



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

INSTITUTO BIOMÉDICO – IB

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA – DMP

CAROLINA MORAES DE SOUZA

OTIMIZAÇÃO DA CULTURA DE LINFÓCITOS T HUMANOS

Rio de Janeiro

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

INSTITUTO BIOMÉDICO – IB

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA – DMP

CAROLINA MORAES DE SOUZA

OTIMIZAÇÃO DA CULTURA DE LINFÓCITOS T HUMANOS

Monografia apresentada junto ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de Imunologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2019

SOUZA, Carolina Moraes

Otimização da cultura de linfócitos T humanos – Rio de Janeiro, 2019.

59 f.

Monografia – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Biomédico, 2019.

Orientadora: Profa. Dra. Cleonice Alves de Melo Bento

1. Linfócito T 2. Cultura de células 3. Fed-Batch 4. Estratégias de agitação 5. Perfusão

I. Bacharel

CAROLINA MORAES DE SOUZA

OTIMIZAÇÃO DA CULTURA DE LINFÓCITOS T HUMANOS

Monografia apresentada junto ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de Imunologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: _____ de _____ de 2019

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cleonice Alves de Melo Bento

Dr. Agostinho de Lima e Silva

MSc. Lana Márcia Ferreira Lopes

“If I see anything vital around me, it is precisely that spirit of adventure, which seems indestructible and is akin to curiosity.”

Marie Curie

Madame Curie: A Biography – Eve Curie

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Prof. KiriLynn Svay por ter me oferecido a oportunidade de trabalhar com ela e sua equipe neste projeto. Também aos alunos que trabalharam comigo ao longo do verão de 2018 no BSUITE program. Devo um agradecimento, principalmente, para a Carolina de 2016, por não ter desistido de um sonho antigo. Apesar de ter ouvido de todos os lados que não daria certo e que era muito difícil. Todos os contratempos foram uma oportunidade para crescer e aprender que nossos sonhos devem ser conquistados. Não podemos desistir no primeiro não que ouvimos da vida. Devo também os mais sinceros agradecimentos à Prof. Cleo por toda a paciência e carinho, e por ter aceitado encarar esse projeto comigo. Por fim, gostaria de agradecer a minha mãe e meus amigos por todo o apoio e paciência, esses 4 anos sem vocês teriam sido muito mais difíceis.

RESUMO

O surgimento de terapias imunocelulares trouxe além de esperança para pacientes oncológicos, novos desafios. Apesar de promissoras, essas intervenções apresentam inúmeras limitações, entre elas, destaca-se o longo tempo demandado para sua preparação. Ademais, o cultivo sustentável de células humanas biologicamente viáveis é desafiador. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar parâmetros físicos e químicos de células de linhagem linfocítica mantidas em cultura sob diferentes condições experimentais. Nas estratégias de agitação, as culturas mantidas à 105 rpm apresentaram o melhor desempenho no que diz respeito à densidade de células viáveis. No entanto, células mantidas à 85 rpm apresentaram circularidade superior. A concentração do íon Na^+ foi significativamente maior nos frascos de cultura mantidos à 85 rpm quando comparado à 105 rpm. A concentração de amônia, foi significativamente superior em culturas expostas à agitação alternada quando comparada a velocidade de 105 rpm. Observou-se que, enquanto a osmolaridade aumenta, o pH diminui ao longo do tempo de cultura, tendo esse apresentado uma redução significativamente maior no grupo exposto à agitação a 105 rpm. Estratégias de nutrição distintas também impactaram nos parâmetros físicos e químicos da linhagem de células Jurkat. A densidade de células viáveis foi maior no grupo sob a estratégia de perfusão. A viabilidade celular no grupo sob perfusão se manteve acima de 90% durante todo o experimento, enquanto no grupo sob *Fed-Batch* observou-se uma redução, e a mesma ficou próxima de 60%. Destaca-se uma menor diminuição na circularidade celular no grupo submetido à perfusão, fenômeno também observado no diâmetro celular desse grupo. A variação na concentração dos íons K^+ e Na^+ foi significativamente menor no grupo submetido à perfusão. As culturas sob *Fed-Batch* apresentaram flutuações menos drásticas no que diz respeito às concentrações de glicose e glutamina. A estratégia de perfusão apresentou concentração de amônia menor que *Fed-Batch* entre os dias 2 e 5, e maior entre os dias 6 e 9. Ademais, o pH da cultura submetida à perfusão sofreu menor redução. O grupo sob perfusão apresentou menor redução na osmolaridade. Portanto, no geral, o melhor desempenho foi obtido pelas células submetidas à perfusão. Tendo em mente o desenvolvimento de terapias imunocelulares, a velocidade de agitação ótima é 85 rpm, pois além de maior percentual de células viáveis, a morfologia dessas células foi menos afetada.

Palavras-chave: Linfócito T. Cultura de células. Fed-Batch. Perfusão. Estratégias de agitação.

ABSTRACT

The development of cell-based therapies brought new horizons and challenges. Although promising, these interventions present many limitations, among those, one can be highlighted: manufacturing. Furthermore, culturing viable human cells is challenging. The main goal of the study was to evaluate chemical and physical parameters of a lymphocytic cell lineage kept under different conditions. On the agitation strategies, flasks kept under 105 rpm agitation had the best performance when it comes to viable cell density. Though, flasks kept under 85 rpm agitation presented better cell circularity. Na^+ concentration was significantly higher on flasks under 85 rpm compared to 105 rpm. Ammonia concentration was significantly superior on flasks kept on alternated agitation compared to 105 rpm. We can highlight that osmolality increases and pH decreases over time. The pH presented a significant decrease on the flasks exposed to 105 rpm agitation. Nutrition strategies also impacted on physical and chemical parameters of Jurkat cell line. Viable cell density was significantly higher on flasks under perfusion. Cell viability was kept over 90% during the whole experiment on the flasks under perfusion, when flasks under Fed-Batch decreased to around 60% viability. We noticed a smaller decrease on cell circularity and cell diameter on flasks under perfusion. The fluctuation on K^+ and Na^+ levels was significantly smaller on flasks under perfusion. Flasks under Fed-Batch presented smaller fluctuations when it comes to glucose and glutamine concentrations. Flasks under perfusion presented lower ammonia concentration between days 2 and 5 when compared to Fed-Batch. Although, between days 6 and 9 presented higher levels when compared to Fed-Batch. Furthermore, flasks under perfusion presented a smaller lowering of pH level. The osmolality had a smaller decrease on flasks under perfusion. Therefore, the best performance was achieved by flasks under perfusion. Having in mind the development of cell-based therapies, the optimal agitation speed is 85 rpm, once it presented a higher cell viability and cell morphology was less affected.

Keywords: T cell. Cell culture. Fed-Batch. Perfusion. Agitation strategies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática dos domínios do CAR.	17
Figura 2. Frasco de cultura Spinner Corning® ProCulture®	21
Figura 3. Biorreator sistema WAVE200®.	22
Figura 4. Representação esquemática de um biorreator.	23
Figura 5. Gráfico representando o padrão de comportamento concentração-tempo da biomassa, substrato e produto em um biorreator em operação Batch	25
Figura 6. Estratégias de agitação nos parâmetros físicos de células mantidas em suspensão.	33
Figura 7 Análise das concentrações de Na ⁺ (A) e K ⁺ (B) em função da velocidade de manutenção de células Jurkat.	34
Figura 8. Análise das concentrações glutamina, glutamato e glicose em função do tempo e da velocidade de manutenção de células Jurkat.	35
Figura 9. Análise das concentrações de amônia e lactato em função do tempo e da velocidade de manutenção de células Jurkat	36
Figura 10. Influência da velocidade de manutenção da suspensão celular na osmolaridade e pH da cultura	37
Figura 11. Estratégias de manutenção nos parâmetros físicos de células mantidas em suspensão.	39
Figura 12. Análise das concentrações de Na ⁺ (A) e K ⁺ (B) em função da estratégia de manutenção de células Jurkat.	40
Figura 13 Análise da concentração de glicose em função do tempo e da estratégia de manutenção de células Jurkat.	41
Figura 14. Análise das concentrações glutamina e glutamato em função do tempo e da estratégia de manutenção de células Jurkat.....	42
Figura 15. Análise das concentrações de amônia e lactato em função do tempo e da velocidade de manutenção de células Jurkart	43
Figura 16. Influência da estratégia de manutenção da suspensão celular na osmolaridade e pH da cultura.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – Célula apresentadora de antígeno (do inglês, *Antigen presenting cell*)
- ATP – Trifosfato de adenosina
- CAR – Receptor de antígeno quimérico (do inglês, *Chimeric antigen receptor*)
- CAR-T – Receptor de antígeno quimérico de célula T (do inglês, *T cell chimeric antigen receptor*)
- CD3 – Cluster de diferenciação 3 (do inglês, *Cluster of differentiation 3*)
- CD4 – Cluster de diferenciação 4 (do inglês, *Cluster of differentiation 4*)
- CD8 – Cluster de diferenciação 8 (do inglês, *Cluster of differentiation 8*)
- CD19 – Cluster de diferenciação 19 (do inglês, *Cluster of differentiation 19*)
- CD25 – Cluster de diferenciação 25 (do inglês, *Cluster of differentiation 25*)
- CD28 – Cluster de diferenciação 28 (do inglês, *Cluster of differentiation 28*)
- CD39 – Cluster de diferenciação 39 (do inglês, *Cluster of differentiation 39*)
- CD134 – Cluster de diferenciação 134 (do inglês, *Cluster of differentiation 134*)
- CD137 – Cluster de diferenciação 137 (do inglês, *Cluster of differentiation 137*)
- CHO – Célula de ovário de hamster chinês
- CRISPR/Cas9 – Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/ Caspase 9
- CTL – Linfócito T citotóxico (do inglês, *Cytotoxic T lymphocyte*)
- CTLA-4 – Proteína associada ao linfócito T citotóxico 4 (do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)
- DC – Célula dendrítica (do inglês, *Dendritic cell*)
- FasL – Fas ligante
- FDA – U.S. Food and Drug Administration
- FoxP3 – do inglês, *Forkhead box P3*
- GluR3 – Receptor de glutamato subunidade 3
- IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase
- IFN- γ – Interferon gama
- Ig – Imunoglobulina
- IL – Interleucina

k_{La} – Coeficiente de transferência de massa de oxigênio

NK – Assassina natural (do inglês, *Natural killer*)

nTreg – Célula T reguladora natural

MHC – complexo maior de histocompatibilidade (do inglês, *Major histocompatibility complex*)

OTR – Taxa de transferência de oxigênio (do inglês, *Oxygen transfer rate*)

PD-1 – Proteína de morte celular programada 1 (do inglês, *Programmed cell death protein 1*)

scFv – Fragmento variável de cadeia única (do inglês, *single-chain variable fragment*)

T-bet – Fator de transcrição T-box

Tc-1 – Linfócito citotóxico 1

TCR – Receptor de célula T (do inglês *T cell receptor*)

TGF- β – Fator β de crescimento transformado

Th1 – Linfócito T helper 1

Th17 – Linfócito T helper 17

Tr-1 – Linfócito T regulatório 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Breve histórico	11
1.2. Resposta imune tumoral e mecanismos de escape	12
1.3. Mecanismos de escape imune pelas células tumorais	14
1.4. CAR-T como tecnologia para elevar imunogenicidade anti-tumoral	15
1.5. Cultivo de células em larga escala	19
1.6. Bioreatores	23
1.7. Limitações	26
2. OBJETIVO	28
2.1. Geral	28
2.2. Específicos	28
3. METODOLOGIA	28
3.1. Experimento 1	29
3.1.1. Estratégia de agitação	30
3.2. Experimento 2	30
3.2.1. Estratégia <i>Fed-Batch</i>	30
3.2.2. Estratégia Perfusão	31
3.3. ViCELL®	31
3.4. NOVA®400	31
3.5. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Estratégia de agitação sobre parâmetros físicos e químicos das células Jurkat	32
4.2. Impacto da manutenção de células em condições de <i>Fed-Batch</i> e perfusão sobre parâmetros físicos e químicos	37
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

A imunoterapia celular tem recebido grande destaque na área de saúde humana devido a sua ampla aplicação no tratamento de diferentes condições clínicas, tais como neoplasias e autoimunidade. Isso se dá pelos resultados promissores obtidos em ensaios pré-clínicos e clínicos. Desde a aprovação dos primeiros medicamentos utilizando células T humanas pelo FDA (do Inglês *Food and Drug Administration*) no ano de 2017 (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017a, 2017b), grandes investimentos têm sido feitos com o objetivo de aprimorar a tecnologia para melhorar o sucesso terapêutico a longo prazo através da modulação do sistema imunológico dos pacientes (ANDROULLA; LEFKOTHEA, 2018; GAUTHIER; YAKOUB-AGHA, 2017; GILL; MAUS; PORTER, 2016). Um dos grandes avanços tem sido a produção de células T que expressam receptores de antígenos (TCR, do Inglês *T cell receptor*) modificados, denominados CAR (do Inglês *chimeric antigen receptor*). A expressão de CAR em células T tem como objetivo elevar a eficiência do reconhecimento e morte das células neoplásicas malignas, tendo importante impacto na sobrevida dos pacientes.

As empresas dedicadas à construção dessas terapias celulares têm também tentado otimizar as condições de cultura para conseguir aumentar o rendimento celular sem afetar a funcionalidade.

1.1. BREVE HISTÓRICO

A tecnologia envolvida no desenvolvimento de receptores quiméricos em células T (CAR-T), apesar de apenas ter recebido maior destaque nos últimos anos, teve início no final da década de 1980 (GASCOIGNE et al., 1987; KUWANA et al., 1987). Um grupo de pesquisadores do The Weizmann Institute of Science, localizado em Israel, desenvolveu no ano de 1989 o primeiro TCR quimérico funcional (GROSS; WAKS; ESHHAR, 1989). Para sua construção foram utilizados vetores genômicos com o construído CAR, transfectado em hibridoma de linfócitos T citotóxicos (CTLs, do Inglês *cytotoxic T lymphocytes*). Esse CAR-T foi construído a partir do domínio

constante do TCR fusionado ao um domínio variável de uma imunoglobulina (Ig) dirigido contra os antígenos tumorais (GROSS; WAKS; ESHHAR, 1989).

A primeira e grande vantagem do CAR é elevar a afinidade do reconhecimento antigênico dos tumores pelos CLTs. *In natura*, o reconhecimento de antígenos pelos TCR apresenta diferenças relevantes quando comparado a anticorpos. Essa diferença pode ser observada tanto no que diz respeito à afinidade quanto à avidéz da ligação. Ao contrário das ligações antígeno-anticorpo, que apresentam alta afinidade e especificidade, a interação do TCR com os complexos peptídeo antigênicos por meio das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) de classe I e II apresenta baixa afinidade. Conseqüentemente, a ativação das células T tumor-específicas via CAR é otimizada em decorrência do reconhecimento dos antígenos de forma direta e com grande avidéz e afinidade, (FENG et al., 2018; OREN et al., 2014). Essa imunointervenção pode ser mais eficaz em subverter os mecanismos de escape dos tumores ao ataque imune.

1.2. RESPOSTA IMUNE TUMORAL E MECANISMOS DE ESCAPE

Classicamente a reposta imune é capaz de conter o crescimento tumoral a partir das interações entre células da imunidade inata e adaptativa. No contexto da resposta imune natural, a presença de células apresentadoras de antígeno (APC, do Inglês *antigen presenting cells*), particularmente as células dendríticas (DCs, do Inglês *dendriect cells*) imunogênicas, é fundamental para indução de reposta imune específica anti-tumor (CAO; LIU, 2007; CARBONE; HEATH, 2003; FAZILLEAU; MCHEYZER-WILLIAMS; MCHEYZER-WILLIAMS, 2007).

As DCs são capazes de fagocitar, processar e apresentar os antígenos peptídicos tumorais acoplados às moléculas do MHC aos linfócitos T. Esse evento é considerado o primeiro sinal e garante que apenas células T específicas sejam majoritariamente recrutadas. No entanto, essas APCs maduras devem fornecer às células T outros dois sinais, segundo e terceiro, que são necessários para adequada

ativação desses linfócitos em fenótipos efetores (CAO; LIU, 2007; CARBONE; HEATH, 2003; FAZILLEAU; MCHEYZER-WILLIAMS; MCHEYZER-WILLIAMS, 2007).

O segundo sinal se dá pela ligação de moléculas da família B7 (CD80/CD86), expresso na superfície das DCs imunogênicas à molécula CD28, expresso constitutivamente na superfície dos linfócitos T. Esse sinal é independente do tipo de antígeno e permite a produção de interleucina (IL)-2 pelos linfócitos T antígeno-específicos, garantindo a linfoproliferação (DUSTIN et al., 2006; HENRICKSON; VONANDRIAN, 2007).

Seguindo a expansão clonal, o terceiro sinal será necessário para uma completa ativação das células T. Esse terceiro sinal é principalmente mediado através da secreção de citocinas pelas DCs conduzindo os linfócitos T ativados à diferenciação em diferentes fenótipos capazes de secretar padrões polarizados de citocinas que coordenam vários tipos de resposta imune. Dessa forma, no contexto da proteção contra tumores, a secreção de IL-12 pelas DCs induz a diferenciação das células T CD4⁺ em linfócitos T auxiliar 1 (Th1 – *T helper 1*) (FAZILLEAU; MCHEYZER-WILLIAMS; MCHEYZER-WILLIAMS, 2007; HENRICKSON; VONANDRIAN, 2007). Além disso, a IL-12 é capaz de suprimir a indução do fenótipo Th2, uma vez que é capaz de inibir a produção de IL-4 (VIGNALI; KUCHROO, 2012). A diferenciação das células em Th1 depende da capacidade da IL-12 de induzir a expressão do fator de transcrição T-bet (*T-box transcription factor*) (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Esse fenótipo é responsável pela secreção de grandes quantidades de IFN- γ e IL-2 e realizam a chamada resposta imune celular, por ativar fagócitos, células assassinas naturais (células NK – *natural killer*) e os linfócitos T CD8⁺. O IFN- γ aumenta não apenas o poder microbicida dos fagócitos (neutrófilos e macrófagos), mas também a função lítica das células NK, como também induz linfócitos B humanos a produzir IgG1 e IgG3 (MCKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2010).

Apesar da dependência das células Th1 para sua ativação e manutenção de memória, os linfócitos T CD8⁺ ativados, conhecidos como linfócitos T citotóxicos (CTL – *cytotoxic T lymphocytes*), são os protagonistas no controle do crescimento tumoral. Os CTLs, ao reconhecerem os antígenos peptídicos dos tumores acoplados às moléculas do MHC de classe I, induzem a morte do tumor por apoptose. Essa morte

envolve a ação coordenada dos produtos estocados nos grânulos citoplasmáticos dos CLTs, particularmente granzimas e perforinas (COQUERELLE; MOSER, 2010). Como os CTLs também secretam citocinas como o IFN- γ , esses linfócitos são capazes de amplificar as respostas Th1, sendo assim também chamados de Tc-1 (Tc-1, do Inglês *T cell cytotoxic- 1*) (OBAR; LEFRANÇOIS, 2010).

Infelizmente, os tumores têm desenvolvido diferentes estratégias para escapar do reconhecimento e/ou ataque imune, o que tem dificultado a cura de muitos cânceres.

1.3. MECANISMOS DE ESCAPE IMUNE PELAS CÉLULAS TUMORAIS

A habilidade do sistema imune em reconhecer a célula tumoral depende, de imediato, da expressão de peptídeos acoplados às moléculas do MHC (COULIE et al., 2014). Entretanto, para evadir o primeiro sinal, as células neoplásicas podem perder sua antigenicidade, que pode ser consequência da pressão seletiva do sistema imune, mutação da proteína antigênica ou mesmo perda na expressão das moléculas do complexo MHC (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

O acesso dos linfócitos tumor-específicos à massa tumoral é necessário para eficiente controle imune. Porém, sob a influência de fatores solúveis e cognitivos produzidos pelos tumores, linfócitos T que chegam no tumor podem ter seu comportamento alterado para favorecer o estabelecimento de um sítio “imunoprivilegiado” (MELLOR; MUNN, 2008). Por exemplo, a produção de IFN- γ pelos CTLs infiltrantes podem induzir a expressão da enzima chamada indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) no microambiente tumoral (SPRANGER et al., 2013). A IDO catalisa a degradação do triptofano, aminoácido essencial para manutenção da resposta imune celular anti-tumor (SPRANGER et al., 2013), gerando cinureninas, conhecidas em favorecer a expressão de marcadores de inibição linfocitária, tais como CTLA-4 e PD-1 (HOLMGAARD et al., 2013). A presença de ligantes para o CTLA-4, os membros da família B7, e do PD-1, o PD-L1, no ambiente tumoral irá inibir a função das CTLs tumor-específicas (HOLMGAARD et al., 2013). Adicionalmente, a produção da citocina fator β de crescimento transformado (TGF- β , do Inglês *Transforming*

growth factor beta) pelas células tumorais favorece a expansão de células T reguladoras, amplamente implicadas na progressão tumoral (JAKOWLEW, 2006).

As células T reguladoras são principalmente do tipo T CD4⁺ e são fundamentais para evitar reações de hipersensibilidade, mas quando em excesso, favorecem crescimento tumoral. Apesar de existirem ao menos três subtipos de T reguladoras, as Tregs naturais e induzidas e as células Tr-1, as nTregs têm sido o subtipo mais associado com pior desfecho quanto ao surgimento de metástase tumoral (TAKEUCHI; NISHIKAWA, 2016). As nTregs são identificadas pela alta expressão dos marcadores de superfície CD25 e CD39 e da proteína FoxP3 (do Inglês *forkhead winged helix*) no citossol (SHEVACH et al., 2006). As nTregs suprimem a proliferação e a função dos linfócitos T CD4⁺ efetores e dos CTLs por diferentes mecanismos, como por exemplo através da secreção de IL-10 e TGF- β (DIECKMANN et al., 2001; FALLARINO et al., 2003; GROHMANN et al., 2002; LEE et al., 2009; LEVINGS; SANGREGORIO; RONCAROLO, 2001; NAKAMURA et al., 2004; PICCIRILLO; SHEVACH, 2001; STEPHENS et al., 2001; WING et al., 2002). Tanto a IL-10 quanto o TGF- β inibem a expressão de moléculas co-estimuladoras e a secreção de citocinas inflamatórias pelas DCs imunogências, como também agem diretamente sobre os linfócitos T ativados, suprimindo sua proliferação e funções efetoras (GROUX et al., 1997; STROBL; KNAPP, 1999).

Diante do exposto, imunoterapia celular no controle tumoral, como por exemplo o CAR-T, deve ser capaz de subverter esses diferentes mecanismos de imunossupressão evidenciado em muitos cânceres.

1.4. CAR-T COMO TECNOLOGIA PARA ELEVAR IMUNOGENICIDADE ANTI-TUMORAL

Como previamente mencionado, a terapia usando linfócitos T que expressam receptores de antígeno quiméricos (CAR-T) consiste na modificação dos TCR das células T. Uma vez modificado, este linfócito T passa a estar capacitado a reconhecer o ligante do CAR, isto é, o antígeno tumoral, e em seguida eliminar as células transformadas de uma maneira independente do processo clássico de ativação imune (ZHAO et al., 2018). Apesar dos inúmeros estudos acerca do uso de CAR-T terem

iniciado na área de imunologia tumoral, alguns autores investigam o potencial dessa tecnologia no combate ao vírus da imunodeficiência humana (LIU et al., 2017; WAGNER, 2018; ZHEN et al., 2017). Além disso, tem sido discutido o uso de CAR-T no combate à doenças autoimunes, onde essas células poderiam atuar de diversas formas, seja direcionando células Treg para sítios de autoimunidade, ou pelo desenvolvimento de CAR direcionado à auto-anticorpos (MALDINI; ELLIS; RILEY, 2018).

A estrutura do CAR consiste em um domínio de ligação extracelular, região de dobradiça e os domínios transmembrana e intracelular (Figura 1). O domínio de ligação comumente deriva da região variável (scFv) de uma imunoglobulina murina ou humanizada (GAUTHIER; YAKOUB-AGHA, 2017). A expressão dessa molécula quimérica aumenta a sinalização intracelular dos linfócitos T, fazendo com que essas células sintetizem IL-2 e, conseqüentemente, proliferem (GAUTHIER; YAKOUB-AGHA, 2017; MILONE et al., 2009). A incorporação de moléculas co-estimuladoras às células T que expressam o CAR deu origem aos CAR de segunda geração. O CAR de segunda geração apresenta uma molécula CD28 acoplada à cadeia CD3 ξ , que contribui para o estímulo para a secreção de citocinas. Já existem CAR de terceira geração, que apresentam duas moléculas co-estimuladoras no seu domínio intracelular, também incorporadas às cadeias CD3 ξ . Além do CD28 foram incorporadas moléculas de CD137 e CD134, que (MILONE et al., 2009). Apesar de ainda não haver evidências de que a eficácia dos CAR de terceira geração sejam superiores aos de segunda geração, em modelos animais a incorporação de uma segunda molécula co-estimuladora contribuiu para o aumento na persistência dessas células (GAUTHIER; YAKOUB-AGHA, 2017; MILONE et al., 2009).

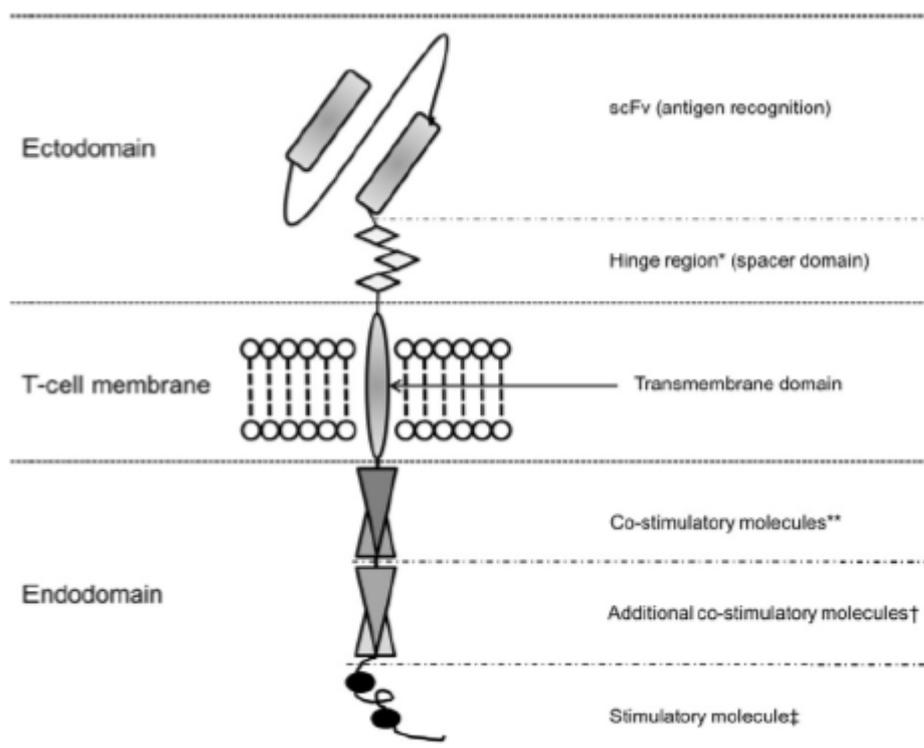


Figura 1. Representação esquemática dos domínios do CAR. (GAUTHIER; YAKOUB-AGHA, 2017).

CAR capacita uma célula T de responder a qualquer molécula de superfície para qual possa ser produzido um anticorpo. Isso confere à terapia vantagem sobre dois aspectos. Uma ampla gama de moléculas como proteínas, glicolipídeos e glicoproteínas podem ser alvos, e há uma independência do procedimento de processamento e apresentação de antígenos via MHC. Uma desvantagem é que antígenos exclusivamente intracelulares não podem ser reconhecidos pelos CAR-T. (RAPOPORT et al., 2015).

Quanto a imunogenicidade, Gross e colaboradores (GROSS; WAKS; ESHHAR, 1989) observaram que os linfócitos T transfectados com CAR parecem ser capazes de produzir níveis significativos de IL-2, o que resolve a questão da dependência do segundo sinal enviado pela DCs para garantir e perpetuar a proliferação e atuação das CTLs tumor-específicas.

A introdução do material genético para expressão do CAR deve ser realizada de forma segura e eficiente. São encontrados na literatura ampla variedade de vetores

virais e não virais para introdução do CAR. Entre as abordagens não-virais pode se destacar o transposon *Sleeping Beauty* e a plataforma CRISPR/Cas9 (GAUTHIER; YAKOUB-AGHA, 2017). Apesar das abordagens não-virais serem mais baratas e mais seguras, vetores retrovirais (STRONCEK et al., 2016) e lentivirais (SCHNEIDER et al., 2018) são muito usados. Ensaio clínico de longo prazo demonstram que esses vetores são seguros para uso em células T (SCHOLLER et al., 2012). Esses vetores alcançam células que não estão em divisão, são menos suscetíveis à degradação por mecanismos intrínsecos do hospedeiro e podem integrar sequências de DNA maiores. Vale ressaltar que as células transfectadas devem apresentar capacidade de expansão suficiente para subsequente aplicação clínica. Essas células uma vez infundidas devem ser capazes de migrar e atingir o tumor, aonde devem ser capazes de passar por mitoses adicionais sem perder sua habilidade de controlar o crescimento tumoral por longo tempo (GILL; MAUS; PORTER, 2016).

Atualmente existem apenas indicações de terapia com CAR-T para neoplasias de ordem hematológica. Entretanto, seu uso em tumores sólidos vem sendo investigado (ANDROULLA; LEFKOTHEA, 2018; GILL; MAUS; PORTER, 2016). O tratamento disponível no mercado, o tisagenlecleucel, tem sido indicado no controle de leucemia linfocítica aguda, linfoma de grandes células B e linfoma difuso de grandes células B. O CAR expresso apresenta especificidade para a molécula CD19, expressa pela maioria dos linfócitos B, exceto pelos plasmócitos (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORPORATION, 2017; WANG; WEI; LIU, 2012). De acordo com dados de uma busca realizada em 05/01/2019, no site clinicaltrials.gov, há 462 ensaios clínicos utilizando CAR-T em andamento (disponível no site https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=CAR-T&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt=).

Apesar de muito promissora, a terapia CAR-T ainda apresenta eventos adversos que levantam preocupações acerca de sua segurança. Têm sido relatados casos de hipersensibilidade associados a produção de elevados níveis de citocinas, com significativa neurotoxicidade (GAUTHIER; TURTLE, 2018; WANG; GUO; HAN, 2017). Devido a intensa lesão tumoral, manifestações metabólicas relacionadas a quadros de hiperuricemia, hipercalemia, hipercalcemia e hiperfosfatemia, conduzindo

a falência renal e respiratória aguda, ou até mesmo morte, têm sido descritas (ANDROULLA; LEFKOTHEA, 2018).

Adicionalmente, para que essa tecnologia seja aplicada à prática clínica de forma eficaz e segura, existe uma série de pré-requisitos a serem atendidos. O número de linfócitos T coletados do paciente, por meio de leucoférese, deve ser adequado de modo que viabilize a cultura. Alguns autores recomendam que no procedimento sejam coletadas entre 0.6×10^9 e 2×10^9 células CD3⁺, sendo ideal 2×10^9 linfócitos, o que viabiliza a criopreservação de células extras caso seja necessária uma segunda cultura (ALLEN et al., 2017; STRONCEK et al., 2016). Vale ressaltar que o tempo médio entre a leucoférese e o disponibilidade da terapia para o paciente é em média 113 dias (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORPORATION, 2017)

As técnicas para a expansão dessas células *in vitro* variam entre os centros de pesquisa. Autores reportam o uso de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, citocinas recombinantes humanas IL-2, IL-7, IL-12, entre outros (STRONCEK et al., 2016). Devido aos custos, a manutenção dessas células é um problema quando se tem em mente a produção dessa terapia em escala industrial atendendo aos pré-requisitos de agências reguladoras como o FDA (U.S. FOOD AND DRUG, 2018). Portanto, faz-se necessária a compreensão das condições ótimas para o cultivo de linfócitos T humanos, de modo a atender os requisitos de segurança e, ao mesmo tempo, a demanda da indústria. Atualmente, o custo desse tipo de terapia, para o paciente, varia entre \$373,000 e \$475,000 dólares por infusão, sem considerar custos de internação e terapias adjuvantes (ANDROULLA; LEFKOTHEA, 2018).

1.5. CULTIVO DE CÉLULAS EM LARGA ESCALA

A utilização de organismos vivos com o objetivo de obter produtos de interesse comercial existe desde a antiguidade. A biomanufatura está presente na agricultura, produção de energia, alimentos, materiais e na indústria farmacêutica. Zhang e colaboradores (ZHANG; SUN; MA, 2017) ressaltam a importância dessa modalidade no curso das três revoluções industriais. A partir dos avanços na área de

biotecnologia, o cultivo de células tornou-se além de uma ferramenta da pesquisa básica, um meio de produção. A partir do surgimento da tecnologia de DNA recombinante, células tornaram-se verdadeiras fábricas para a indústria. No ano de 1972, Jackson e colaboradores (JACKSON; SYMONS; BERG, 1972) desenvolveram a primeira sequência de DNA recombinante, onde foram combinados segmentos de genes do fago lambda e o operon galactose da *Escherichia coli* ao DNA do vírus Símio 40. Em 1978 Goeddel e colaboradores da Genentech conseguiram produzir insulina humana recombinante utilizando como sistema de expressão a *Escherichia coli*. Dez anos depois da descoberta dessa tecnologia, ano de 1982, o primeiro medicamento biológico do mundo chegou a mercado, a Humulin® produzida pela Eli Lilly™ (PAULOSE, 1999).

O cultivo de *Escherichia coli* para a produção de proteínas recombinantes ainda é representativo, e isso se dá a ampla compreensão da genética e fisiologia deste bastonete gram-negativo. Além disso, é uma bactéria com baixo tempo de geração e demandas nutricionais simples, o que torna a *Escherichia coli* o organismo preferencial para a produção de proteínas (FERRER-MIRALLES; VILLAVARDE, 2013; ZHANG; SUN; MA, 2017). Apesar de apresentar diversas vantagens, o uso de *Escherichia coli* na produção em larga escala de proteínas apresenta limitações. Por se tratar de um organismo procarioto e de baixa complexidade, a produção de proteínas complexas torna-se um desafio. Além disso, a necessidade de lise das células para a obtenção do produto acrescenta etapas adicionais ao processo de purificação, comumente chamado *downstream*. Finalmente, a presença de material tóxico resultante do metabolismo bacteriano e da liberação de toxinas exige etapas adicionais no *downstream*, o que eleva o custo e as perdas na produção (FERRER-MIRALLES; VILLAVARDE, 2013; ZHANG; SUN; MA, 2017).

No ano de 1980 a Amgen foi fundada com o objetivo de produzir Eritropoietina, uma proteína altamente glicosilada. A empresa foi pioneira na produção do primeiro medicamento biológico gerado em células de mamíferos (ZHANG; SUN; MA, 2017). As células de ovário de hamster chinês (CHO) são, atualmente, uma das mais utilizadas na indústria para a produção de proteínas recombinantes em larga escala. Essas células, diferente da *Escherichia coli*, são capazes de produzir proteínas

complexas (FAN; LEY; ANDERSEN, 2018). A existência de uma estrutura para a realização de modificações pós-traducionais é essencial para produzir proteínas que apresentam glicosilações e pontes dissulfeto em sua estrutura (FERRER-MIRALLES; VILLAVERDE, 2013).

O procedimento de cultivo de células em larga escala tem início a partir do descongelamento de uma alíquota de células que se encontram criopreservadas no biobanco. Comumente cada empresa tem seu próprio biobanco. Essas células foram previamente modificadas geneticamente para expressar a proteína de interesse. A suspensão celular é repicada para volumes cada vez maiores até ser inserida em um biorreator de grande porte. Além dos frascos de cultura, são utilizados frascos *spinner* (Figura 2), *wave bags* (Figura 3). Essa fase do processo é denominada *scale-up*, ou *seed train*, e faz parte do processo denominado *upstream*. (WRIGHT et al., 2015)

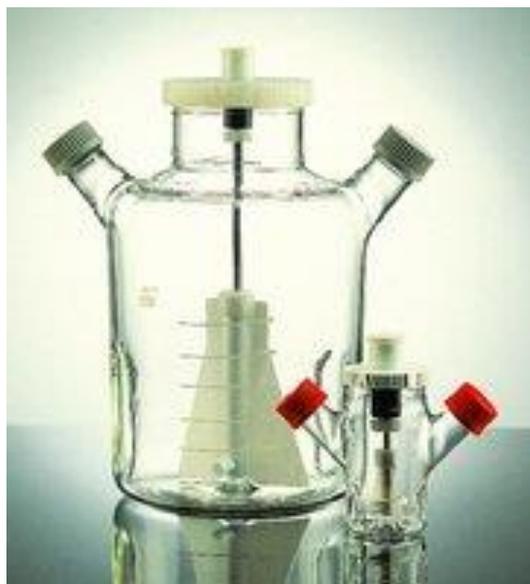


Figura 2. Frasco de cultura Spinner Corning® ProCulture® .(MERCK KGAA, 2019)



Figura 3. Biorreator sistema WAVE200®. (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, [s.d.]

Durante o processo de cultivo, as fases de crescimento são monitoradas, e divididas em três: a lag, a exponencial e a estacionária. No caso de cultura em suspensão, a exaustão do meio com acúmulo de metabólitos pode levar a uma quarta fase, a de morte. Nesse caso as células sofrem morte por apoptose a uma velocidade maior que a de crescimento, resultando, dessa forma, em um crescimento negativo. Portanto, no cultivo em larga escala, é importante o monitoramento do processo de modo a evitar que as células entrem em fase de morte (FRESHNEY, 2010). Além disso, conhecimento acerca do tempo de expansão da população, que varia entre os tipos celulares, é importante para determinar a taxa de crescimento e otimização dos processos (KERN et al., 2016).

Boas práticas de fabricação (cGMP, do Inglês *Current good manufacturing practices*) são os pilares da produção industrial de produtos biológicos. Em constante atualização, estas definem os requisitos mínimos quanto aos métodos e instalações para controle do processamento, produção e acondicionamento do produto final (U.S. FOOD AND DRUG, 2018). Devido a uma demanda cada vez mais crescente, o investimento da indústria para aprimorar a produção desses medicamentos, e amortecer o custo final, deve ser feito, pois nos Estados Unidos da América esses imunobiológicos representam 40% do lucro em medicamentos. Uma forma de reduzir

o custo da produção é a otimização do processo produtivo de forma que não afete as cGMPs (JACQUEMART et al., 2016). Nesse sentido, a utilização de biorreatores tem como objetivo diminuir o custo de todo o processo de produção de medicamento à base de células por meio do aumento da produtividade.

1.6. BIOREATORES

Biorreator é definido como um recipiente onde uma reação biológica ocorre (BHATIA, 2015). São utilizados amplamente na indústria de biotecnologia, que abrange desde a indústria de alimentos até a indústria farmacêutica. Existem diversos modelos de biorreatores que operam em configurações distintas. Esta primeira etapa, em que se desenvolve e executa a cultura é comumente denominada *upstream* (CHUNG et al., 2018). A operação mais utilizada na indústria de biotecnologia é em Batch, e o volume comportado por esses equipamentos pode variar de 250 mL a 75.000L (WARNOCK; AL-RUBEAI, 2006). A Figura 4 apresenta uma representação esquemática de um biorreator.

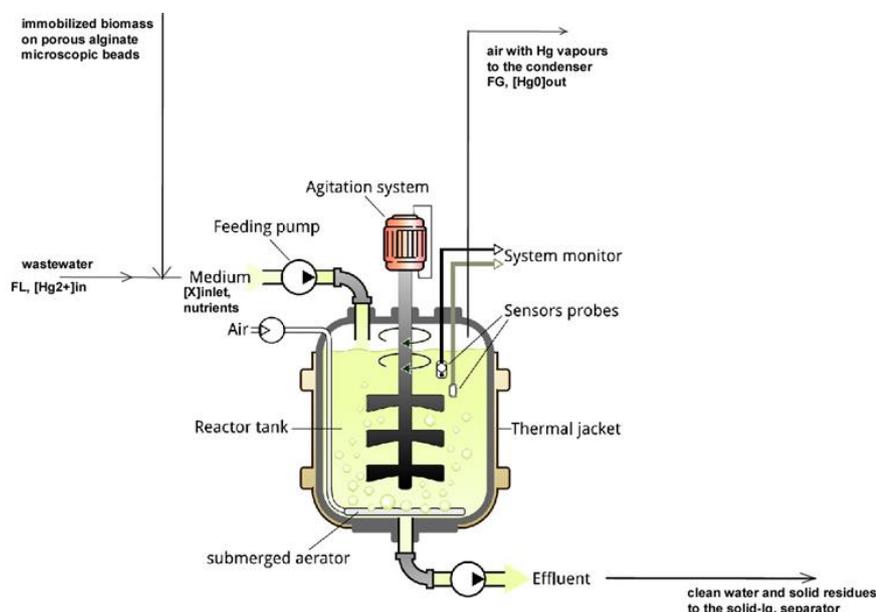


Figura 4. Representação esquemática de um biorreator. (MARIA, 2017)

Assim como o cultivo tradicional de células, biorreatores demandam assepsia minuciosa de modo a evitar a contaminação e consequente perda de, em muitos casos, centenas de litros de produto. Dependendo do produto de interesse, a contaminação é menor, como, por exemplo, os antibióticos. No entanto, o cultivo de células de mamíferos pode apresentar taxa de contaminação de até 17%, visto que trata-se de um cultivo lento em um meio nutritivo complexo (DORAN, 2013).

Biorreatores convencionais possuem sondas que avaliam em tempo real parâmetros de modo a garantir estabilidade nas condições ambientais as quais o inóculo é exposto. Comumente são monitorados o pH, a temperatura, o volume de ar injetado, a velocidade de agitação, quando existir agitação, e a concentração de O₂ na fase líquida. Devido a limitações estruturais, parâmetros mais complexos como a composição da biomassa, viabilidade celular, morfologia, concentração de íons, entre outros, não são analisados em tempo real. Para que essas variáveis sejam avaliadas, amostras são rotineiramente coletadas do bioreator e os parâmetros mais importantes analisados de acordo com a linhagem celular e produto de interesse. (DORAN, 2013) No caso de cultura de células de mamíferos, parâmetros comumente avaliados são a concentração de amônia, lactato, glutamina, glutamato, glicose, viabilidade celular e densidade celular. (AMANULLAH et al., 2010; TRUMMER et al., 2006)

No cultivo de células em biorreatores um dos substratos essenciais é o oxigênio. Desse modo, esses equipamentos fornecem oxigênio dissolvido para as células continuamente pelo processo de aeração. A dissolução do ar injetado ocorre por meio da agitação, que pode se dar de diversas formas, dependendo do tipo de biorreator. A agitação auxilia na dispersão de bolhas e propicia a transferência do oxigênio para a fase líquida, o que irá facilitar sua subsequente transferência para o interior das células em cultura. A taxa de transferência de oxigênio (OTR, do Inglês *oxygen transfer rate*) irá depender de propriedades físico-químicas do meio de cultura, parâmetros geométricos do biorreator e do número de células. A taxa de utilização de oxigênio (OUR, do inglês *oxygen utilization rate*) varia entre as células de acordo com suas demandas energéticas. O coeficiente de transferência de massa de oxigênio, ou kLa, tem um papel importante nos bioprocessos. Essa medida irá auxiliar na determinação de uma injeção de ar ideal, e uma concentração ótima de O₂ no

biorreator, de modo que este esteja disponível para atender as demandas das células em suspensão (DORAN, 2013; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, 2018)

A operação em Batch tem início a partir da adição do inóculo ao biorreator. O inóculo contém células de interesse e o meio de cultivo que melhor atende as mesmas. As células são mantidas no equipamento até se obtenha o máximo do produto de interesse como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 5. O tempo de operação do biorreator varia de acordo com o tipo celular utilizado. Durante o período de crescimento não são adicionados suplementos ao biorreator. São realizados apenas ajustes de pH e controle da espuma, além da obtenção de alíquotas do conteúdo para o monitoramento. Assim que a densidade alvo é atingida, todo o conteúdo do biorreator é drenado e segue para os processos de purificação. (DUNN et al., 2003)

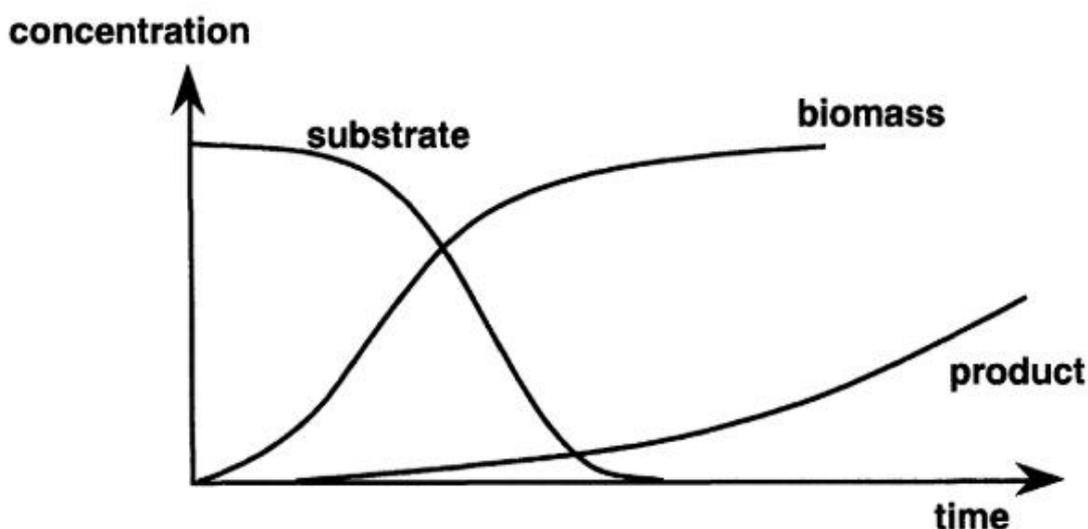


Figura 5. Gráfico representando o padrão de comportamento concentração-tempo da biomassa, substrato e produto em um biorreator em operação Batch (DUNN et al., 2003).

A operação chamada *Fed-Batch* consiste em um procedimento semelhante ao Batch, no entanto há a adição de substratos que irão prolongar o tempo de operação. Essa adição fornece às células suplementação nutricional. Isso permite maior crescimento e manutenção da viabilidade da cultura por um tempo prolongado, o que, conseqüentemente, aumenta a quantidade do produto final. A operação apresenta

uma flexibilidade no que diz respeito a adição de suplementos que pode se dar de três formas: adição constante da solução nutritiva; adição na fase exponencial de crescimento, de modo a maximizar a fase de crescimento exponencial; ou adição de substrato conforme a necessidade, sendo essa última aferida a partir do monitoramento da concentração de determinados componentes (DUNN et al., 2003).

O modo de operação contínuo, ou em perfusão, é um dos grandes objetivos atuais da indústria no que diz respeito a otimização do processo *upstream*. Apesar de terem surgido modelos de operação em perfusão nas décadas de 1980 e 1990, os mesmos apresentavam baixo kLa e limitações no que diz respeito a volumes maiores (KISS; GOTTSCHALK; POHLSCHEIDT, 2018).

1.7. LIMITAÇÕES

Toda célula para se manter viva e funcional necessita de uma fonte de energia para manter seu metabolismo. Para gerar energia, e biomassa, células animais dependem de moléculas orgânicas complexas. Esses precursores são convertidos em metabólitos. Os principais produtos finais do catabolismo são o ácido láctico, a amônia (NH_3), o dióxido de carbono (CO_2) e a água (H_2O) (NELSON; COX, 2014). Entre esses, no cultivo de células, dois recebem destaque, o ácido láctico e a amônia. Por mais de 60 anos pesquisadores têm tentado desenvolver métodos para minimizar a produção desses metabólitos. A manipulação do meio de cultura é uma estratégia, no entanto, deve se dar de forma cautelosa, visto que o aumento no número de células tem impacto direto na produção de amônia e ácido láctico, além de aumentar as necessidades nutricionais (FREUND; CROUGHAN, 2018). A adição maciça de suplementos nutricionais também não é recomendada visto o impacto significativo sobre a osmolaridade do meio de cultura, que pode impactar negativamente no crescimento e viabilidade das células (BERDUGO, 2010; PRICE, 2017). Dada a existência de efeitos significativos sobre o crescimento e produtividade celular, no caso de sistemas fechados como biorreatores em batch ou *Fed-Batch*, o acúmulo de metabólitos pode se tornar um problema (FREUND; CROUGHAN, 2018).

Portanto, entre as limitações para o cultivo em larga escala de células de mamíferos estão o acúmulo de metabólitos decorrentes do catabolismo celular, o

fornecimento limitado de oxigênio e a sensibilidade ao estresse por cisalhamento. Nesse sentido, é emergencial a otimização do processo e do equipamento de modo a fornecer maior sensibilidade para o monitoramento em tempo real da cultura. Atualmente, um dos principais desafios é desenvolver um sistema contínuo de cultivo em larga escala, que, no contexto de células vivas é difícil por se tratar de sistemas biológicos complexos (KARST et al., 2017; WARIKOO et al., 2012).

A sensibilidade de proteínas a degradação (VOGEL et al., 2012) e o impacto do estresse hidrodinâmico sobre as células levantam uma série de questionamentos acerca da melhor estratégia de cultivo em larga escala (BERDUGO, 2010). Portanto para que seja elaborado o biorreator ideal, devem ser levados em consideração fatores físicos e biológicos. Fatores físicos irão envolver a hidrodinâmica do recipiente, padrão de fluxo líquido, tempo de circulação, eficiência da distribuição de ar, k_{La} , entre outros. Todos esses fatores são afetados pela velocidade de agitação e pela estrutura de agitação, que pode se dar por *rocking*, no caso das *wave bags*, ou com o uso de *impellers*, que podem apresentar diversas formas e tamanhos. (DUNN et al., 2003) Wave bags têm sido utilizadas no processo de produção de terapias imunocelulares como o CAR-T, no entanto, apesar dos bons resultados, apresenta limitada escalabilidade (STEPHENSON; GRAYSON, 2018).

Os efeitos exercidos por uma plataforma contínua sobre o upstream podem afetar o produto, que pode sofrer degradação por uma série de mecanismos. Vale ressaltar que o impacto se dá também no *downstream*, visto que trata-se de volumes elevados constantemente na linha de purificação. (VOGEL et al., 2012)

O advento de terapias tendo como produto final células levanta diversas preocupações no que tange o processo de produção (CAMPBELL et al., 2015). Meios de cultura tradicionais foram originalmente desenvolvidos para linhagens de células tumorais. Desse modo, esses atendem de forma sub-ótima as necessidades de algumas linhagens de células humanas especializadas (PRICE, 2017). Além disso, os métodos convencionais utilizando biorreatores podem não ser ideais devido a maior sensibilidade ao estresse de cisalhamento de células humanas não transformadas. O estresse hidrodinâmico provocado pela agitação pode comprometer a função celular e induzir apoptose (BERDUGO, 2010). Portanto faz-se necessária a investigação das

condições ótimas para o cultivo de células T humanas, para que este conhecimento seja aplicado na otimização do processo produtivo de terapias como CAR-T.

2. OBJETIVO

2.1. GERAL

Avaliar o efeito de estratégias de cultivo distintas no rendimento de linhagens de células T humanas.

2.2. ESPECÍFICOS

☞ Determinar a influência de diferentes estratégias de agitação da suspensão celular sobre parâmetros físicos (densidade, circularidade, diâmetro e viabilidade celular) e químicos (valores de pH e as concentrações de amônia, lactato, glicose, glutamato e glutamina e de íons K^+ , Na^+ , além da osmolaridade) das células.

☞ Avaliar, de forma comparativa, o impacto das estratégias de manutenção *Fed-Batch* e perfusão sobre vários parâmetros físicos das células (diâmetro, densidade e circularidade celular);

☞ Determinar alterações em parâmetros químicos, como os valores de pH, concentração de íons K^+ e Na^+ , osmolaridade, concentrações de amônia, lactato, glicose, glutamato e glutamina, na suspensão celular mantidas em *Fed-Batch* ou em perfusão;

3. METODOLOGIA

A seção experimental do estudo, consistiu em 2 séries distintas de experimentos. Cada série objetivou analisar parâmetros distintos de modo a buscar

estratégias ótimas para o cultivo de células Jurkat, clone E6-1 (ATCC® TIB152™). As hipóteses foram formuladas a partir de dados obtidos previamente pelo grupo da professora KiriLynn Svay (dados não publicados). Ambos os experimentos tiveram duração de 10 dias. Os experimentos foram realizados no Amgen Bioprocessing Center localizado nas instalações do Keck Graduate Institute na cidade de Claremont, CA, Estados Unidos.

3.1. EXPERIMENTO 1

Foram utilizadas células Jurkat, clone E6-1 (ATCC® TIB152™) obtidas a partir de uma subcultura desenvolvida previamente pelo grupo da professora KiriLynn Svay conforme protocolo do fabricante (ATCC, 2018). Essas células, amplamente usadas em pesquisa, correspondem a uma linhagem de linfócitos T derivado de leucemia/linfoma de células T de adolescente. Para o nosso experimento, uma subcultura foi realizada com algumas alterações nas condições de cultivo. Todos os ensaios foram conduzidos utilizando frascos de cultura Erlenmeyer de 250 mL, tampa rosqueada com membrana filtrante acoplada Nalgene®, com volume de trabalho de 60 mL. Parâmetros físicos e químicos dessas culturas foram avaliados após suplementação da suspensão celular como se segue:

- ☞ 6mL de solução contendo 2g/L de glicose e 2mmol/L de glutamina no segundo dia de cultura;
- ☞ 6mL de solução contendo 4 g/L glicose e 4 mmol/L glutamina no quarto dia de cultura;
- ☞ 6mL de solução contendo 8 g/L glicose e 8 mmol/L glutamina no oitavo dia de cultura;

Durante todo o experimento os frascos foram mantidos na estufa à 37°C, 5% CO₂ em agitadores orbitais programados para trabalhar em diferentes rpm (rotação por minuto)

3.1.1. ESTRATÉGIA DE AGITAÇÃO

Foram definidas três estratégias a partir de resultados prévios do grupo (dados não publicados). Cada estratégia foi realizada em triplicata. Durante todos os dias do experimento foram retiradas alíquotas de aproximadamente 1,8 mL de cada frasco de cultura, para a realização das análises pelo ViCELL® e NOVA®. Os frascos foram mantidos na estufa à 37°C, 5% CO₂.

A primeira estratégia consistiu na agitação dos frascos de cultura à velocidade de 85 rpm durante os 10 dias de experimento em um agitador orbital, a segunda à velocidade de 105 rpm. A terceira e última estratégia consistiu na agitação alternada. A estratégia de agitação alternada consistiu em expor os frascos a diferentes velocidades de agitação ao longo da cultura. Entre o dia zero e dia 2, as células foram expostas à 85 rpm. Entre o terceiro e quinto dia de cultura essas células foram expostas à 105 rpm. A partir do sexto dia, a suspensão celular foi exposta à agitação de 65 rpm, condição mantida até o último dia do experimento.

3.2. EXPERIMENTO 2

Usando os frascos contendo 60 mL de células Jurkat, avaliamos o impacto de duas diferentes condições de manutenção, *Fed-Batch* e perfusão, no rendimento e qualidade celular. Cada condição foi realizada em triplicata. Durante todo o experimento os frascos foram mantidos na estufa à 37°C, 5% CO₂ em agitadores orbitais programados para trabalhar em agitação à 65 rpm.

3.2.1. ESTRATÉGIA *FED-BATCH*

A estratégia *Fed-Batch* consistiu na suplementação com alíquotas de solução composta por 8g/L de glicose e 8 mmol/L de L-glutamina. O equivalente a 10% do volume de trabalho, ou seja, 6 mL, era adicionado à cultura em dias alternados. Durante todos os dias do experimento foram retiradas alíquotas de aproximadamente 1,8 mL de cada frasco de cultura, para a realização das análises pelo ViCELL® e NOVA®.

3.2.2. ESTRATÉGIA PERFUSÃO

A estratégia de perfusão consistiu na substituição diária do meio de cultura recomendado pelo fabricante, RPMI-1640 ATCC®. Dado o modelo de cultura de células em suspensão, fez-se necessária a centrifugação prévia das células à 125 x g durante 5 minutos, de modo a formar um precipitado. Após o procedimento de centrifugação o meio era descartado. Em sequência eram adicionados ao frasco 60 mL do meio de cultura utilizado, RPMI-1640 ATCC®, e feita a ressuspensão das células. Durante todos os dias do experimento foram retiradas alíquotas de aproximadamente 1,8 mL de cada frasco de cultura, antes do procedimento de perfusão, para a realização das análises pelo ViCELL® e NOVA®.

3.3. VICELL®

Para a obtenção de dados referentes a densidade, viabilidade, celularidade e diâmetro celular, alíquotas de suspensão das células Jurkat foram diluídas em azul de trypan e analisadas pelo contador celular automatizando ViCELL XR®. Os dados apresentados foram analisados pelo software do equipamento.

3.4. NOVA®400

Para a realização da análise bioquímica das amostras foi utilizado equipamento automatizado NOVA®400. Esse equipamento consegue medir não apenas o pH e a osmolaridade, como também identificar vários analitos em suspensão, tais como: glicose, glutamato, glutamina, amônia (NH₄⁺), íon sódio (Na⁺), íon potássio (K⁺) e ácido láctico.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística dos resultados foi utilizado o software GraphPad Prism® 6. Foram construídos gráficos e, para avaliar a presença de diferenças entre os grupos experimentais ao longo do tempo foi realizado um ANOVA de dois critérios (two-way). Para realização de comparações múltiplas foi realizado pós-teste de Bonferroni nos parâmetros que apresentaram ANOVA com *p*

<0,05.

4. RESULTADOS

4.1. ESTRATÉGIA DE AGITAÇÃO SOBRE PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS CÉLULAS JURKAT

Como pode ser observada na Figura 6A-D quanto aos parâmetros físicos, apesar da densidade de células viáveis cair ao longo de todas as condições experimentais, o rendimento de células viáveis foi significativamente superior nas culturas mantidas a 105 rpm, quando comparado tanto a 85 rpm ($p < 0,05$), quanto a agitação alternada ($p < 0,01$) (Fig. 6B). No caso do percentual de células viáveis, 105 rpm mostrou ser melhor que a agitação alternada ($p < 0,05$) (Fig. 6A). Melhores resultados quanto à circularidade da célula foram observados quando os frascos foram mantidos na agitação de 85 rpm *versus* 105 rpm ($p < 0,05$) (Fig. 6C). Finalmente, nesse conjunto de análises, as estratégias de agitação não influenciaram o diâmetro das células ao final do experimento (Fig. 6D).

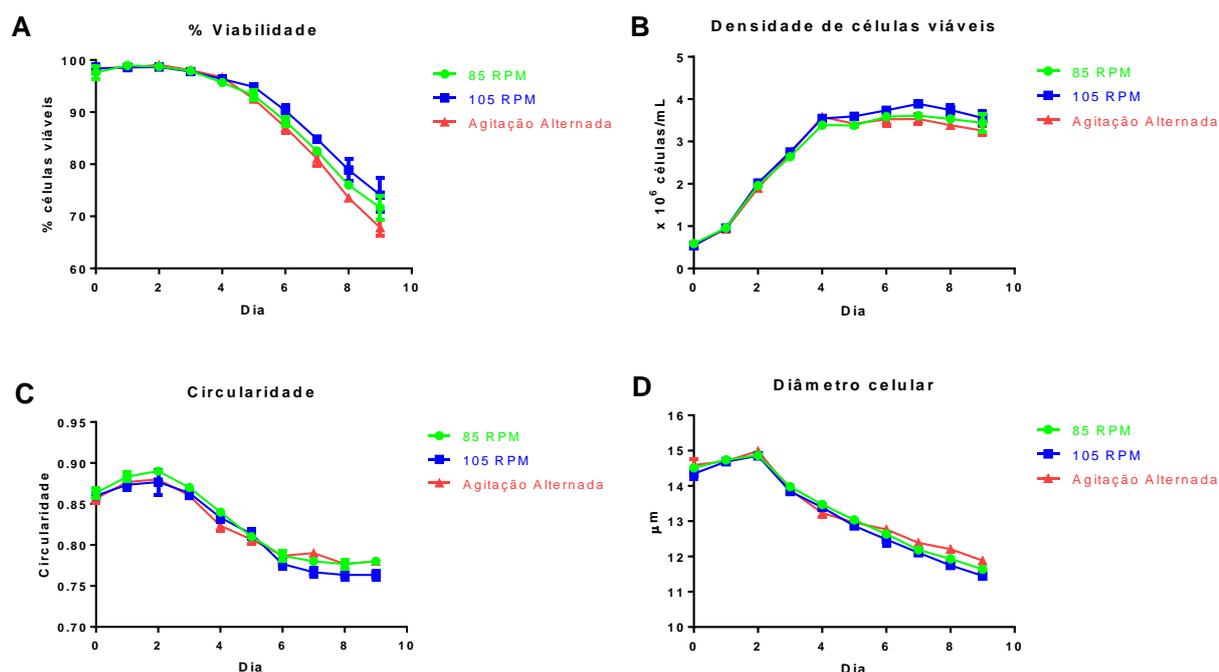


Figura 6. Estratégias de agitação nos parâmetros físicos de células mantidas em suspensão. Células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) foram mantidas por 10 dias sob agitação à 85, 105 rpm, ou alternada. Alíquotas da suspensão celular foram obtidas em diferentes dias e analisadas quanto a percentual de viabilidade (A), densidade de células viáveis (B), circularidade (C) e diâmetro celular (D). Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni.

Quanto à dosagem dos íons em suspensão, foi observada uma queda progressiva nas concentrações de Na^+ (Fig. 7A) e K^+ (Fig. 7B) entre os dias 3 a 5 pós cultura, com aumento progressivo até o último dia de análise (9 d), sem, no entanto, recuperar os mesmos valores dos tempos iniciais da cultura. A concentração do íon Na^+ foi significativamente maior nos frascos de cultura mantidos à 85 rpm quando comparado à 105 rpm ($p < 0,05$). A velocidade de agitação, no entanto, não impactou nas concentrações de K^+ . Ademais, nenhuma diferença no rendimento de glutamina (Fig. 8A), glutamato (Fig. 8B) e glicose (Fig. 8C) foi quantificada na suspensão das células mantida a diferentes velocidades. Os níveis de amônia acumulados, no entanto, foram significativamente superiores em tempos tardios das culturas mantidas à agitação alternada quando comparada a velocidade de 105 rpm ($p < 0,05$) (Fig. 9A). Nenhuma diferença entre a concentração de lactato foi observada entre os grupos (Fig. 9B). O coeficiente de variação da concentração de amônia apresentou variação

em intervalo curto (Fig. 9C). O coeficiente de variação do gráfico da concentração de lactato demonstrou uma queda ao longo do tempo, chegando próximo do zero (0,03) no 6 dia de experimento, mas com tendência a aumento discreto no 8º dia (Fig. 9D).

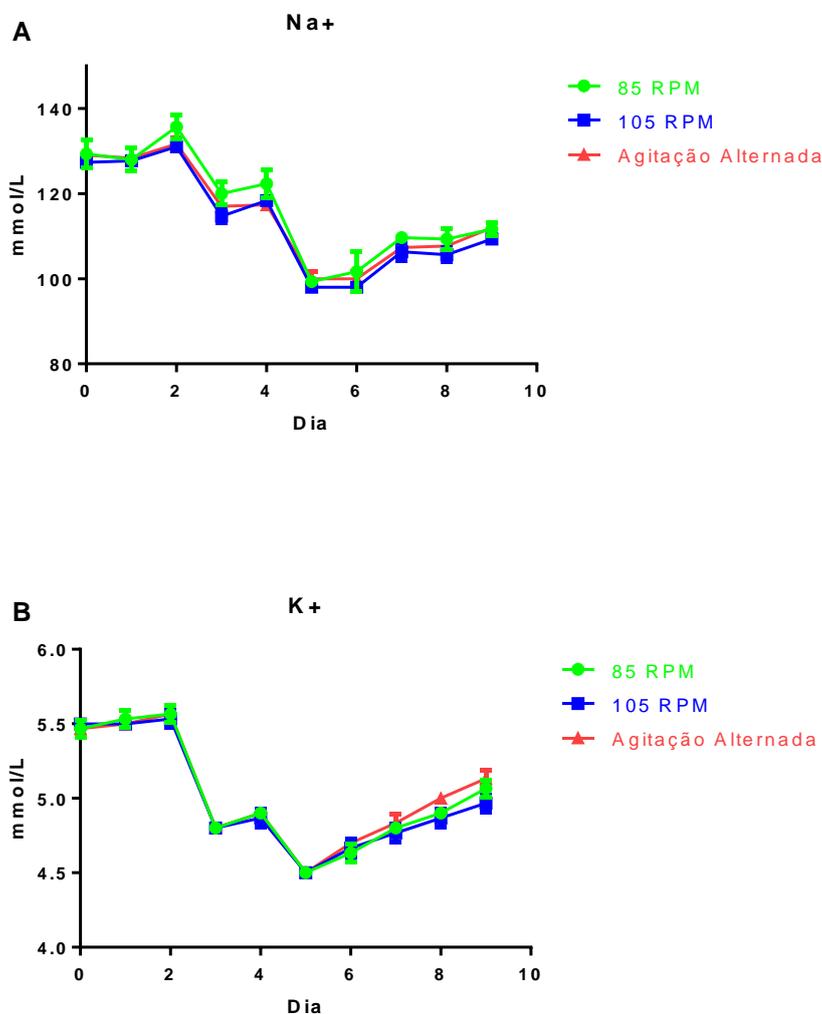


Figura 7 Análise das concentrações de Na⁺ (A) e K⁺ (B) em função da velocidade de manutenção de células Jurkat. Suspensão de células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) foram mantidas por 10 dias sob diferentes velocidades de agitação (rpm) e as concentrações dos íons Na⁺ (A) e K⁺ (B) em suspensão foram avaliadas em função do tempo. Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni.

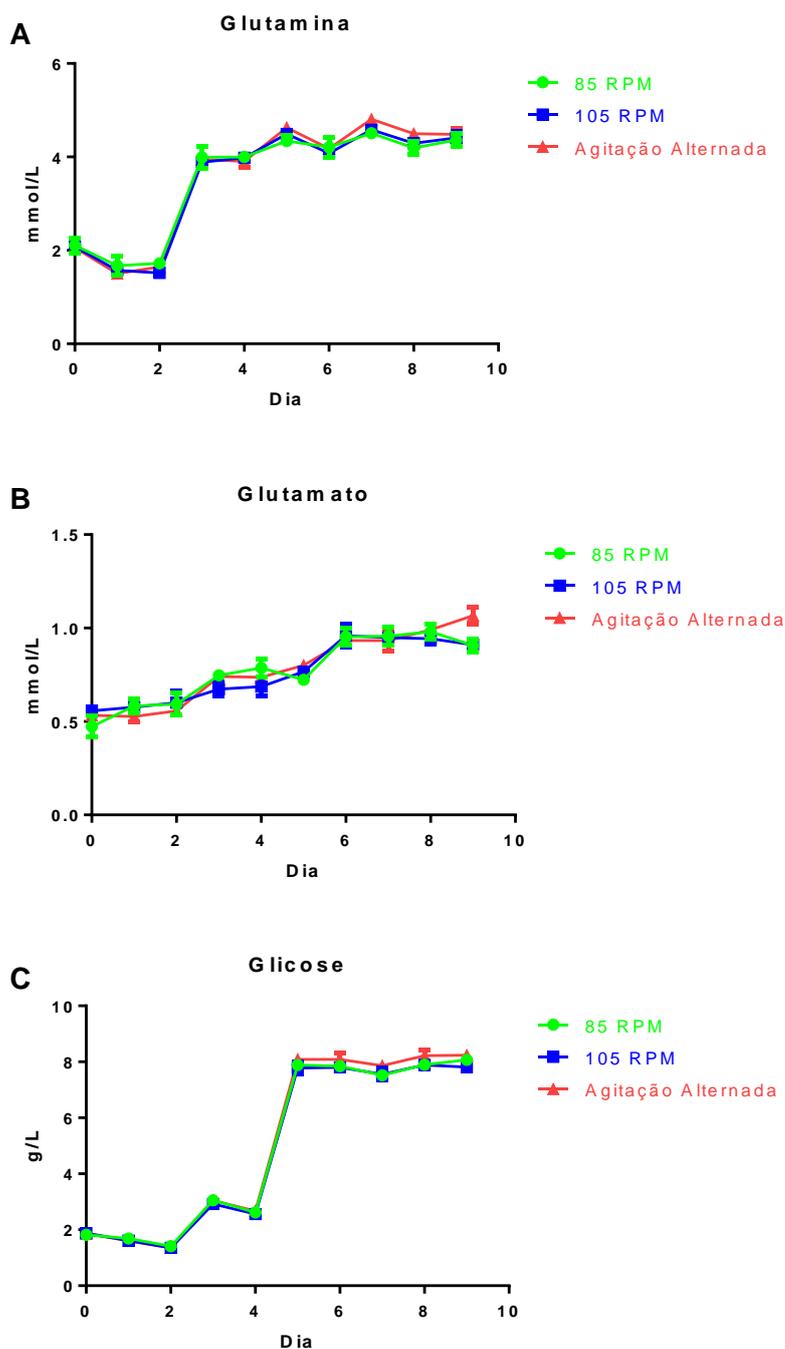


Figura 8. Análise das concentrações glutamina, glutamato e glicose em função do tempo e da velocidade de manutenção de células Jurkat. As concentrações de glutamina (A), glutamato (B) e glicose (C) foram quantificadas na suspensão de células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) mantidas por 10 dias sob diferentes velocidades de agitação (rpm). Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni

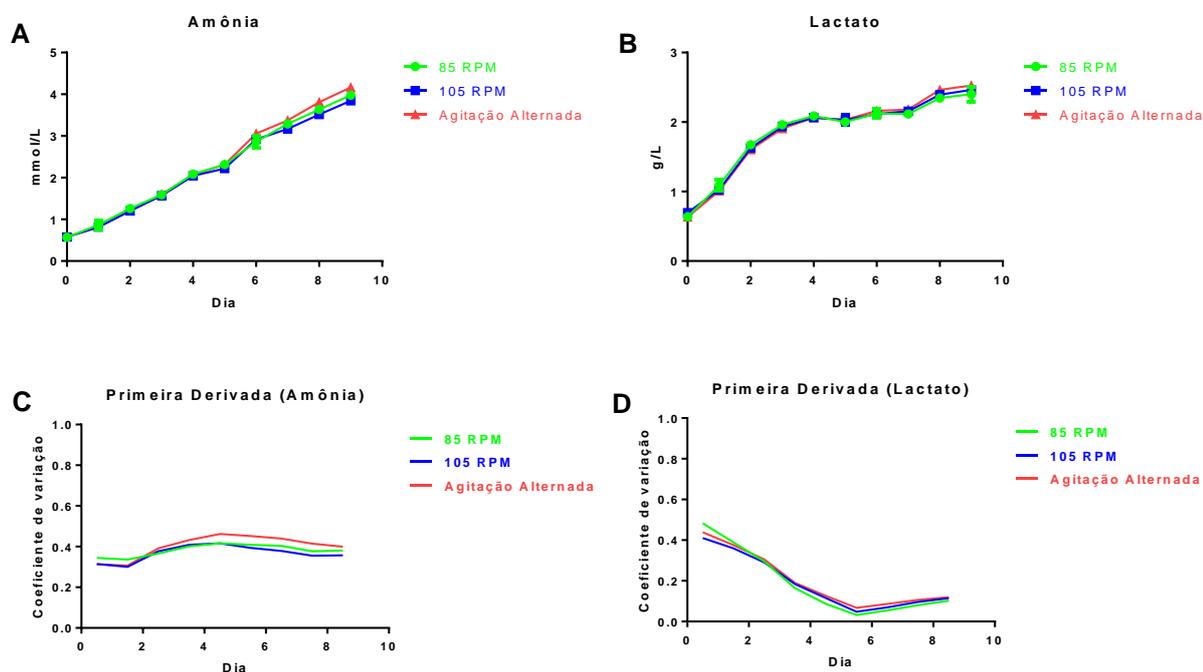


Figura 9. Análise das concentrações de amônia e lactato em função do tempo e da velocidade de manutenção de células Jurkat. As concentrações de amônia (A) e lactato (B), assim como as variações desses metabólitos (C e D) em suspensão de células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) foram avaliados sequencialmente até o nono dia de cultura de culturas mantidas sob diferentes velocidades de agitação (rpm). Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni.

Por fim, fechando esse conjunto de experimentos, observa-se que enquanto a osmolaridade aumenta (Fig 10A), o pH diminui ao longo do tempo de cultura (Fig. 10B). Quanto a influência da agitação sobre esses parâmetros, nós observamos uma diminuição no pH significativamente superior nas culturas de células Jurkat mantidas a 105 rpm *versus* agitação alternada ($p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos nas variações da osmolaridade (Fig. 10).

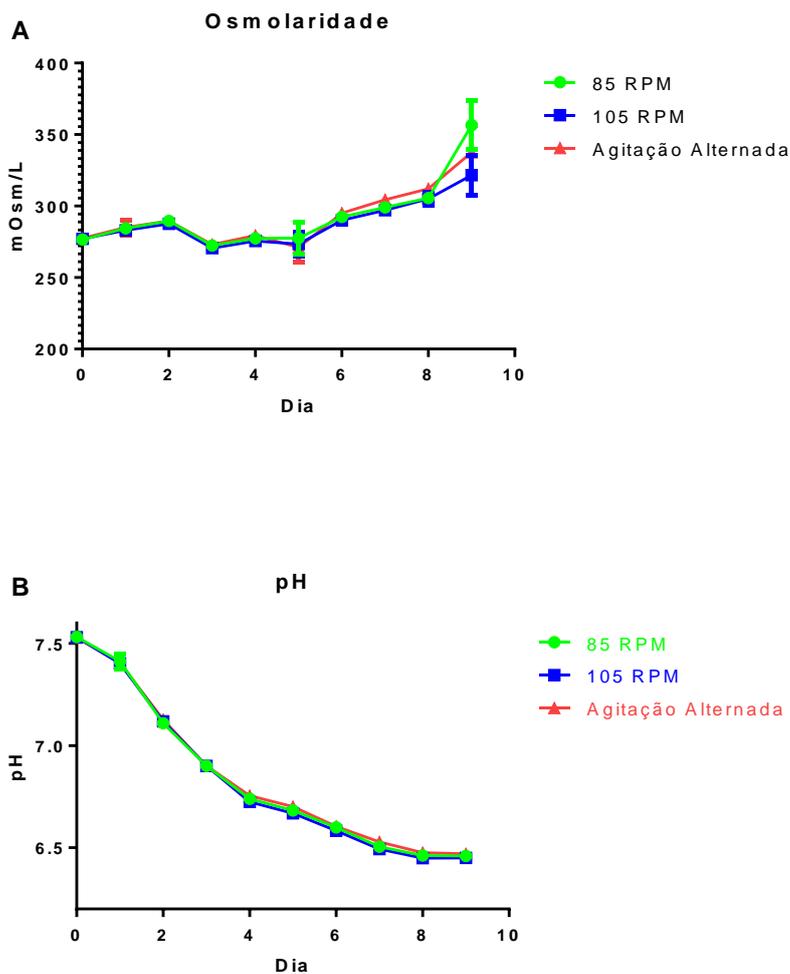


Figura 10. Influência da velocidade de manutenção da suspensão celular na osmolaridade e pH da cultura. As concentrações de amônia (A) e os valores de pH (B) foram avaliados em suspensão de células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) mantidas por 10 dias sob diferentes velocidades de agitação (rpm). Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni.

4.2. IMPACTO DA MANUTENÇÃO DE CÉLULAS EM CONDIÇÕES DE *FED-BATCH* E PERFUSÃO SOBRE PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS.

Este conjunto de experimentos avaliou o impacto das estratégias de *Fed-Batch* e perfusão sobre parâmetros físicos e químicos de células Jurkat em função do tempo de cultura. Como pode ser observada na figura 11A-D, a partir do 2^o ao 4^o dia de

cultura, as duas condições parecem influenciar, de forma significativa, os parâmetros físicos das células Jurkat. Na figura 11A, é notável que a densidade de células viáveis foi significativamente maior no grupo sob a estratégia de perfusão ($p < 0,0001$). A viabilidade celular no grupo submetido à *Fed-Batch* decaiu ao longo do tempo, enquanto no grupo sob perfusão se manteve acima de 90% durante os 10 dias de experimento, enquanto o grupo sob *Fed-Batch* a partir do dia 6 apresentou declínio acentuado da viabilidade atingindo em torno de 60% ao fim do experimento ($p < 0,001$) (Fig.11B).

A circularidade celular apresentou aumento até o dia 1 para o grupo submetido à *Fed-Batch* e até o dia 3 no grupo sob perfusão, seguido de uma redução até o último dia de cultura em ambos os grupos. Nota-se uma diferença significativa entre os grupos a partir do dia 3 de cultura, destacando uma menor diminuição na circularidade celular ao longo da cultura no grupo submetido à estratégia de perfusão ($p < 0,05$) (Fig 11C). Quanto ao diâmetro celular observa-se algo semelhante à circularidade, um aumento até o dia 1 no grupo sob *Fed-Batch* e até o dia 3 para o grupo sob perfusão, seguido de uma redução até o último dia de cultura. É possível observar diferença significativa entre os grupos a partir do 2º dia de cultura, e, assim como na circularidade, o grupo sob a estratégia de perfusão, sofreu uma menor diminuição no diâmetro celular ao longo da cultura ($p < 0,001$) (Fig 11D).

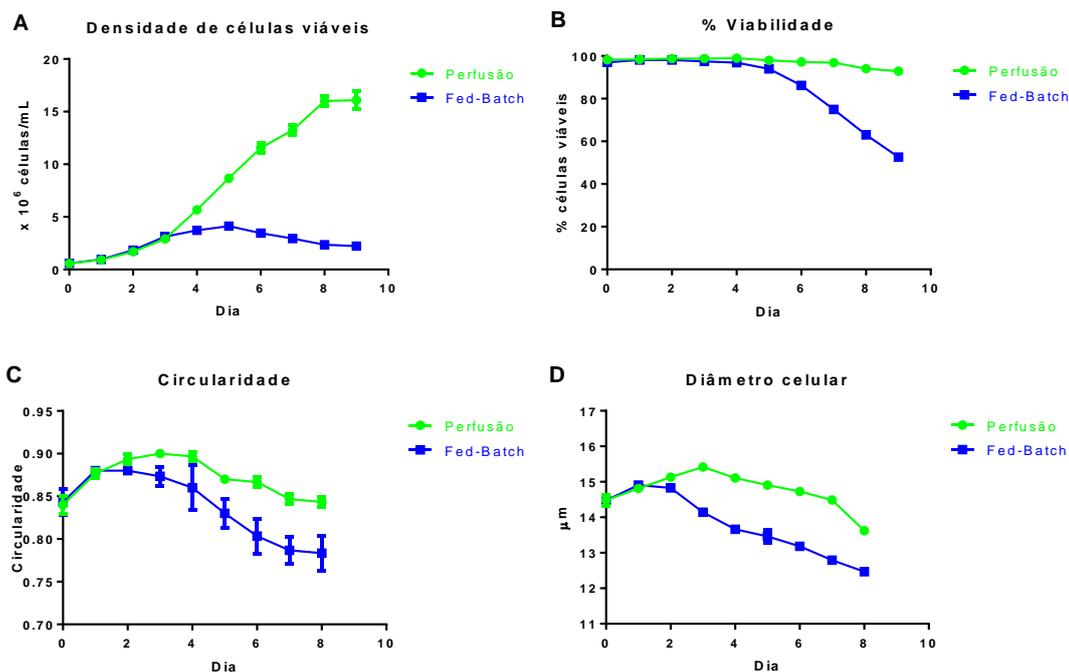


Figura 11. Estratégias de manutenção nos parâmetros físicos de células mantidas em suspensão. Células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) foram mantidas por 10 dias sob estratégia de perfusão ou *Fed-Batch*. Alíquotas da suspensão celular foram obtidas em diferentes dias e analisadas quanto a densidade de células viáveis (A), percentual de viabilidade (B), circularidade (C) e diâmetro celular (D). Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni. Dados de circularidade e diâmetro celular para o dia 9 encontram-se ausentes devido à falha do equipamento. No dia 9 a densidade e viabilidade celular foram obtidas manualmente por meio de contagem utilizando a câmara de Neubauer.

Quanto aos parâmetros químicos, nós observamos que as concentrações dos íons Na^+ e K^+ apresentaram, no geral, uma redução. Ao longo da cultura a concentração desses íons flutuou, chegando ao fim da cultura em menor concentração comparado ao início (Fig.12). Nota-se que a variação foi significativamente menor no grupo submetido à perfusão. Essa diferença pode ser observada a partir do dia 4 até o último dia de cultura, exceto no dia 7 para o Na^+ ($p < 0,05$) (Fig.12A) e nos dias 6 e 7 para o K^+ ($p < 0,001$) (Fig.12B).

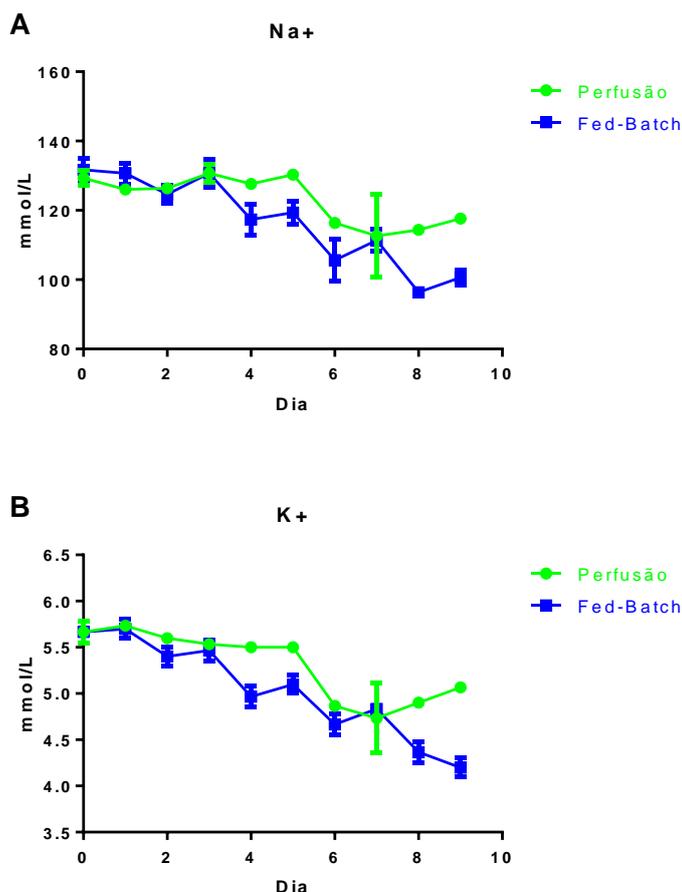


Figura 12. Análise das concentrações de Na⁺ (A) e K⁺ (B) em função da estratégia de manutenção de células Jurkat. Suspensão de células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) foram mantidas por 10 dias sob estratégia de perfusão ou *Fed-Batch*. e as concentrações dos íons Na⁺ (A) e K⁺ (B) em suspensão foram avaliadas em função do tempo. Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni.

Referente à concentração de glicose, observou-se que a variação se deu de forma distinta entre os grupos ($p < 0,001$) (Fig 13). Nesse caso, o grupo sob *Fed-Batch* apresentou flutuação menos drástica ao longo dos dias comparado ao grupo sob perfusão (Fig 13). Durante a cultura foi possível observar um aumento progressivo na concentração de glutamato em ambos os grupos, sem, no entanto, notar diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$) (Fig 14A). Quanto à glutamina, foi observado um comportamento semelhante ao da concentração de glicose (Fig 13), tendo o grupo sob perfusão sofrido variações mais drásticas (Fig 14B). Nota-se uma diferença

significativa na concentração de glutamina entre os grupos a partir do dia 2 até o último dia, exceto no dia 7 ($p < 0,001$) (Fig 14B).

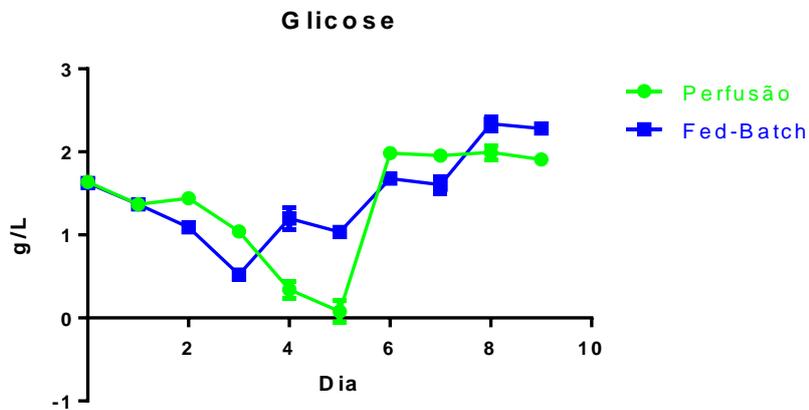


Figura 13 Análise da concentração de glicose em função do tempo e da estratégia de manutenção de células Jurkat. As concentrações de glicose foram quantificadas na suspensão de células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) mantidas por 10 dias sob estratégia de perfusão ou *Fed-Batch*. Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni

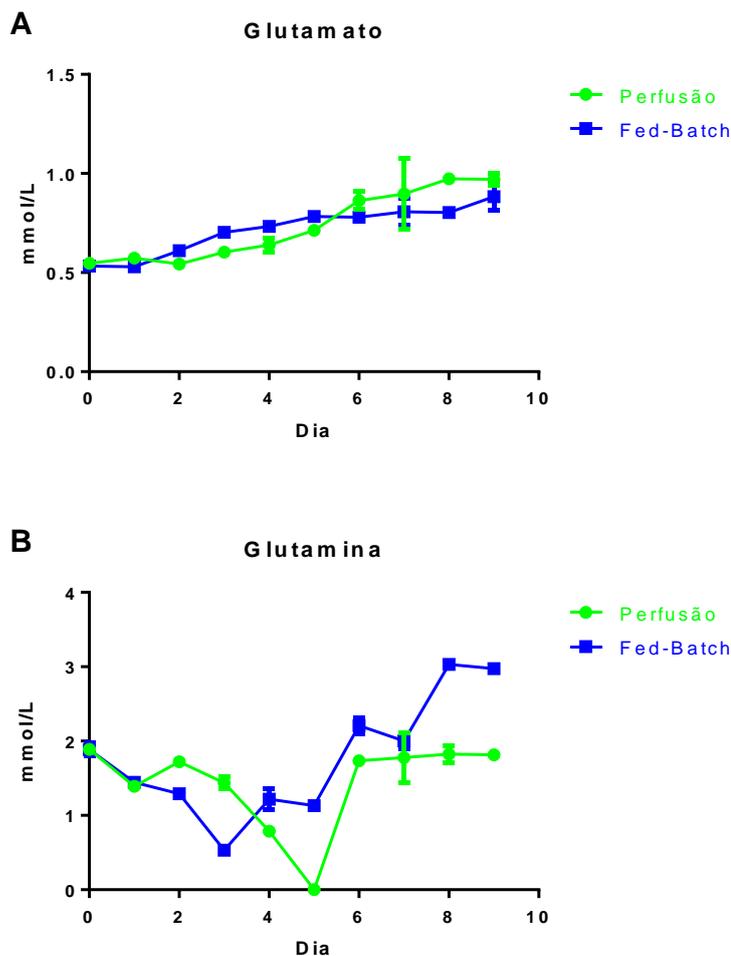


Figura 14. Análise das concentrações glutamina e glutamato em função do tempo e da estratégia de manutenção de células Jurkat. As concentrações de glutamato (A), glutamina (B) foram quantificadas na suspensão de células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) mantidas por 10 dias sob estratégia de perfusão ou *Fed-Batch*. Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni

Com referência às concentrações de lactato e amônia, nós observamos um aumento progressivo de ambos ao longo da cultura. Quanto a variação na concentração de lactato, os grupos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Fig 15A). A concentração de amônia apresentou uma diferença significativa entre os grupos a partir do segundo dia de cultura ($p < 0,0001$) (Fig 15B). A estratégia de perfusão apresentou concentração de amônia significativamente menor que *Fed-Batch* entre os dias 2 e 5, e significativamente maior entre o dia 6 e 9 ($p < 0,0001$) (Fig 15B).

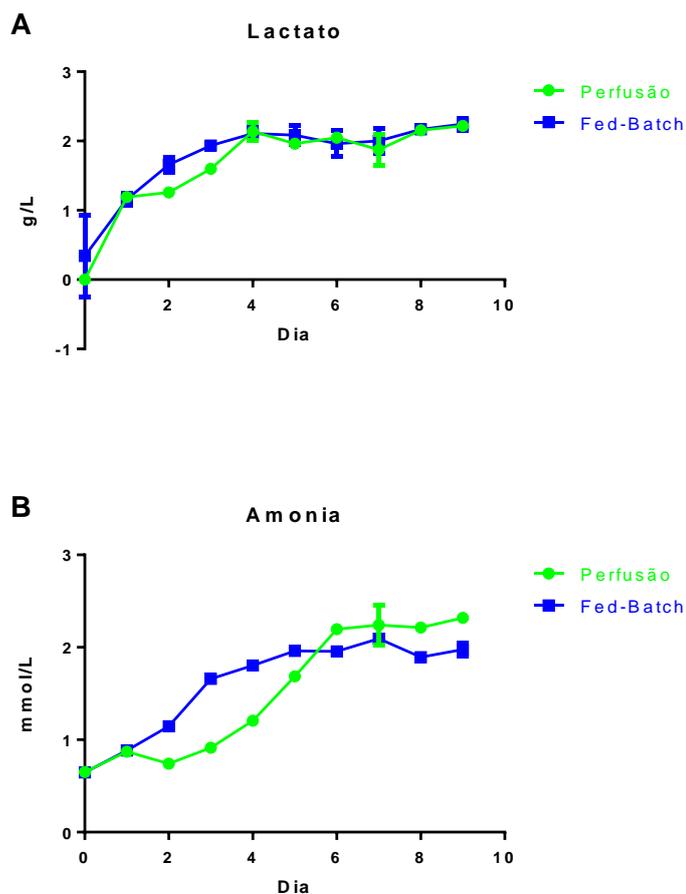


Figura 15. Análise das concentrações de amônia e lactato em função do tempo e da velocidade de manutenção de células Jurkat. As concentrações de lactato (**A**) e amônia (**B**), em suspensão de células Jurkat ($0,5 \times 10^6/\text{mL}$) foram avaliados até o nono dia de cultura. Essas células foram mantidas sob estratégia de perfusão ou *Fed-Batch*. Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni.

Por fim, como pode ser observado na figura 16, o pH (Fig.16A) decaiu ao longo do tempo. O pH da cultura submetida à perfusão sofreu menor redução quando comparado ao grupo sob *Fed-Batch* ($p < 0,0001$) (Fig 16A). Quanto à osmolaridade, também nota-se uma diferença significativa entre os grupos, no entanto somente a partir do 4º dia de cultura ($p < 0,0001$) (Fig 16B). Observa-se uma redução da osmolaridade no grupo submetido à *Fed-Batch* ao longo da cultura, apresentando uma osmolaridade média de 266,5 mOsm/L ($\pm 18,9$). O grupo sob perfusão apresentou menor variação, apresentando uma média de 278,9 mOsm/L ($\pm 4,81$).

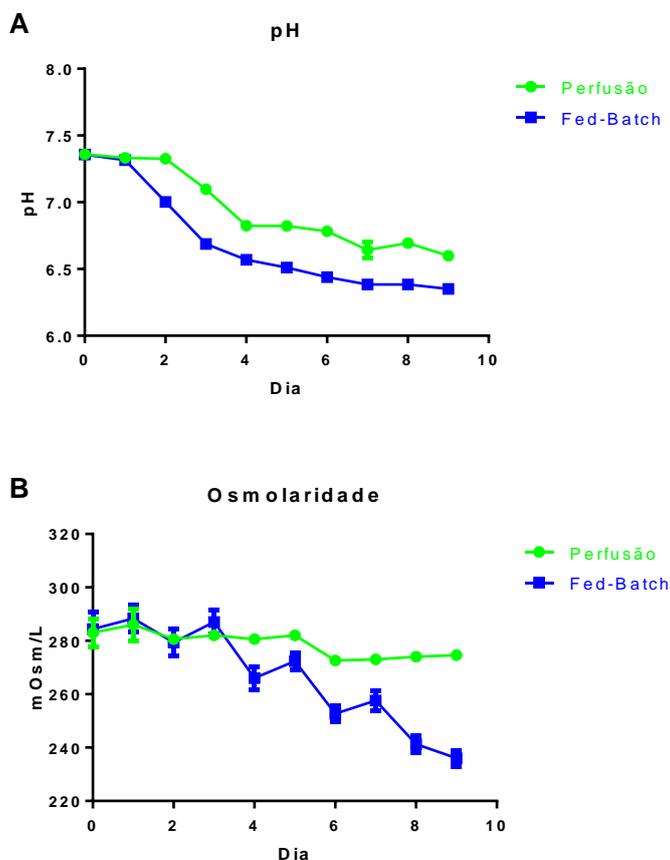


Figura 16. Influência da estratégia de manutenção da suspensão celular na osmolaridade e pH da cultura. Os valores de pH (A) e a osmolaridade (B) foram avaliados em suspensão de células Jurkat ($0,5 \times 10^6$ /mL) mantidas por 10 dias sob diferentes estratégias de manutenção (perfusão ou *Fed-Batch*). Os valores médios (\pm desvio-padrão) dos grupos experimentais foram comparados através do teste ANOVA de dois critérios seguido da análise do pós-teste de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

A otimização do processo de cultura de células em pequena escala é um processo essencial, pois não apenas minimiza custos, como leva um tempo menor para ser desenvolvida, o que permite gerar mais dados em um menor período de tempo. (KERN et al., 2016) Devido à ampla aplicação clínica de uma terapia baseada em células T, o desenvolvimento de estratégias ótimas para o cultivo desses linfócitos em pequena escala é o primeiro passo para que posteriormente o cultivo se dê em biorreatores de maior escala.

Nós avaliamos parâmetros físicos e químicos e sua influência sobre o cultivo de células Jurkat. A osmolaridade desempenha papel importante na sobrevivência das células, e por isso é considerada um dos fatores físicos mais importantes no cultivo de células. Visto que um meio de baixa ou alta osmolaridade pode ameaçar a sobrevivência das células, a mesma deve ser monitorada durante o cultivo. (FRESHNEY, 2010; NELSON; COX, 2014). Autores reportam o aumento gradual da osmolaridade em sistemas *Fed-Batch*, que se dá devido ao acúmulo de metabólitos (ALTAMIRANO et al., 2004; XIE; WANG, 1994), o que foi observado em parte do conjunto objetivando avaliar o papel das estratégias de agitação sobre os parâmetros de cultura de células Jurkat. O processo de aeração, realizado por meio da agitação, pode contribuir para o aumento da osmolaridade dado que moléculas de O₂ e CO₂ são dissolvidas no meio de cultura (KIMURA; MILLER, 1996). No entanto, não foram observadas diferenças entre as velocidades testadas sobre a osmolaridade. Por outro lado, em nosso sistema em perfusão, em que o meio de cultura é substituído diariamente, não observamos alterações tão dramáticas na osmolaridade como visto no sistema *Fed-Batch*. Nós observamos uma constante queda na osmolaridade no sistema *Fed-Batch* ao longo da cultura. Esse resultado foi inesperado, desde que nutrientes são adicionados em sistemas *Fed-Batch*, o que deveriam aumentar a osmolaridade do meio de cultura (DORAN, 2013; NELSON; COX, 2014). No entanto, vale ressaltar que macromoléculas e proteínas presentes em suspensão são capazes de se ligarem à íons e moléculas de baixo peso molecular, o que afeta diretamente a osmolaridade, e possivelmente poderia causar sua diminuição (WAYMOUTH, 1970).

Vale ressaltar que células de espécies diferentes apresentam osmolaridade ótima distinta. Células humanas, por exemplo, apresentam osmolaridade ótima em torno de 290 mOsm/kg, enquanto células de camundongos apresentam osmolaridade ideal em torno de 312 mOsm/kg. Apesar de na prática as células em geral tolerarem osmolaridade entre 260 mOsm/kg e 320 mOsm/kg, uma vez estabelecida, a mesma deve ser mantida consistente, variando cerca de ± 10 mOsm/kg (FRESHNEY, 2010). O único grupo experimental da série de experimentos que apresentou osmolaridade variando dentro do intervalo recomendado foi o grupo submetido à perfusão.

Sais são os principais componentes que contribuem para mudanças na

osmolaridade do meio de cultura. Nas culturas mantidas sob diferentes velocidades de agitação, a osmolaridade não apresentou diferenças significativas entre os grupos, também observado na K^+ . A concentração de Na^+ apresentou diferença significativa entre o grupo submetido à 85 rpm vs. 105 rpm. Na rotina da cultura em larga escala, íons como Na^+ e K^+ não tem suas concentrações monitoradas. Apesar de não terem alterado a osmolaridade no presente estudo, esses íons são essenciais na regulação do potencial de membrana. (FRESHNEY, 2010; NELSON; COX, 2014) No caso de células T, um grupo de pesquisadores observou que a elevação da concentração de K^+ extracelular pode resultar na supressão da sua função efetora. Autores observaram que essa concentração elevada de K^+ suprimia a ativação de células T amplamente. Os linfócitos T $CD4^+$ dos subtipos T_{H1} e T_{H17} também tiveram suas atividades suprimidas. Adicionalmente, foi observado que a elevação na concentração de Na^+ contribui para a ocorrência de um comportamento patológico das células T, promovendo, inclusive, a autoimunidade (EIL et al., 2016).

Os metabólitos monitorados nesse estudo, amônia e lactato, são descritos por diversos autores como os principais limitadores do crescimento e produtividade celular. (EIBL; WERNER; EIBL, 2009; FREUND; CROUGHAN, 2018; XIE; WANG, 1994) A concentração de amônia e lactato, como esperado, apresentou crescimento ao longo da cultura, no entanto suas taxas de crescimento apresentaram características distintas. A concentração de amônia, até o 10º dia de cultura, apresentou tendência a um crescimento linear quando os frascos contendo células foram submetidos a diferentes velocidades. A concentração de lactato apresentou crescimento positivo, no entanto, decrescente até o dia 5. A partir do dia 6 apresentou um crescimento mais discreto. Pesquisadores argumentam que, muitas vezes, em procedimentos *Fed-Batch* e perfusão, a suplementação nutricional, ao invés de beneficiar, pode levar a um aumento ainda maior da amônia e do lactato (GORFIEN et al., 2003).

Estratégias *Fed-Batch*, apresentam variados regimes de suplementação, podendo ser esta composta de nutrientes específicos ou até mesmo de meio completo (DORAN, 2013). As necessidades nutricionais variam de acordo com o tipo celular. Em alguns casos meios complexos demais podem ser inadequados e levar a uma

baixa produtividade e longevidade celular (GORFIEN et al., 2003). Meios de cultura comumente apresentam elevadas concentrações de glicose e glutamina. Esses nutrientes são considerados essenciais e são encontrados em grande parte dos meios de cultura comercializados. Em ambas condições experimentais testadas no presente estudo, as concentrações de glicose e glutamina apresentaram comportamento previsto. Como esperado, as concentrações de glicose e glutamina foram significativamente maiores nas culturas mantidas em sistema *Fed-Batch* quando comparado à perfusão, e isso é explicado pela adição diária dessas biomoléculas na primeira condição, o que não foi realizado no sistema de perfusão. Na literatura é apontado que a agitação pode aumentar o consumo de glicose pelas células, no entanto ainda não está claro se trata-se de um aumento na conversão de glicose em ácido láctico, ou do consumo pelas células para formar ATP (HO; WANG, 1991). A glutamina já foi apontada na literatura como importante aminoácido na proliferação de linfócitos e sua manutenção da viabilidade celular. Pesquisadores observaram que a suplementação de glutamina impactava de maneira dose-dependente na produção de IL-2, proliferação e viabilidade celular de células Jurkat (CHANG et al., 2002).

A glutamina é um aminoácido importante, no entanto, em meios de cultura tem comportamento instável. A molécula além de ser utilizada pelas células, pode sofrer degradação no meio, e ser convertida em glutamato e amônia (OZTURK; PALSSON, 1990). Ao longo da cultura, em ambas condições experimentais um aumento na concentração de glutamato foi observado, mas sem diferença significativa. Esse resultado já era esperado. O glutamato é um neurotransmissor importante, pois células do sistema nervoso expressam uma vasta gama de receptores para esta molécula. De forma interessante, linfócitos T também expressam receptores de glutamato, e por isso essa molécula pode influenciar o comportamento funcional dessas células (LEVITE, 2017). Pesquisadores reportam que o glutamato em concentrações baixas (10nM), ao se ligar a GluR3 (do inglês, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid subtype 3*) estimula a interação entre integrinas e moléculas de fibronectina e laminina. Essas integrinas geralmente só são expressas por linfócitos T ativados (GANOR et al., 2003). Em outro estudo autores reportam que o glutamato é capaz de reduzir a expressão de FasL por linfócitos T, o que diminui a sua suscetibilidade à morte por apoptose. (CHIOCCHETTI et al., 2006).

O pH é um parâmetro que deve ser monitorado regularmente, visto que pequenas alterações podem alterar o estado de ionização de moléculas, e, conseqüentemente, a função de proteínas. (FRESHNEY, 2010; NELSON; COX, 2014). A maior parte das linhagens celulares apresentam pH ótimo de 7,4, no entanto algumas linhagens de células transformadas toleram bem um pH entre 7 e 7,4. No cultivo de células *in vitro*, é esperada a redução gradual do pH, visto que a maioria dos metabólitos apresentam caráter ácido. (DORAN, 2013; FRESHNEY, 2010; NELSON; COX, 2014) Em ambas condições experimentais foi observada uma redução no pH, sendo essa queda menos proeminente nas culturas mantidas em perfusão quando comparado à *fed-batch*. Esse resultado era esperado, visto que o meio era renovado diariamente, o que evitaria o acúmulo de metabólitos ácidos e, conseqüentemente, a redução do pH.

Por muitos anos na literatura, o estresse hidrodinâmico vem sendo discutido como um fator limitante no desenvolvimento de produtos produzidos por células de mamíferos. Densidades maiores de células demandam um aumento no k_La , o que demanda um aumento na agitação do meio de cultura (HU; BERDUGO; CHALMERS, 2011). Em um dos experimentos realizados foram comparadas estratégias distintas de agitação sobre uma linhagem de células T humanas. Levando em consideração parâmetros como a densidade de células viáveis e o percentual de células viáveis, a velocidade de 105 rpm apresentou maior densidade celular comparada aos outros grupos.

Na literatura reporta-se que células cultivadas em suspensão geralmente apresentam maior tolerância à agitação. Não foram observadas diferenças significativas no percentual de viabilidade de células entre células expostas à 105 rpm e 85 rpm. No entanto, a agitação alternada comparada a 105 rpm apresentou menor percentual de viabilidade. Pesquisadores apontam que a velocidade de agitação deve ser mantida sobre um intervalo curto, de modo que não exponha as células a um estresse hidrodinâmico muito expressivo (SCHAFFER et al., 2011). Berdugo (BERDUGO, 2010) aponta que células sobre estresse hidrodinâmico passam a expressar proteínas de estresse celular. Ademais, esse tipo de estresse também parece afetar a duração da fase lag, e a sensibilidade também parece estar

relacionada à fase de crescimento em que as células se encontram. Além disso, velocidades de agitação mais altas podem contribuir para a formação de bolhas, o que pode ser um problema. Ao estourarem bolhas podem exercer forças consideráveis sobre as células, o que pode impactar a viabilidade das mesmas (NATARAJAN et al., 2017).

A densidade celular e o percentual de viabilidade apresentaram diferenças expressivamente significativas entre as culturas de células mantidas em perfusão apresentam melhores índices nos parâmetros físicos das células quando comparado ao sistema de fed-batch. Esses resultados eram esperados visto que o sistema em perfusão minimiza os efeitos dos principais limitadores do crescimento e viabilidade celular. A manutenção de um pH mais estável, a minimização do acúmulo de metabólitos tóxicos como amônia e o lactato, e a prevenção da depleção de nutrientes, são fatores que fazem com que o sistema em perfusão permita maior crescimento e viabilidade celular (HILLER et al., 2017; VOGEL et al., 2012; WARIKOO et al., 2012; WARNOCK; AL-RUBEAI, 2006).

Quanto a influência de diferentes velocidades sobre os parâmetros físicos, nós observamos que a circularidade de células expostas à 85 rpm foi maior que das células expostas à 105 rpm. Além disso, o diâmetro celular não apresentou diferenças significativas quando comparados os grupos entre si. Esses resultados eram esperados visto que autores reportam que expor células à altas velocidades de agitação pode induzir alterações na morfologia das mesmas (YAGASAKI et al., 2003). Esses mesmos parâmetros também foram melhores nas culturas mantidas em sistema de perfusão quando comparado à fed-batch. O acúmulo de metabólitos e a variação na osmolaridade podem contribuir para alterações na morfologia celular (DORAN, 2013; FREUND; CROUGHAN, 2018), o que não ocorre no sistema em perfusão, minimizando portanto os efeitos sobre a circularidade e diâmetro celular.

6. CONCLUSÃO

Nos dias atuais, encontram-se no mercado numerosos medicamentos biológicos. Desde enzimas à anticorpos monoclonais, que são produtos proteicos. A terapia imunocelular tem como produto final células que são o próprio mecanismo de

ação do fármaco. Portanto, deve se atentar ao fato de que essas células devem estar saudáveis para que possam ser transferidas para o paciente. Para isso a otimização do processo de cultivo dessas células deve ser priorizada.

A partir deste estudo é possível concluir que entre as velocidades de agitação testadas, a que apresentou melhor desempenho quanto a densidade celular foi a velocidade de 105 rpm, no entanto, a velocidade de 85 rpm apresentou menor alteração na morfologia celular. Tendo em mente o desenvolvimento de terapias imunocelulares, a velocidade ótima seria 85 rpm, pois além de mesmo percentual de células viáveis, a morfologia dessas células foi menos afetada, quando comparadas às células expostas à 105 rpm.

Quanto a estratégia de suporte da cultura, o melhor desempenho foi obtido pelas células submetidas à perfusão. De modo geral, os parâmetros importantes apresentaram menores flutuações comparado à estratégia *Fed-Batch*, como a osmolaridade, o pH, a circularidade e o diâmetro celular. Além disso o crescimento e a viabilidade das células submetidas à perfusão foi expressivamente maior quando comparado à estratégia *Fed-Batch*.

7. REFERÊNCIAS

(FDA) U.S. FOOD AND DRUG. **Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations**. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/Manufacturing/ucm090016.htm>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

ALLEN, E. S. et al. Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. **Transfusion**, v. 57, n. 5, p. 1133–1141, 1 maio 2017.

ALTAMIRANO, C. et al. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: Substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 2, p. 171–179, 2004.

AMANULLAH, A. et al. Novel micro-bioreactor high throughput technology for cell culture process development: Reproducibility and scalability assessment of fed-batch CHO cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 1, p. 57–67, 2010.

ANDROULLA, M. N.; LEFKOTHEA, P. C. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 5–18,

2018.

ATCC. **Product Sheet Jurkat, Clone E6-1 (ATCC® TIB-152™)**, 2018.

BERDUGO, C. **Cell damage mechanisms and stress reponse in animal cell culture**. [s.l.] Ohio State University, 2010.

BHATIA, S. Application of Plant Biotechnology. In: **Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences**. 1^a ed. London: Elsevier, 2015. p. 157–207.

CAO, W.; LIU, Y.-J. Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 24–30, fev. 2007.

CARBONE, F. R.; HEATH, W. R. The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses. **Current opinion in immunology**, v. 15, n. 4, p. 416–20, ago. 2003.

CHANG, W. K. et al. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. **Clinical Immunology**, v. 104, n. 2, p. 151–160, 2002.

CHIOCCHETTI, A. et al. Group I mGlu receptor stimulation inhibits activation-induced cell death of human T lymphocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 6, p. 760–768, 2006.

CHUNG, S. et al. Industrial bioprocessing perspectives on managing therapeutic protein charge variant profiles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 7, p. 1646–1665, jul. 2018.

COQUERELLE, C.; MOSER, M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 317–334, 1 mar. 2010.

COULIE, P. G. et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 2, p. 135–146, 1 fev. 2014.

DIECKMANN, D. et al. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 11, p. 1303–10, 4 jun. 2001.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. 2^a ed. Waltham: Elsevier, 2013. v. 9780080970

DUNN, I. J. et al. Basic Bioreactor Concepts. In: **Biological Reaction Engineering**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. p. 55–66.

DUSTIN, M. L. et al. T cell–dendritic cell immunological synapses. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 4, p. 512–516, ago. 2006.

EIBL, R.; WERNER, S.; EIBL, D. Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications. **Advances in Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 11, p. 55–87, jun. 2009.

EIL, R. et al. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. **Nature**, v. 537, n. 7621, p. 539–543, 2016.

FALLARINO, F. et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 12, p. 1206–1212, 26 dez. 2003.

FAN, Y.; LEY, D.; ANDERSEN, M. R. Fed-Batch CHO Cell Culture for Lab-Scale Antibody Production. In: **Recombinant Glycoprotein Production: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 1674p. 147–161.

FAZILLEAU, N.; MCHEYZER-WILLIAMS, L. J.; MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. Local development of effector and memory T helper cells. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 3, p. 259–67, jun. 2007.

FENG, Y. et al. α b T Cell Receptor Mechanosensing Forces out Serial Engagement. **Trends in Immunology**, v. 596, n. 8, 2018.

FERRER-MIRALLES, N.; VILLAVERDE, A. Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 113, 2013.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells : A manual of basic technique and specialized applications**. 6th. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2010.

FREUND, N.; CROUGHAN, M. A Simple Method to Reduce both Lactic Acid and Ammonium Production in Industrial Animal Cell Culture. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 385, 28 jan. 2018.

GANOR, Y. et al. Human T Cells Express a Functional Ionotropic Glutamate Receptor GluR3, and Glutamate by Itself Triggers Integrin-Mediated Adhesion to Laminin and Fibronectin and Chemotactic Migration. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 8, p. 4362–4372, 2003.

GASCOIGNE, N. R. et al. Secretion of a chimeric T-cell receptor-immunoglobulin protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 9, p. 2936–40, maio 1987.

GAUTHIER, J.; TURTLE, C. J. Insights into cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19-specific CAR-T cell therapy. **Current Research in Translational Medicine**, v. 66, n. 2, p. 50–52, 2018.

GAUTHIER, J.; YAKOUB-AGHA, I. Chimeric antigen-receptor T-cell therapy for hematological malignancies and solid tumors: Clinical data to date, current limitations and perspectives. **Current Research in Translational Medicine**, v. 65, n. 3, p. 93–102, 2017.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. **WAVE Bioreactor System 200**. Disponível em: <<https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/wave-bioreactor-system-200-p-02461>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. **What do cells need from a bioreactor ?**, 2018. Disponível em:

<<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=26286>>

GILL, S.; MAUS, M. V.; PORTER, D. L. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making. **Blood Reviews**, v. 30, n. 3, p. 157–167, 2016.

GORFIEN, S. F. et al. Optimized nutrient additives for fed-batch cultures. **BioPharm International**, v. 16, n. 4, p. 34–40, 2003.

GROHMANN, U. et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 1097–101, 30 nov. 2002.

GROSS, G.; WAKS, T.; ESHHAR, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity (chimeric genes/antibody variable region). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 10024–10028, 1989.

GROUX, H. et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 737–42, 16 out. 1997.

HENRICKSON, S.; VONANDRIAN, U. Single-cell dynamics of T-cell priming. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 3, p. 249–258, jun. 2007.

HILLER, G. W. et al. Cell-controlled hybrid perfusion fed-batch CHO cell process provides significant productivity improvement over conventional fed-batch cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 7, p. 1438–1447, 2017.

HO, C. S.; WANG, D. I. . Animal cell bioreactors. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 17, p. 3–478, 1991.

HOLMGAARD, R. B. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 7, p. 1389–402, 1 jul. 2013.

HU, W.; BERDUGO, C.; CHALMERS, J. J. The potential of hydrodynamic damage to animal cells of industrial relevance: Current understanding. **Cytotechnology**, v. 63, n. 5, p. 445–460, 2011.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 10, p. 2904–2909, 1972.

JACQUEMART, R. et al. A Single-use Strategy to Enable Manufacturing of Affordable Biologics. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 309–318, 2016.

JAKOWLEW, S. B. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 435–457, 6 dez. 2006.

KARST, D. J. et al. Process performance and product quality in an integrated

continuous antibody production process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 2, p. 298–307, 2017.

KERN, S. et al. Model-based strategy for cell culture seed train layout verified at lab scale. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1019–32, ago. 2016.

KIMURA, R.; MILLER, W. M. Effects of elevated pCO₂ and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, n. 1, p. 152–160, 5 out. 1996.

KISS, B.; GOTTSCHALK, U.; POHLSCHEIDT, M. **New bioprocessing strategies : development and manufacturing of recombinant antibodies and proteins**. [s.l.] Springer International Publishing, 2018.

KUWANA, Y. et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 149, n. 3, p. 960–8, 31 dez. 1987.

LEE, C.-C. et al. The regulatory function of umbilical cord blood CD4(+) CD25(+) T cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28 and exogenous interleukin (IL)-2 or IL-15. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 20, n. 7, p. 624–632, nov. 2009.

LEVINGS, M. K.; SANGREGORIO, R.; RONCAROLO, M. G. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 11, p. 1295–302, 4 jun. 2001.

LEVITE, M. Glutamate, T cells and multiple sclerosis. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 7, p. 775–798, 2017.

LIU, D. et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-modified natural killer cell-based immunotherapy and immunological synapse formation in cancer and HIV. **Protein and Cell**, v. 8, n. 12, p. 861–877, 2017.

MALDINI, C. R.; ELLIS, G. I.; RILEY, J. L. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 10, p. 605–616, 25 out. 2018.

MARIA, G. Optimal Operating Policy of a Fluidized Bed Bioreactor used for Mercury Uptake from Wastewaters by Using Immobilized P. Putida Cells. **Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences**, v. 2, n. 4, 27 mar. 2017.

MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M.; SWAIN, S. L. The potential of CD4 T-cell memory. **Immunology**, v. 130, n. 1, p. 1–9, maio 2010.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 1, p. 74–80, 1 jan. 2008.

MERCK KGAA. **Corning® ProCulture® glass spinner flask complete, baffled, angled sidearms**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=17215954>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

- MILONE, M. C. et al. Chimeric Receptors Containing CD137 Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In Vivo. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 8, p. 1453–1464, ago. 2009.
- NAKAMURA, K. et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 2, p. 834–42, 15 jan. 2004.
- NATARAJAN, V. et al. Quantifying the potential for bursting bubbles to damage suspended cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORPORATION. **KYMRIAH™ (tisagenlecleucel)**, 2017.
- OBAR, J. J.; LEFRANÇOIS, L. Memory CD8+ T cell differentiation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1183, n. 1, p. 251–266, jan. 2010.
- OREN, R. et al. Functional Comparison of Engineered T Cells Carrying a Native TCR versus TCR-like Antibody– Based Chimeric Antigen Receptors Indicates Affinity/Avidity Thresholds. **The Journal of Immunology**, v. 11, n. 193, p. 5733–5743, 2014.
- OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. **Biotechnology Progress**, v. 6, n. 2, p. 121–128, mar. 1990.
- PAULOSE, K. P. History of insulin. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 47, n. 2, p. 255, 1999.
- PICCIRILLO, C. A.; SHEVACH, E. M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 3, p. 1137–40, 1 ago. 2001.
- PRICE, P. J. Best practices for media selection for mammalian cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 53, n. 8, p. 673–681, 19 set. 2017.
- RAPOPORT, A. P. et al. NY-ESO-1–specific TCR–engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. **Nature Medicine**, v. 21, n. 8, p. 914–921, 20 ago. 2015.
- SCHAFFER, D. et al. Bioreactors for Stem Cell Expansion and Differentiation. In: **Stem Cell Engineering**. [s.l.] Springer, 2011. p. 1–28.
- SCHNEIDER, D. et al. A Unique Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Domain-Only CD33 CAR for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. November, p. 1–16, 2018.
- SCHOLLER, J. et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 132, 2012.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 25 mar. 2011.

SHEVACH, E. M. et al. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. **Immunological reviews**, v. 212, n. 1, p. 60–73, ago. 2006.

SPRANGER, S. et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. **Science translational medicine**, v. 5, n. 200, p. 200ra116, 28 ago. 2013.

STEPHENS, L. A. et al. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. **European journal of immunology**, v. 31, n. 4, p. 1247–54, abr. 2001.

STEPHENSON, M.; GRAYSON, W. Recent advances in bioreactors for cell-based therapies. **F1000Research**, v. 7, p. 517, 30 abr. 2018.

STROBL, H.; KNAPP, W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. **Microbes and infection**, v. 1, n. 15, p. 1283–90, dez. 1999.

STRONCEK, D. F. et al. Myeloid cells in peripheral blood mononuclear cell concentrates inhibit the expansion of chimeric antigen receptor T cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 7, p. 893–901, 2016.

TAKEUCHI, Y.; NISHIKAWA, H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. **International Immunology**, v. 28, n. 8, p. 401–409, ago. 2016.

TRUMMER, E. et al. Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 1033–1044, 20 ago. 2006.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Yescarta BL 125643/0 Approval Letter**, 2017a. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM581259.pdf>>

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Kymriah BL 125646/0 Approval Letter**, 2017b. Disponível em: <www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM574106.pdf>

VIGNALI, D. A. A.; KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, v. 13, n. 8, p. 722–728, 19 ago. 2012.

VOGEL, J. H. et al. A new large-scale manufacturing platform for complex biopharmaceuticals. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 12, p. 3049–3058, 2012.

WAGNER, T. A. Quarter Century of Anti-HIV CAR T Cells. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 15, n. 2, p. 147–154, 2018.

- WANG, K.; WEI, G.; LIU, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 1, n. 1, p. 36, 2012.
- WANG, Z.; GUO, Y.; HAN, W. Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment. **Protein and Cell**, v. 8, n. 12, p. 896–925, 2017.
- WARIKOO, V. et al. Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 12, p. 3018–3029, 2012.
- WARNOCK, J. N.; AL-RUBEAI, M. Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 1, 2006.
- WAYMOUTH, C. Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells. **In Vitro**, v. 6, n. 2, p. 109–127, set. 1970.
- WING, K. et al. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. **Immunology**, v. 106, n. 2, p. 190–9, jun. 2002.
- WRIGHT, B. et al. A Novel Seed-Train Process. **BioProcess International**, v. 13, n. 3, p. 16–25, 2015.
- XIE, L.; WANG, D. I. C. Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. **Cytotechnology**, v. 15, n. 1–3, p. 17–29, 1994.
- YAGASAKI, K. et al. **Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003.
- ZHANG, Y. H. P.; SUN, J.; MA, Y. Biomanufacturing: history and perspective. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 4–5, p. 773–784, 2017.
- ZHAO, Z. et al. The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 4, p. 539–551, 2018.
- ZHEN, A. et al. Long-term persistence and function of hematopoietic stem cell-derived chimeric antigen receptor T cells in a nonhuman primate model of HIV/AIDS. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 12, p. e1006753, 2017.
- ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, mar. 2010.