

# AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CÉLULAS VERO EM SISTEMA PSEUDO AGITADO COM MICROCARREGADORES CYTODEX 1

Jaci Leme<sup>a</sup>

Thaissa Consoni Bernardino<sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Laboratório de Biotecnologia Viral, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil 1500, Prédio 105, 1º andar, São Paulo, SP, CEP 05503-900, São Paulo, SP-Brasil

## RESUMO

Células Vero são utilizadas para o desenvolvimento de vacinas virais, aprovadas para uso humano, incluindo assim uma vacina contra o vírus SARS-CoV-2. Nosso objetivo foi estabelecer um protocolo de produção para esta condição de cultivo. As células cultivadas em frasco *spinner* foram testadas em diferentes concentrações. Os valores de  $\mu_{max}$  permitem observar que o melhor desempenho foi com o ensaio cujo valor ficou em 0,0334 h<sup>-1</sup>. A duplicação celular ocorreu em 1= 37,47 h, 2= 21,15 h e 3= 22,29 h. A concentração e a qualidade do inóculo são determinantes para o desempenho das células quando cultivadas em sistema pseudo agitado com microcarregadores.

**Palavras-chave:** Célula Vero, SARS-CoV-2, Microcarregadores, Vacina

## ABSTRACT

Vero cells are used to develop viral vaccines approved for human use, thus including a vaccine against the SARS-CoV-2 virus. Our objective was to establish a production protocol for this cultivation condition. Cells grown in spinner flask were tested at different concentrations. The  $\mu_{max}$  values allow us to observe that the best performance was with the assay whose value was 0.0334 h<sup>-1</sup>. Cell duplication occurred at 1=37.47 h, 2=21.15 h and 3=22.29 h. The concentration and quality of the inoculum are crucial for the performance of cells when cultivated in a pseudo-stirred system with microcarriers.

**Keywords:** Vero Cell, SARS-CoV-2, Microcarriers, Vaccine

---

\***Autor correspondente:** Jaci Leme; Mestre em Ciências pela FCF-USP; Endereço; Rua Tapuias nº120, bloco 2 apto.64, São Paulo, SP, CEP 04763-080; E-mail de contato: [jaci.leme@butantan.gov.br](mailto:jaci.leme@butantan.gov.br); Telefone de contato; (011) 99209 6866

<https://doi.org/10.51189/rema/2003>

Editora IME© 2021. Todos os direitos reservados.

## 1 INTRODUÇÃO

A pandemia da covid-19 que se iniciou na China e rapidamente se espalhou pelo mundo destacou o aspecto de emergência para o desenvolvimento de vacinas de imunização contra o SARS-CoV-2, também conhecido como corona vírus<sup>1</sup>. As plataformas tradicionais são desenvolvidas com base em células de mamíferos produtoras diretas do vírus alvo da vacina e depois inativados. Por outro lado, as plataformas mais modernas com partículas virais utilizam um carreador como o adenovírus inativado (vírus comum em organismos humanos que servem como apresentadores de proteína específica). Ambas as plataformas são utilizadas para ativar o sistema imunológico<sup>2,3</sup>.

O desafio da alta demanda por vacina ao redor do mundo<sup>4</sup>, também desafia os processos de produção, que necessitam ampliar a produção de células de maneira eficiente e com baixo custo<sup>5</sup>. Sendo as células vero a linhagem preferencial para produção do corona vírus SARS-CoV-2 mas ao mesmo tempo apresentando características de cultivo em monocamada que demanda considerável volume de meio de cultura, consumo de material e mão de obra, além do risco de contaminação ao longo do processo<sup>6,7</sup>.

O sistema de pseudo agitado utiliza microcarregadores e oferecem a possibilidade de cultivo em bioreatores de tanque agitado. Estes microcarregadores são microesferas de polímero desenvolvidas para atuarem como um substrato para células aderentes<sup>8</sup>. Além disso, estes sistemas se apresentam como uma alternativa promissora para ganho de produtividade e diminuição de custo de produção.

O objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de produção de células Vero utilizando o sistema pseudo agitado com microcarregadores bem como estudar a cinética de crescimento da linhagem dessas células nestas condições de cultivo.

## 2 RELATO DE CASO

Foram utilizadas Células Vero, da

European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC); Microcarregadores Cytodex1 (Sigma-Aldrich); Meio de cultura VP-SFM (Gibco); Tripsina TripleSelect1X (Gibco); inibidor de tripsina STI T6622 (Sigma-Aldrich). Foram avaliados concentração celular (Xv), velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação. Preparo do frasco *Spinner*: Os frascos spinner foram siliconizados e depois foram lavados com detergente neutro, enxaguados com água purificada e finalmente deixados em estufa à 50 °C para secagem. Após esta etapa foram autoclavados com ciclo de 121 °C/30 minutos. Preparo dos Microcarregadores: Foram pesados 150 mg de Cytodex1 e diluídos em 50 mL de solução PBS (estéril), em um tubo Falcon 50 mL que foi deixado em estufa a 37 °C (*overnight*). Repique: As células foram observadas através do microscópio e apresentavam 100% de confluência. Foi feito um repique para quatro garrafas T75 cm<sup>2</sup> (1:4). O meio condicionado foi descartado e a parede foi lavada com 1,5 ml de Tripsina (Triple™) para liberar as células, em seguida foram adicionados 2,5 ml de meio VP-SFM. Foi transferido 1 ml para cada garrafa T75 cm<sup>2</sup> e completado um volume de 15 ml de meio VP-SFM. As garrafas foram deixadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 96 h. Foi retirada uma alíquota de 0,4 ml para observação pelo microscópio, observando que os Mcs estavam hidratados em sua maioria 100%.

Em seguida foi retirado cuidadosamente uma alíquota do sobrenadante acima do pellet formado pelos Mcs sedimentados de forma a não extrair Mc. Então adicionou-se +/-25 ml de PBS fresco, adicionou-se no frasco *Spinner* autoclavado com ciclo de 121°C/30 min. Em seguida foi retirado um volume de 25 ml de PBS e então foi feita uma lavagem com meio fresco, completado o volume até 25 ml e o *spinner* foi deixado em estufa com agitação a 25 rpm. Preparo do inoculo: A partir de quatro garrafas T75cm<sup>2</sup> com células aderidas em semi confluência (70% monocamada), foi descolado o tapete com tripsinização, centrifugado e ressuspenso com meio fresco (suplementado com inibidor de tripsina). Foi retirada uma alíquota 0,4 mL para amostragem e contagem

de células (a amostra foi diluída em 1:10 com PBS e azul trypan 0,4%).

No frasco *spinner* já pronto foi transferido um volume de inoculo. O *spinner* inoculado foi depositado em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após o ciclo de aderência foi completado o volume de meio fresco (VP-SFM) para 50 ml e mantida agitação de 20 rpm. De cada amostra foi feita a contagem de núcleos e posteriormente as análises dos metabólitos glutamina, glutamato, glicose e lactato. As células Vero cultivadas em microcarregadores,

apresentaram aderência e expansão como esperado.

### 3 RESULTADOS

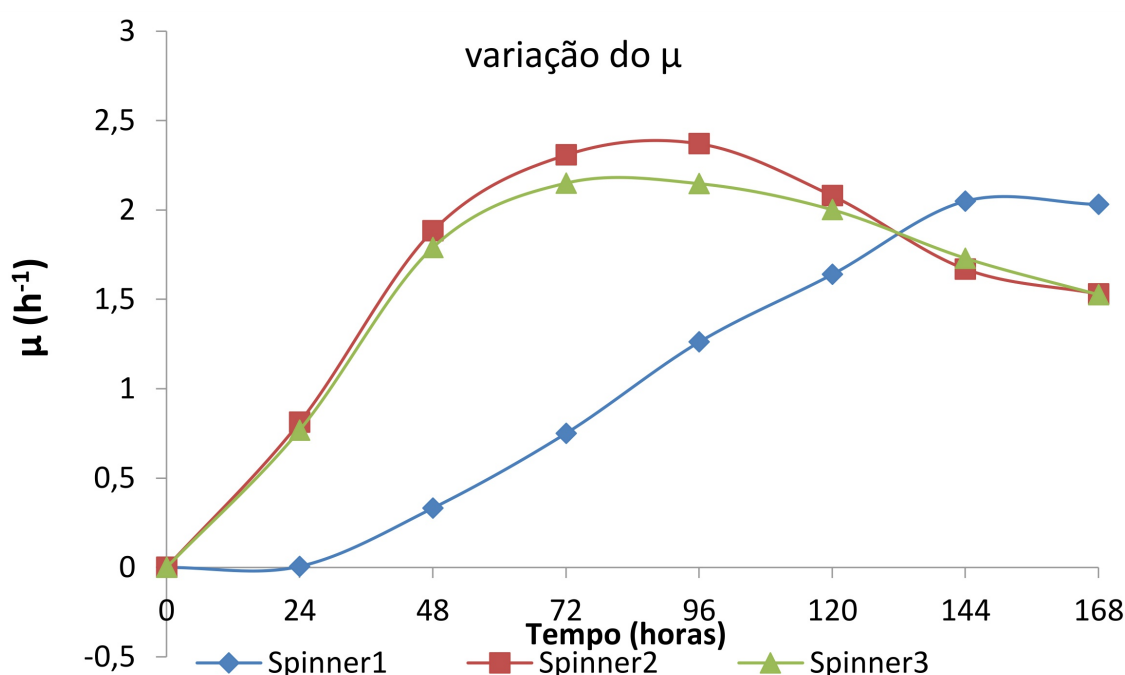
As amostras tratadas conforme protocolo para contagem de núcleo permite aferir a concentração celular ao longo do cultivo. Os valores aferidos nas contagens organizados como tabela para permitir o estudo da cinética de crescimento celular dos ensaios realizados (Tabela1).

**Tabela 1** - Variação da concentração celular/tempo e Ln (Xv)

Tempo (h)	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Cel/ml (Xv)	Ln(Xv)	Cel/ml (Xv)	Ln(Xv)	Cel/ml (Xv)	Ln(Xv)
0	7,09E+04	0,00E+00	9,80E+04	0,00E+00	1,40E+05	0,00E+00
24	8,16E+04	1,40E-01	2,21E+05	8,13E-01	3,01E+05	7,68E-01
48	9,88E+04	3,32E-01	6,44E+05	1,88E+00	8,35E+05	1,79E+00
72	1,50E+05	7,50E-01	9,95E+05	2,32E+00	1,20E+06	2,15E+00
96	2,50E+05	1,26E+00	1,07E+06	2,39E+00	1,20E+06	2,16E+00
120	3,65E+05	1,64E+00	7,99E+05	2,10E+00	1,05E+06	2,02E+00
144	5,50E+05	2,05E+00	5,29E+05	1,69E+00	7,99E+05	1,74E+00
168	5,40E+05	2,03E+00	4,58E+05	1,54E+00	6,50E+05	1,54E+00

(h)= Horas, (Xv)= concentração células viáveis, (Ln) = Logarítmo Natural

**Gráfico 1** - Variação da vel. max crescimento (μmax)



## 4 DISCUSSÃO

No presente ensaio, buscou-se implementar um protocolo para o cultivo de células Vero em pseudosuspensão com utilização de microcarregadores Cytodex1 em meio sem Soro fetal Bovino (VP-SFM) com sistema agitado em frasco tipo *spinner* de 100 mL, com volume de trabalho final de 50 mL<sup>9</sup>. Os parâmetros de trabalho foram; agitação de 20 rpm e temperatura de 37 °C em estufa, com umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub>.

O preparo do inóculo se dá com a semi confluência das células cultivadas em garrafas tipo frascoT 75cm<sup>2</sup> inoculadas com células Vero na proporção de diluição 1:4, e com aproximadamente 72 horas de cultivo. A separação das células foi feita com tripsinização. A tripsina é utilizada para o descolamento das células quando aderidas na parede da garrafa de cultivo (monocamada). Essa adesão se dá por conta da diferença iônica entre a parede da garrafa e a membrana celular, sendo as cargas da parede da garrafa e da membrana celular opostas, elas naturalmente se atraem. No entanto não é só este fator que permite a adesão e espraiamento das células formando a monocamada, as células também produzem as caderinas que são proteínas de ligação, como a Vitronectina e Fibronectina<sup>10</sup>.

A tripsina quebra essas proteínas de ligação fazendo com que as células descolem e permitam que se propague um novo cultivo. Quando se utiliza o soro fetal bovino ele neutraliza a ação da tripsina, permitindo que as células continuem aderindo e se desenvolvendo. O meio isento de soro não tem ação inibidora de tripsina, conforme informação do fabricante então foi utilizado o inibidor de tripsina STI T6622 (SigmaAldrich). Após o inóculo com células Vero, foi estabelecido um período de adesão celular aos Mcs, sendo que o sistema permaneceu sem agitação por 60 min e por 3 min sob agitação constante. Este ciclo idealmente deve durar 8 horas, para a perfeita adesão das células ao Mc, fator determinante para o bom desempenho do cultivo com ganho de produtividade ao final. Também foram retiradas amostras com volume

de 1 mL a cada 24 horas para contagem dos núcleos e análise dos metabólitos, posteriormente<sup>11</sup>.

A tabela 1, mostra os dados provenientes da contagem dos núcleos, concentração celular e o logaritmo natural de  $X_v$  ( $\ln X_v$ ), conforme procedimento anteriormente descrito. Os dados devidamente registrados geraram os gráficos para análise da cinética. Contagem dos núcleos: a contagem dos núcleos é uma técnica permite determinar a concentração de células no decorrer do cultivo. Para tanto retirou-se uma alíquota de 1 mL a cada 24 horas. As células aderidas aos Mcs, são destruídas pela ação do ácido cítrico e os núcleos que se preservam são corados com cristal violeta, o que possibilita obter a concentração de núcleos/mL na contagem em hemocitômetro.

Multiplicando-se o valor dos núcleos encontrados pelo volume de trabalho é possível se obter a concentração celular nos momentos distintos do cultivo. É possível observar que houve maior crescimento para os ensaios 2 e 3 com os respectivos inóculos com maior concentração de células. Para o ensaio 1, cujo inóculo foi de  $7,0 \cdot 10^4$  cel/mL, a concentração máxima chegou a  $5,50 \cdot 10^5$  cel/mL após 144 horas de cultivo e um período de adaptação (fase lag) de aproximadamente 48 horas.

No ensaio 2 o inóculo foi de  $1,00 \cdot 10^5$  cel/mL e a curva de crescimento não apresentou a fase lag, tal como observado no ensaio 1, a concentração máxima chegou a  $1,07 \cdot 10^6$  cel/mL após 96 horas. Já no ensaio 3 que obteve a maior concentração o inóculo foi de  $1,40 \cdot 10^5$  cel/mL, as células cresceram sem apresentar fase lag e atingiram a concentração máxima de  $1,20 \cdot 10^6$  cel/mL após 96 horas de cultivo, como no ensaio 2.

O desempenho das células Vero em relação a concentração máxima atingida, para esse desenho de experimento, está relacionada com a concentração celular do inóculo e sua qualidade já que é altamente recomendável utilizar células que estejam em semi confluência para a formação do inóculo. A velocidade específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ) é um dado que nos auxilia a compreender como

se dá o crescimento celular ao longo do tempo e está relacionada com o tempo de multiplicação celular. Fatores como concentração de nutrientes, temperatura, concentração de oxigênio no meio, variação do pH e formação de metabólitos tóxicos para a células interferem na concentração celular atingida ao final do processo<sup>12,13</sup>.

A sinalização para o crescimento celular também é um fator a ser considerado, uma vez que se dá numa população com determinada concentração<sup>14</sup>. No gráfico 1, é possível observar o desempenho relativo aos ensaios, sendo que para o ensaio 1 houve um período inicial entre 0 e 24 horas sem crescimento (fase lag), e após esse período as células cresceram de forma exponencial atingindo 2,04 h<sup>-1</sup> com 144 h de cultivo. Para o ensaio 2 a velocidade máxima de crescimento foi de 2,37 h<sup>-1</sup> após 96 h de cultivo e no ensaio 3, a velocidade máxima chegou 2,14 h<sup>-1</sup> após 72 h de cultivo.

Esses resultados mostram que o ensaio 2 foi o que apresentou melhor desempenho entre os experimentos. Os valores de  $\mu_{max}$  para os ensaios em *spinners* nos permite observar que o melhor desempenho foi obtido para o ensaio 2 cujo valor ficou em 0,0334 h<sup>-1</sup> em comparação com os ensaios 1 = 0,0185 h<sup>-1</sup> e 3, 0,0311 h<sup>-1</sup> (gráfico 1).

A apreciação da velocidade máxima de crescimento em conjunto com outros valores aqui discutidos permite uma análise de desempenho para determinar o melhor momento para uma intervenção específica no cultivo, tais como suplementação de algum nutriente ou infecção viral para produção de antígeno<sup>15</sup>. Este valor de  $\mu_{max}$  está relacionado com o tempo de duplicação celular, e os valores aferidos no presente trabalho foram; ensaio 1 = 37,47 h, 2 = 21,15 h e 3 = 22,29 h. Os dados acima citados como um todo servem como subsídeo para a tomada de decisão em relação a utilização do cultivo das células vero para esse sistema.

## 5 CONFLITO DE INTERESSE

Declaro que não há conflito de interesse durante o desenvolvimento do estudo.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Johns Hopkins University, coronavirus reasource center. Available at <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> [acesso 08 de agosto de 2021].
2. Van Riel, D., de Wit, E. Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nat. Mater*, s/v n.19, p.810–812, 2020.
3. Guimarães, R. Anti-covid vaccines: A look from the collective health. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 25, n. 9, p. 3579–3585, 2020.
4. Marson, Fernando Augusto Lima. "Um milhão de casos de COVID-19: o que aprendemos?." *Revista de Medicina*, v. 99, n. 2: p. 209-212, 2020.
5. Gomord, Véronique, et al. "Production and glycosylation of plant made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge." *Plant Biotechnology Journal*, v. 2.n. 2, p. 83-100, 2004.
6. Delgadillo Álvarez, D. M. DEL C. Cultivos celulares: reducción histórica en el uso de animales de laboratorio. *Revista Fesahancccal*, v. 7, n. 1, p. 17-24, 2021.
7. Fiocruz, "Cultivo celular." Alves, Emanuele Amorim, Anna Christina Rosa Guimarães. [https://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo\\_5\\_vol2.pdf](https://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo_5_vol2.pdf), [acesso 08 de agosto de 2021].
8. Levine, D.W., Wong, J.S., Wang, D.I.C. et al. Microcarrier cell culture: New methods for research-scale application. *Somat Cell Mol Genet*, s/v n.3,p. 149–155, 1977.
9. Almeida, Aline Guimarães de, et al. "Estudo de condições passíveis de ampliação de escala para propagação de células vero em microcarregadores." [Dissertação de mestrado] São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013.

10. Lerman, Max J., et al. "The evolution of polystyrene as a cell culture material." *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v.24, n.5, p.359-372, 2018.

11. Gupta, Abhishek J., et al. "Factors causing compositional changes in soy protein hydrolysates and effects on cell culture functionality." *Journal of agricultural and food chemistry*, v.61,n.45,p.10613-10625, 2013.

12. Kim, Dong K. "Statistical methods for estimating doubling time in in vitro cell growth." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v.33,n.4,p.289-293, 1997.

13. Mendonça, Ronaldo Zucatelli, and C. A. Pereira. "Cell metabolism and medium perfusion in VERO cell cultures on microcarriers in a bioreactor." *Bioprocess Engineering*, v.18,n.3,p. 213-218, 1998.

14. Powers, C. J., S. W. McLeskey, and A. Wellstein. "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling." *Endocrine-related cancer*, v.7,n.3,p. 165-197, 2000.

15. Schügerl, Karl. "Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years." *Journal of biotechnology*, v.85,n.2,p. 149-173, 2001.