

B14 Comparação de metodologias de quantificação celular para monitoramento de cultivos de células animais em suspensão

Esther Vinhais Gutierrez¹, Maira Peixoto Pellegrini¹, Alexandre Borges Murad¹, Marina Vergne de Almeida¹, Tiago Pereira dos Santos¹, Eduardo Ruback dos Santos¹, Ana Carolina Siqueira Couto de Oliveira¹, Rodrigo Coelho Ventura Pinto¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: O cultivo de células animais é um sistema já estabelecido na produção de proteínas recombinantes para uso terapêutico e, conseqüentemente, o controle e monitoramento do crescimento celular são cruciais para a condução apropriada do processo produtivo, sendo empregadas diversas metodologias para a sua avaliação. O processo de produção da eritropoietina humana recombinante (rhEPO), foco de Transferência de Tecnologia em Bio-Manguinhos/Fiocruz, utiliza a técnica de exclusão do corante azul de tripano para a quantificação celular. Porém, a linhagem celular empregada no processo produtivo se caracteriza pelo crescimento em suspensão formando agregados celulares. Este fenômeno pode dificultar a contagem, pois grumos de maior tamanho não conseguem acessar os quadrantes de contagem e as células mais internas não entram em contato com o corante, resultando em um potencial erro de quantificação.

Objetivo: Comparar diferentes metodologias para monitoramento do cultivo celular, com o intuito de implementação na rotina de produção.

Metodologia: Foram utilizadas quatro estratégias de quantificação celular para o monitoramento de cultivos de células CHO expressando a rhEPO: coloração de células mortas pelo azul de tripano (padrão); desagregação de grumos celulares (tripsinização) e posterior quantificação com azul de tripano; coloração dos núcleos pelo corante cristal violeta; e quantificação pelo equipamento NucleoCounter. A citometria de fluxo foi utilizada a fim de se estabelecer um padrão preciso para análise de viabilidade celular dos cultivos.

Resultados: As estratégias de quantificação de células totais com azul de tripano pós tripsinização e coloração por cristal violeta não apresentaram diferença significativa quando comparadas à técnica padrão. Em relação às células mortas, foi observada uma variação quando comparadas às técnicas de coloração por azul de tripano com e sem tripsinização, tendo este último apresentado um quantitativo superior entre os dias 5 e 7 do cultivo. A partir do terceiro dia de cultivo, a quantificação de células totais com o equipamento NucleoCounter foi cerca de 50% inferior à obtida por meio da técnica padrão. Em relação às células mortas, esta variação foi muito grande, alcançando níveis incompatíveis com o estado e a fase do cultivo. A viabilidade celular

obtida pelo NucleoCounter manteve-se superior a 98% até o sétimo dia de cultivo, enquanto os valores apontados pelas demais metodologias, incluindo a citometria de fluxo, sofreram queda a partir do quinto dia de cultivo, como era de se esperar.

Conclusão: Os resultados indicam que a quantificação celular pelo NucleoCounter se mostrou inconsistente, impossibilitando, por enquanto, a substituição dos métodos mais laboriosos, como o azul de tripano e o cristal violeta. Nas concentrações alcançadas durante o experimento, a formação de poucos agregados celulares não gerou interferência na quantificação pela técnica padrão. No entanto, para maiores densidades celulares e cultivos mais prolongados, é necessário avaliar o impacto de prováveis agregados na metodologia de quantificação celular.

Palavras-Chave: Cultivo Celular, Quantificação Celular, Viabilidade