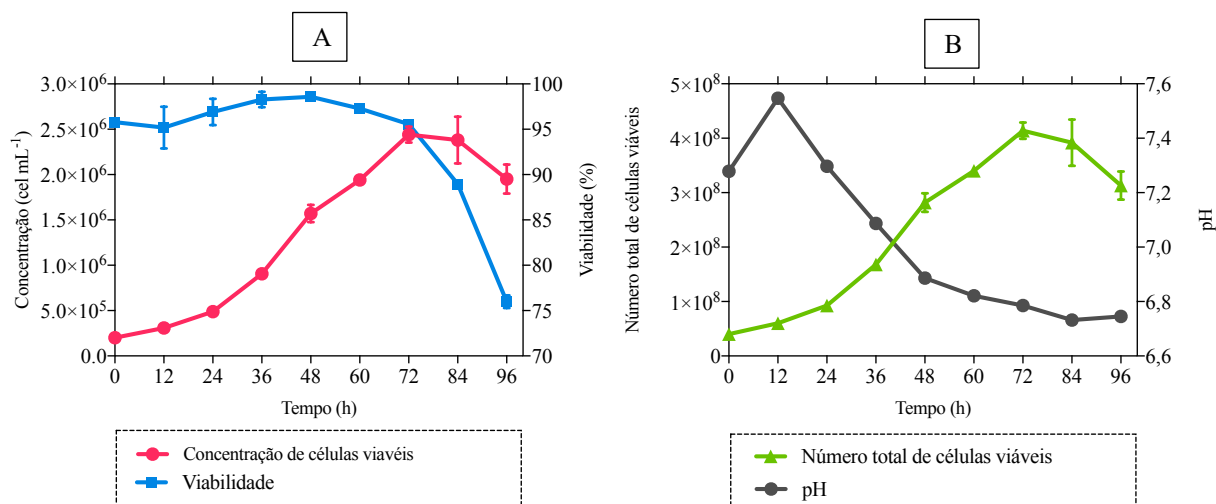
Com exceção do trabalho de Prampero (2017), o cultivo realizado, neste trabalho foi semelhante aos outros dois, mostrando que as condições e os procedimentos adotados foram satisfatórios.

5.1.2. Cultivo em Meio SFM (ESB)

No Apêndice B - Parte 1 estão disponíveis todos os dados obtidos durante este cultivo.

Assim como anteriormente, para o cultivo com o meio SFM, foram construídos dois gráficos a partir da contagem das células a cada 12 horas, os quais são apresentados na Figura 30. O gráfico A mostra a concentração de células viáveis (células mL^{-1}) e a viabilidade (%) por unidade de tempo (h), enquanto que o gráfico B, mostra o número total de células viáveis e o pH vs. tempo

Figura 30: Gráficos para o cultivo celular em meio SFM: A) Concentração de células viáveis e viabilidade vs. tempo. B) Número total de células viáveis e pH vs. tempo.



No gráfico A da Figura 30, observou-se que a partir das 72 horas as células provavelmente estavam na fase estacionária, e a partir das 84 horas, na fase de declínio.

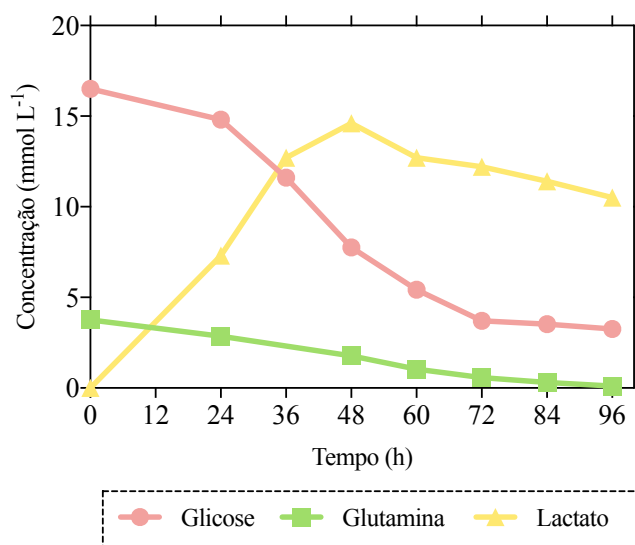
O maior valor obtido para a concentração de células viáveis foi de, aproximadamente, $2,44 \pm 0,08 \times 10^6$ cel mL⁻¹, 72 horas após o inóculo. A partir deste momento, os valores para a concentração diminuíram, por conta do aumento na morte das células, possivelmente, por apoptose. O que também é identificado pelos valores obtidos para a viabilidade celular, na última hora (96 horas) o valor ficou próximo de 75%.

A maior quantidade de células viáveis foi obtida após as 72 horas, e foi de, aproximadamente, $4,14 \pm 0,15 \times 10^8$ células. Nas horas seguintes, como já observado, houve um aumento na morte das células e consequentemente uma diminuição no número total de células viáveis, na última hora de cultivo (96 horas), o valor era cerca de $3,13 \pm 0,26 \times 10^8$.

Em relação ao pH do sobrenadante, o valor sofreu redução com o aumento de células, e para evitar que o meio de cultivo ficasse ácido, a concentração de CO₂ foi restringida do ambiente de forma gradual, ficando próximo de 3% no final do cultivo. O valor mais baixo para o pH medido foi de 6,732 as 84 horas.

A morte celular pode ter sido consequência do acúmulo de metabólitos e depleção de nutrientes no meio, assim como no cultivo com RPMIS, foram feitas análises para construir o perfil de consumo dos principais nutrientes, e da produção de lactato. Na Figura 31, é apresentado um gráfico mostrando o consumo de glicose e glutamina e a produção de lactato.

Figura 31: Gráfico de consumo de glicose e glutamina e produção de lactato por unidade de tempo pelas células PC-61 no meio SFM.



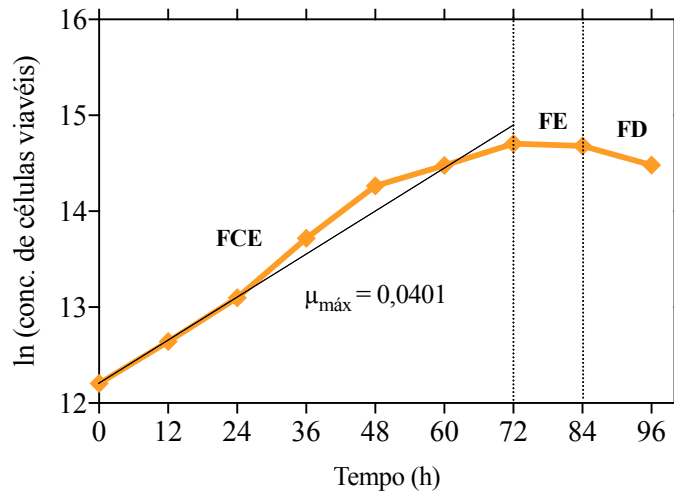
A quantidade de cada componente no meio SFM é desconhecida por sua composição ser protegida por patentes, entretanto pelas análises feitas, verificou-se que, a concentração de glicose, glutamina e lactato é de, respectivamente, 16,5; 3,754 e 0 mmol L⁻¹, concentrações maiores, quando comparadas com as do meio de cultivo RPMIS. As 96 horas, as concentrações de glicose, glutamina e lactato eram 3,26; 10,5 e 0,301 mmol L⁻¹, respectivamente. A glutamina foi quase que totalmente consumida, e este é aminoácido é de grande importância para o cultivo, e sua ausência pode ter contribuído para a interrupção do crescimento das células.

Não foi identificado a exaustão ou o consumo de outros aminoácidos.

A taxa máxima de crescimento celular específica ($\mu_{\text{máx}}$) foi obtida através da regressão linear da fase de crescimento exponencial (FCE) no gráfico de logaritmo neperiano da concentração de células viáveis por tempo (h), mostrado na Figura 32. O valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi igual a $0,0401 \pm 0,0024 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,9885$) e o tempo de duplicação foi de 18,87 h.

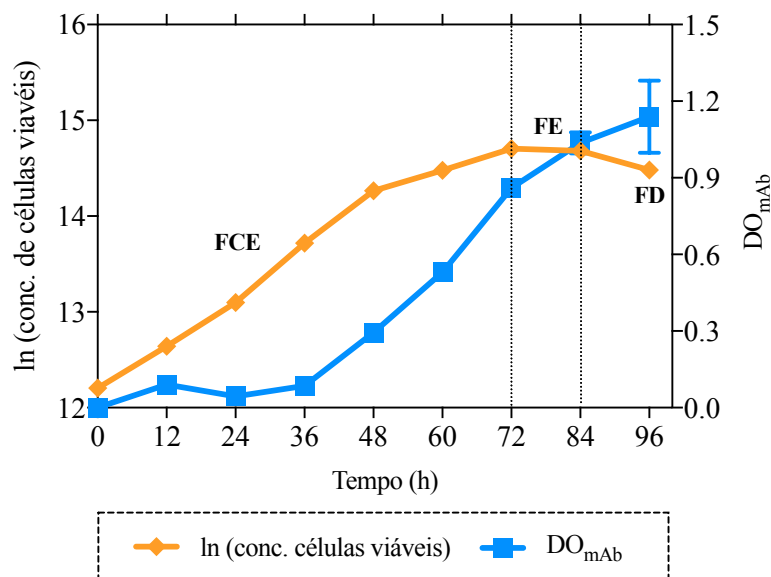
Por meio da Figura 32 também foi possível confirmar, pelos valores de μ , que as células estavam na fase estacionária ($\mu \approx 0$) a partir das 72 horas, e na fase de declínio ($\mu < 0$) a partir das 84 horas.

Figura 32: Gráfico ln (concentração de células viáveis) vs. tempo para o crescimento das células no meio de cultivo SFM. As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial, FE, Fase Estacionária e FD, Fase de Declínio. A linha (—) corresponde a regressão linear para o cálculo de $\mu_{\text{máx}}$, em evidência. O primeiro traço (---) determina o início da FE as 72 horas, e o segundo traço (---), o possível da FD as 84 horas.



E por ultimo, foi feito o ELISA para a detecção dos mAbs anti-CD25, os valores foram obtidos em densidade ótica (DO_{mAb}). E para conferir em qual fase houve maior produção de anticorpos, foi construído um gráfico ln (concentração de células viáveis) e DO_{mAb} vs. tempo (h), o qual é mostrado na Figura 33.

Figura 33: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e DO_{mAb} vs. tempo para o cultivo com o meio de cultivo SFM. As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial, FE, Fase Estacionária e FD, Fase de Declínio. O primeiro traço (---) determina o início da FE as 72 horas, e o segundo traço (---), o início da FD as 84 horas.



Pela Figura 33, a maior detecção de mAb anti-CD25 foi observada nas fases estacionária e de declínio, sendo que o maior valor de DO_{mAb} obtido foi $1,139 \pm 0,142$, as 96 horas.

Prampero (2017) e Zanata (2009) em seus trabalhos também utilizaram meios de cultivo sem SFB, enquanto que a primeira utilizou o SFM, a segunda, utilizou o Ex-cell. As condições de cultivo utilizadas nesta etapa foram semelhantes as de Prampero (2017): inóculo de 2×10^5 cel mL^{-1} e agitação de 70 rpm (células não foram adaptadas a agitação). Já no cultivo realizado por Zanata (2009), o inóculo foi de 2×10^5 cel mL^{-1} e agitação de 50 rpm (células antes de serem inoculadas no biorreator, foram adaptadas a agitação por meio da utilização de garrafas *roller* com agitação de 40 rpm). A maior concentração celular para Prampero (2017) foi de $9,12 \times 10^6$ cel mL^{-1} , Zanata (2009) obteve 2×10^6 cel mL^{-1} e neste trabalho foi obtido $2,44 \times 10^6$ cel mL^{-1} . A diferença com Prampero (2017) deve-se, novamente, a não observação de depleção de nutrientes essenciais, o que possibilita um maior crescimento.

5.1.3. Comparação Entre os Cultivos em Batelada em Meio RPMIS e SFM

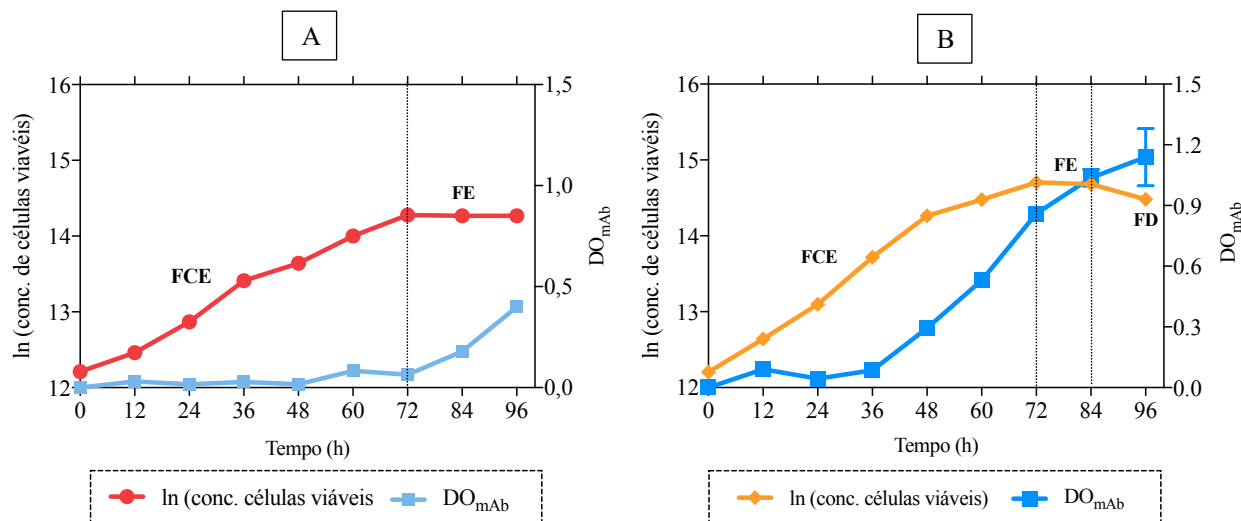
Comparando-se os dois cultivos, fica evidente, que a maior concentração celular, foi obtida no meio SFM, assim como os maiores valores de taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{m\acute{a}x}$) e densidade ótica para a detecção dos mAbs anti-CD25. Isso mostra que a ausência do SFB no cultivo não traz desvantagens, ainda que seja uma fonte de fatores e proteínas de crescimento. Meios sem SFB são dotados de componentes que podem garantir um ótimo e até melhor crescimento celular em detrimento aos meios suplementados com soro, como já foi observado por Merten e colaboradores (1994).

As células utilizadas no cultivo com o meio SFM, não foram congeladas com o SFB, como é mostrado na literatura (BUTLER, 2005, MORAES *et al.*, 2008), e sim com o próprio meio de cultivo, o meio SFM, o que gerou um excelente resultado. Após o descongelamento a média entre os valores de viabilidade obtidos foi de, aproximadamente, 95%.

Não foram encontrados dados na literatura a respeito do congelamento com o próprio meio de cultivo, o que se torna uma boa alternativa quando se deseja a total eliminação do SFB.

Na Figura 34 são rerepresentados os gráficos de \ln das concentrações celular e DO_{mAb} vs. tempo (h) para os meios de cultivo RPMIS e SFM.

Figura 34: Gráfico \ln (concentração de células viáveis) e DO_{mAb} vs. tempo para os cultivos com os meios: RPMIS (A) e SFM (B). As abreviações FCE corresponde a Fase de Crescimento Exponencial, FE, Fase Estacionária e FD, Fase de Declínio. O primeiro traço (---), da esquerda para a direita em (A) e (B) determina o início da FE, e o segundo traço (---), da esquerda para a direita, em (B), o início da FD.



O valor de DO_{mAb} para o meio SFM foi quase 3 vezes maior que a do RPMIS.

Acosta e colaboradores (2007) constataram que em baixos níveis de nutrientes as taxas de captação, principalmente, de glicose pelos hibridomas são marcadamente reduzidas, levando a uma utilização mais efetiva desses nutrientes para o metabolismo energético e a biossíntese.

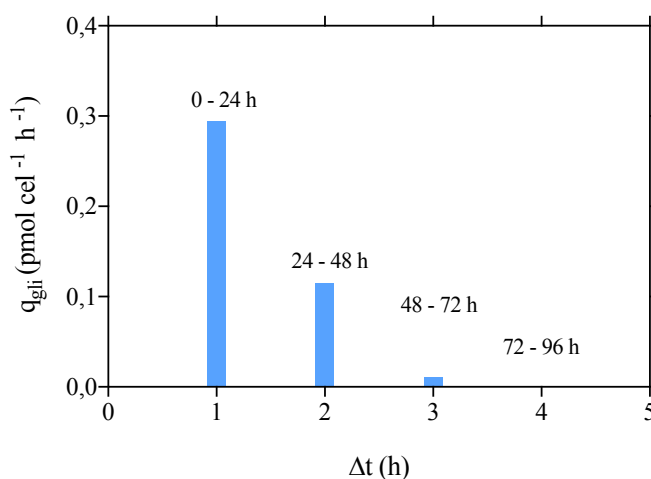
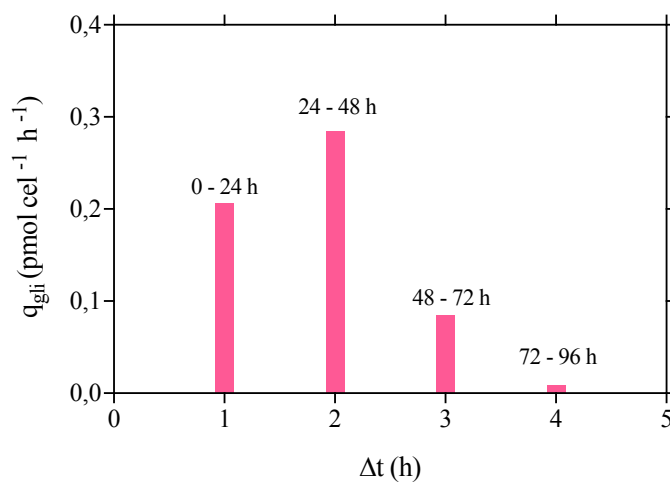
Considerando-se isso, uma sugestão para o motivo da detecção de mAbs anti-CD25 acontecer após pelo menos 2 dias do inóculo em ambos os cultivos, é que o rápido crescimento celular provoca uma diminuição na concentração dos nutrientes presentes no meio, e com o intuito de manter suas atividades, as células limitam a captação de nutrientes alterando o seu metabolismo focando na necessidade energética e produção do mAb anti-CD25.

Este comportamento é observado neste experimento, no qual a partir das 48 horas, tanto no cultivo com o meio RPMIS quanto no cultivo com o meio SFM, verifica-se que os valores da taxa específica de consumo de glicose (Tabela 7) sofrem redução, mesmo momento em que se tem o início da detecção de mAbs anti-CD25 nos cultivos. As taxas específicas de consumo de glicose (q_{gli}), obtidas a cada 24 h, para os cultivos com os meios RPMIS e SFM foram calculadas por meio da Equação 10.

Para melhor ilustrar a situação citada, para cada meio de cultivo, foi construído um gráfico do tipo barra com os valores da taxa específica de consumo de glicose ($q_{gli} = \text{pmol cel}^{-1} \text{h}^{-1}$) para cada intervalo de tempo (h). O gráfico para o cultivo em meio RPMIS é apresentado na Figura 35, enquanto que o gráfico para o meio SFM, na Figura 36.

Tabela 7: Valores de taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para o cultivo com os meios RPMIS e SFM a cada 24 h.

Δt (h)	q_{gli} (pmol cel ⁻¹ h ⁻¹) RPMIS	q_{gli} (pmol cel ⁻¹ h ⁻¹) SFM
0-24	0,295	0,206
24-48	0,115	0,285
48-72	0,012	0,085
72-96	-0,002	0,008

Figura 35: Gráfico do tipo barra da taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) por intervalo de tempo, onde 1 representa o intervalo entre 0 e 24 h, 2, 24 e 48 h, 3, 48 e 72 h e 4, 72 e 96 h. Dados para o cultivo com o meio RPMIS.**Figura 36:** Gráfico do tipo barra da taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) por intervalo de tempo, onde 1 representa o intervalo entre 0 e 24 h, 2, 24 e 48 h, 3, 48 e 72 h e 4, 72 e 96 h. Dados para o cultivo com o meio SFM.

Quanto a maior produção de mAbs ser no meio SFM, uma possível explicação para isso pode estar relacionada com a concentração de lactato. Ozturk e colaboradores (1992) verificaram uma maior produção específica de anticorpo quando a concentração do metabólito era maior no meio. Porém, isto foi verificado em um procedimento considerando-se todas as células, viáveis e não viáveis, portanto tem-se a possibilidade de isso não ser uma realidade quando considerado apenas as células viáveis. Mas mesmo com esta possibilidade, neste trabalho, as células no meio SFM apresentaram um maior consumo de glicose e produção de lactato, a concentração deste componente chegou próximo de 15 mmol L^{-1} , enquanto que para o meio RPMIS, ficou próximo de 5 mmol L^{-1} , podendo assim ser uma forma para explicar a diferença na detecção de anticorpo nos diferentes meios de cultivo.

Deve-se ainda considerar que no meio SFM devem haver componentes que auxiliam na biossíntese do anticorpo. Todavia, como já citado, a composição deste meio de cultivo é protegida por patentes, o que dificulta a validação.

5.2. Cultivo de Hibridomas em Modo de Operação do Tipo Batelada Alimentada

Como foi observado pelo cultivo em batelada, a maior produção de mAbs aconteceu nas últimas horas, no término da fase de crescimento e durante a fase estacionária, para ambos os meios de cultivo, portanto, com o intuito de prolongar este período, utilizou-se o modo de operação batelada alimentada. Este modo de operação permite manter a concentração de nutrientes necessária no meio para que as células direcionem o seu metabolismo e sintetizem os anticorpos.

Logo, assim como a etapa anterior, esta etapa teve como objetivo averiguar e caracterizar o crescimento dos hibridomas em biorreatores do tipo *spinner*, mas dessa vez, operados em batelada alimentada, assim como a produção de mAbs. As condições de cultivo foram as mesmas utilizadas para a batelada, a única diferença é o volume de trabalho, neste caso, foram utilizados 50 mL.

5.2.1. Cultivo em Meio RPMIS (ERBA)

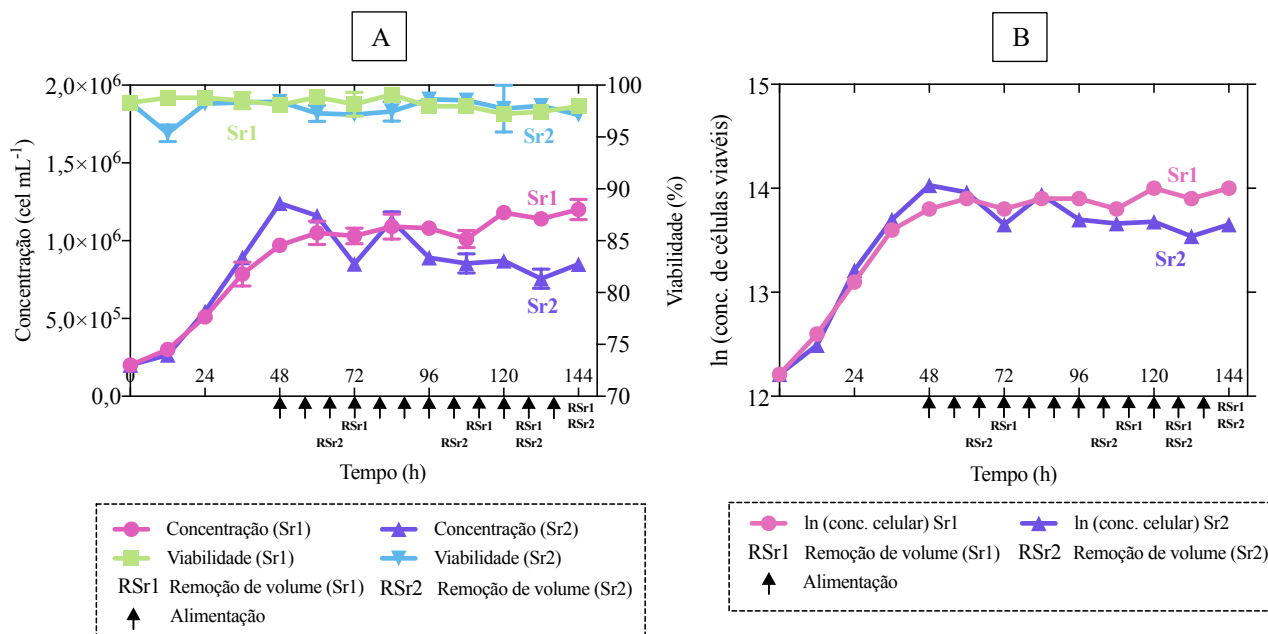
No Apêndice A - Parte 2 estão disponíveis todos os dados obtidos durante este cultivo.

Foram preparados dois biorreatores, os quais foram chamados de Sr1 e Sr2, de 100 mL de capacidade e com 50 mL de volume de trabalho, cada um. Os dois cultivos foram feitos ao mesmo tempo, mantidos nas mesmas condições e durou 144 horas (6 dias).

Com o objetivo de verificar o crescimento celular, foram construídos dois gráficos, a partir da contagem celular, feitas a cada 12 horas (Figura 37). O primeiro gráfico representa a

concentração celular (células mL⁻¹) e a viabilidade (%) vs. tempo (h) e o segundo, o logaritmo neperiano da concentração de células vs. tempo (h).

Figura 37: Gráfico concentração de células viáveis e viabilidade vs. tempo (A) e ln (concentração de células viáveis) vs. tempo (B) para os biorreatores Sr1 e Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.



A viabilidade durante todo o cultivo foi acima de 95% para ambos os cultivos.

Com o objetivo de fazer com que as células crescessem durante a fase pré-estacionária e não na fase estacionária, a qual deveria ocorrer entre 60 e 70 horas (como observado no cultivo em batelada) iniciou-se a alimentação a partir das 48 horas, sendo feita a cada 8 horas (indicado pela seta ↑, em ambos os gráficos) seguindo a Equação 3. A fase pré-estacionária foi escolhida pelo motivo que na fase estacionária as células já poderiam estar sofrendo apoptose, e o prolongamento poderia não trazer resultados positivos. Pelos gráficos, verifica-se que o objetivo desta etapa foi atingido, com resultados positivos.

Durante a alimentação, para evitar que o volume no biorreator atingisse sua capacidade máxima, alíquotas de 50 mL eram retiradas, o que é representado por RSr1 e RSr2 na Figura 37. Observa-se que antes de realizar a remoção do excesso de volume a concentração de células viáveis estavam diminuindo, mas após efetuar a remoção, a concentração volta a crescer, indicando que tal procedimento faz com que o volume que resta no biorreator atue com um novo inoculo (BUTLER, 2005).

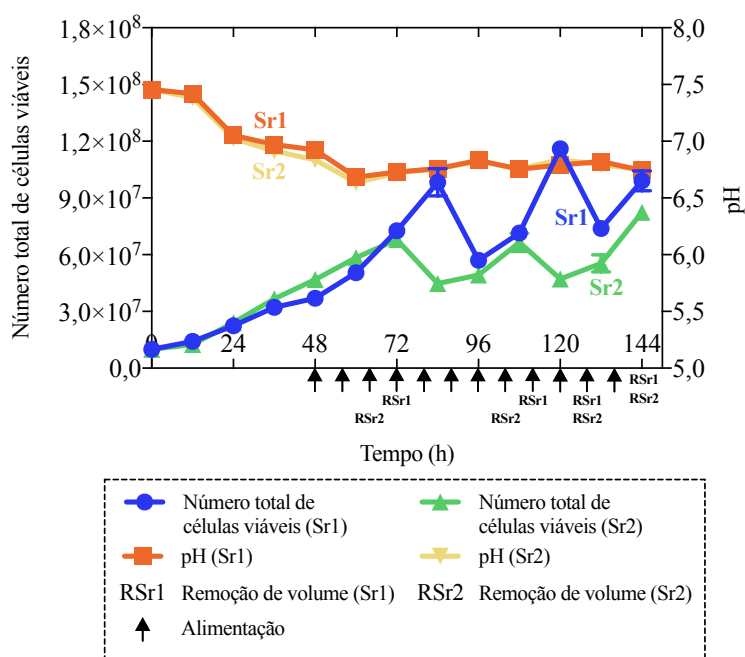
A taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$), durante a fase de crescimento, para o Sr1 foi de $0,03483 \pm 0,00253$ ($R^2 = 0,9844$) com tempo de duplicação igual a 19,9 h, e para o Sr2, foi de $0,04042 \pm 0,00323$ ($R^2 = 0,9812$) com tempo de duplicação igual a 17,1 h.

Como observa-se a taxa de crescimento para o Sr2 foi maior, o que pode explicar a diferença na concentração celular e número total de células viáveis em comparação ao Sr1 durante a fase de crescimento: a concentração celular para o Sr1, após o início da alimentação, ficou entre, $1,05 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^6$ cel mL⁻¹, enquanto que o maior número de células viáveis foi obtido em dois momentos, 84 após o início de cultivo, sendo próximo de $9,83 \pm 0,72 \times 10^7$ células e as 144 horas, momento em que o número total era de, aproximadamente, $9,90 \pm 0,05 \times 10^7$. Já para o Sr2, a concentração celular após o início da alimentação ficou entre $8,5 \times 10^5$ e $1,1 \times 10^6$ cel mL⁻¹, e a maior quantidade de células viáveis foi observada as 144 horas do início do cultivo, que foi cerca de $8,24 \pm 0,18 \times 10^7$ células.

O rápido crescimento em Sr2 pode ter levado a uma diminuição na concentração dos nutrientes, e conseqüentemente a um maior número de morte celular em comparação ao Sr1, assim, após o início da alimentação, a concentração celular em Sr2 ficou abaixo de Sr1.

A Figura 38 mostra o número total de células viáveis e pH vs. tempo (h) para os dois biorreatores.

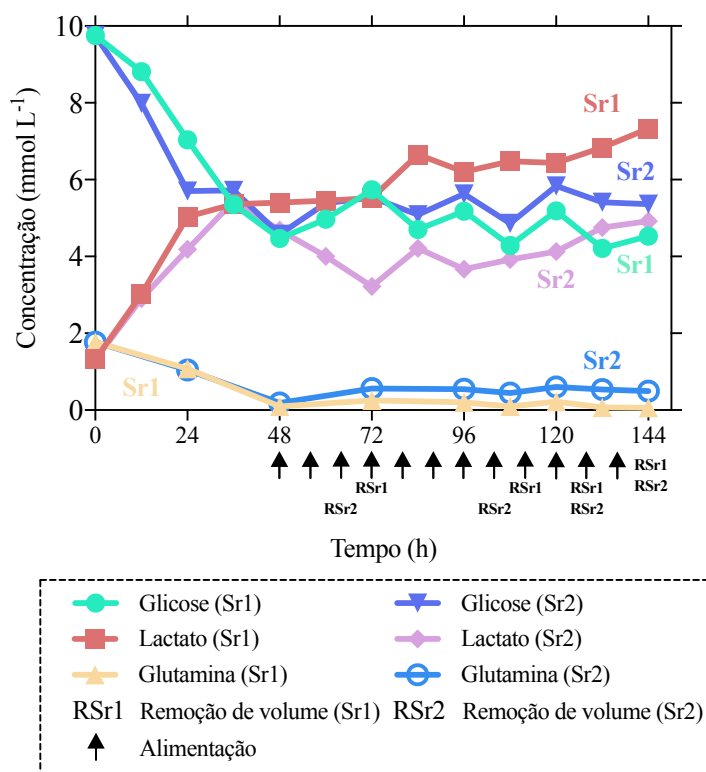
Figura 38: Gráfico número total de células viáveis e pH do sobrenadante vs. tempo para os biorreatores Sr1 e Sr2 como o meio de cultivo RPMIS.



Quanto ao pH do sobrenadante, até as 48 horas, sofreu uma redução, de 7,4 para 6,6 tanto em Sr1, quanto em Sr2, e após a alimentação, ficou entre 6,7 e 6,8. Sendo necessário diminuir a porcentagem de CO₂ em ambos os cultivos para evitar a acidez do meio de cultivo e conseqüentemente a interrupção do crescimento.

Em relação ao consumo de nutrientes, foi feito um gráfico para o consumo de glicose e glutamina, e produção de lactato, o qual é mostrado na Figura 39.

Figura 39: Gráfico de consumo de glicose e glutamina e produção de lactato por unidade de tempo pelas células nos biorreatores Sr1 e Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.



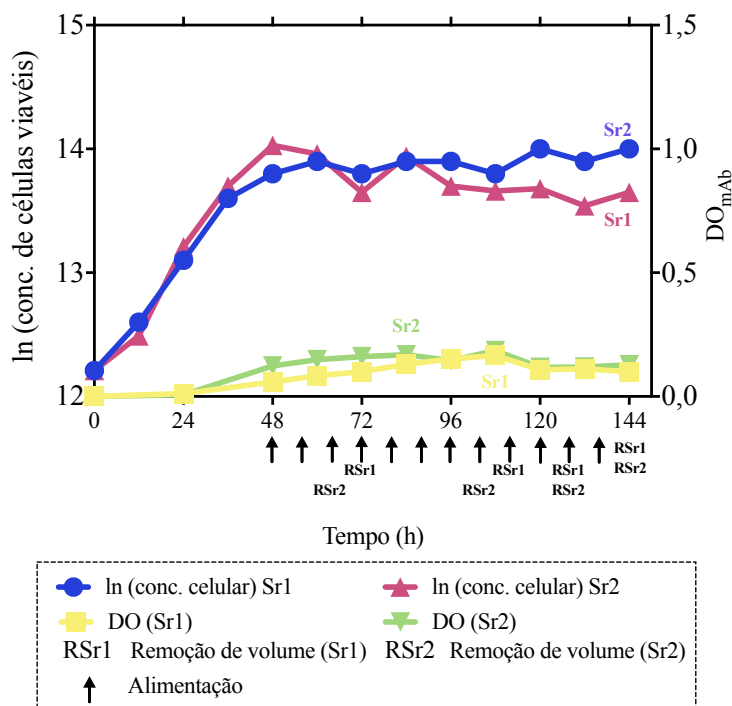
O consumo de glicose, para o Sr2 foi maior do que no Sr1 nas primeiras 48 horas do cultivo, mas após a alimentação, o consumo, com pequena diferença, foi maior no Sr1, o que já era esperado, visto que a concentração celular para este biorreator, neste momento, era maior. A concentração de lactato foi maior no Sr1, sendo o valor máximo igual a 7,33 mmol L⁻¹ as 144 horas, e 4,92 mmol L⁻¹ para o Sr2, também, as 144 horas. Em ambos os biorreatores, os valores de concentração de lactato não ficaram próximos dos valores considerados inibitórios (OZTURK *et al.*, 1992).

A concentração de glutamina próxima das 48 horas já estava próxima de zero em Sr1 e Sr2, sendo o consumo igual em ambos os biorreatores, mas após a alimentação, o consumo foi ligeiramente maior para o Sr1, no qual a concentração ficou entre 0,26 e 0,06 mmol L⁻¹ e no Sr2, variou entre 0,50 e 0,55 mmol L⁻¹. Jeong e Wang (1995) constataram que concentrações entre 1 e 2 mM de glutamina são limitantes para o crescimento de hibridomas, todavia nos cultivos realizados, mesmo a concentração deste aminoácido ser consideravelmente menor, a viabilidade foi elevada, indicando a utilização deste aminoácido, pelas células, de forma eficiente, não o deixando exaurir.

Não foi identificado a exaustão ou o consumo de outro aminoácido.

E por último, foi feito o ELISA para detectar os anticorpos produzidos pelas células durante o cultivo. Afim de acompanhar o crescimento celular com a produção dos mAbs, foi feito um gráfico ln da concentração de células viáveis e densidade ótica (DO_{mAb}) vs. tempo (h), o qual é mostrado na Figura 40.

Figura 40: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e DO_{mAb} vs. tempo para os biorreatores Sr1 e Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.



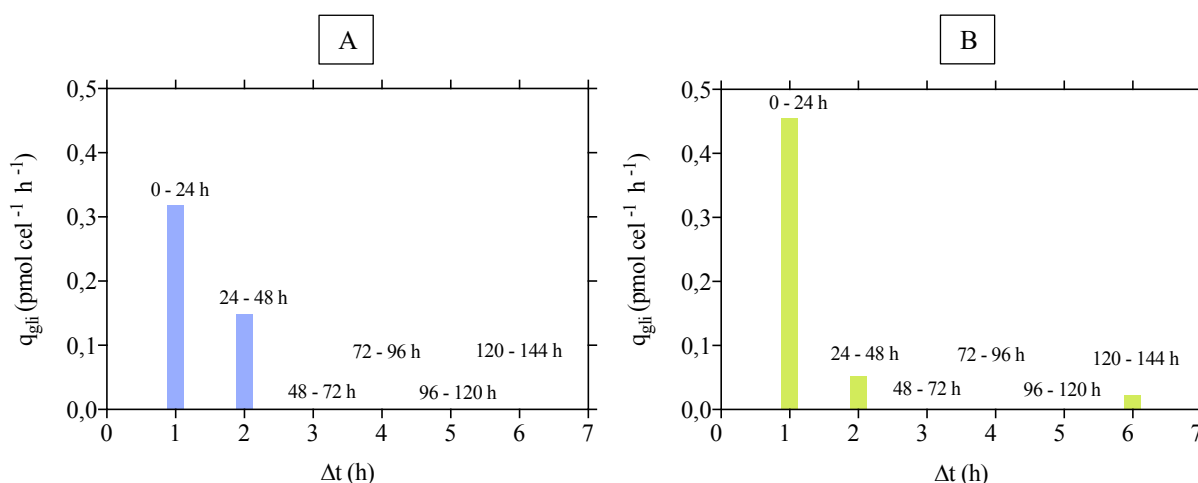
Os mAbs foram detectadas a partir das 48 horas em Sr1 e Sr2. Para o Sr1, maior valor foi de $0,166 \pm 0,001$ as 108 horas, e para o Sr2, o maior valor foi de $0,186 \pm 0,005$, também as 108 horas.

Como já observado, uma sugestão para a produção de mAbs pelas células é que uma diminuição na concentração de nutrientes do ambiente provocada pelo crescimento celular, faz com que a taxa de captação dos nutrientes (q_{gli}) pelas células, sofra considerável redução, o que altera o metabolismo destas, para a biossíntese do anticorpo. E assim como nos biorreatores operados em batelada, isto também foi observado em Sr1 e Sr2, a partir dos valores de q_{gli} mostrados na Tabela 8 e apresentados na forma de gráficos do tipo barra (Figura 41). Verifica-se que a partir das 48 horas quando os valores de q_{gli} ficam próximos de zero, tem-se o início da detecção dos anticorpos.

Tabela 8: Valores de taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para o cultivo com os meios RPMIS e SFM a cada 24 h.

Δt (h)	q_{gli} (pmol cel h ⁻¹) Sr1	q_{gli} (pmol cel h ⁻¹) Sr2
0-24	0,318	0,456
24-48	0,148	0,052
48-72	-0,052	-0,008
72-96	-0,053	0,0
96-120	0,0	-0,010
120-144	-0,001	0,023

Figura 41: Gráfico do tipo barra da taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para Sr1 (A) e Sr2 (B), por intervalo de tempo, onde 1 representa o intervalo entre 0 e 24 h, 2, 24 e 48 h, 3, 48 e 72 h, 4, 72 e 96 h, 5, 96 e 120 h e 6, 120 e 144 h. Dados para o cultivo com o meio RPMIS.



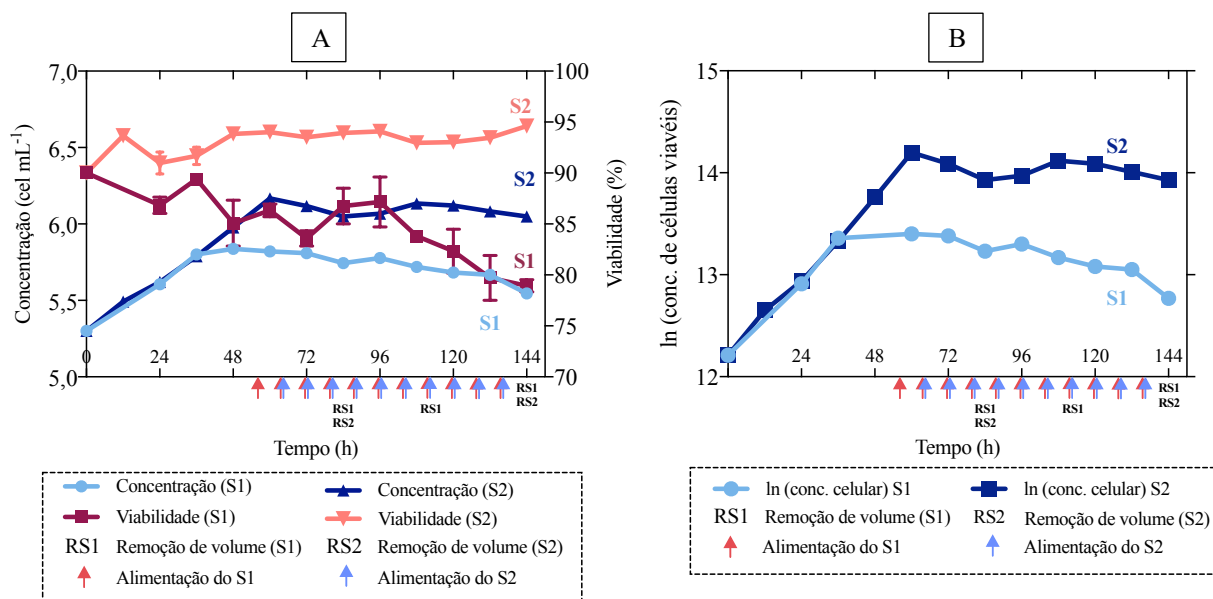
5.2.2. Cultivo em Meio SFM (ESBA)

No Apêndice B - Parte 2 estão disponíveis todos os dados obtidos durante este cultivo.

Assim, como anteriormente, foram preparados dois biorreatores, os quais foram chamados de S1 e S2, de 100 mL de capacidade e com 50 mL de volume de trabalho, cada um. Os dois cultivos foram feitos separados, mas cultivados nas mesmas condições. O cultivo durou 144 h (6 dias).

Com o objetivo de verificar o crescimento celular, foram construídos dois gráficos, a partir da contagem celular, feitas a cada 12 horas. O primeiro gráfico representa a concentração celular (células mL⁻¹) e a viabilidade (%) vs. tempo (h) e o segundo, o logaritmo neperiano da concentração de células viáveis vs. tempo (h) (Figura 42).

Figura 42: Gráfico concentração de células viáveis e viabilidade vs. tempo (A) e ln (concentração de células viáveis) vs. tempo (B) para os biorreatores S1 e S2 com o meio de cultivo SFM.



Até as 36 horas de cultivo, o crescimento em ambos os biorreatores foi similar, mas depois de um período, verificou-se que as células em S1 pararam de crescer, sendo necessário iniciar a alimentação após 56 horas (indicado na Figura 42, pela seta ↑), 12 horas antes do planejado, já para o S2, a alimentação foi feita como planejada e iniciou-se a partir das 64 horas (indicado na Figura 42, pela seta ↑). Vale ressaltar que o início da alimentação foi diferente para Sr1 e Sr2, pois não foi estabelecido um padrão, apenas estipulado que deveria iniciar antes das 70 horas.

A viabilidade para S1 ficou entre 90 e 80% e para o S2, entre 90 e 95%. O que mostra que as células em S1, nas últimas 24 horas, mesmo com a alimentação de meio de cultivo fresco, as células estavam morrendo. Possivelmente, pelo fato de as células já estarem no estado estacionário em S1 quando alimentação iniciou-se, o prolongamento da fase não foi efetivo.

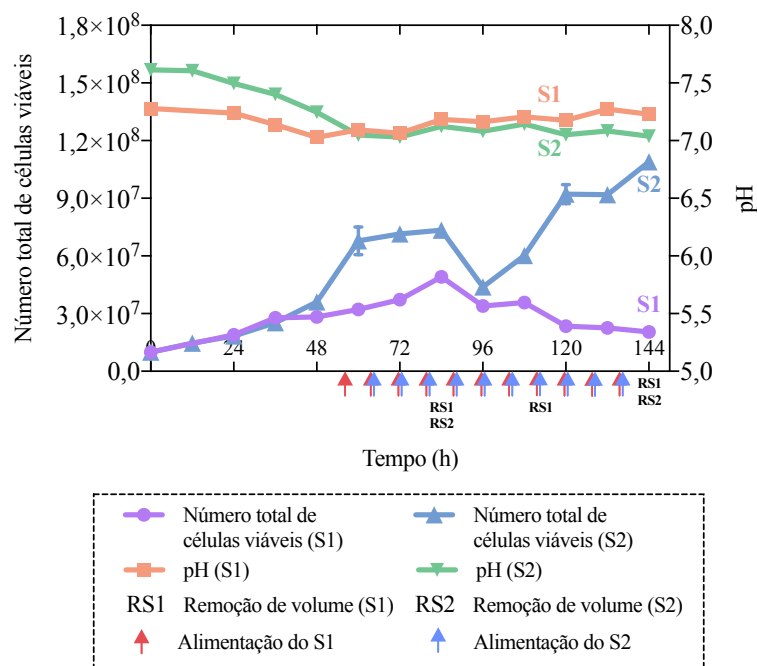
Pelo gráfico B da Figura 42, foram calculadas as taxas de crescimento para cada biorreator durante a fase de crescimento, e os valores ficaram próximos, sendo $0,03155 \pm 0,00206$ ($R^2 = 0,9957$), com tempo de duplicação igual a 22 h, para o S1 e $0,0327 \pm 0,00112$ ($R^2 = 0,9962$), com tempo de duplicação igual a 21,2 h, para o S2. Com esses valores foi possível iniciar a alimentação, utilizando a Equação 3.

Assim como nos biorreatores preparados com o meio RPMIS, nestes cultivos, quando o volume do sobrenadante superava a capacidade dos biorreatores, o excesso era retirado. Os momentos de remoção para S1 e S2 estão representados por RS1 e RS2, respectivamente, na Figura 42. E novamente, observa-se que após a remoção, a concentração celular aumenta, como se iniciasse um novo cultivo.

A concentração para o S1, após a alimentação ficou entre $5,2 \times 10^5$ e $6,6 \times 10^5$, e após as células entrarem na fase de declínio, as 120 horas, a concentração ficou entre $4,8 \times 10^5$ e $3,5 \times 10^5$ cel mL⁻¹. Esta redução na concentração indica a paralização do crescimento associada a morte celular, mesmo com a adição de meio de cultivo fresco. Para o S2, a concentração celular, após o início da alimentação, ficou entre $1,1 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^6$ cel mL⁻¹. A diferença nos valores das concentrações indicam um crescimento pouco satisfatório em S1, quando comparado com S2.

A maior quantidade de células viáveis para S1 foi de, aproximadamente, $4,91 \pm 0,02 \times 10^7$ as 84 horas, e para o S2, foi de, aproximadamente, $1,09 \pm 0,01 \times 10^8$, as 144 horas. O número total de células viáveis a cada intervalo de tempo do cultivo é mostrado na Figura 43, assim como o pH.

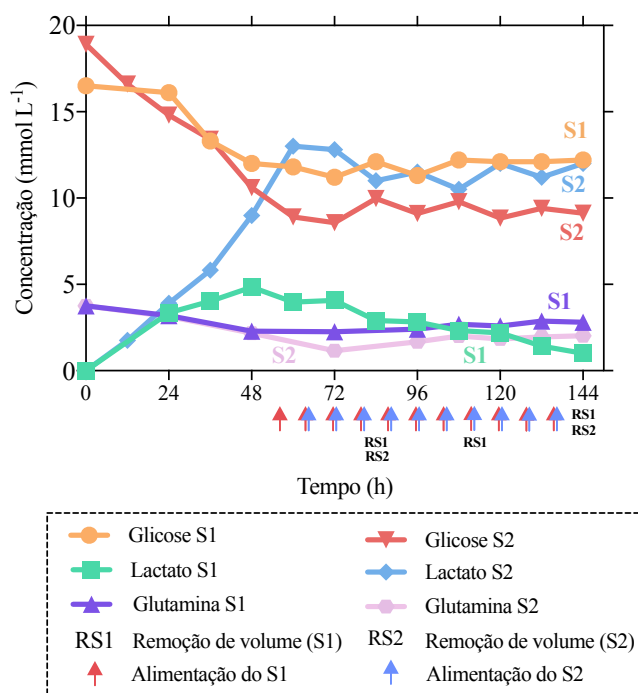
Figura 43: Gráfico número total de células viáveis e pH do sobrenadante vs. tempo para os biorreatores S1 e S2 com o meio de cultivo SFM.



Em relação ao pH, em ambos os biorreatores, antes do início da alimentação houve uma redução, mas após a alimentação os valores ficaram entre 7,0 e 7,3, valores considerados como ótimos para o crescimento das células. Sendo este parâmetro, portanto, não inibitório no crescimento para S1.

A análise do metabolismo é essencial para tentar entender o comportamento das células durante um cultivo, assim foi feito um gráfico de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato vs. tempo (h), o qual é mostrado na Figura 44.

Figura 44: Gráfico de consumo de glicose e glutamina e produção de lactato por unidade de tempo para os biorreatores S1 e S2 com o meio de cultivo SFM.



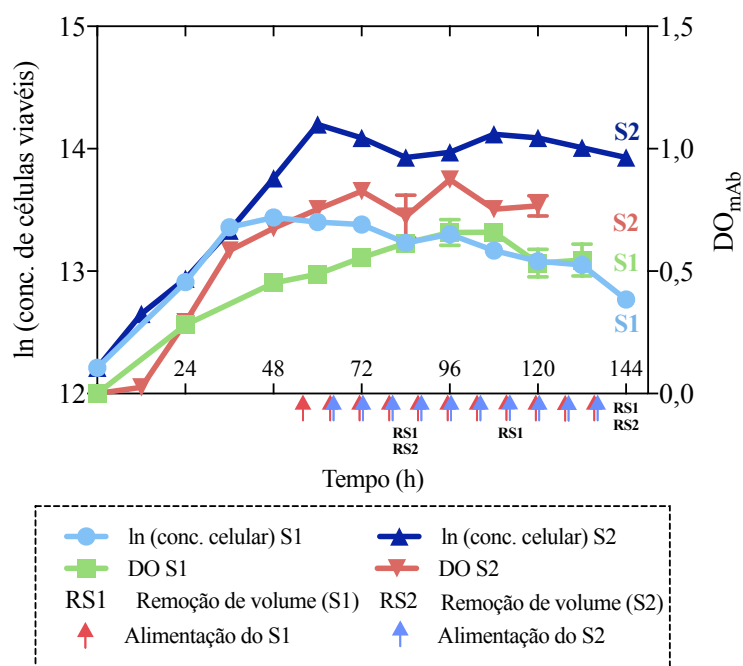
Como é mostrado no gráfico da Figura 44, o consumo de glicose é maior em S2 do que em S1 em todo o cultivo, durante a alimentação a concentração do açúcar ficou entre 11,1 e 11,2 mmol L⁻¹ para o S1 e entre 8,9 e 9,5 mmol L⁻¹ para o S2. A maior concentração de lactato em S1 foi as 48 horas, sendo igual a 4,89 mmol L⁻¹, já para o S2, o maior valor para a concentração de lactato foi de 13 mmol L⁻¹ as 60 horas.

Quanto a glutamina, este aminoácido teve um maior consumo em S2, a concentração variou entre 2,0 e 2,1 mmol L⁻¹. Já para o S1, a concentração ficou entre 2,2 e 2,8 mmol L⁻¹, sendo o maior valor obtido as 144 horas, momento em que a maior parte das células já deviam estar mortas.

Não foi identificado a exaustão ou o consumo de outro aminoácido.

E por último, foi feito o ELISA para detectar os anticorpos produzidos pelas células durante o cultivo. Afim de acompanhar o crescimento celular com a produção dos mAbs, foi feito um gráfico ln da concentração de células viáveis e densidade ótica (DO_{mAb}) vs. tempo (h), o qual é mostrado na Figura 45.

Figura 45: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e Densidade Ótica vs. tempo para os biorreatores S1 e S2 com o meio de cultivo SFM.

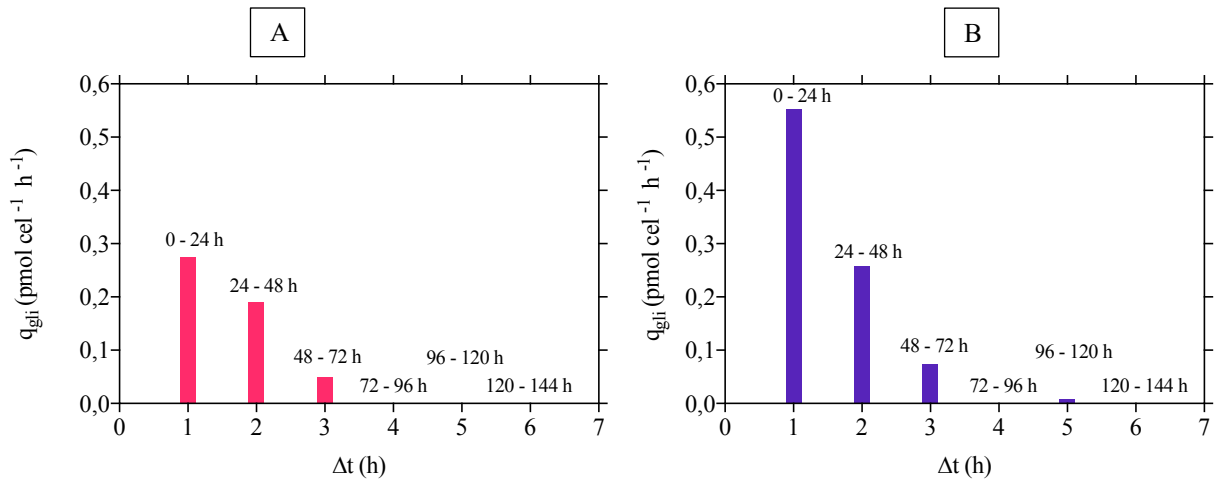


E novamente, nesta etapa deste trabalho, foi possível observar que a redução nos valores da taxa de captação de nutrientes (q_{gli}) pelas células, direcionam estas, provavelmente, a produzir os mAbs. Os valores para q_{gli} calculados a cada 24 h para os biorreatores S1 e S2 são apresentados na Tabela 9, e além disso, para melhor elucidação foi construído um gráfico do tipo barra para os valores de q_{gli} ($\mu\text{mol cel}^{-1} \text{h}^{-1}$) por unidade de tempo (h) para cada biorreator (Figura 46). Observa-se que a partir das 24 horas há uma redução nos valores de q_{gli} para S1 e S2, o que coincide com o início da detecção de mAbs.

Tabela 9: Valores de taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para o cultivo com os meios RPMIS e SFM a cada 24 h.

Δt (h)	q_{gli} ($\mu\text{mol cel h}^{-1}$) Sr1	q_{gli} ($\mu\text{mol cel h}^{-1}$) Sr2
0-24	0,275	0,553
24-48	0,190	0,256
48-72	0,050	0,074
72-96	-0,007	-0,017
96-120	-0,062	0,009
120-144	-0,010	-0,009

Figura 46: Gráfico do tipo barra da taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) para S1 (A) e S2 (B), por intervalo de tempo, onde 1 representa o intervalo entre 0 e 24 h, 2, 24 e 48 h, 3, 48 e 72 h, 4, 72 e 96 h, 5, 96 e 120 h e 6, 120 e 144 h. Dados para o cultivo com o meio SFM.

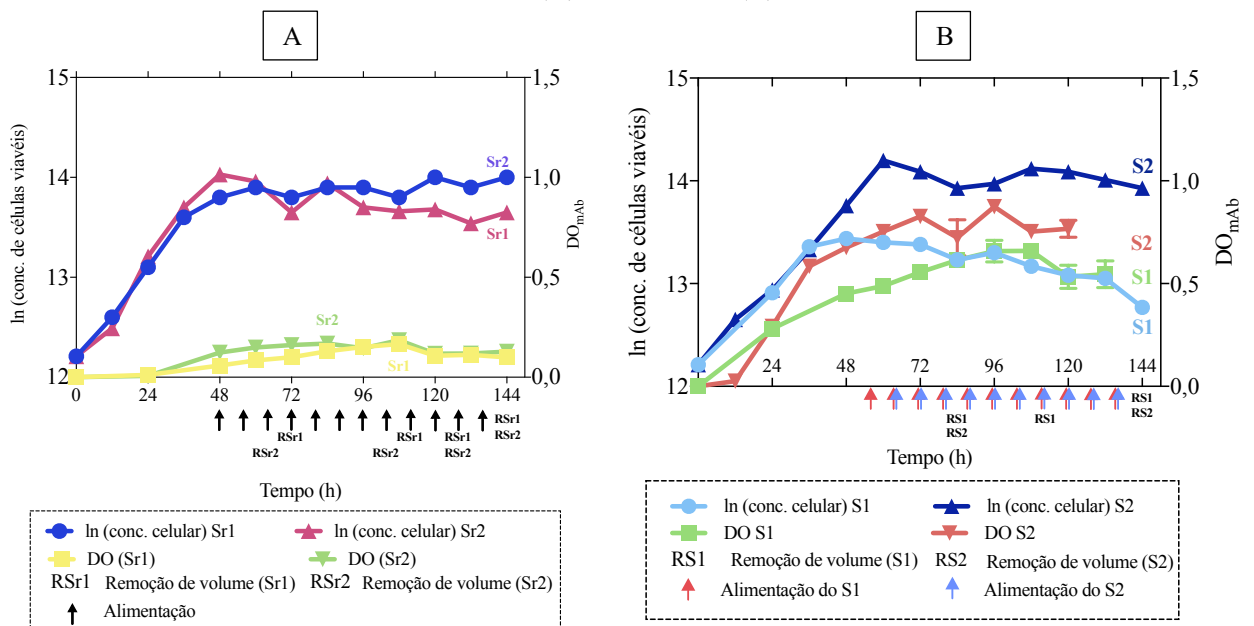


5.2.3. Comparação Entre os Cultivos em Batelada Alimentada em Meio RPMIS e

SFM

Na Figura 47, dois gráficos (ln (concentração de células viáveis) e Densidade Ótica vs. tempo) são rerepresentados, o primeiro é referente ao cultivo em batelada alimentada com o meio RPMIS e o segundo, ao cultivo em batelada alimentada com o meio SFM.

Figura 47: Gráfico ln (concentração de células viáveis) e Densidade Ótica vs. tempo para o meio RPMIS (A) e meio SFM (B).



Estes gráficos ilustram, como já observado também por Acosta (2007), que a produção de anticorpo monoclonal não está relacionada com a concentração celular ou $\mu_{m\acute{a}x}$. O crescimento celular em Sr1, Sr2 e S2 foram semelhantes, já no S1, a concentração celular obtida foi menor, entretanto a produção de mAbs foi maior do que em Sr1 e Sr2.

A glutamina no cultivo em batelada quando exaurida provocou uma diminuição no crescimento, seguida pela morte das células, entretanto para o cultivo em batelada alimentada, mesmo que em baixas concentrações, garantiu alta viabilidade celular. A adição de meio fresco permite que as células tenham acesso ao aminoácido, mesmo que em níveis menores, e garante a continuidade do crescimento celular.

No tópico 5.1.3 foi sugerido que a alta produção de anticorpo no meio SFM é devido a alta concentração de lactato. Isto é observado em S2, já no S1, os valores de DO_{mAb} foram maiores quando comparados aos de Sr1 e Sr2, contudo a concentração de lactato ficou abaixo de 5 mmol L⁻¹, o que propõe que o lactato não seja o fator determinante para uma maior produção de mAb, e sim situações que levam as células ao estresse (sem ocasionar a morte). Glacken (1987) mostrou que a osmolalidade quando não regulada, promove uma maior produção de mAb pelas células, o que pode reforçar a observação feita nos cultivos deste trabalho.

Portanto a diminuição no nível de nutriente no meio de cultivo direciona as células a iniciar a biossíntese do mAb e condições de estresse, leva a uma maior produção. Deve reiterar-se que isto é uma suposição a partir das observações realizadas neste trabalho a um específico grupo celular, novos testes e estudos devem ser feitos para uma melhor elucidação.

O procedimento foi feito em duplicata, mas vale destacar que para trazer mais confianças aos resultados, o ideal seria uma triplicata, entretanto por conta das dificuldades com os biorreatores, e de conseguir o meio de cultivo SFM, não sobrou tempo hábil para mais uma repetição.

O modo de operação batelada alimentada, quando operado de forma correta, traz bons resultados. Para a continuidade deste trabalho deve-se considerar a necessidade de padronização na remoção de volumes e no início de alimentação, para a obtenção de concentrações com menor discrepância durante o cultivo

E mais uma vez o soro se mostrou passível de ser eliminado de cultivos celulares por meio da utilização de meios livres de soro, o meio SFM trouxe os melhores resultados de cultivo, assim como no cultivo em batelada.

5.3. Comparação Entre os Cultivos em Batelada e Batelada Alimentada

O cultivo em batelada, como já mostrado por Butler (2005) e Moraes (2008) tem como vantagens ser simples, logo de fácil operação, ser de baixo-custo e ainda apresenta baixo risco de contaminação. Por conta desses motivos este modo de operação é amplamente utilizado, principalmente em escala laboratorial. Entretanto o seu uso também traz desvantagens, como o acúmulo de metabólitos e a acidificação no meio de cultivo, o que pode levar a condições de estresse para a célula, implicando na morte e em muitos casos na degradação da proteína de interesse (FENGE e LULLAU, 2006).

Assim, a batelada alimentada torna-se uma boa alternativa quando deseja-se prolongar uma fase, como é o caso desta segunda parte deste trabalho. Neste modo de operação os nutrientes são adicionados de acordo com a necessidade da célula, e a adição de meio de cultivo e a remoção de volumes, promove um controle maior do pH, e contribui para a não acumulação de metabólitos. A soma destes fatores contribui para um melhor crescimento e por um maior período de tempo. Por conta do grande número de manipulações, o risco de contaminação se torna maior, e por isso, a automação é um ótimo caminho para garantir bons resultados (BUTLER, 2005; FRESHNEY, 2010; FENGE e LULLAU, 2006).

Vale destacar que no cultivo em batelada alimentada, a adição de meio de cultivo fresco contribui para a diluição do produtos de interesse, sendo necessário, mais etapas para realizar a purificação do produto, o que pode ser um problema, uma vez que um maior número de etapas para a purificação pode fazer com que as proteínas percam a viabilidade.

Portanto, o cultivo em batelada alimentada, tem vários pontos positivos, e foi uma ótima escolha para este trabalho, uma vez que garantiu as condições para o crescimento celular e a produção de mAbs, e mostrou que o cultivo pode ser escalonável, mas fica evidente a necessidade de melhorias para a continuação de seu uso.

5.4. Purificação (EPR e EPS)

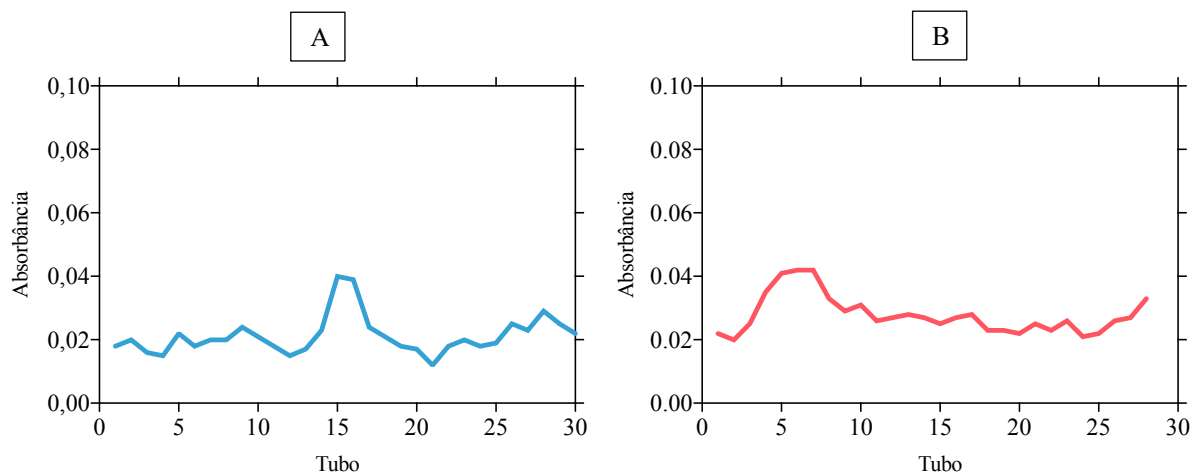
Foram utilizados dois métodos para a purificação dos mAbs anti-CD25 (IgG1) afim se obter uma metodologia simples e eficiente.

5.4.1 Cromatografia de Troca Iônica

Os anticorpos utilizados nesta etapa foram obtidos por Prampero (2017), em seu trabalho, a partir de cultivo em batelada com os mesmos meios de cultivo.

Após a leitura em um espectrofotômetro a 280 nm das amostras eluidas pela coluna de CM-sepharose, foram construídos dois gráficos, um para o RPMIS (Figura 48 – A) e outro pra o SFM, (Figura 48 – B) de absorbância vs. número de tubos de amostras eluidas.

Figura 48: Gráfico de absorvância (280 nm) vs. número de tubo de coleta para o meio RPMIS (A) e para o meio SFM (B) .



Como é observado nos gráficos acima a quantidade de anticorpo em ambos os casos é quase indetectável, para o RPMIS observa-se um pico de 0,04 no tubo de número 15, enquanto que para o SFM, um “pico” também próximo do valor de 0,04. Estes valores mostram que o procedimento não gerou um resultado satisfatório, possivelmente a diálise realizada, pode ter ocasionado esses valores, ou ainda, pelo fato destes anticorpos estarem armazenados há mais de um ano.

Logo, para os anticorpos monoclonais obtidos neste projeto foi utilizado uma técnica diferente, a de imunoprecipitação de com a proteína G.

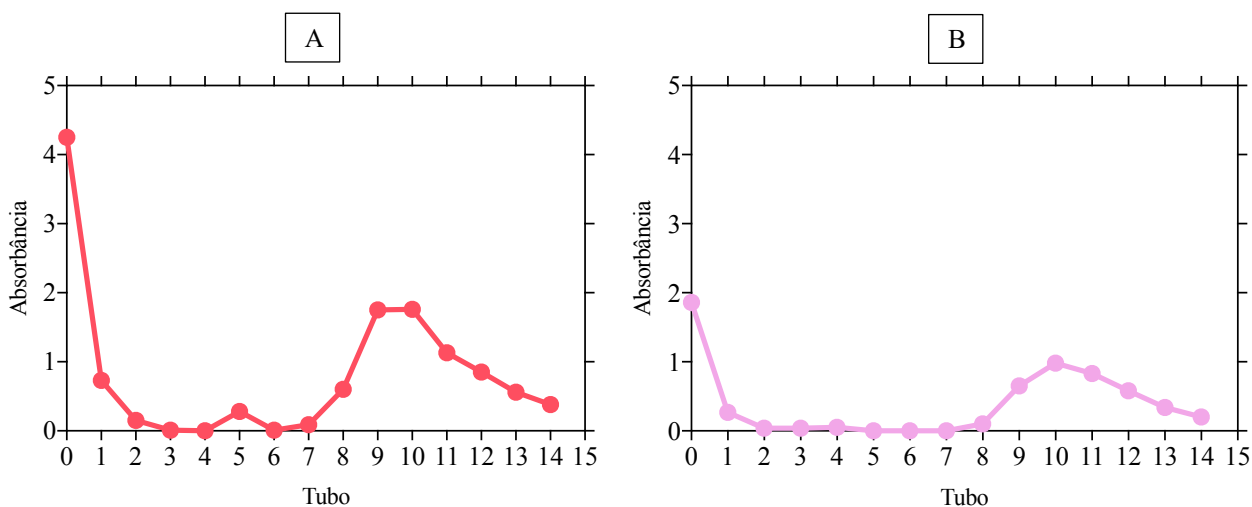
5.4.2. Imunoprecipitação com Proteína G em Gel de Sepharose

Os anticorpos utilizados nesta etapa foram obtidos a partir do cultivo em batelada de hibridomas deste trabalho. E como o anticorpo é classificado IgG1, foi utilizado a proteína G, a qual possui melhor interação.

A partir do resultado de ELISA do sobrenadante (coletado as 96 horas do cultivo em batelada) verificou-se que a DO_{mAb} para o meio de cultivo SFM foi 3 vezes maior do que a do RPMIS, então, para se obter aproximadamente, a mesma quantidade de anticorpo e poder comparar igualmente, foi separado uma alíquota de 13 mL do sobrenadante obtido através do cultivo em RPMIS, e 4,3 mL do sobrenadante do cultivo com SFM.

Após as amostras, em tubos cônicos de 15 mL, ficarem em rotação, foi realizado a centrifugação destes tubos e a resina de meio de cultivo separada e transferida para microtubos de 1,5 mL, e nestes forma feitas as lavagens com tampão e a eluição. Amostras de cada etapa foram colocadas em tubos de coleta e em cada um foi feita a leitura em um espectrofotômetro UV-vis. O resultado é mostrado nos gráficos abaixo (Figura 49) nos quais são mostrados os valores de absorvância (280 nm) para cada tubo.

Figura 49: Gráfico de absorvância (280 nm) vs. número de tubos de coleta para o meio RPMIS (A) e para o meio SFM (B). O tubo 0 corresponde ao sobrenadante, dos tubos 1 ao 7, as soluções de lavagem e dos tubos 8 ao 14, as amostras eluídas.



Verifica-se que as lavagens foram feitas de forma eficiente, visto que a absorvância foi próxima ou igual a *zero* nos tubos contendo as soluções de lavagem. Os tubos contendo as amostras eluídas com maior valor de absorvância foram os de números 9, 10 e 11 para ambos os meios de cultivo (Tabela 10). Os maiores valores para o meio RPMIS implica no maior conteúdo proteico presente no meio de cultivo por conta do SFB.

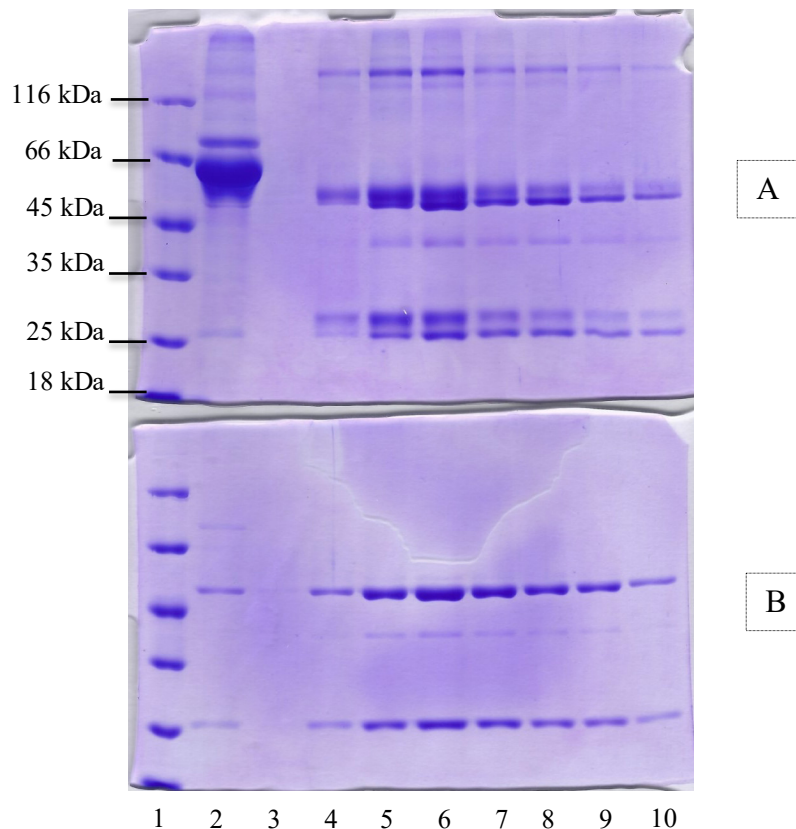
Tabela 10: Maiores valores de absorvância para os tubos de amostras eluídas dos meios RPMIS e SFM.

Tubo	Absorbância (meio RPMIS)	Absorbância (meio SFM)
9	1,75	0,65
10	1,76	0,98
11	1,13	0,83

Para averiguar a eficiência da purificação e a produção de mAbs anti-CD25 pelas células, para cada meio de cultivo foi realizado a eletroforese em gel de poli-acrilamida 10%. O gel para cada meio de cultivo é apresentado na Figura 50.

Em cada gel foram feitas canaletas e enumeradas de 1 a 10. Na canaleta de número 1 foi aplicado o padrão da ThermoFisher, no de número 2, o sobrenadante do cultivo, no de número 3, a última solução de lavagem obtida e nas canaletas de 4 a 10, as soluções de eluição.

Figura 50: Gel de poliacrilamida (10%) obtido a partir da eletroforese com as amostras em meio RPMIS (A) e em meio SFM (B) obtidas após a purificação. As numerações abaixo da figura correspondem, para ambos os meios de cultivo a: 1, padrão ThermoFisher, 2, sobrenadante, 3, solução de lavagem e 4 – 10, frações das eluições. No lado esquerdo da Figura (A) estão disponíveis as massas moleculares das proteínas presentes na solução padrão em kDa.



Antes das amostras serem inseridas no gel, elas passaram por um processo de desnaturação, o que fez com que os anticorpos presentes se dividissem em duas cadeias (cadeia leve e pesada) pelo rompimento das ligações dissulfeto, o que ocasionou a formação das bandas referentes ao peso de cada cadeia, sendo 24 kDa para o de cadeia leve e 55 kDa para a cadeia pesada (ABBAS *et al.*, 2015). A largura da banda indica a quantidade polipeptídios.

As bandas marcadas no gel, assim, confirmaram a produção de anticorpo monoclonal pelas células em ambos os meios de cultivo.

Fica claro que no gel com o meio SFM, o nível de contaminantes (moléculas diferentes do anticorpo) é extremamente baixa, e que foi possível separar e concentrar predominantemente, o mAb. Outro caso a se ressaltar é que mesmo no sobrenadante o nível de contaminantes é pequena, o que torna o meio SFM, uma excelente opção para a obtenção de anticorpos com alto grau de pureza, sem a necessidade de muitas etapas de purificação, o que poderia comprometer a viabilidade do anticorpo. Nos tubos de números 5, 6 e 7, obteve-se os

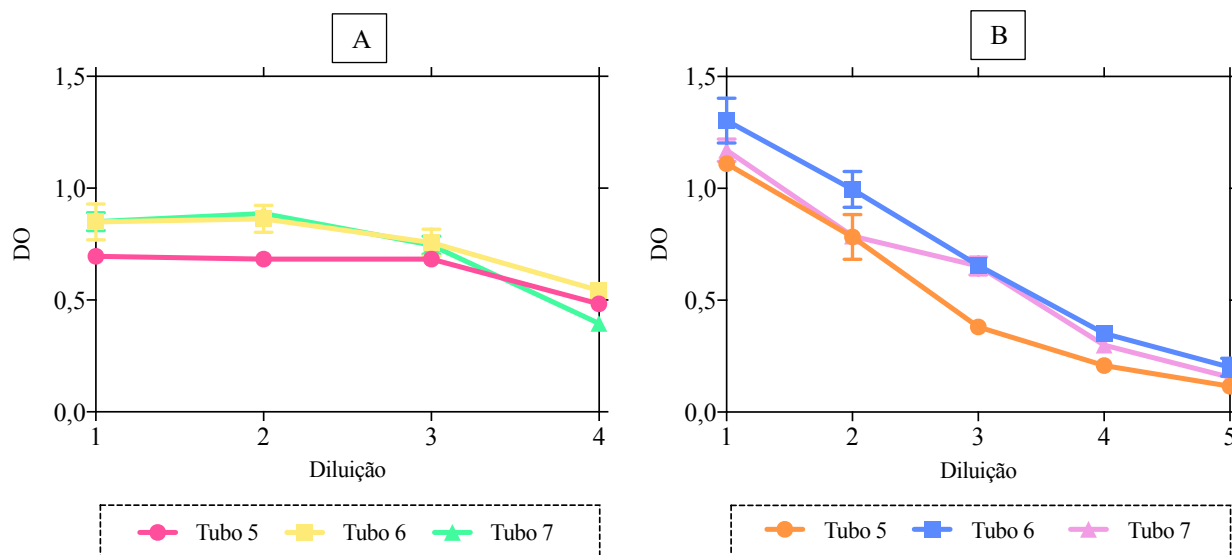
maiores valores de absorvância, o que é mostrado pelas marcações mais intensas em ambos os géis, implicando em alto teor de anticorpo.

No gel para o meio RPMIS, as bandas características de anticorpo, ficaram um pouco mascaradas por conta da presença de contaminantes, mas observa-se que a albumina bovina, presente em grande quantidade no SFB, foi eliminada. Este gel mostra a necessidade de mais etapas para a purificação do anticorpo com este meio de cultivo.

Manna e colaboradores (2015) utilizaram a cromatografia de afinidade para a purificação de mAbs, com a proteína “A”. O cultivo das células foi feito nos meios Nutridoma SP e Excell, meios de cultivo sem SFB, e DMEM, meio de cultivo com SFB (10% v/v). O padrão observado no gel, foi o mesmo observado neste trabalho, indicando um resultado positivo para a técnica utilizada.

Com o objetivo de investigar a viabilidade dos anticorpos após a purificação, foi realizado o ELISA, para isso foram utilizadas as amostras presentes nos tubos de números 5, 6 e 7, de cada meio. As amostras por estarem concentradas antes de serem aplicadas na placa foram diluídas. As diluições feitas para cada tubo do meio de cultivo RPMIS foram 1:100, 1:400, 1:800 e 1:1600. As diluições para o meio SFM foram 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 e 1:16000. Os valores de DO_{mAb} , para cada diluição e meio de cultivo são mostrados Figura 51.

Figura 51: Gráficos de Densidade ótica vs. diluição para o meio RPMIS(A) e meio SFM (B). No gráfico A, 1 corresponde a :100; 2 a 1:400; 3 a 1:800 e 4 a 1:1600. No gráfico B, 1 corresponde a 1:1000, 2 a 1:2000, 3 a 1:4000, 4 a 1:8000 e 5 a 1:16000.



A partir da Figura 51 é possível observar que os anticorpos continuam viáveis após o procedimento de purificação.

Por meio do método de Bradford foi feita a quantificação de proteína nos tubos com bandas mais intensas, ou seja, para os tubos de números 5, 6 e 7. Os valores estão disponíveis na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de concentração proteína em amostras purificadas para os meios RPMIS e SFM.

Meio	Tubo 5 ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	Tubo 6 ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	Tubo 7 ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)
RPMIS	0,32	0,55	0,43
SFM	0,49	0,34	0,37

Verifica-se que a diferença entre os valores é pequena, o que era esperado, visto que os volumes foram acertados, afim de tentar equiparar as quantidades de anticorpo. A pequena discrepância entre os valores pode ser explicada pela presença das proteínas do SFB ainda presentes nas amostras de RPMIS.

Logo, estes resultados comprovam que a quantidade de anticorpo produzida pelo cultivo com o meio SFM é maior, aproximadamente, 3 vezes mais.

Não foram encontrados dados na literatura em relação a métodos de purificação para mAbs anti-CD25, mas os trabalhos consultados com outros mAbs e proteínas específicas, com excelentes resultados também (AYBAY e IMIR, 2000), todavia só é utilizada para pequenas quantidades de volume, quando deseja-se realizar o procedimento para maiores volumes, é utilizado a cromatografia de afinidade IMAC, que utiliza íons metálicos para promover a separação dos componentes (OLIVEIRA, 2014). Isto é devido pelo alto custo da proteína, que limita o seu uso.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem inferir:

- O cultivo do hibridoma PC-61 em meio SFM, sem SBF é cerca de 3 vezes mais eficiente para a produção de mAb anti-CD25, que o meio convencional contendo SBF;
- O cultivo em batelada permitiu analisar o comportamento do hibridoma PC-61, como o metabolismo e produção de mAbs, e identificar a fase de crescimento com maior produção de mAbs e prolongá-la realizando a substituição da operação batelada por batelada alimentada;
- A utilização do meio SFM é uma ótima alternativa em comparação aos meios de cultivo suplementados com SBF, uma vez que, em determinada condição, permite a obtenção de maiores quantidades de anticorpo, e garante maior facilidade na aplicação de técnicas de purificação, diminuindo os custos da produção.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K e LICHTMAN, A. H. e PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ACOSTA, M. L. et al. Analysis of kinetic, stoichiometry and regulation of glucose and glutamine metabolism in hybridoma batch cultures using logistic equations. *Cytotechnology*, v. 54(3), p. 189-200, 2007.
- AYBAY, C. e IMIR, T. Development of a rapid, single-step procedure using protein G affinity chromatography to deplete fetal calf serum of its IgG and to isolate murine IgG1 monoclonal antibodies from supernatants of hybridoma cells. *Journal of Immunological Methods*, v. 233, p. 77-81, 2000.
- AL-RUBEAI, M. *Animal Cell Culture*. Springer, 2015.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.
- ACS (AMERICAN CANCER SOCIETY). *Treatment types*. 2018. Disponível em: <www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>. Acessado em dezembro de 2017.
- AROSA, F. A.; CARDOSO, E. M. e PACHECO, F. C. *Fundamentos de Imunologia*. 2. Ed. Lisboa: Lidel, 2012.
- BENJOUAD, A. Antibody biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, v.8 (13), p.2911-5, 2009.
- BETTINARDI, I. W. *Desenvolvimento de estratégias de alimentação com meios concentrados para cultivo de células animais em perfusão*. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- BIELEKOVA, B. et al. Intrathecal effects of daclizumab treatment of multiple sclerosis. *neurology*, v. 77(21), p. 1877–1886, 2011.
- BETTS, G. J., et al. Regulating the immune response to tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 948-961, 2006.
- BICKELS J., et al. Coley's toxin: Historical perspective. *The Israel Medical Association Journal*, v. 4(2), p. 471-2, 2002.
- BIZZARO, N.; ANTICO, A., e VILLALTA, D. Autoimmunity and gastric cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19(2), p. 377, 2018.
- BORGHAEI, H.; SMITH, M. R., e CAMPBELL, K. S. Immunotherapy of cancer. *European journal of pharmacology*, v.625(1-3), p.41-54, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.
- 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, p. 59-68, 2002.

- BUTLER, M. *Animal cell cultures and technology*. 2. ed. Nova Iorque: Taylor & Francis Group, 2005.
- CALÌ, B. *et al.* Tuning cancer fate: the unremitting role of host immunity. *Open biology*, v.7(4), 2017.
- CARVALHO, S., *et al.* Immunotherapy of cancer: from monoclonal to oligoclonal cocktails of anti - cancer antibodies. *British Journal of Pharmacology*, v. 173(9), p. 1407-1424, 2016.
- CHAE, Y. K. *et al.* Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget*, v. 7(17), p. 23312-23321, 2016.
- CORDEIRO, M. L. S., *et al.* Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. *Revista Saúde e Ciência On Line*, v. 3(3), p.252-262, 2014.
- CRUVINEL, W. M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia, São Paulo*, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.
- DEZENGOTITA, V. M., SCHMELZER, A. E., MILLER, W. M. Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO₂ and osmolality: Intracellular pH, cell size, apoptosis, and metabolismo. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 77 (4), p. 369-380, 2002 (a).
- DEZENGOTITA, V. M., *et al.* Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbono dioxide and osmolality. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 78 (7), p. 741-752, 2002 (b).
- DEZENGOTITA, V. M., SCHMELZER, A. E., MILLER, W. M. Effects of CO₂ and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 28, p. 213-227, 1998.
- DINE J, *et al.* Immune checkpoint inhibitors: an innovation in immunotherapy for the treatment and management of patients with cancer. *Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing*, v. 4(2), p. 127-135, 2017.
- DOUGAN, M. e DRANOFF, G. Immune therapy for cancer. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 83-117, 2009.
- DUNN, G. P., *et al.* Cancer immunoediting: from immune-surveillance to tumor escape. *Nature*, v. 3(11), p. 991-998, 2002.
- DUVAL, D. *et al.* Comparison of various methods for monitoring hybridoma cell proliferation. *Journal of Immunological Methods*. v.134, p. 177-185, 1990.
- ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE. H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, v. 7(1), p. 9-14, 2015.
- ELLIS J. S. e BRALEY-MULLEN, H. Mechanisms by which B cells and regulatory T cells influence development of murine organ-specific autoimmune diseases. *Journal of Clinical Medicine*, v. 6(2), p.13, 2017.
- FENGE. C.; LULLAU, E. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. Nova Iorque: Taylor & Francis Group, 2006.

- FERREIRA, D. *Caracterização metabólica e cinética do cultivo de três hibridomas para a produção de imunoglobulinas com especificidade a antígenos eritrocitários para o uso hemoterápico*. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- FLYNN M. J. e HARTLEY J. A. The emerging role of anti-CD25 directed therapies as both immune modulators and targeted agents in cancer. *British Journal of Haematology*, v. 179(1), p. 20-35, 2017.
- FONTENOT, J. D., *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*, v. 22 (3), p. 329 – 341, 2005.
- FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*. 6. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2010.
- GAGNON, P. Technology trends in antibody purification. *Journal of Chromatography A*, v. 1221, p. 57-70, 2012.
- GIL, E. S.; KUBOTA, L. T. e YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. *Química Nova*, v. 22(6), p. 874-881, 1999.
- GLACKEN, M. W. *Development of mathematical descriptions of mammalian cell culture kinetics for the optimization of fed-batch bioreactors*, 1987. Dissertação de Doutorado, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA.
- GÒDIA, F.; CAIRO, J. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. Nova Iorque: Taylor & Francis Group, p.81-112, 2006.
- GOLDSBY R. A.; KINDT T. J. e OSBORNE B. A. *Kuby Immunology*. 4. ed. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company, 2000.
- GRANIER, C. *et al.* Cancer immunotherapy: Rational and recent breakthroughs. *La Revue de médecine interne*, v. 37(10), p. 694-700, 2016.
- GREEN BIORESEARCH. 2018. Disponível em: <<<https://elabsaver.com/product/greiner-t175-cell-culture-flask/>>> acessado em maio de 2018.
- GUO, H.; TSUNG, K. Tumor reductive therapies and antitumor immunity. *Oncotarget*, v. 8(33), p. 55736-55749, 2017.
- GUTZEIT, C.; CHEN, K. e CERUTTI, A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. *European Journal of Immunology*, v. 48(7), p. 1101-1113, 2018.
- HANACK, K.; MESSERSCHMIDT, K. e LISTEK, M. Antibodies and selection of monoclonal antibodies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 917, p. 11-22, 2016
- HANSON, M. A. *et al.* Comparisons of optical pH and dissolved oxygen sensors with traditional electrochemical probes during mammalian cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, p. 833–841, 2007.
- HARLOW, E. D. e LANE, D. *Antibody a laboratory manual*. Nova Iorque: Cold Spring, 1988.
- HE J. S. *et al.* Biology of IgE production: IgE cell differentiation and the memory of IgE responses *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 388, p. 1-19, 2015

- HOFF, P. M. e MUNHOZ, R. R. *Imunoterapia renova esperanças no tratamento contra o câncer*. 2016. Disponível em: <<www.hospitalsiriolibanes.org.br/sua-saude/Paginas/imunoterapia-renova-esperancas-tratamento-cancer.aspx>> acessado em novembro de 2017.
- HONG H., *et al.* Depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells enhances natural killer T cell-mediated anti-tumour immunity in a murine mammary breast cancer model. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 159(1), p. 93-99, 2010.
- HUSS, D. J., *et al.* Anti - CD25 monoclonal antibody Fc variants differentially impact regulatory T cells and immune homeostasis. *Immunology*, v.148(3), p. 276-286, 2016.
- HUSS, D. J.; *et al.* In vivo maintenance of human regulatory t cells during CD25 blockade. *The Journal of Immunology*, v. 194 (1), p. 84-92, 2015;
- INDIANMART. 2018. Disponível em: <<[http:// www.indiamart.com/proddetail/semi-automatic-elisa-plate-reader-15597576888.html](http://www.indiamart.com/proddetail/semi-automatic-elisa-plate-reader-15597576888.html)>> acessado em maio de 2018.
- INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER). *ABC do Câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer*. Rio de Janeiro, 2011.
- INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER). *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil, 2018*. Disponível em <<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-brasil-consolidado.asp>>> acessado em maio de 2018.
- JANEWAY, C. A. e MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, v. 20(1), p. 197–216, 2002
- JEONG, Y. H.; WANG, S. S. Role of glutamine in hybridoma cell culture: Effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 47- 55, 1995.
- JOYCE, J. A e FEARON, D. T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, v. 348 (6230), p. 74-80, 2015.
- KARLSSON, E.; RYDEN, L. e BREWER, J. Protein Purification: principles, high resolution methods, and applications. 2. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1998.
- KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, v. 121(1), p. 1-14, 2007.
- KIRCHER, B., *et al.* Comparative *in vitro* study of the immunomodulatory activity of humanized and chimeric anti-CD25 monoclonal antibodies. *Clinical and Experimental Immunology*, v.134(3), p. 426-430, 2003.
- KOHLER, G. e MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.
- KRÄUTLER, N. J., *et al.* Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 214 (5) p. 1259-1267, 2017.
- LAW, A. M. K., *et al.* The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Endocrine-Related Cancer*, v. 24(4), p. 123–144, 2017.

- LI, J., *et al.* Two doses of humanized anti-CD25 antibody in renal transplantation: A preliminary comparative study. *mAbs*, v. 1(1), p. 49-55, 2009
- LIAO, W.; JIAN-XIN L. e WARREN J. L. IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, v. 23(5), p. 598–604, 2011.
- LINDAU, D., *et al.* The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*, v. 138 (2), p. 105–115, 2013
- LISTON, A. e GRAY, D. H. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nature Reviews Immunology*, v.14 (3), p. 154-65, 2014.
- LODISH, H., *et al.* *Biologia Celular e Molecular*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- LOEB, L. A. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Research*, v. 61(8), p. 3230-3239, 2001
- LOUIS, A. G. e GUPTA, S. Primary selective IgM deficiency: an ignored immunodeficiency. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 46(2), p. 104-111, 2014
- LOW, D.; O'LEARY, R.; PUJAR, N. S. Future of antibody purification. *Journal of Chromatography B*, v. 848, p. 48-63, 2007
- MANNA, L., *et al.* Production of monoclonal antibodies in serum-free media. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, v. 34(4), p. 278–288, 2015.
- MARX, U. *et al.* Monoclonal Antibody Production. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 23. *Alternatives to Laboratory Animals*. v. 25, p. 121-137, 1997.
- MELLMAN, I.; COUKOS, G.; DRANOFF, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, v. 480, p. 480-489, 2011.
- MELO, K. M. e CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. v. 32, n. 5, p. 184-188, 2009.
- MERCILLE, S. e MASSIE B. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44(9), p. 1140-1154, 1994.
- MERTEN, O. W., *et al.* Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: use of various cell lines. *Cytotechnology*, v. 14, p. 47-59, 1994.
- MILLER, W. M.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. A kinetic analysis of hibridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate and pH. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 67, p. 853-871, 1988.
- MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P. e CASTILHO, L. R. *Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia genética*. São Paulo: Roca, 2008.
- MUELLER S. N. *et al.* Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annual Review of Immunology*, v. 31, p. 137-161, 2013.
- MURPHY, K., *et al.* *Imunobiologia de Janeway*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, , 2010.

- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - US). Monoclonal Antibody Production. Washington, DC: *The National Academies Press*, 1999.
- NELSON, D. L. e COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NEVES, H. e KWOK, H. F. Recent advances in the field of anti-cancer immunotherapy. *BBA Clinical*, v.3, p. 280-288, 2015.
- NICHOLSON, L. B. The immune system. *Essays in Biochemistry*, v. 60(3), p. 275-301, 2016.
- ODEH, A. N.; SIMECKA, J. W. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells dampen inflammatory disease in murine mycoplasma pneumonia and promote IL-17 and IFN- γ responses. *Plos One*, v. 11, n. 5, p. 1-25, 2016.
- OISETH, Stanley J.; AZIZ, Mohamed S.. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, v. 3(10,) p. 250-61, 2017
- OLIVEIRA, C. R. Purificação de anticorpo monoclonal anti- trypanosoma cruzi do isotipo IgG2a em ops-agarose. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- ONIZUKA, S., *et al.* Tumor rejection by *in vivo* administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor α) monoclonal antibody. *Cancer Research*, v. 59(13), p. 3128-3133, 1999.
- ONUBR (ORGANIZAÇÕES DAS NAÇÕES UNIDAS BRASIL). OMS: câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo. 2017. Disponível em: <<<http://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/amp/>>> acessado em junho de 2018.
- ØYASS, K. *et al.* Hyperosmotic hybridoma cell cultures: increased monoclonal antibody production with addition of glycine betaine. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 991-998, 1994.
- ØYASS, K. *et al.* Transport of osmoprotective compounds in hybridoma cells exposed to hyperosmotic stress. *Cytotechnology*. v. 17, p. 143-151, 1995.
- OZTURK, S.S.; RILEY, M.R. e PALSSON, B.O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, 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.
- PANDYA, P. H.; Murray, M. E.; Pollok, K. E.; J. L. Renbarger. The immune system in cancer pathogenesis: potential therapeutic approaches. *Journal of Immunology Research*, 2016.
- PFENDER, N. e MARTIN, R. Daclizumab (anti-CD25) in multiple sclerosis. *Experimental Neurology*, v. 262, p. 44-51, 2014.
- PLITAS, G. e RUDENSKY A. Y. Regulatory T cells: differentiation and function. *Cancer Immunology Research*, v. 4(9), p. 721-725, 2016.

- PODHORECKA, M., *et al.* Target therapy in hematological malignances: new monoclonal antibodies. *International Scholarly Research Notices*, v. 2014(701493), 16 páginas, 2014.
- PRAMPERO, A. C. *Produção de anticorpos monoclonais Anti-GITR e Anti-CD25 através de cultivo de hibridomas e comparação do seu potencial como agentes antitumorais.* 2017. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- RECH A. J., *et al.* CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory t cells in concert with immunotherapy in cancer patients. *Science translational medicine*. 2012, v. 4(134), p.134ra62.
- REICHERT, J. M., *et al.* Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotechnology*, v.23(9):1073, 2005
- REICHERT, J. M. e DHIMOLEA, E. The future of antibodies as cancer drugs. *Drug Discovery Today*, v. 17 (17-18), p. 954-963, 2012.
- ROCHE. *Imunoterapia e cura: imunoterápicos podem reduzir e estabilizar até mesmo tumores de difícil tratamento*, 2017. Disponível em: <<http://www.roche.com.br/home/farmacutica/areas_terapeuticas/oncologia/imunoncologia/imunoterapia-e-cura.html>> acessado em maio de 2018.
- ROLAND, M. Anti-CD25 (daclizumab) monoclonal antibody therapy in relapsing – remitting multiple sclerosis. *Journal of Clinical Immunology*, v. 142(1), p. 9-14, 2012.
- ROQUE, A. C. A.; SILVA, C. S. O.; TAIPA, M. A. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. *Journal of Chromatography A*, v. 1160, p. 44-55, 2007.
- SANFELIU, A. *et al.* Analysis of nutritional factors and physical conditions affecting growth and monoclonal antibody production of the hibridoma KB-26.5 cell line. *Biotechnology Progress*, v.12, p. 209-216, 1996.
- SANTOS, R. V., *et al.* Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais. *Revista Brasileira de Alergia Imunopatologia*. v. 29(2), p. 77-85, 2006.
- SCHMELZER A. E. *et al.* *Animal cell technology: from target to market.* Springer, 2001
- SETOGUCHI, R., *et al.* Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201(5), p. 723-735, 2005.
- SIGMA. *EX-CELL® Hybridoma Medium.* 2018. Disponível em: <<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/excellhybridomamedium1234598765?lang=pt®ion=BR>>> acessado em maio de 2018.
- SINGH, K., CHANG, C. e GERSHWIN, M. E. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, v. 13(2), p. 163–177, 2014.
- SHEPARD, H M. *et al.* Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clinical Medicine*, v. 17(3), p. 220-232, 2017.
- SHINNAKASU, R. e KUROSAKI, T. Regulation of memory B and plasma cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, v. 45, p. 126–131, 2017.

- SHUPTRINE, C.; SURANA, R.; WEINER, L. M. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, v. 22(1), p. 3-13, 2012.
- SETIADY, Y. Y.; COCCIA, J. A e PARK, P. U. In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIII+ phagocytes. *European Journal of Immunology*, v. 40(3), p. 780-786, 2010.
- TAGUCHI, O. e TAKAHASHI, T. Administration of anti-interleukin-2 receptor alpha antibody in vivo induces localized autoimmune disease. *Europe Journal Immunology*, v. 26(7), p. 1608-12, 1996.
- TFS (THERMO FISHER SCIENTIFIC). *Hybridoma media*. 2018. Disponível em: <<<http://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/serum-free-media/hybridoma-media.html>>> acessado em maio de 2018.
- VAN DER VALK, J., *et al.* Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology in Vitro*, n. 24, p. 1053 – 1063, 2010.
- VAN DER VALK, J., *et al.* Fetal bovine serum (FBS): past - present - future. *ALTEX*, v. 35(1), p. 99-118, 2018.
- VIDARSSON, G.; DEKKERS, G. e RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, v. 5(520), 17 p., 2014.
- VINAY, D. S., *et al.* Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, v. 35, p. S185–S198, 2015.
- VOGELSTEIN, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science*, v. 339(6127), p. 1546-1558, 2013.
- WADDELL, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, v. 518(7540), p. 495-501, 2015.
- 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.
- WALSH C. *et al.* Anti-CD25 monoclonal antibody replacement therapy for chronic kidney disease in liver transplant recipients. *Transplantation*, v. 95(3), p. 495-500, 2013.
- WILKINSON, D. S., *et al.* Partial CD25 antagonism enables Dominance of antigen-inducible CD25high FOXP3+ regulatory T cells as a basis for a regulatory T cell based adoptive immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1-21, 2017.
- WINZELER, A.; WANG, J. Y. Culturin hybridoma cell lines for monoclonal antibody production. *Cold Spring Harbor Protocols*. v.7, p. 640, 2013.
- WLASCHIN, K., HU, W.S. Fed-batch culture and dynamic nutrient feeding. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.101, p. 43-74, 2006.
- YATIM, K. M. e LAKKIS, F. G. A brief journey through the immune system. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, v. 10(7), p. 1274-1281, 2015.
- YU, H.; PAIVA, R. e FLAVELL, R. A. Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *Immunology*, v. 153(2), p.161-170, 2018.

- ZANATTA, A. S. *Obtenção de anticorpo monoclonal anti-dengue tipo2 em diferentes meios e sistemas de cultivo*. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- ZHOU, X.; *et al.* Plasticity of CD4⁺ FoxP3⁺T cells. *Current Opinion in Immunology*, v. 21(3), p. 281-285, 2009.
- ZOU, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, v. 6(4), p. 295-307, 2006.

APÊNDICE A – Cultivo em RPMIS

Parte 1 – Cultivo em Batelada

Tabela A-1: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada com o meio RPMIS.

Tempo (h)	pH sobren.	Concent. ($\times 10^6$ cel mL^{-1})	Número Total de cél. ($\times 10^8$ cel)	Viabilidade (%)	DO
0	7,133	0,20	0,40	95,43 \pm 0,41	0
10	7,001	0,26 \pm 0,01	0,50 \pm 0,01	96,23 \pm 1,41	0,031
22	6,91	0,40 \pm 0,02	0,74 \pm 0,04	95,93 \pm 1,03	0,017
34	6,817	0,67 \pm 0,01	1,24 \pm 0,02	98,13 \pm 0,83	0,028
46	6,746	0,84 \pm 0,06	1,51 \pm 0,10	97,44 \pm 0,29	0,017
58	6,715	1,20 \pm 0,05	2,10 \pm 0,09	97,02 \pm 0,71	0,083
70	6,727	1,59 \pm 0,02	2,70 \pm 0,04	97,44 \pm 0,42	0,064
82	6,755	1,57 \pm 0,13	2,60 \pm 0,22	95,35 \pm 0,56	0,179
94	6,781	1,58 \pm 0,08	2,53 \pm 0,12	93,48 \pm 0,22	0,399

Tabela A-2: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada com o meio RPMIS.

Tempo (h)	Glicose (mmol L^{-1})	Lactato (mmol L^{-1})	Glutamina (mmol L^{-1})
0	9,50	1,64	1,671
12	7,59	1,96	-
24	7,41	3,01	1,085
36	7,53	4,25	-
48	5,71	3,87	0,757
60	5,11	3,79	-
72	5,37	4,01	0,04
84	5,68	3,47	0
96	6,05	1,92	0

Parte 2 - Cultivo em Batelada Alimentada

Biorreator 1 – Sr1

Tabela A-3: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada alimentada para o Sr1 co o meio de cultivo RPMIS.

Tempo (h)	pH sobren.	Volume Biorreator (mL)	Concent. ($\times 10^6$ cel mL⁻¹)	Número Total de cél. ($\times 10^7$ cel)	Viabilidade (%)	DO
0	-	50,0	0,2	1,00	98,32 \pm 0,48	0
12	7,418	47,0	0,30 \pm 0,02	1,42 \pm 0,09	98,79 \pm 0,33	-
24	7,052	44,0	0,51 \pm 0,01	2,24 \pm 0,03	98,79 \pm 0,26	0,012 \pm 0,003
36	6,972	41,0	0,79 \pm 0,08	3,22 \pm 0,31	98,52 \pm 0,78	-
48	6,923	38,0	0,97 \pm 0,01	3,69 \pm 0,02	98,10 \pm 0,13	0,059 \pm 0,004
60	6,685	48,0	1,05 \pm 0,08	5,05 \pm 0,36	98,85 \pm 0,38	0,084 \pm 0,011
72	6,728	70,0	1,03 \pm 0,05	7,26 \pm 0,35	98,16 \pm 1,15	0,100 \pm 0,003
84	6,759	90,2	1,09 \pm 0,08	9,83 \pm 0,72	99,09 \pm 0,07	0,130 \pm 0,006
96	6,830	52,7	1,08 \pm 0,04	5,70 \pm 0,20	97,96 \pm 0,07	0,152 \pm 0,002
108	6,754	70,8	1,01 \pm 0,06	7,14 \pm 0,40	97,95 \pm 0,24	0,166 \pm 0,001
120	6,792	98,3	1,18 \pm 0,04	11,6 \pm 0,40	97,23 \pm 0,41	0,108 \pm 0,003
132	6,820	64,9	1,14 \pm 0,01	7,38 \pm 0,05	97,43 \pm 0,23	0,112 \pm 0,009
144	6,744	82,7	1,20 \pm 0,06	9,90 \pm 0,54	97,95 \pm 0,11	0,099 \pm 0,022

Tabela A-4: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada alimentada para o Sr1 com o meio de cultivo RPMIS.

Tempo (h)	Glicose Sr1 (mmol L⁻¹)	Lactato (Sr1) (mmol L⁻¹)	Glutamina (Sr1) (mmol L⁻¹)
0	9,75	1,32	1,769
12	8,81	3,02	-
24	7,04	5,04	1,075
36	5,35	5,36	-
48	4,47	5,4	0,096
60	4,97	5,45	-
72	5,74	5,52	0,257
84	4,7	6,65	-
96	5,18	6,2	0,207
108	4,29	6,48	0,093
120	5,19	6,44	0,217
132	4,21	6,84	0,07
144	4,53	7,33	0,065

Biorreator 2 – Sr2

Tabela A-5: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada alimentada para o Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.

Tempo (h)	pH sobren.	Volume Biorretor (mL)	Concent. ($\times 10^6$ cel mL⁻¹)	Número total de cél. ($\times 10^7$ cel)	Viabilidade (%)	DO
0		50,0	0,20	1,00	98,32 ± 0,48	0
12	7,384	47,0	0,26 ± 0,05	1,25 ± 0,22	95,36 ± 0,79	-
24	7,023	44,0	0,54 ± 0,01	2,40 ± 0,01	98,20 ± 0,45	0,007 ± 0,002
36	6,913	41,0	0,90 ± 0,03	3,66 ± 0,11	98,35 ± 0,22	-
48	6,837	38,0	1,24 ± 0,01	4,69 ± 0,04	98,41 ± 0,18	0,124 ± 0,003
60	6,636	50,4	1,16 ± 0,01	5,84 ± 0,07	97,29 ± 0,79	0,149 ± 0,002
72	6,721	79,9	8,51 ± 0,02	6,80 ± 0,20	97,15 ± 0,20	0,161 ± 0,013
84	6,759	39,6	1,13 ± 0,06	4,48 ± 0,22	97,47 ± 0,93	0,169 ± 0,002
96	6,823	55,4	0,90 ± 0,04	4,93 ± 0,21	98,64 ± 0,49	0,145 ± 0,008
108	6,760	77,9	0,85 ± 0,06	6,65 ± 0,48	98,53 ± 0,39	0,186 ± 0,005
120	6,835	54,3	0,87 ± 0,03	4,72 ± 0,15	97,74 ± 2,26	0,118 ± 0,002
132	6,797	73,3	0,76 ± 0,06	5,54 ± 0,45	98,02 ± 0,48	0,119 ± 0,012
144	6,746	97,1	0,85 ± 0,02	8,24 ± 0,18	97,13 ± 0,62	0,128 ± 0,004

Tabela A-6: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada alimentada para o Sr2 com o meio de cultivo RPMIS.

Tempo (h)	Glicose Sr2 (mmol L⁻¹)	Lactato (Sr2) (mmol L⁻¹)	Glutamina (Sr2) (mmol L⁻¹)
0	9,75	1,32	1,769
12	7,99	2,9	-
24	5,7	4,19	1,042
36	5,72	5,44	-
48	4,58	4,69	0,189
60	5,39	4	-
72	5,54	3,22	0,559
84	5,09	4,21	-
96	5,63	3,67	0,547
108	4,86	3,92	0,447
120	5,84	4,13	0,607
132	5,41	4,75	0,534
144	5,36	4,92	0,498

APÊNDICE B – Cultivo em SFM

Parte 1 – Cultivo em Batelada

Tabela B-1: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada com o meio de cultivo SFM.

Tempo (h)	pH sobren.	Concent. (x10⁶ cel mL⁻¹)	Número Total de cél. (x10⁸ cel)	Viabilidade (%)	DO
0	7,279	0,20	0,40	95,78 ± 0,57	0,000
12	7,547	0,31 ± 0,02	0,60 ± 0,04	95,19 ± 2,29	0,090 ± 0,005
24	7,297	0,49 ± 0,04	0,93 ± 0,07	96,91 ± 1,46	0,044 ± 0,002
36	7,087	0,90 ± 0,04	1,68 ± 0,08	98,29 ± 0,85	0,085 ± 0,014
48	6,886	1,57 ± 0,09	2,82 ± 0,17	98,59 ± 0,07	0,294 ± 0,011
60	6,821	1,94 ± 0,01	3,40 ± 0,02	97,30 ± 0,56	0,530 ± 0,018
72	6,785	2,44 ± 0,09	4,14 ± 0,01	95,56 ± 0,36	0,860 ± 0,036
84	6,732	2,38 ± 0,02	3,92 ± 0,43	88,96 ± 0,39	1,037 ± 0,041
96	6,745	1,95 ± 0,02	3,13 ± 0,26	75,98 ± 0,71	1,139 ± 0,142

Tabela B-2: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada com o meio de cultivo SFM.

Tempo (h)	Glicose (mmol L⁻¹)	Lactato (mmol L⁻¹)	Glutamina (mmol L⁻¹)
0	16,50	0	3,754
24	14,80	7,3	-
36	11,60	12,7	2,86
48	7,76	14,6	-
60	5,43	12,7	1,767
72	3,70	12,2	1,035
84	3,52	11,4	0,575
96	3,26	10,5	0,301

Parte 2 - Cultivo em Batelada Alimentada

Biorreator 1 – S1

Tabela B-3: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada alimentada para o S1 com o meio de cultivo SFM.

Tempo (h)	pH sobren.	Volume Biorretor (mL)	Concent. ($\times 10^5$ cel mL⁻¹)	Número total de cél. ($\times 10^7$ cel)	Viabilidade (%)	DO
0	-	50,0	2,00	1,00	90,00 \pm 0,57	0
24	7,239	44,0	4,04 \pm 0,04	1,90 \pm 0,02	86,83 \pm 0,81	0,281 \pm 0,011
36	7,139	41,0	6,33 \pm 0,55	2,78 \pm 0,24	89,41 \pm 0,12	-
48	7,029	38,0	6,89 \pm 0,01	2,82 \pm 0,01	85,09 \pm 2,26	0,452 \pm 0,014
60	7,094	35,0	6,63 \pm 0,10	3,21 \pm 0,06	86,34 \pm 0,62	0,488 \pm 0,018
72	7,063	54,2	6,45 \pm 0,30	3,73 \pm 0,17	83,60 \pm 0,77	0,555 \pm 0,001
84	7,185	86,0	5,55 \pm 0,02	4,91 \pm 0,02	86,75 \pm 1,75	0,614 \pm 0,026
96	7,163	46,4	5,98 \pm 0,30	3,39 \pm 0,17	87,17 \pm 2,47	0,658 \pm 0,052
108	7,207	55,9	5,24 \pm 0,08	3,58 \pm 0,06	83,81 \pm 0,28	0,659 \pm 0,035
120	7,176	41,1	4,81 \pm 0,36	2,34 \pm 0,17	82,33 \pm 2,15	0,533 \pm 0,056
132	7,274	48,7	4,65	2,26	79,72	0,546 \pm 0,065
144	7,229	58,1	3,51 \pm 0,01	2,04 \pm 0,01	78,94 \pm 0,61	-

Tabela B-4: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada alimentada para o S1 com o meio de cultivo SFM.

Tempo (h)	Glicose S1 (mmol L⁻¹)	Lactato S1 (mmol L⁻¹)	Glutamina S1 (mmol L⁻¹)
0	16,5	0	3,754
12	-	-	-
24	14,5	3,36	3,189
36	13,3	4,02	-
48	12	4,84	2,297
60	11,8	3,97	-
72	11,2	4,08	2,254
84	12,1	2,91	-
96	11,3	2,83	2,4
108	12,2	2,33	2,699
120	12,1	2,19	2,598
132	12,1	1,42	2,871
144	12,2	1,01	2,8

Biorreator 2 – S2

Tabela B-5: Dados obtidos por meio do cultivo em batelada alimentada para o S2 com o meio de cultivo SFM.

Tempo (h)	pH sobren.	Volume Biorreator (mL)	Concent. ($\times 10^6$ cel mL⁻¹)	Número total de cél. ($\times 10^7$ cel)	Viabilidade (%)	DO
0	-	50,0	0,2	1,00	90,00	-
12	7,605	47,0	0,31 \pm 0,01	1,46 \pm 0,04	93,67	-
24	7,496	44,0	0,42 \pm 0,02	1,84 \pm 0,07	90,98 \pm 1,09	0,025 \pm 0,04
36	7,400	41,0	0,62 \pm 0,10	2,53 \pm 0,40	91,68 \pm 0,85	-
48	7,245	38,0	0,95 \pm 0,04	3,61 \pm 0,14	93,83	0,292 \pm 0,032
60	7,049	46,1	1,47 \pm 0,16	6,78 \pm 0,73	94,02 \pm 0,07	0,585 \pm 0,010
72	7,030	54,4	1,31 \pm 0,01	7,14 \pm 0,05	93,50 \pm 0,20	0,676 \pm 0,019
84	7,124	65,6	1,12 \pm 0,03	7,34 \pm 0,19	93,93 \pm 0,64	0,753 \pm 0,088
96	7,080	37,5	1,17 \pm 0,03	4,39 \pm 0,10	94,09 \pm 0,72	0,827 \pm 0,015
108	7,145	44,4	1,36 \pm 0,03	6,02 \pm 0,14	92,96 \pm 0,64	0,723 \pm 0,033
120	7,052	69,8	1,32 \pm 0,07	9,21 \pm 0,50	93,05 \pm 0,22	0,870 \pm 0,041
132	7,084	75,9	1,21 \pm 0,02	9,19 \pm 0,14	93,45 \pm 0,45	0,753 \pm 0,008
144	7,039	97,8	1,12 \pm 0,01	10,9 \pm 0,01	94,61 \pm 0,65	0,767 \pm 0,038

Tabela B-6: Análise do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato do cultivo em batelada alimentada para o S2 com o meio de cultivo SFM.

Tempo (h)	Glicose S2 (mmol L⁻¹)	Lactato S2 (mmol L⁻¹)	Glutamina S2 (mmol L⁻¹)
0	18,9	0	3,754
12	16,6	1,75	-
24	14,8	3,91	3,143
36	13,4	5,82	-
48	10,6	8,99	2,178
60	8,91	13	-
72	8,58	12,8	1,156
84	9,97	11	-
96	9,1	11,5	1,678
108	9,79	10,5	2,013
120	8,84	12	1,836
132	9,41	11,2	1,953
144	9,12	12	2,02