**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Utilização do monitoramento de reações múltiplas para quantificação de
produtos de interesse biotecnológico**

EDSON GALDINO DO NASCIMENTO FILHO

**RIBEIRÃO PRETO (SP)
2016**

EDSON GALDINO DO NASCIMENTO FILHO

**Utilização do monitoramento de reações múltiplas para quantificação de
produtos de interesse biotecnológico**

Dissertação de Mestrado Profissional
apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Vitor Marcel Faça

RIBEIRÃO PRETO (SP)

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nascimento Filho, Edson Galdino do

Utilização do monitoramento de reações múltiplas para quantificação de produtos de interesse biotecnológico. Ribeirão Preto, 2016.

128 f. : il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Orientador: Prof. Dr. Vitor Marcel Faça

1. Espectrometria de massas. 2. Monitoramento de reações múltiplas.
3. Fator VIII recombinante. 4. Hemofilia A.

FOLHA DE APROVAÇÃO

EDSON GALDINO DO NASCIMENTO FILHO

Utilização do monitoramento de reações múltiplas para quantificação de produtos de interesse biotecnológico

Dissertação de Mestrado Profissional
apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração:
Biotecnologia

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha família, por todo o incentivo, compreensão e,
especialmente, pela intensa dedicação à realização
dos meus sonhos e à formação de quem sou hoje.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial à minha mãe e ao meu padrasto, Rosangela e Luis Paulo, pela confiança, compreensão e incentivo, essenciais à concretização desta importante etapa.

À minha avó e ao meu irmão, Dalva e Vitor, por serem pessoas tão especiais que dividiram comigo os momentos desta trajetória.

À Vera Epifânio, técnica do Laboratório de Proteômica, que eu tive o privilégio de conhecer e conviver todos os dias cujo apoio foi de fundamental importância para realização de várias etapas deste projeto e, sobretudo, pela amizade construída e dos conselhos nos momentos difíceis.

Aos meus companheiros de laboratório, Gabriela Solano e Guilherme Lanfredi, pela ajuda nos momentos-chaves durante o desenvolvimento deste projeto, além de tornar mais alegre o tempo de trabalho.

Aos meus amigos do Departamento de Bioquímica, Andressa, Tatiana, Raquel, Nathália, Israel, Niele, Gláucia, Silvana, Hanna, Odete, Silvinha, Mariane, Deisy e Silvia.

Ao Laboratório de Cultura Celular, em especial ao Mario Soares de Abreu Neto pelo apoio e disponibilidade.

À Dr^a Virgínia Picanço e Castro, pela colaboração e importância para realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Eduardo Brandt pela colaboração no processo de síntese de peptídeos.

Ao André Brandão e Gabriela Solano por terem me ajudado a entender todo o processo de síntese química de peptídeos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica pela amizade e ajuda proporcionadas.

À Raquel Botelho, secretária da pós-graduação, pela disponibilidade e atenção com que sempre me atendeu e ajudou.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pela oportunidade e apoio financeiro.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo conhecimento adquirido e experiências vivenciadas durante o período de mestrado.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro e incentivo à realização desta pesquisa.

Aos integrantes da banca examinadora, que disponibilizaram parte de seu tempo para a análise deste trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito”.

(Martin Luther King)

RESUMO

NASCIMENTO FILHO, EG. **Utilização do monitoramento de reações múltiplas para quantificação de produtos de interesse biotecnológico**. 2016. 128 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A biotecnologia é definida como qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para alguma utilização específica (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 1992). Os produtos biotecnológicos devem atender certas especificações exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicine Agency* (EMA) e *World Health Organization* (WHO). Para isso, utilizam-se técnicas rotineiras aplicadas à pesquisa e análise de biomoléculas como *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), *Western blot*, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e espectrometria de massas (MS). A abordagem do Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) é considerada uma interessante alternativa aos ensaios imunoenzimáticos para caracterização e quantificação total de proteínas terapêuticas, sejam elas recombinantes ou não (KIM e DOYLE, 2010). Esta abordagem é baseada nos fundamentos da proteômica quantitativa pela utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) cuja plataforma apresenta alta especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade quantitativa em suas análises para detecção simultânea de várias regiões da estrutura proteica. Em vista disso, estabeleceu-se uma metodologia para quantificação do FVIII recombinante (FVIIIr) produzido pela linhagem celular humana Sk-Hep-1 ou do FVIII derivado do plasma (FVIII_{dp}), ambos utilizados no tratamento da Hemofilia A (HEMA). Para o estabelecimento da metodologia, toda uma estratégia de seleção e síntese química de peptídeos representativos das cadeias pesada e leve do FVIII humano foi empregada. Tais peptídeos obtidos foram utilizados como padrões das análises. Além disso, foi demonstrada a relação direta entre a quantificação total do FVIII com técnicas convencionais como ELISA,

possibilitando a aplicação rotineira dessa abordagem para quantificação do FVIIIr e do FVIII_{dp}.

Palavras-chave: espectrometria de massas, monitoramento de reações múltiplas, fator VIII recombinante, hemofilia A.

ABSTRACT

NASCIMENTO FILHO, EG. **Utilization of multiple reaction monitoring for quantification of biotechnological interest products.** 2016. 128 f. Dissertation (Master degree). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Biotechnology is defined as any technological application that uses biological systems, living organisms, or derivatives thereof, to make or modify products or processes for a specific use (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 1992). Biotechnological products must meet certain specifications required by Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Food and Drug Administration (FDA), European Medicine Agency (EMA), and World Health Organization (WHO). For that routine techniques applied to research and analysis of biomolecules such Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), Western blot, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and mass spectrometry (MS) are utilized as quality control techniques. The MS-based approach termed Multiple Reaction Monitoring (MRM) is considered an interesting alternative to immunoassays for the total quantification and characterization of therapeutic proteins, whether recombinant or not (KIM e DOYLE, 2010). This approach is based on the fundamentals of quantitative proteomics and uses of liquid chromatography coupled to tandem spectrometric mass (LC-MS/MS) to obtain a highly specific, sensitive and reproducible analysis for quantification of multiple regions of a given protein structure. Here, we established a methodology for total quantification of recombinant FVIII (rFVIII) produced in Sk-Hep-1 human cell line or of plasma derived FVIII (pdFVIII), both used in the treatment of Hemophilia A (HMA). For that, we adopted a strategy of selection and chemical peptide synthesis of representative peptides of the heavy and light chains of human FVIII, which were used as standards in the analysis. The quantitative MRM method developed here indicated a direct correlation with FVIII quantitative techniques such ELISA, which allows routine application of such approach for rFVIII and pdFVIII quantification.

Key words: mass spectrometry, multiple reaction monitoring, recombinant factor VIII, hemophilia A.

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AT	Antitrombina
ATCC	<i>American type culture collection</i>
Arg/R	Aminoácido arginina
Asn/N	Aminoácido asparagina
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina do soro bovino)
Ca ²⁺	Íons cálcio
CAMPM	Cininogênio de alto peso molecular
cDNA	DNA complementar
CID	<i>Collision-induced dissociation</i> (Dissociação induzida por colisão)
CO ₂	Gás carbônico
Cys/C	Aminoácido cisteína
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido deoxirribonucleico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenediamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por eletrospray)
FI	Fator I
FII	Fator II
FIIa	Fator II ativo
FIII	Fator III

FIV	Fator IV
FV	Fator V
FVa	Fator V ativo
FVII	Fator VII
FVIIr	Fator VII recombinante
FVIII	Fator VIII
FVIIIa	Fator VIII ativo
FVIII _{dp}	Fator VIII derivado do plasma
FVIIIr	Fator VIII recombinante
FVIIIrBD	FVIIIr com parte do domínio B deletado
FIX	Fator IX
FIXr	Fator IX recombinante
FIXa	Fator IX ativo
FX	Fator X
FXa	Fator X ativo
FXI	Fator XI
FXII	Fator XII
FL	Fosfolipídeos
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxycarbonil
FvW	Fator de <i>von Willebrand</i>
Glu/G	Aminoácido glutamina
HEMA	Hemofilia A
His/H	Aminoácido histidina
H ₂ O	Água
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
IAA	Iodoacetamida

LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i> (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial)
Lys/K	Aminoácido lisina
Met/M	Aminoácido metionina
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
m/z	<i>mass-to-charge ratio</i> (relação entre massa e carga)
NMP	N-metilpirrolidona
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Salina tamponada com fosfato)
PC	Proteína C
Phe/F	Aminoácido fenilalanina
poli P	Polifosfato
PS	Peptídeo sinal
PS	Proteína S
RE	Retículo endoplasmático
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNA _m	RNA mensageiro
S.A.R.P.	<i>Specialty Assayed Reference Plasma</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sódio)
Ser/S	Aminoácido serina
SOFS	Síntese orgânica de peptídeos em fase sólida
SFB	Soro fetal bovino
TFA	Ácido trifluoroacético
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
Thr/T	Aminoácido treonina
TIS	Triisopropilsilano
TNBS	Ácido trinitrobenzenossulfônico
TP	Tempo de protrombina

Trp/W	Aminoácido triptofano
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada
Tyr/Y	Aminoácido tirosina

SÍMBOLOS E UNIDADES

cm ²	Área
g	Grama
eV	Elétron-volt
°C	Graus Celsius
kb	Kilobase
kDa	Kilodáton
pH	Log negativo da concentração de H ⁺
®	Marca registrada
min	Minuto
µg	Micrograma
µmol	Micromol
µL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
M	Molar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
pb	Pares de base
%	Porcentagem
rpm	Rotações por minuto
™	<i>Trademark</i>
UI	Unidade internacional
x g	Gravidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo	5
Figura 2. Fragmentações de um peptídeo por CID	6
Figura 3. Número de publicações por ano indexadas no <i>Pubmed</i> quando pesquisados os termos “ <i>Multiple Reaction Monitoring and Mass Spectrometer</i> ”	8
Figura 4. A via clássica da cascata da coagulação sanguínea	17
Figura 5. O novo modelo da coagulação sanguínea baseado em superfícies celulares	18
Figura 6. Representação esquemática do FVIII da coagulação sanguínea	21
Figura 7. Estrutura heterodimérica do FVIII plasmático	22
Figura 8. Estrutura do FVIII humano recombinante	25
Figura 9. Fluxograma mostrando as etapas de desenvolvimento do projeto... .	33
Figura 10. Visualização da linhagem celular humana Sk-Hep-1 utilizada na produção de FVIIIr	34
Figura 11. Visualização dos peptídeos nos domínios das cadeias pesada e leve do FVIII humano	49
Figura 12. Desenvolvimento da abordagem do Monitoramento de Reações Múltiplas para quantificação total do FVIII humano pelo <i>software Skyline</i>	52
Figura 13. Determinação dos tempos de retenção dos peptídeos representativos do FVIII humano pelo <i>software Skyline</i>	54
Figura 14. Visualização dos espectros das transições iônicas dos peptídeos endógenos do plasma de referência	56
Figura 15. Visualização dos espectros das transições iônicas dos peptídeos endógenos do sobrenadante da linhagem celular Sk-Hep-1	58
Figura 16. Avaliação da digestão enzimática pela área total dos peptídeos endógenos em diferentes tempos de incubação	60
Figura 17. Uma visão geral do processo de compilação das ferramentas utilizadas na proteômica quantitativa	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência da Hemofilia A em função do total de coagulopatias diagnosticadas no Brasil	15
Tabela 2. Seleção dos peptídeos representativos do FVIII humano utilizando as informações disponibilizadas pelo Uniprot e <i>PeptideAtlas</i>	35
Tabela 3. Relação dos peptídeos sintetizados quimicamente em fase sólida	36
Tabela 4. Sítios de modificações pós-traducionais do FVIII humano da coagulação sanguínea.....	48
Tabela 5. Seleção dos peptídeos representativos do FVIII humano baseada em critérios como tamanho, número de observações e sequência peptídica.....	51
Tabela 6. Os valores das energias de colisões dos peptídeos com e sem marcação isotópica utilizados no desenvolvimento da abordagem do MRM	55
Tabela 7. Cálculo da concentração peptídica e da massa injetada nas amostras preparadas pela adição dos peptídeos marcados isotopicamente	62
Tabela 8. Razão entre as áreas totais médias dos peptídeos sem e com marcação isotópica referentes às cadeias pesada e leve do FVIII humano	63
Tabela 9. Cálculo da quantificação total do FVIII humano pela abordagem do MRM	64
Tabela 10. Quantificação dos Fatores VIII recombinante e plasmático pelos ensaios imunoenzimático (ELISA) e de atividade biológica (Cromogênico)	65
Tabela 11. Comparação entre os valores obtidos das quantificações totais realizadas pelos ensaios imunoenzimático (ELISA) e proteômico (MRM).....	66
Tabela 12. Detecção dos peptídeos representativos dos Fatores VII, VIII e IX pela abordagem do MRM virtual	67

SUMÁRIO

1 Introdução	2
1.1 A biotecnologia aplicada às análises de biofármacos	2
1.2 Fundamentos básicos do espectrômetro de massas	4
1.3 Monitoramento de reações múltiplas	7
1.4 Fator VIII como produto de interesse biotecnológico	11
1.5 Hemofilia A.....	13
1.6 Novo modelo da coagulação sanguínea	15
1.7 Gene, estrutura e síntese do Fator VIII humano.....	20
1.8 Produção de Fator VIII recombinante	23
 2 Objetivos	 28
2.1 Geral.....	28
2.2 Específicos	28
 3 Justificativa	 30
 4 Material e métodos	 33
4.1 Fluxograma da metodologia utilizada	33
4.2 Material biológico.....	33
4.2.1 Sobrenadante de cultura celular	33
4.2.2 Plasma de referência.....	34
4.3 Metodologia	35
4.3.1 Seleção dos peptídeos representativos	35
4.3.2 Síntese de peptídeos	36
4.3.2.1 Ativação e verificação da resina	37
4.3.2.2 Ativação e adição dos aminoácidos para acoplamento	37
4.3.2.3 Clivagem dos peptídeos sintetizados	39
4.3.2.4 Precipitação dos peptídeos clivados	40
4.3.3 Dissolução dos peptídeos sintéticos	40
4.3.4 Purificação dos peptídeos sintéticos pela cromatografia líquida de alta eficiência	41
4.3.5 Caracterização dos peptídeos pela cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução	41
4.3.6 Cultura de células humanas.....	42
4.3.7 Quantificação total do FVIII humano	43

4.3.8	Quantificação da atividade biológica do FVIII humano	43
4.3.9	Concentração do sobrenadante	44
4.3.10	Quantificação de proteínas totais	44
4.3.11	Digestão enzimática das proteínas totais	44
4.3.12	Extração dos peptídeos das amostras	45
4.3.13	Quantificação total do FVIII humano nas amostras pelo espectrômetro de massas.....	46
4.3.14	Processamento dos resultados obtidos	46
5	Resultados	48
5.1	Modificações pós-traducionais do Fator VIII humano	48
5.2	Relação dos peptídeos nas cadeias pesada e leve	49
5.3	Seleção dos peptídeos representativos do Fator VIII humano	50
5.4	Desenvolvimento da abordagem do monitoramento de reações múltiplas	52
5.5	Avaliação da digestão enzimática	55
5.6	Quantificação total do Fator VIII humano pela abordagem do monitoramento de reações múltiplas.. ..	61
5.7	Determinação das quantificações total e específica	65
5.8	Comparação entre as diferentes quantificações analíticas	66
5.9	Estabelecimento de outros peptídeos para quantificação total	67
6	Discussão	69
7	Conclusão.....	82
8	Referências	84
9	Apêndices	94
10	Anexos	96

Introdução

1 Introdução

1.1 A biotecnologia aplicada às análises de produtos biotecnológicos

De acordo com a definição estabelecida na Convenção sobre Diversidade Biológica, biotecnologia significa “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para alguma utilização específica” (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 1992). Portanto, entende-se que a biotecnologia é uma área de intensa inovação que objetiva o desenvolvimento de projetos com finalidades industriais.

Um produto biotecnológico pode ser caracterizado como anticorpos, biofármacos, biossimilares, proteínas derivadas do sangue, terapias genética e celular, vacinas entre outros. Estes produtos são utilizados no tratamento, diagnóstico ou prevenção de diversas doenças.

O uso da biotecnologia para produção de biofármacos tornou-se crescente ao longo dos anos, possibilitando o desenvolvimento de medicamentos mais seguros e eficientes no tratamento e diagnóstico de diversas doenças. É fundamental, portanto, a avaliação dos biofármacos por diferentes técnicas analíticas que sejam capazes de demonstrar a presença de formas relacionadas ou degradadas das proteínas recombinantes que podem causar efeitos indesejáveis com a diminuição ou perda total de sua atividade biológica (APOSTOL *et al.*, 2008).

Existem certas especificações estabelecidas pelas agências reguladoras que precisam ser empregadas na produção de biofármacos para garantir a sua segurança, qualidade e eficiência terapêutica. Todos esses cuidados pré-estabelecidos são necessários antes da liberação comercial do biofármaco. Deste modo, a validação consiste em uma importante etapa para determinar a pureza e a

potência do produto recombinante cuja finalidade é atender as especificações nacionais e internacionais exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA) e *World Health Organization* (WHO). Podemos destacar que as técnicas rotineiras aplicadas à pesquisa e análise de biomoléculas como *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), *Western blot*, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), espectrometria de massas (MS) são algumas das metodologias analíticas utilizadas na validação de produtos biotecnológicos para demonstrar a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados por meio da caracterização e quantificação de proteínas, sejam elas recombinantes ou não (KIM e DOYLE, 2010). Desta maneira, os parâmetros analíticos para validar são determinados basicamente pela especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade da técnica utilizada (DOMON e AEBERSOLD, 2006).

Dentre todas as metodologias disponíveis, a MS destaca-se como uma alternativa promissora aos métodos convencionais de quantificação proteica. Isso ocorre devido à possibilidade de identificar proteínas em um curto espaço de tempo, diferentemente dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) que detectam apenas uma proteína por vez (SHI *et al.*, 2012). Em vista disso, abre-se um importante campo de aplicação da MS para desenvolver metodologias direcionadas ao acompanhamento da produção e validação de produtos biotecnológicos (KALTASHOV *et al.*, 2010), dado que as proteínas recombinantes necessitam de análises altamente minuciosas a fim de conseguir a aprovação das agências reguladoras e, assim, sua disponibilização no mercado para finalidades terapêuticas.

1.2 Fundamentos básicos do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas consegue determinar a relação entre massa e carga (m/z) de elementos ionizados em fase gasosa (INTERNACIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2014). Os resultados são gerados sob a forma de um espectro cuja abscissa corresponde à m/z e a ordenada mostra a intensidade iônica. Todo equipamento é composto por um sistema de introdução de amostras, fonte de ionização, analisador de massas e detector que são partes essenciais à captação de dados.

A fonte de ionização é a parte do equipamento onde são produzidos os íons na fase gasosa. Uma das técnicas mais utilizadas para volatilizar e ionizar peptídeos denomina-se Ionização por *Eletrospray* (ESI) que acoplada à cromatografia líquida aumenta a capacidade analítica do espectrômetro de massas (GSTAIGER e AEBERSOLD, 2009). A ionização ocorre quando os analitos em solução atravessam um fino capilar com determinada voltagem. No final deste processo são formadas gotículas constituídas pelo solvente e íons positivos. Aplica-se, então, um gás de solvatação para eliminar as moléculas de solvente, diminuindo a área total dessas gotas. Isso ocasionará na repulsão entre as cargas positivas que serão ejetadas da gota formando os íons positivos de interesse (AEBERSOLD e MANN, 2003).

Após a obtenção dos íons, estes são submetidos ao analisador de massas que é responsável em separar os íons de acordo com sua m/z . O analisador de massas mais frequentemente utilizado em análises quantitativas é o quadrupolo, constituído por quatro barras metálicas dispostas paralelamente e arranjadas em pares opostos (GILLETTE e CARR, 2013). Sendo que cada um destes pares está conectado com diferentes potenciais elétricos. A essas barras aplica-se uma voltagem de corrente contínua e alternada que gera um campo eletrostático

oscilante. Isso determina que a transmissão dos íons possa ocorrer de maneira seletiva, para permitir a passagem de determinados íons, ou de varredura para se obter um espectro de massas com todas as espécies iônicas presentes na amostra em determinado instante.

O analisador de massas do tipo quadrupolo, um dos mais comuns e robusto dentre os diversos tipos de analisadores disponíveis, é constituído por três compartimentos. Os íons com determinada m/z são selecionados no primeiro analisador de massas (MS1), sendo fragmentados na câmara de colisão e, novamente, selecionados no segundo analisador de massas (MS2) (**Figura 1**). A utilização do quadrupolo em análises quantitativas deve-se, portanto, à sua alta capacidade para selecionar íons conforme a m/z .

Figura 1. Representação de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo. O espectrômetro é configurado para selecionar as transições tanto do íon precursor quanto dos íons produtos referentes ao peptídeo selecionado. Este equipamento é utilizado na proteômica quantitativa para identificação das transições iônicas. O primeiro analisador de massas (MS1) é programado para selecionar o íon precursor do peptídeo ionizado para ser fragmentado na câmara de colisão. Os fragmentos do íon precursor, denominados íons produtos, são novamente selecionados no segundo analisador de massas (MS2) para serem detectados. Desta maneira, apenas os íons moleculares escaneados no MS1 e MS2 são detectados resultando em um espectro de massas (Adaptado de GILLETTE e CARR, 2013).

A fragmentação dos peptídeos previamente ionizados é usualmente realizada pela dissociação induzida por colisão (CID) em MS (TABB *et al.*, 2003). Neste processo, aplica-se uma energia cinética cuja aceleração permitirá que os peptídeos ionizados colidam com o gás inerte. Posteriormente, essa energia cinética será convertida em energia vibracional levando à desestabilização das ligações químicas presentes nas cadeias polipeptídicas culminando na formação de íons produtos (KINTER e SHERMAN, 2000), os quais são classificados como íons que apresentam carga residual (próton) na extremidade N-terminal gerando fragmentos -a, -b e -c, ou como íons que apresentam carga residual (próton) na extremidade C-terminal gerando fragmentos -x, -y e -z (ROEPSTORFF e FOHLMAN, 1984) (**Figura 2**).

Figura 2. Fragmentações de um peptídeo por CID. A figura mostra um peptídeo que pode ser clivado em 9 posições, gerando 18 fragmentos diferentes. Quando ocorre a fragmentação da cadeia polipeptídica, a carga positiva permanece no lado N-terminal, os íons são nomeados a_n, b_n e c_n, dependendo se a quebra aconteceu nas ligações CH – CO, CO – NH ou NH – CH da cadeia principal, sendo n correspondente ao número de cadeias laterais existentes no fragmento. Desta forma, se a carga positiva estiver na posição C-terminal da molécula os íons produzidos são denominados como x_n, y_n e z_n. (Adaptado de STEEN e MANN, 2004).

É importante destacar que os pares de íons fragmentos a/x, b/y e c/z são simétricos e complementares entre si. Como as ligações peptídicas são pouco energéticas, isso acaba facilitando a formação de íons -b e -y que são produtos de sua fragmentação (TABB *et al.*, 2003). Espera-se, portanto, que os pares de íons b/y sejam mais frequentes em relação aos outros pares. Apesar desta técnica ser amplamente utilizada em MS, ela apresenta limitações para peptídeos grandes devido à dificuldade de ionização.

A obtenção dos resultados no espectrômetro de massas é realizada pelo detector que tem a função de identificar e amplificar os sinais oriundos da corrente de íons (DASS, 2007). Estes sinais são transferidos até o sistema operacional de dados para então convertê-los resultando na formação de espectros baseados na intensidade.

1.3 Monitoramento de reações múltiplas

A técnica de MS torna-se ainda mais poderosa quando acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS). Assim, pode-se analisar misturas complexas de peptídeos, por exemplo, com monitoramento contínuo das espécies que estão sendo separadas pela cromatografia. Dentro desta estratégia, destaca-se a técnica de monitoramento de reações múltiplas (MRM), onde misturas complexas de compostos são constantemente e quantitativamente monitoradas para detectar a presença de espécies específicas pelo desenvolvimento metodológico do MRM para detectar peptídeos obtidos da proteólise.

Toda a informação obtida sobre a presença de modificações pós-traducionais e o processamento da estrutura proteica é fundamental ao desenvolvimento da abordagem do MRM (HANSSON e STENFLO, 2005). Além destas informações

obtidas na literatura científica, também se faz uso de bancos de dados e *softwares* baseados em proteômica para auxiliar na escolha dos melhores peptídeos representativos e, assim, contribuir com o processo de validação e otimização dos parâmetros necessários para quantificação da proteína de interesse. A abordagem do MRM vem ganhando cada vez mais popularidade conforme indicado pelo número crescente de publicações indexadas no *Pubmed* (**Figura 3**).

Figura 3. Número de publicações por ano indexadas no *PubMed* quando pesquisados os termos “*Multiple Reaction Monitoring and Mass Spectrometer*”.

O desenvolvimento do MRM se inicia com a geração de uma lista contendo os melhores peptídeos selecionados a partir de critérios previamente estabelecidos com objetivo de aumentar a sua especificidade, sensibilidade, precisão, acurácia e reprodutibilidade quantitativa durante a realização dos ensaios proteômicos. Para isso é necessário estabelecer critérios que incluem a exclusão de peptídeos

hidrofílicos curtos e hidrofóbicos longos devido aos problemas ocasionados na sua separação e geração de seus espectros (LIEBER e ZIMMERMAN, 2013; PICOTTI e AEBERSOLD; 2012). Desta maneira, entende-se que um bom peptídeo deve compreender entre 10 a 15 aminoácidos e não apresentar resíduos com modificações pós-traducionais em sua estrutura. Outra importante recomendação que deve ser aplicada na seleção dos peptídeos é excluir aqueles que contenham resíduos de asparagina (N) ou glutamina (Q) na posição N-terminal ou metionina (M), triptofano (W) e cisteína (C) na cadeia peptídica (LIEBER e ZIMMERMAN, 2013). No entanto, podemos escolher peptídeos que tenham apenas um resíduo de cisteína, porém devido à necessidade de alquilação do grupamento tiol presente em sua estrutura é preferível escolher os peptídeos que não contenham este resíduo.

Após a obtenção de uma lista tendo o conjunto de peptídeos que melhor representam a proteína de interesse é realizada a digestão enzimática *in silico* utilizando o banco de dados *Resource Protein Universal* (UniProt) para geração dos peptídeos (APWEILER *et al.*, 2004). Sendo assim, cliva-se a proteína em regiões que contenham os resíduos de lisina (K) ou arginina (R), culminando na formação de peptídeos trípticos pela utilização da tripsina como agente catalisador da digestão enzimática.

Em seguida, utiliza-se outro banco de dados denominado *PeptideAtlas* que possibilita a visualização dos peptídeos trípticos mais observados em outros experimentos proteômicos cujas informações foram depositadas neste banco. Essa iniciativa tem por finalidade de agilizar o planejamento experimental e garantir a seleção dos melhores peptídeos em relação ao número de visualizações. Também existem outras características que são mostradas no *PeptideAtlas* como

hidrofobicidade, carga, energia de colisão, tempo de retenção e espectros de massas.

Além das informações obtidas nos bancos de dados, faz-se uso de *softwares* direcionados ao desenvolvimento e análise de proteínas por MRM, como o *Skyline*, que gera as possíveis transições dos íons precursores e produtos dos respectivos peptídeos originados da digestão enzimática *in silico* (MACLEAN *et al.*, 2010). Isto é possível pela importação da sequência proteica que se encontra disponível no UniProt ou *PeptideAtlas*. Sendo assim, as informações obtidas no *Skyline* são utilizadas como parâmetros de validação analítica aplicados ao desenvolvimento do MRM. É importante ressaltar que este *software* se baseia em bibliotecas *ProteoWizard* para efetuar as análises dos dados proteômicos gerados pela MS, o que garante maior confiabilidade (KESSNER *et al.*, 2008).

Quando ocorre a fragmentação dos peptídeos na câmara de colisão, isso produz íons do tipo -a, -b, -c, -x, -y e -z (HOLMAN *et al.*, 2012). No entanto, utilizamos apenas os íons -b e -y pelo motivo de aparecerem com mais frequência do que os outros na amostra (TABB *et al.*, 2003). Esse cuidado no momento de selecionar os íons repercute diretamente na sensibilidade das análises proteômicas.

Para determinar o tempo de retenção dos peptídeos e as suas transições iônicas mais relevantes é necessário fazer primeiramente uma corrida exploratória no espectrômetro de massas com intuito de obter as informações desejadas. Prepara-se então uma mistura com todos os peptídeos para realização do experimento. Além disso, deve-se determinar o tempo total da corrida do gradiente de eluição usado na cromatografia líquida de ultra eficiência. Depois de realizada a corrida, os resultados obtidos são exportados ao *Skyline* para determinar a seleção das transições iônicas mais relevantes. Recomenda-se selecionar entre 3 a 5

transições dos íons produtos com a finalidade de reduzir a probabilidade de resultados falsos positivos durante as análises proteômicas (PICOTTI e AEBERSOLD, 2012).

A quantificação absoluta ou relativa são duas estratégias utilizadas para determinar a abundância da proteína de interesse nas análises proteômicas baseadas no MRM (PICOTTI e AEBERSOLD, 2012). Desta maneira, podemos adicionar nas amostras quantidades conhecidas de peptídeos sintéticos marcados isotopicamente que se caracterizam como padrões internos cuja estratégia é empregada para quantificação absoluta de proteínas (ONG *et al.*, 2003). Ou então, podemos realizar a quantificação relativa utilizando apenas os peptídeos sem marcação isotópica como referência para calcular a intensidade do peptídeo pela área obtida (NEILSON *et al.*, 2011) ou mediante a contagem espectral do peptídeo (MANN e KELLEHER, 2008).

1.4 Fator VIII como produto de interesse biotecnológico

O Fator VIII (FVIII) da coagulação sanguínea, também conhecido como Fator Anti-hemofílico (LENTING *et al.*, 1998), é uma proteína economicamente interessante à indústria pela sua utilização no tratamento de pacientes hemofílicos que apresentam deficiência quantitativa de FVIII plasmático (STRYJEWSKA *et al.*, 2013).

Nos anos 70, surgiram avanços na indústria de hemoderivados que possibilitaram a obtenção de FVIII derivado do plasma (FVIII_{dp}) na sua forma liofilizada. Com isso, este produto permitiu uma mudança significativa no tratamento dos pacientes hemofílicos. Durante os anos 90, iniciaram-se pesquisas para

obtenção do FVIII recombinante (FVIIIr) como alternativa ao FVIII_{dp} pela ausência de contaminações virais (KAUFMAN, 1990).

Ainda não existem indústrias brasileiras com tecnologia para produzir concentrados de FVIII_{dp}. O plasma brasileiro é, portanto, fracionado por indústrias estrangeiras cujo procedimento eleva o preço final do FVIII liofilizado que retorna ao país. A baixa concentração plasmática do FVIII humano, cerca de 200 ng/mL, é outro fator que contribui ao elevado custo de sua purificação (FREITAS, 2014; RODRIGUES, 2013). O FVIIIr também precisa ser importado para realizar o tratamento de pacientes hemofílicos. A falta de incentivos e competitividade para que as indústrias brasileiras realizem algum tipo de inovação tecnológica aplicada à produção de biofármacos, acaba impedindo o desenvolvimento do setor biotecnológico no país.

A produção do FVIIIr possui certas vantagens em relação ao produto obtido diretamente do plasma como a isenção de risco de transmissão de vírus e uma capacidade inesgotável de obtenção. No entanto, existe o problema econômico que dificulta a sua produção em larga escala. O grande desafio da atualidade é a criação de estratégias que possibilite reduzir o custo total de um biofármaco no país. Uma das alternativas seria despertar o interesse da iniciativa privada em investir no setor de inovação tecnológica.

O projeto de criação da Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás) foi aprovado em dezembro de 2004. Esta empresa teria capacidade de fracionar até 500 mil litros de plasma anualmente para produzir hemoderivados como FVIII_{dp} (COORDENAÇÃO DA POLÍTICA NACIONAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS, 2009). Mesmo com esta iniciativa o país não se tornaria autossuficiente durante os próximos anos, para isto ocorrer a doação de

sangue precisaria aumentar em cinco vezes. Uma estratégia para resolver o problema da escassez de matéria-prima seria que a Hemobrás produzisse também o FVIIIr.

A produção comercial do FVIIIr ainda é restrita a poucas empresas pelo fato da complexidade associada ao seu processo de obtenção (LEE *et al.*, 2011). Isso contribui para que a produção de FVIIIr seja insuficiente em relação à crescente demanda mundial (MANNUCCI, 2003). Diante disso, entende-se que para solucionar este problema e diminuir o gasto público com as importações dos FVIII_{dp} e FVIIIr é necessário realizar o financiamento de pesquisas. Em 2000, houve um investimento da ordem de R\$ 11.500.000,00 em projetos aplicados ao desenvolvimento de fatores recombinantes da coagulação sanguínea. As realizações destes projetos têm como contrapartida facilitar a transferência tecnológica para produção de biofármacos à Hemobrás. Em relação aos produtos que possuem patentes registradas por grandes empresas, esse repasse de tecnologia seria extremamente dificultado devido aos interesses econômicos presentes no meio industrial que impedem qualquer tipo de concorrência, no qual possa diminuir o seu lucro.

1.5 Hemofilia A

A Hemofilia A (HEMA), também conhecida como hemofilia clássica, é uma doença hemorrágica de herança recessiva ligada ao cromossomo X, o que leva os pacientes à incapacidade de produzir corretamente um coágulo estável após a lesão tecidual (GITSCHER *et al.*, 1984). Essa deficiência resulta em manifestações hemorrágicas que podem ocorrer nas articulações, músculos, trato gastrointestinal e sistema nervoso central (COTRAN *et al.*, 2001).

O aparecimento da HEMA pode decorrer de fatores adquiridos ou hereditários. A sua forma adquirida é resultante do desenvolvimento de auto anticorpos associados às doenças autoimunes, câncer ou causas de origem desconhecida. Já a forma hereditária resulta de alterações genéticas específicas no gene que codifica a proteína do FVIII (BOLTON-MAGGS e PASI, 2003).

A concentração de FVIII plasmático e a frequência dos episódios hemorrágicos são dois importantes fatores que possibilitam a classificação da HEMA em três níveis de severidade (WHITE *et al.*, 2001):

- Grave: atividade do FVIII menor que 1% (0,01 UI/mL), média de um episódio de sangramento por semana. Ocorre aproximadamente em 50% dos pacientes.
- Moderada: atividade do FVIII entre 1% a 5% (0,01 – 0,05 UI/mL), média de um episódio de sangramento por mês. Ocorre aproximadamente em 20% dos pacientes.
- Leve: atividade do FVIII maior que 5% até 40% (0,05 – 0,40 UI/mL), menos de um episódio de sangramento por mês. Ocorre aproximadamente em 30% dos pacientes.

A incidência da HEMA é de 1 em cada 10.000 homens no mundo (OLDENBURG *et al.*, 2004). Isso ocorre devido ao caráter recessivo desta doença que afeta em sua grande maioria os homens. No Brasil, dados obtidos pelo Ministério da Saúde mostram que a HEMA é a coagulopatia mais diagnosticada dentre os pacientes hemofílicos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Incidência da Hemofilia A em função do total de coagulopatias diagnosticadas no Brasil.

	Hemofilia A		Coagulopatias	
	Nº	%	Nº Total	% Total
2010	8.369	52,06%	16.076	100%
2011	8.848	50,94%	17.370	100%
2012	9.122	49,17%	18.552	100%
2013	9.348	47,33%	19.751	100%
2014	9.616	45,65%	21.066	100%

Fonte: Ministério da Saúde.

Em 2014, constatou-se a existência de 143.523 casos de HEMA no estudo realizado com 106 países (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2015). No Brasil, diagnosticou-se 9.616 pacientes com HEMA (**Tabela 1**), houve então a necessidade de importar 285.150.250 UI de FVllldp e 289.662.250 UI de FVlllr, o que representa 574.812.500 UI de FVlll total utilizados no tratamento da HEMA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010 – 2014). Estes dados confirmam a importância terapêutica da produção de FVllldp e FVlllr pelas indústrias de base biotecnológica devido ao seu potencial econômico.

1.6 Novo modelo da coagulação sanguínea

Em 1964 foi proposto o primeiro modelo fisiológico da coagulação sanguínea cujo mecanismo compreende as vias intrínseca e extrínseca que convergem para uma via comum e resulta na formação do coágulo no tecido lesionado (DAVIE e RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964). Assim, todo o processo seria iniciado por

uma ativação sequencial de proteínas plasmáticas, denominadas como fatores de coagulação (DAVIE, 2003), que são secretadas principalmente por hepatócitos na corrente sanguínea sob a forma de zimógenos (WION *et al.*, 1985).

A via intrínseca ocorre de forma mais lenta e, inicia-se quando o sangue entra em contato com as superfícies de carga negativa, tal como colágeno e outros tipos de materiais. O cininogênio de alto peso molecular (CAPM) ativa o Fator XII (FXII) que, por sua vez, ativa o Fator XI (FXI). Este participa da formação do complexo tenase intrínseco na presença de cálcio e fosfolipídeos. O complexo, portanto, atua na ativação do Fator IX (FIX) que, junto do Fator VIII ativado (FVIIIa), ativa o Fator X (FX). Já a via extrínseca ocorre de forma mais rápida e, inicia-se quando ocorre a lesão do vaso que provoca a liberação do Fator Tecidual (FT) pelas células endoteliais, o qual ativa o Fator VII (FVII). Essa interação resulta em um complexo tenase extrínseco, que junto do cálcio, possibilita a ativação do FX (HANDIN *et al.*, 2003). A partir da ativação do FX, ambas as vias culminam ao mesmo ponto de partida, onde haverá reações sequenciais de ativação proteolítica que produzirá a trombina para estabilizar o tampão plaquetário no sítio da lesão (BROZE, 1995).

No entanto, este modelo não consegue explicar completamente a ocorrência da hemostasia *in vivo* (BECKER, 2005). Estudos recentes indicam que as células têm um importante papel dentro do processo de coagulação sanguínea (RIDDEL *et al.*, 2007). Além de não explicar o motivo no qual a ativação do FX pela via extrínseca não compensa o problema da via intrínseca, quando ocorre a falta de FVIII ou FIX (VINE, 2009). Diante dessas limitações, entendeu-se que seria necessário revisar o modelo clássico da coagulação do sangue (**Figura 4**). Para melhorar o entendimento deste processo, desenvolveu-se então um modelo que

mostrasse a interação entre os fatores de coagulação e as superfícies celulares para responder aos antigos questionamentos.

Figura 4. A via clássica da cascata da coagulação sanguínea. Representação esquemática das vias intrínseca e extrínseca que convergem em uma mesma via para formação de fibrina cuja função permite a estabilização do coágulo após uma lesão tecidual. Isso ocorre pela ativação sequencial de proteínas, que junto de outros elementos participantes, são denominados como fatores de coagulação sanguínea. FI – fibrinogênio; FII – protrombina; FIII – fator tecidual ou tromboplastina; FIV – íons cálcio; FV – pró-acelerina; FVII – pró-convertina; FVIII – fator anti-hemofílico; FIX – fator de Christmas; FX – fator de Stuart; FXI – antecedente de tromboplastina plasmática; FXII – fator de Hageman; FXIII – fator estabilizante de fibrina; FvW – fator de von Willebrand; CAPM – cininogênio de alto peso molecular; FL – fosfolípeidos (Adaptado de DAVIE e RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964; WRIGHT, 1962).

Atualmente utiliza-se o modelo celular da coagulação baseado em superfícies celulares que estabelece a divisão da hemostasia em quatro fases – iniciação, amplificação, propagação e finalização – sendo regulada por componentes celulares (HOFFMAN e MONROE, 2001) (**Figura 5**). Este modelo permite uma melhor compreensão do processo fisiopatológico da hemofilia cuja doença está relacionada

à deficiência de Fator X ativo (FXa) na superfície plaquetária. Deficiência esta que impede a produção de trombina para clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina que atua na estabilização do coágulo sanguíneo.

Figura 5. O novo modelo da coagulação sanguínea baseado em superfícies celulares. Após a lesão endotelial, o FT é exposto na corrente sanguínea ligando-se ao FVII, o qual é ativado. O complexo FT/FVIIa promove a ativação subsequente do FX e da protrombina. Uma pequena quantidade de trombina (FIIa) produzida é capaz de ativar o FXI, este participa da ativação do FIX na superfície das plaquetas. O FIXa promove a ativação do FX adicional. Simultaneamente, os traços de trombina produzidos ativarão o FVIII (cofator do FIX) e o FV (cofator de FX), os quais aumentam drasticamente a atividade catalítica do FIX e FX. Finalmente, a ativação da trombina converte o fibrinogênio em fibrina. Em paralelo, a liberação do polifosfato (poli P) pelas plaquetas ativadas pode estimular a ativação adicional dos FXII, FV e FXI e inibir a lise do coágulo (Adaptado de VERSTEEG *et al.*, 2013).

De forma resumida, o novo processo da coagulação é iniciado pela exposição do FT na corrente sanguínea após a lesão endotelial e de células vizinhas ou pela

ativação de células endoteliais ou monócitos (NEMERSON, 1988). Na fase de iniciação, o FT participa da ativação do FVII, formando um complexo que ativa os FIX e FX em pequenas quantidades (MONROE e HOFFMAN, 2009). O FXa promove a ativação do FV cuja associação forma o complexo protrombinase na superfície das células que expressam o FT. Esse complexo transforma pequenas quantidades de Fator II (FII) em trombina que são importantes durante a fase de amplificação (VINE, 2009). Nesta fase, ocorre a ativação de plaquetas que atraem os fatores de coagulação para sua superfície (HANDIN *et al.*, 2003). A trombina participa da ativação dos FV, FVIII e FXI na superfície de plaquetas ativadas. O complexo FVIII/FvW é dissociado, permitindo o FvW mediar a formação do tampão plaquetário no sítio da lesão (MONROE e HOFFMAN, 2009; VINE, 2009). Em seguida, tem-se a fase de propagação que é caracterizada pela agregação de plaquetas no sítio lesionado, além de produzir os complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas para produção de trombina (VINE, 2009). A maior quantidade de FXa é produzida na superfície da plaqueta pelo complexo tenase (FIXa/FVIIIa) (HOFFMAN, 2003). O FXa associa-se ao FVa ligado à plaqueta formando o complexo protrombinase (FXa/FVa) que converte a protrombina em trombina. Esta cliva o fibrinogênio em monômeros de fibrina que atua na estabilização do tampão plaquetário (RIDDEL *et al.*, 2007). Após o coágulo formado na região lesionada é necessário controlar a ativação da coagulação com anticoagulantes naturais, por exemplo, inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína C (PC), proteína S (PS) e antitrombina (AT) (ELIAS *et al.*, 1993; MALY *et al.*, 2007).

1.7 Gene, estrutura e síntese do Fator VIII humano

O gene do FVIII localiza-se na região 28 da extremidade distal do braço longo do cromossomo X (Xq28). Seu tamanho é de aproximadamente 180 kb de DNA genômico composto por 26 éxons que variam entre 69 a 3.106 pb. Já os íntrons são grandes, variam de 14 a 32 kb, e representam aproximadamente 95% do gene (GITSCHIER *et al.*, 1984). O RNA mensageiro (RNAm) do FVIII possui cerca de 9.000 nucleotídeos que codificam um polipeptídeo precursor com 2.351 aminoácidos. Após o processamento do peptídeo sinal, origina-se uma proteína madura com 2.332 aminoácidos de 280 kDa, aproximadamente (VEHAR *et al.*, 1984).

O FVIII é uma glicoproteína plasmática cuja síntese ocorre principalmente nos hepatócitos e células endoteliais. A estrutura nativa do FVIII inclui três domínios distintos A, B e C (KANE e DAVIE, 1988). Os domínios A são flanqueados por espaçadores denominados regiões acídicas, as quais contêm resíduos de ácido aspártico e glutamina (LENTING *et al.*, 1998). O domínio B, codificado pelo éxon 14, é altamente glicosilado em sua porção central com resíduos de asparagina, sendo que sua maior parte pode ser deletada sem acarretar em perda de atividade do FVIII (EATON *et al.*, 1986). Este domínio apresenta 19 dos 24 sítios de asparagina propensos à N-glicosilação de toda a molécula do FVIII, além de possuir sítios de clivagem antes da secreção e durante a ativação pela trombina (BOVENSCHEN *et al.*, 2005). A organização genômica e a estrutura dos domínios do FVIII encontram-se representadas na **Figura 6**.

Depois que o FVIII é sintetizado, o peptídeo sinal tem a função de direcioná-lo até o lúmen do Retículo Endoplasmático (RE), região na qual acontece o dobramento e a montagem de proteínas. O peptídeo sinal é clivado no RE para

formar a proteína madura de 2.332 aminoácidos. Também ocorre a N-glicosilação nos resíduos de asparagina e a formação das pontes de dissulfeto, principalmente no domínio B (DORNER *et al.*, 1987). A interação das chaperonas junto ao FVIII permite apenas a exportação de proteínas dobradas corretamente até o aparelho de Golgi por meio de vesículas.

Figura 6. Representação esquemática do FVIII humano da coagulação sanguínea. (A) Organização genômica do FVIII que contém 26 éxons. Domínio A1 (éxons 1 a 7); Domínio A2 (éxons 8 a 13); Domínio B (éxons 14); Domínio A3 (éxons 15 a 19); Domínio C1 (éxons 20 a 23); Domínio C2 (éxons 24 a 26). (B) FVIII sintetizado em sua forma precursora apresentando um peptídeo sinal cujo objetivo é direcionar a proteína até o Retículo Endoplasmático (RE), região responsável pela sua remoção. (C) FVIII maduro é exportado até o Sistema Golgi que promove a clivagem da proteína em três lugares. (D) A ativação do FVIII ocorre no plasma após a clivagem do domínio B, resultando na formação das cadeias pesada e leve unidas por uma ligação metálica. PS – peptídeo sinal (Adaptado de BOWEN, 2002).

Dentro do compartimento de Golgi, ocorre a clivagem do domínio B para formar uma cadeia pesada de 200 kDa ligada por um íon metálico com a cadeia leve de 80 kDa. O domínio B é clivado parcialmente antes da secreção pelo aparelho de Golgi, ou seja, este domínio ainda permanece na estrutura do FVIII inativo secretado no plasma (FOWLER *et al.*, 1990). Os resíduos de tirosina nas regiões ácidas são sulfatados para que a trombina reconheça os sítios de clivagem e, assim, ativar o FVIII (HORTIN *et al.*, 1986).

O FVIII é liberado no plasma sanguíneo sob a forma de um heterodímero inativo constituído pelas cadeias pesada (A1 – A2 – B de 200 kDa) e leve (A3 – C1 – C2 de 80 kDa), as quais são unidas por uma ligação metálica (**Figura 7**).

Figura 7. Estrutura heterodimérica do FVIII plasmático. (A) FVIII é liberado no plasma sanguíneo como um heterodímero com cadeia pesada (A1 – a1 – A2 – a2 – B) e cadeia leve (a3 – A3 – C1 – C2), unidas por uma ligação metálica. O FvW liga-se ao heterodímero para evitar sua degradação. **(B)** Após a clivagem pela trombina, o FVIII é ativado como um heterotrímero de duas cadeias pesadas (A1 – a1 e A2 – a2) e uma cadeia leve (A3 – C1 – C2). O FVIIIa apresenta a subunidade A1 associada com a cadeia leve pela ligação metálica, além das subunidades A2 com A1 associadas por interações iônicas. (Adaptado de LAVIGNE-LISSALDE *et al.*, 2009).

A estabilidade do heterodímero depende da interação não-covalente com o FvW, que atua também na adesão e agregação plaquetária. Essa interação protege o FVIII da degradação e da endocitose, além de direcioná-lo ao seu sítio de ação (FAY *et al.*, 1991). Após a lesão tecidual, formam-se pequenas quantidades de trombina que clivam o FVIII nas posições Arg372 e Arg740 da cadeia pesada e na posição Arg1689 da cadeia leve. As clivagens nas posições Arg372 e Arg1689 são essenciais à atividade da proteína, sendo que esta última consegue alterar a conformação estrutural do FVIII, que se liberta do FvW, para interagir com as plaquetas. A ativação do FVIII pela trombina resulta em um heterotrímero com duas cadeias pesadas (A1 de 50 kDa e A2 de 43 kDa) e uma cadeia leve (A3 – C1 – C2 de 73 kDa) (EATON *et al.*, 1986). As subunidades A1 e A3 – C1 – C2 são unidas pelas ligações metálicas. Já as subunidades A2 e A1/A3 – C1 – C2 são mediadas por interações eletrostáticas.

1.8 Produção de Fator VIII recombinante

A produção recombinante do FVIII humano utilizando organismos geneticamente modificados, tornou-se uma plataforma terapêutica mais segura quando comparada ao uso de FVIII_{dp} devido ao menor risco de infecções virais (GRILLBERGER *et al.*, 2009). Sendo assim, percebemos que a produção de proteínas recombinantes tem ganhado cada vez mais destaque no cenário industrial (WALSH G, 2003).

O FVIII é uma glicoproteína altamente complexa em virtude da grande quantidade de modificações pós-traducionais na sua estrutura que são necessárias para atribuir sua atividade como cofator enzimático. Existem produtos licenciados comercialmente que utilizam células de murinos para produção de FVIII_r (BAXTER,

2010; HEALTHCARE, 2009; WYETH PHARMA PZIZER, 2007), porém estas linhagens apresentam mecanismos de glicosilação diferentes do humano, podendo causar reações imunológicas aos pacientes com HEMA (SPENCER *et al.*, 2011). Por esse motivo, tem-se preferido expressar o FVIIIr em linhagens de células humanas para evitar este problema.

No início dos anos 90, comercializou-se a primeira geração de FVIIIr humano que apresentava proteínas plasmáticas em sua formulação final oriundas do meio de cultivo. Em 2000, a segunda geração de FVIIIr foi caracterizada pelo aumento de sua pureza, já que as proteínas plasmáticas permaneciam apenas no meio de cultura, contudo ainda não se descartava a presença destas no produto final (FRANCHINI *et al.*, 2012). Atualmente, desenvolveu-se a terceira geração de FVIIIr que não tem a adição de nenhuma proteína em seu meio de cultura (PIPE, 2008).

Os estudos realizados pela Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP) levou ao desenvolvimento do FVIIIr produzido em linhagem hepática humana Sk-Hep-1. Estas células foram transduzidas utilizando vetores lentivirais de terceira geração derivado do vírus HIV-1, no qual mais da metade do seu genoma foi deletado (TRONO, 2000). Com o objetivo de construir vetores que sejam eficientes e seguros, algumas modificações foram realizadas em sua estrutura. Para otimizar o sistema lentiviral foram removidos genes responsáveis pela virulência, além de regiões do cassete de expressão ligadas à atividade transcricional do vetor. Isso permite que o RNA viral não seja transcrito na célula hospedeira, produzindo apenas RNAm controlado pelo promotor interno, característica de vetores auto-inativados (MIYOSHI *et al.*, 1998). Adicionou-se também sequências específicas que facilitam a entrada do DNA complementar (cDNA) viral até a região do núcleo celular, levando ao aumento da transdução. Portanto, todas essas modificações possibilitaram gerar

células produtoras do FVIIIr com parte do domínio B deletado (FVIIIrBD) (US 20140051122 A1), no qual se encontra representado na **Figura 8**.

Figura 8. Estrutura do FVIII humano recombinante. (A) Organização estrutural do FVIII que consiste em uma cadeia de 2.332 resíduos de aminoácidos cujas regiões N-terminal e C-terminal do domínio B encontram-se destacadas. A1 (1 – 336), a1 (337 – 372), A2 (373 – 710), a2 (711 – 740), B (741 – 1648), a3 (1649 – 1689), A3 (1690 – 2020), C1 (2021 – 2173) e C2 (2174 – 2332). **(B)** Representação esquemática do FVIIIrBD com as regiões N-terminal e C-terminal unidas. No domínio B entre as posições Arg740 e Glu1640 há a substituição por um oligopeptídeo ligador (L) rico em arginina que contém 10 a 25 aminoácidos, de preferência 14 a 20 aminoácidos (US 20140051122 A1). Estas posições referem-se à sequência de aminoácidos do FVIII humano maduro (GITSCHIER *et al.*, 1984; TOOLE *et al.*, 1984).

Sabe-se que o FVIIIr é uma forma artificial de proteína criada pela introdução parcial do cDNA do FVIII humano em um DNA viral. De maneira resumida, podemos dizer que a metodologia para obtenção de FVIIIr envolve a geração dos vetores lentivirais utilizados para infecção da linhagem Sk-Hep-1, o que resulta na produção do FVIIIrBD por meio de células transduzidas. Posteriormente, o FVIIIr é recuperado do sobrenadante celular, sendo submetido a inativação viral e purificação para remover as substâncias interferentes. Após este processo, deve-se realizar a quantificação de FVIIIr purificado pelos ensaios imunoenzimático (ELISA) e de

atividade biológica (Cromogênico). Além destes ensaios, também será aplicado a metodologia da abordagem do MRM desenvolvida neste projeto para quantificação total do FVIII humano.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Geral

- ✓ Desenvolver e aplicar uma nova metodologia analítica baseada na abordagem do MRM utilizando a LC-MS/MS para quantificação total do FVIII humano da coagulação sanguínea de origem recombinante ou plasmática.

2.2 Específicos

- ✓ Analisar a estrutura molecular do FVIII humano para seleção dos seus peptídeos representativos;
- ✓ Sintetizar os peptídeos representativos das cadeias pesada e leve;
- ✓ Desenvolver a metodologia do MRM para quantificação total dos Fatores VIII recombinante e plasmático;
- ✓ Quantificar as amostras de sobrenadante celular e do plasma de referência pelos ensaios imunoenzimático (ELISA) e de atividade biológica (Cromogênico);
- ✓ Avaliar o processo da digestão enzimática em diferentes tempos de incubação;
- ✓ Realizar a quantificação total do FVIII_r e do FVIII_{dp} pela abordagem do MRM utilizando a plataforma da LC-MS/MS.

Justificativa

3 Justificativa

Todos os produtos biotecnológicos devem ser caracterizados e quantificados utilizando-se metodologias analíticas que atendam aos requisitos estabelecidos pelas agências nacionais e internacionais como ANVISA, FDA, EMEA e WHO. O objetivo da quantificação pela LC-MS/MS visa o monitoramento dos níveis de concentração destes produtos, sejam eles recombinantes ou não. Atualmente, tem-se utilizado ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para quantificação total do FVIII_r produzido em células humanas, em conjunto com os ensaios de atividade biológica (Cromogênico). Os ensaios imunoenzimáticos são metodologias quantitativas baseadas na utilização de anticorpos, os quais podem apresentar certas limitações de disponibilidade, especificidade ou de produção dificultando a quantificação da proteína de interesse (DOMON e AEBERSOLD, 2006).

Neste projeto, desenvolveu-se uma metodologia analítica baseada nos fundamentos da proteômica quantitativa mediante à utilização da LC-MS/MS que permite uma rápida quantificação de várias amostras simultaneamente. Para isso, aplicou-se a abordagem do MRM que apresenta alta especificidade, sensibilidade, precisão, acurácia e reprodutibilidade quantitativa em suas análises. A abordagem do MRM é, portanto, considerada uma interessante alternativa aos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) de quantificação total do FVIII humano. Podemos também detectar mutações pontuais em sua estrutura, quando necessário, pela utilização de peptídeos que sejam capazes de mostrar essas mutações. Entende-se, portanto, que esta metodologia é facilmente adaptada aos interesses de cada projeto. Além de algumas vantagens técnicas e a possibilidade de realizar a quantificação independentemente da disponibilidade de anticorpos, pode-se inferir

que a abordagem do MRM é também economicamente viável considerando apenas o custo total dos ensaios.

Material e Métodos

4 Material e métodos

4.1 Fluxograma da metodologia utilizada

A metodologia utilizada no desenvolvimento deste trabalho encontra-se resumida a seguir.

Figura 9. Fluxograma mostrando as etapas de desenvolvimento do projeto.

4.2 Material biológico

4.2.1 Sobrenadante de cultura celular

O sobrenadante da linhagem celular Sk-Hep-1-FVIII (**Figura 10**) foi utilizado para quantificação de FVIIIr. Esta linhagem é derivada de adenocarcinoma de hepatócito humano que se encontra depositada no *American Type Culture Collection*

(ATCC), sob o número de acesso HTB-52™, que foi adquirida pela FUNDHERP – FMRP/USP.

Figura 10. Visualização da linhagem celular humana Sk-Hep-1 utilizada na produção de FVIIIr. Esta linhagem apresenta morfologia de células epiteliais, condizente com sua origem de adenocarcinoma hepático. **(A)** Células em baixa densidade. **(B)** Células em alta densidade.

4.2.2 Plasma de referência

S.A.R.P (*Specialty Assayed Reference Plasma*) é preparado a partir de uma mistura de plasmas de indivíduos saudáveis congelados, sendo usado como referência aos Fatores II, V, VII, X, VIII, IX, XI, XI, Fibrinogênio, Antígeno de *von Willebrand* (vW:Ag), Proteína C, Proteína S (total e livre), Tempo de protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa) em testes que utilizam substratos cromogênicos incluindo Proteína C, FVIII, Antiplasmina e Plasminogênio.

4.3 Metodologia

4.3.1 Seleção dos peptídeos representativos

Os peptídeos representativos do FVIII humano utilizados no desenvolvimento da abordagem do MRM foram selecionados pelas informações disponibilizadas nos bancos de dados proteômicos *open source* (**Tabela 2**).

Tabela 2. Seleção dos peptídeos representativos do FVIII humano utilizando as informações disponibilizadas pelo Uniprot e *PeptideAtlas*.

Cadeia	Domínio	Tamanho	Sequência	Peptídeos
Pesada	A1	11	VDSCPEEPQLR	1
Pesada	A2	11	DFPILPGEIFK	2
Leve	C1	11	HNIFNPPIAR	3
Leve	C2	10	VTGVTTQGVK	4

Primeiramente, foi gerada uma lista com 116 peptídeos pela digestão enzimática *in silico* do FVIII humano no UniProt, utilizando-se a tripsina como agente catalisador da reação. Essa lista foi, posteriormente, diminuída para cerca de 48 peptídeos conforme alguns critérios estabelecidos como tamanho, constituição estrutural e número de observações. Para isso, considerou-se então um tamanho entre 10 a 15 aminoácidos e ausência de modificações pós-traducionais na sequência dos peptídeos. Os peptídeos sem resíduos de asparagina (N) ou glutamina (G) na posição N-terminal, cisteína (C), metionina (M) e triptofano (W) na sua constituição estrutural foram selecionados. Sendo que todos estes, apresentam resíduos de lisina (K) ou arginina (R) na posição C-terminal de suas cadeias. Em

seguida, usou-se as informações disponíveis no *PeptideAtlas* referentes aos números de visualizações dos peptídeos selecionados como parâmetro final.

4.3.2 Síntese de peptídeos

A síntese dos peptídeos representativos das cadeias pesada e leve do FVIII humano (**Tabela 3**) foi realizada seguindo o protocolo de síntese em fase sólida devidamente estabelecido por *Bruce Merrifield*. Utilizou-se aminoácidos derivatizados que apresentam o grupamento protetor Fmoc na porção amino. A cadeia lateral é clivada com TFA na última etapa da síntese.

Tabela 3. Relação dos peptídeos sintetizados quimicamente em fase sólida.

Peptídeo 1		Peptídeo 2		Peptídeo 3		Peptídeo 4	
Aa-Fmoc (mg)		Aa-Fmoc (mg)		Aa-Fmoc (mg)		Aa-Fmoc (mg)	
V	50,9	D	61,7	H	93,0	V	50,9
D	61,7	F	58,1	N	89,5	T	59,6
S	57,5	P	50,6	I	53,0	G	44,6
C	87,9	I	53,0	F	58,1	V	50,9
P	50,6	L	53,0	N	89,5	T	59,6
E	63,8	P	50,6	P	50,6	T	59,6
E	63,8	G	44,6	P	50,6	Q	91,6
P	50,6	E	63,8	I	53,0	G	44,6
Q	91,6	I	53,0	I	53,0	V	50,9
L	58,1	F	58,1	A	58,1	K	70,3
R	70,3	K	70,3	R	70,3		

A síntese de peptídeos foi realizada em um suporte sólido insolúvel para efetuar o acoplamento dos aminoácidos. Utilizou-se 100 mg de resina, considerando um rendimento máximo de 40 μ mol para cada peptídeo sintetizado.

4.3.2.1 Ativação e verificação da resina

Pesou-se 100 mg de resina em um tubo de vidro. Em seguida, ela foi ativada pela solução DMSO 20%/NMP 80% em um volume suficiente para cobrir toda resina durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após isso, percebe-se visualmente que a resina aumenta de tamanho. Toda resina é transferida ao tubo de síntese com o auxílio de uma micropipeta. A solução DMSO/NMP é aspirada utilizando uma bomba de vácuo.

Para remover qualquer resquício da solução anterior ainda presente na resina, realiza-se 7 lavagens ao total (5 vezes em DMF e 2 vezes em metanol). O tempo médio entre cada lavagem é de 1 minuto sob agitação em nitrogênio.

Por fim, realiza-se o teste da amina livre para saber se o aminoácido acoplado à resina encontra-se bloqueado com grupo protetor Fmoc. Para isso, adiciona-se 10 μ L de DIPEA 1,2 M e 10 μ L TNBS (10 mg/mL) adicionados em um tubo de 500 μ L, juntamente com a resina. Espera-se 1 minuto para visualização do resultado que deve mostrar uma coloração incolor, indicando assim que o grupamento amina está bloqueado.

4.3.2.2 Ativação e adição dos aminoácidos para acoplamento

A resina usada apresenta um aminoácido acoplado em sua estrutura que deve ser desbloqueado com piperidina para, então, adicionar o seguinte aminoácido.

A reação de desbloqueio do grupamento amina é realizada em duas partes: adiciona-se 2 mL da solução piperidina 20% em DMF durante 1 minuto no microondas sob agitação em nitrogênio. Toda solução de desbloqueio é aspirada para a realização do segundo desbloqueio com 2 mL da solução piperidina 2% e DBU 2% em DMF durante 10 minutos no microondas sob agitação em nitrogênio. A solução de desbloqueio é novamente aspirada. Em seguida, faz-se 7 lavagens ao total (5 vezes em DMF e 2 vezes em metanol). O tempo médio entre cada lavagem é de 1 minuto sob agitação em nitrogênio.

Realiza-se o teste da amina livre para saber se o aminoácido acoplado à resina encontra-se desbloqueado, ou seja, sem o grupamento Fmoc. Por essa razão, adiciona-se 10 µL de DIPEA 1,2 M em DMSO 20%/NMP 80% e 10 µL de TNBS em metanol (10 mg/mL) adicionados em um tubo de 500 µL, juntamente com a resina. Espera-se 1 minuto para visualização do resultado que deve mostrar uma coloração alaranjada, indicando assim que o grupamento amina está desbloqueado. Caso o aminoácido em questão seja prolina, utiliza-se 10 µL de cloranil 2% em DMF e 10 µL de acetaldeído 2% em DMF para realização do teste da amina livre. O desbloqueio da prolina é indicado pela coloração roxa.

Após a confirmação do resultado, executa-se mais uma lavagem com DMSO durante 1 minuto sob agitação em nitrogênio. Toda solução de condicionamento é aspirada para adicionar o próximo aminoácido. Em relação ao peso molecular do peptídeo, calcula-se a quantidade necessária de aminoácido para ser dissolvido em 300 µL de DMSO 20%/NMP 80% no tubo de vidro. Posteriormente, adiciona-se 117 µL de HOBT em DMSO 20%/NMP 80% para ativação do aminoácido. Com auxílio de uma micropipeta, transfere-se o aminoácido diluído ao tubo de síntese.

A reação de acoplamento é realizada, adicionando-se 23 μL de DIC no tubo de síntese que contém a resina e o aminoácido. Além disso, faz-se 6 ciclos de aquecimento no microondas de 2 minutos para efetivar essa reação. Entre cada ciclo é importante agitar o tubo de síntese para desaquecer a solução. Por fim, realiza-se o teste da amina livre para saber se houve a reação de acoplamento cujo resultado deve mostrar uma coloração incolor. Em seguida, faz-se 7 lavagens ao total (5 vezes em DMF e 2 vezes em metanol). O tempo médio entre cada lavagem é de 1 minuto sob agitação em nitrogênio.

Todas as etapas de desbloqueio, lavagem, dissolução e acoplamento são realizadas para cada aminoácido adicionado. Caso seja o último aminoácido, executa-se o desbloqueio do grupamento amina em duas etapas conforme explicado anteriormente, além das lavagens com DMF e metanol. O teste da amina livre é realizado para saber se o grupamento amina encontra-se desbloqueado cujo resultado deve mostrar uma coloração alaranjada.

Fazer 7 lavagens com DMF e metanol, lavar mais 5 vezes com metanol, secar a resina por aspiração e transferi-la ao tubo de vidro devidamente identificado. Deixar a resina secar em temperatura ambiente *overnight*.

4.3.2.3 Clivagem dos peptídeos sintetizados

Os peptídeos sintetizados foram clivados da resina durante 3 ou 4 horas sob agitação em temperatura ambiente. A reação de clivagem deve ocorrer na ausência de luz. Os peptídeos que não apresentam os resíduos de cisteína (C), triptofano (W), tirosina (Y) ou metionina (M) em sua estrutura devem ser clivados utilizando-se os seguintes reagentes: 40 μL de H_2O destilada, 20 mg de DTT, 900 μL de TFA e 40 μL de TIS. Já, os peptídeos que apresentam os resíduos de cisteína (C), triptofano (W),

tirosina (Y) ou metionina (M) em sua estrutura devem ser clivados utilizando-se os seguintes reagentes: 40 µL de H₂O destilada, 20 mg de DTT, 860 µL de TFA, 40 µL de ANISOL e 40 µL de TIS.

4.3.2.4 Precipitação dos peptídeos clivados

A solução de clivagem é transferida ao suporte de filtração para separar a resina do peptídeo clivado. Utiliza-se um tubo com 10 mL de éter gelado para precipitar o peptídeo. Observa-se uma precipitação branca conforme o peptídeo entra em contato com o éter gelado. Posteriormente, homogeniza-se essa solução com auxílio do agitador para desfazer os grumos formados durante o processo. Essa solução é centrifugada por 5 minutos até a formação do *pellet*, descartando-se o éter. Realiza-se cerca de 4 lavagens com éter gelado para garantir a remoção total de impurezas que é indicada pela coloração branca do *pellet*. Após isso, deixar o tubo com o peptídeo aberto *overnight* fora da geladeira para secar em temperatura ambiente.

4.3.3 Dissolução dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintetizados em fase sólida foram dissolvidos em 500 µL de ácido acético 100% e 500 µL H₂O destilada com o auxílio de um agitador. Foram realizadas 10 alíquotas com 100 µL de cada peptídeo. Separou-se uma alíquota como solução de trabalho, sendo que as outras foram armazenadas em - 20° C.

4.3.4 Purificação dos peptídeos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência

Os peptídeos sintetizados em fase sólida foram submetidos à cromatografia em fase reversa com objetivo de analisar as suas purezas. Utilizou-se a coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm) (Shim-pack CLD-ODS (M)-Shimadzu®) no sistema HPLC da Shimadzu® para realização das cromatografias. A coluna foi primeiramente equilibrada com uma solução de H₂O destilada e TFA 0,1%. Em seguida, fez-se uma injeção de 550 µL para obtenção do pico correspondente ao peptídeo sintetizado. Cerca de 5 µL de cada peptídeo foi eluído em 545 µL de ACN 5% e TFA 0,1% durante 50 minutos com um fluxo de 1 mL/min. A concentração de ACN atingiu 100% em 40 minutos e retornou a 1% em 5 minutos. O comprimento de onda utilizado foi de 215 nm para visualização dos cromatogramas. Realizou-se duas injeções no HPLC para coletar os picos referentes aos peptídeos. Fez-se alíquotas de 200 µL em microtubos para concentrar o volume utilizando a centrifugação sob vácuo. Após este procedimento, os peptídeos foram caracterizados e identificados pelo espectrômetro de massas.

4.3.5 Caracterização dos peptídeos no espectrômetro de massas

As possíveis transições iônicas dos peptídeos foram inicialmente estipuladas pela digestão *in silico* do FVIII humano utilizando o *software Skyline*. Selecionou-se 10 transições de cada peptídeo sem marcação isotópica (peptídeo purificado) e com marcação isotópica (peptídeo importado) para desenvolver a abordagem do MRM. Essas análises possibilitaram determinar a melhor energia de colisão, as transições iônicas mais abundantes de carga 2+ ou 3+ e o tempo de retenção por meio da LC-MS/MS Waters®. É importante lembrar que este equipamento realiza a

fragmentação dos peptídeos por CID. Os dados obtidos foram processados pelo *software Skyline* que facilita a visualização dos espectros e a identificação das transições com maior intensidade. Utilizou-se, portanto, uma mistura dos peptídeos marcados isotopicamente para realizar as análises. A preparação da mistura consistiu em aliquotar 10 µL de cada peptídeo diluído em 90 µL de ACN 5% e TFA 0,1%. Dessa solução, pipetou-se 5 µL dos peptídeos, totalizando 20 µL, os quais foram novamente diluídos em 30 µL de ACN 5% e TFA 0,1%. A cromatografia foi desenvolvida com gradiente de 2 a 100% de ACN e TFA 0,1% durante 30 minutos com fluxo de 1 mL/min.

4.3.6 Cultura de células humanas

As células Sk-Hep-1-FVIII^{BD} foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Gibco) não suplementado com SFB por 24 horas, 100 U/mL penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). O cultivo desta linhagem ocorreu a 37° C, 5% de CO₂ e 95% de ar em estufa úmida. Meio de cultura e PBS foram pré-aquecidos a 37° C para serem utilizados.

Esta linhagem foi expandida no Laboratório de cultura celular da FUNDHERP. O processo de expansão celular foi realizado em garrafas de 75 cm². A tripsina foi inativada pela adição de meio apropriado ao cultivo celular. Após 24 horas, o sobrenadante da linhagem Sk-Hep-1-FVIII^{BD} foi coletado por centrifugação e armazenado a - 80° C.

4.3.7 Quantificação total do FVIII humano

A quantificação total do FVIII humano foi realizada pelo ensaio imunoenzimático *ELISA FVIII Antigen Kit*, conforme as recomendações do fabricante. Os valores obtidos em UI/mL representam a atividade presente no plasma normal e foram convertidos a ng/mL utilizando-se um valor padrão de 0,2 µg/mL de FVIII no plasma. A conversão dos valores obtidos em UI/mL para ng/mL foi realizado por regra de três.

O resultado é obtido em porcentagem e, posteriormente, convertido em UI considerando-se que 100% corresponde a 1 UI.

4.3.8 Quantificação da atividade biológica do FVIII humano

A atividade do FVIII_r presente no sobrenadante da linhagem Sk-Hep-1-FVIII_{BD} foi devidamente quantificada pelo ensaio cromogênico *Immno Chrom* (*Immuno GmbH*, Alemanha) conforme as recomendações do fabricante. Este ensaio permite a medição da atividade do FVIII por meio da produção de FXa. Sendo assim, o FVIII contido na amostra tem a função de cofator enzimático, em conjunto com FIX, Ca²⁺ e fosfolípídeos que são adicionados na amostra com o objetivo de transformar FIX em FXa. O FXa degrada o substrato p-nitroanilina que resulta na coloração amarela. Após 15 minutos de incubação, as absorbâncias foram lidas em 405 nm utilizando um espectrofotômetro para determinar a concentração da amostra.

O resultado é obtido em porcentagem e, posteriormente, convertido em UI considerando-se que 100% corresponde a 1 UI.

4.3.9 Concentração do sobrenadante

O sobrenadante da cultura celular Sk-Hep-1-FVIII^{BD} foi concentrado por centrifugação a 3.000 x g a 4° C durante 20 minutos. Para isso, utilizou-se membranas *VivaSpin 10 KDa MWCO (GE Healthcare)*, conforme as recomendações do fabricante. A remoção da glicerina presente na membrana do filtro consistiu em uma lavagem de 10 minutos com H₂O destilada por meio da centrifugação a 6.000 rpm a 4° C. Posteriormente foram realizadas alíquotas das amostras, as quais foram armazenadas a -20° C.

4.3.10 Quantificação de proteínas totais

As proteínas extracelulares presentes no sobrenadante da linhagem Sk-Hep-1-FVIII^{BD} foram quantificadas pelo ensaio *Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad, EUA)*, baseado na metodologia descrita por *Bradford* em 1976. O ensaio foi realizado em microplaca com volume total de 220 µL por poço, sendo 20 µL de amostra e 200 µL do reagente. Após 10 minutos de incubação, utilizou-se um espectrofotômetro cujas absorbâncias foram lidas a 595 nm. Deste modo, a concentração de proteínas totais foi estimada pela construção de uma curva padrão de cinco pontos correlacionados às quantidades conhecidas de albumina de soro bovino (BSA). O experimento foi realizado em triplicata para calcular a concentração média de proteínas na amostra.

4.3.11 Digestão enzimática das proteínas totais

Utilizou-se um volume correspondente a 100 µg de proteínas totais para realização da digestão enzimática com tripsina. As amostras foram incubadas a 90°

C durante 5 minutos com 50 µl do tampão desnaturante (ureia 8M em Tris 0,1M). Após isso, as proteínas foram reduzidas adicionando-se 30 µl de ditioneitol (DDT) 0,1 M durante 30 minutos a 60° C. Em seguida, elas foram alquiladas adicionando-se 10 µl de iodoacetoamida (IAA) 0,5 M durante 30 minutos em temperatura ambiente com ausência de luz. Após a redução e alquilação das proteínas, adicionando-se 470 µL de Tris-HCl 0,1 M (pH=8). Por fim, realizou-se a digestão com 40 µL de tripsina (1:25) sob agitação a 37° C. O tempo de incubação foi avaliado em três tempos distintos (10, 16 e 22 horas) com objetivo de analisar o processo de digestão enzimática com tripsina. Essa avaliação foi necessária para determinar o tempo de incubação que seja mais eficiente para digestão das proteínas. A partir disso, conseguimos otimizar as análises de quantificação total do FVIII humano pela abordagem do MRM utilizando a MS. A reação de digestão foi interrompida adicionando-se 10 µL de ácido fórmico 1%.

4.3.12 Extração dos peptídeos das amostras

Logo após o processo de digestão enzimática, os peptídeos tripticos foram extraídos utilizando-se as colunas *Oasis* (Waters, EUA). Para tal, foi necessário o uso de soluções com diferentes concentrações de acetonitrila. A coluna foi condicionada com 1,2 mL de solução ACN 100% em ácido fórmico 0,1%. Em seguida, a coluna foi equilibrada com 1,2 mL da solução ACN 5% em ácido fórmico 0,1%. Posteriormente, adicionou-se toda a amostra digerida na coluna cujos peptídeos ficam retidos na membrana de sílica por afinidade iônica. O filtrado é devidamente descartado. A coluna foi novamente equilibrada com 0,8 mL da solução ACN 5% em ácido fórmico 0,1%. Os peptídeos foram, portanto, eluídos da membrana de sílica com 1,2 mL da solução ACN 70% em ácido fórmico 0,1%. A

solução resultante que contém os peptídeos foi, posteriormente, submetida ao processo de concentração sob vácuo.

4.3.13 Quantificação total do FVIII humano nas amostras pelo espectrômetro de massas

As amostras foram ressuspensas em 40 μ L da solução ACN 5% em ácido fórmico 0,1% e, posteriormente, submetidas a centrifugação durante 15 minutos a 12.000 rpm. Este procedimento é extremamente importante, porque impede a pipetagem de resíduos que ainda podem estar presentes na solução. Desta maneira, foram realizadas alíquotas com 35 μ L das amostras ressuspensas e 5 μ L dos peptídeos com marcação isotópica em cada *vial* injetado na LC-MS/MS.

4.3.14 Processamento dos resultados obtidos

Os resultados obtidos foram exportados do espectrômetro de massas e analisados no *software Skyline*, o qual possibilita a geração de uma lista contendo os valores das áreas totais dos peptídeos sem e com marcação isotópica. Estes dados são essenciais para realizar a quantificação total do FVIII humano nas amostras analisadas pela abordagem do MRM.

Resultados

5 Resultados

5.1 Modificações pós-traducionais do Fator VIII humano

O FVIII da coagulação sanguínea é uma glicoproteína com 2.332 aminoácidos de 280 kDa, aproximadamente (VEHAR *et al.*, 1984). A sua estrutura possui três domínios distintos A, B e C (KANE e DAVIE, 1988). O domínio B é altamente glicosilado na sua parte central. Este domínio apresenta 19 dos 24 sítios de asparagina propensos à N-glicosilação de toda a molécula (HANSSON e STENFLO, 2005). As informações a seguir foram baseadas no banco de dados *Swiss-Prot* (Tabela 4).

Tabela 4. Sítios de modificações pós-traducionais do FVIII humano da coagulação sanguínea.

Modificações pós-traducionais	Posições
N-glicosilação	Asn41, Asn239, Asn582, Asn757, Asn784, Asn828, Asn900, Asn943, Asn963, Asn1001, Asn1055, Asn1066, Asn1185, Asn1255, Asn1259, Asn1282, Asn1300, Asn1384, Asn1412, Asn1442, Asn1512, Asn1685, Asn1810 e Asn2118.
Fosforilação	Thr351 e Ser1657.
Sulfatação	Tyr346, Tyr718, Tyr719, Tyr723, Tyr1664 e Tyr1680.

As mutações de ocorrência natural podem criar novos sítios glicosilados na estrutura do FVIII humano, sendo que os carboidratos adicionais são responsáveis pela patogênese da HEMA grave (ALY e HOYER, 1992). Ainda não se sabe como

estas cadeias laterais de carboidratos conseguem afetar a atividade biológica da proteína no processo de coagulação sanguínea. Desta maneira, podemos utilizar os bancos de dados *Swiss-Prot* e *PeptideAtlas* para determinar as localizações dos sítios que possuem modificações pós-traducionais presentes na estrutura do FVIII humano cuja análise é importante para escolher os peptídeos representativos.

5.2 Relação dos peptídeos nas cadeias pesada e leve

O banco de dados Uniprot foi utilizado como ferramenta para realizar a digestão enzimática *in silico* do FVIII humano. A partir deste processo, obteve-se uma lista com 153 peptídeos dos quais 103 pertencem à cadeia pesada e 50 à cadeia leve (**Figura 11**).

Figura 11. Visualização dos peptídeos nos domínios das cadeias pesada e leve do FVIII humano.

Sabe-se que a estrutura molecular do FVIII humano é composta por duas cadeias associadas pela ligação metálica (**Figura 6**). A cadeia pesada é representada pelos domínios A1 (21 peptídeos), A2 (17 peptídeos) e B (65 peptídeos), sendo este último domínio clivado da estrutura proteica. Já a cadeia leve é constituída pelos domínios A3 (28 peptídeos), C1 (11 peptídeos) e C2 (11 peptídeos). Por meio desta análise, conseguimos determinar a exata localização de todos os peptídeos em relação aos respectivos domínios do FVIII humano.

O mapeamento peptídico e a organização estrutural proteica, além do conhecimento das regiões propensas às modificações pós-traducionais são fatores importantes que devem ser considerados na escolha dos peptídeos utilizados no desenvolvimento da abordagem do MRM para quantificação total da proteína de interesse em amostras pela LC-MS/MS.

5.3 Seleção dos peptídeos representativos do Fator VIII humano

A partir de uma lista com 153 peptídeos gerados da digestão enzimática *in silico* pela utilização da tripsina. Fez-se uma seleção utilizando os seguintes parâmetros, tais como tamanho dos peptídeos entre 10 a 15 aminoácidos, não apresentar resíduos com modificações pós-traducionais, excluir peptídeos que contenham resíduos de asparagina (N) ou glutamina (G) na posição N-terminal e, também, aqueles que apresentem resíduos de metionina (M), triptofano (W) e cisteína (C) na cadeia peptídica. No entanto, podemos selecionar peptídeos com apenas um resíduo de cisteína que deve ser alquilado, antes das análises no espectrômetro de massas.

Baseando-se nestes critérios foi estabelecida uma lista com 15 peptídeos representativos do FVIII humano que podem ser utilizados no desenvolvimento da

abordagem do MRM (**Tabela 5**). Esta lista foi estruturada por meio das informações disponibilizadas nos bancos de dados Uniprot e *PeptideAtlas*.

Tabela 5. Seleção dos peptídeos representativos do FVIII humano baseando-se em critérios como tamanho, número de observações e sequência peptídica.

Cadeia	Domínio	Tamanho	Observações	Sequência	Seleção
Pesada	A1	11	0	SFPFNTSVVYK	
Pesada	A1	14	21	ASEGAEYDDQTSQR	
Pesada	A1	14	25	DLNSGLIGALLVCR	
Pesada	A1	12	33	FILLFAVFDEGK	
Pesada	A1	10	5	SLPGLIGCHR	
Pesada	A1	11	24	VDSCPEEPQLR	✓
Pesada	A1	13	13	FDDDNSPSFIQIR	
Pesada	A2	10	4	SQYLNNGPQR	
Pesada	A2	11	36	DFPILPGEIFK	✓
Pesada	A2	15	24	DLASGLIGPLLCYK	
Leve	A3	15	-	EDFDIYDEDENQSPR	
Leve	A3	10	-	AQSGSVPQFK	
Leve	A3	15	1	GELNEHLGLLGPYIR	
Leve	C1	11	2	HNIFNPPIAR	✓
Leve	C2	10	4	VTGVTTQGVK	✓

(-) peptídeo não observado no banco de dados proteômicos do *PeptideAtlas*.

De acordo com os critérios estabelecidos foram pré-selecionados 15 peptídeos tidos como bons representantes do FVIII humano para sua quantificação pela abordagem do MRM. A escolha final dos peptídeos baseou-se em dois fatores: número de visualizações e tamanho da estrutura. Sendo assim, optou-se em selecionar dois peptídeos de cada cadeia com intuito de gerar resultados com maior confiabilidade.

5.4 Desenvolvimento da abordagem do monitoramento de reações múltiplas

Após a escolha dos peptídeos representativos das cadeias pesada e leve do FVIII humano, fez-se a seleção das transições iônicas pela utilização do *software* Skyline. Para isso, deve-se saber que todo peptídeo fragmentado produz os seguintes íons -a, -b, -c, -x, -y e -z (HOLMAN *et al.*, 2012). A abordagem do MRM foi baseada apenas na escolha dos íons -y (**Figura 12**), porque estes apresentam a marcação isotópica dos peptídeos sintéticos (TABB *et al.*, 2003) e, também, por aparecerem com mais frequência do que os outros íons na amostra.

Figura 12. Desenvolvimento da abordagem do MRM para quantificação total do FVIII humano pelo *software* Skyline. Para isso, utilizou-se os peptídeos com marcação isotópica (A) VDSCPEEPQLR, (B) DFPILPGEIFK, (C) HNIFNPPIAR e (D) VTGVTQGVK para determinar as transições iônicas e o tempo de retenção.

Os tempos de retenções dos peptídeos representativos podem ser vistos de duas maneiras através do *software* Skyline (**Figura 13**). Para isso foi necessário desenvolver um banco de dados contendo informações sobre os tempos de retenção mediante à hidrofobicidade de alguns peptídeos já caracterizados pela LC-MS/MS. Assim, podemos estimar uma janela de retenção com aproximadamente 2 minutos antes e depois do valor predito aumentando a especificidade das análises.

Figura 13. Determinação dos tempos de retenção dos peptídeos representativos do FVIII humano pelo software Skyline. (A) Regressão linear e (B) transições iônicas.

A energia de colisão é outro importante parâmetro analítico que precisa ser estabelecido para realizar as análises quantitativas. Os peptídeos que foram ionizados e, posteriormente, selecionados no MS1 são submetidos a múltiplas colisões com um gás inerte. Ou seja, a energia cinética das colisões aumenta a energia interna dos peptídeos ionizados levando-os à fragmentação gerando as transições iônicas utilizadas na abordagem do MRM para identificação e quantificação do FVIII humano (**Tabela 6**).

Tabela 6. Os valores das energias de colisões das transições iônicas dos peptídeos utilizados no desenvolvimento da abordagem do MRM.

Peptídeos	Energias de colisões (eV)				
	y5	y6	y7	y8	y9
VDSCPEEPQLR	26	26	26	26	26
DFPILPGEIFK	25	25	25	16	16
HNIFNPPIAR	13	13	13	13	13
VTGVTQTQGVK	14	14	14	14	14

A reação de fragmentação dos peptídeos resulta na formação de transições com íons que contém o próton na parte N-terminal gerando fragmentos -a, -b e -c e na parte C-terminal gerando fragmentos -x, -y e -z. Todos os peptídeos originados pela tripsina no processo da digestão enzimática, quando submetidos a fragmentação geram íons predominantemente do tipo -b e -y. Além disso, estes íons possuem a marcação isotópica dos peptídeos quando fragmentados. Portanto, é necessário escolher corretamente as energias de colisões para se obter análises reproduzíveis pela interface da LC-MS/MS.

5.5 Avaliação da digestão enzimática

Antes de realizar a quantificação total do FVIII humano no plasma de referência e no sobrenadante de cultura celular, avaliou-se a eficiência da digestão enzimática em diferentes tempos de incubação como 10, 16 e 22 horas. Para isso, foi necessário analisar a qualidade dos espectros das transições iônicas dos peptídeos endógenos (sem marcação isotópica) detectados pela abordagem do MRM. Desta maneira, conseguimos indicar os melhores peptídeos que podem ser

utilizados para determinar a eficiência da digestão enzimática através da visualização espectral pelo *software Skyline* (Figuras 14 e 15).

Figura 14. Visualização dos espectros das transições iônicas dos peptídeos endógenos do plasma de referência. (A) VDSCEEPQLR, (B) DFPILPGEIFK, (C) HNIFNPPIAR e (D) VTGVTTQGVK.

Figura 15. Visualização dos espectros das transições iônicas dos peptídeos endógenos do sobrenadante da linhagem celular humana Sk-Hep-1. (A) VDSCPEEPQLR, (B) DFPILPGEIFK, (C) HNIFNPPIAR e (D) VTGVTTQGVK.

Todas as amostras foram processadas em triplicatas biológicas e técnicas no espectrômetro de massas. Cada espectro foi escolhido para representar uma das triplicatas técnicas. A partir das análises realizadas conseguimos determinar a qualidade dos peptídeos endógenos e, assim, indicar quais destes poderiam ser utilizados para demonstrar a eficiência da digestão enzimática nas amostras submetidas às incubações de 10, 16 e 22 horas. Escolheu-se, portanto, os peptídeos DFPILPGEIFK (cadeia pesada) e VTGVTTQGVK (cadeia leve) devido à boa qualidade das transições iônicas que foram detectadas pela abordagem do

MRM. Os outros peptídeos apresentaram problemas relacionados à fragmentação ruim ou à baixa detecção das transições iônicas selecionadas. Além disso, estabelecemos que 16 horas de incubação é o tempo ideal para digestão do FVIII humano. A comparação entre os três tempos de incubação apontou uma perda de eficiência em 10 e 22 horas, indicada pela intensidade cujos valores correspondem às áreas totais dos peptídeos endógenos representativos das cadeias pesada e leve da proteína (**Figura 16**).

Figura 16. Avaliação da digestão enzimática pela área total dos peptídeos endógenos em diferentes tempos de incubação. (A) Plasma de referência que contém o FVIII_{dp}. (B) Sobrenadante de cultura da linhagem humana Sk-Hep-1 produtora do FVIII_r.

De acordo com os resultados mostrados, percebemos que existe um ganho de eficiência quando incubamos por 16 horas com tripsinas as amostras. Isso é indicado média entre as áreas totais dos peptídeos em cada injeção realizada no espectrômetro de massas. Os outros tempos de digestão enzimática também apresentam resultados, porém inferiores aqueles obtidos pela incubação de 16 horas em relação aos peptídeos endógenos representativos do FVIII humano. Caso for preciso utilizar outros peptídeos para identificação de diferentes regiões da estrutura é aconselhável realizar a verificação da eficiência considerando estes tempos de incubação. Também foi estabelecido que a proporção de 1:25 (enzima:proteína) para realização da digestão enzimática apresenta melhores resultados quando comparamos as áreas médias totais dos peptídeos escolhidos (SONG *et al.*, 2012; DONEANU *et al.*, 2012).

5.6 Quantificação total do Fator VIII humano pela abordagem do monitoramento de reações múltiplas

As amostras de sobrenadante celular e do plasma de referência foram processadas pela LC-MS/MS em triplicatas técnicas e biológicas com intuito de determinar a reprodutibilidade da quantificação total do FVIII humano pela abordagem do MRM. O sobrenadante celular da linhagem humana Sk-Hep-1 foi utilizado para detecção do FVIIIr. Já o plasma de referência também denominado como S.A.R.P. contém algumas das proteínas envolvidas no processo da coagulação sanguínea como FVIII_{dp}. Desta maneira, o cálculo da quantificação total do FVIII humano foi realizado pela obtenção da área total dos peptídeos e de outros parâmetros especificados a seguir (**Tabelas 7, 8 e 9**).

Tabela 7. Cálculo da concentração peptídica e da massa injetada nas amostras preparadas pela adição dos peptídeos marcados isotopicamente.

	DFPILPGEIFK	VTGVTTQGVK
A. Concentração dos peptídeos	1 µg/µL	1 µg/µL
B. Volume dos peptídeos utilizados	12 µL	5 µL
C. Volume final da diluição	60 µL	60 µL
D. Concentração dos peptídeos na mistura	0,2 µg/µL	0,083 µg/µL
E. Volume dos peptídeos na amostra	5 µL	5 µL
F. Volume final da amostra	40 µL	40 µL
G. Volume das injeções no LC-MS/MS	10 µL	10 µL
H. Massa dos peptídeos injetados	4,167 ng	1,736 ng
Média das massas	2,9515 ng	

A concentração da mistura dos peptídeos marcados isotopicamente que foram adicionados nas amostras como padrões internos, além das massas injetadas no espectrômetro de massas foram devidamente calculadas pelas seguintes fórmulas:

(1) Concentração dos peptídeos na mistura

$$D = (A \times B) \div C$$

(2) Massa dos peptídeos injetados

$$H = [(2 \times D) \div C] \times (G \div F) \times 1000$$

Após a obtenção dos valores pelas fórmulas (1) e (2), foi necessário determinar a razão das áreas totais médias entre os peptídeos sem e com marcação isotópica (**Tabela 8**). Para isso, foram preparadas três *vials* para cada tipo de

amostra – plasma de referência e sobrenadante celular – totalizando seis *vials*, sendo que cada um foi injetado três vezes no espectrômetro de massas. Em vista disso, adquiriu-se triplicatas técnicas e biológicas nas análises quantitativas realizadas. Ou seja, cada injeção é representada pela média das três injeções de uma mesma amostra.

Tabela 8. Razão entre as áreas totais médias dos peptídeos sem e com marcação isotópica referentes às cadeias pesada e leve do FVIII humano.

Triplicatas biológicas (Injeções)	Razão das áreas totais médias		Média
	DFPILPGEIFK	VTGVTQTQGVK	
1A	0,1749	0,5167	0,3458
2A	0,1016	0,6329	0,3673
3A	0,1774	0,5837	0,3806
1B	0,3359	0,5429	0,4394
2B	0,2687	0,5322	0,4005
3B	0,3022	0,5374	0,4198

A – plasma de referência (FVIII_{dp}), B – sobrenadante celular (FVIII_{lr}).

De acordo com os valores obtidos entre as razões das áreas totais médias dos peptídeos sem e com marcação isotópica que representam as cadeias pesada e leve do FVIII humano, fez-se uma média das razões para cada injeção das amostras do plasma de referência e do sobrenadante celular. Posteriormente, esses valores serão aplicados nos cálculos da quantificação total da proteína (**Tabela 9**).

Tabela 9. Cálculo da quantificação total do FVIII humano pela abordagem do MRM nas amostras.

		Injeções das triplicatas biológicas					
		1A	2A	3A	1B	2B	3B
I.	Média da razão entre os peptídeos	0,3458	0,3673	0,3806	0,4394	0,4005	0,4198
J.	Concentração da amostra injetada	1,021 ng/μL	1,084 ng/μL	1,123 ng/μL	1,297 ng/μL	1,182 ng/μL	1,239 ng/μL
K.	FVIII humano em 100 μg de proteínas totais	4,082 ng/μL	4,336 ng/μL	4,493 ng/μL	5,188 ng/μL	4,728 ng/μL	4,956 ng/μL
L.	Volume para 100 μg de proteínas totais	14 μL	14 μL	14 μL	43 μL	43 μL	43 μL
M.	Concentração do FVIII humano	291,6 ng/mL	309,74 ng/mL	320,94 ng/mL	120,64 ng/mL	109,96 ng/mL	115,26 ng/mL

A – plasma de referência (FVIII_{dp}), B – sobrenadante celular (FVIII_{lr}).

A concentração do FVIII humano foi determinada pela utilização das três fórmulas apresentadas a seguir:

(3) Concentração da amostra injetada

$$J = I \times H$$

(4) FVIII humano em 100 μg de proteínas totais

$$K = J \times (F \div G)$$

(5) Concentração do FVIII humano

$$M = K \div (L \div 1000)$$

5.7 Determinação das quantificações total e específica

As amostras de sobrenadante celular e do plasma de referência foram quantificadas pelos ensaios imunoenzimático (ELISA) e de atividade biológica (Cromogênico). Para determinar a expressão do FVIIIr ativo e não ativo na linhagem celular Sk-Hep-1, utilizou-se o sobrenadante dessas células, após 24 horas de incubação com meio DMEM sem adição de SFB. A quantificação do FVIII_{dp} foi através do plasma de referência cuja amostra é uma mistura de várias proteínas envolvidas no processo da coagulação sanguínea.

Os valores obtidos em porcentagem de atividade do FVIII foram comparados aos valores encontrados no plasma humano e calculados em UI/mL (1 UI/mL = 100% de atividade) e ng/mL (**Tabela 10**).

Tabela 10. Quantificação dos Fatores VIII recombinante e plasmático pelos ensaios imunoenzimático (ELISA) e de atividade biológica (Cromogênico).

Amostras	ELISA		Cromogênico	
	(UI/mL)	(ng/mL)	(UI/mL)	(ng/mL)
Sk-Hep-1-FVIII _r BD	0,37	74,0	0,68	136,0
Sk-Hep-1	0	0	0	0
S.A.R.P.	1,08	216,0	17,12	3424,0

Os resultados pela tabela anterior mostram que a linhagem celular humana Sk-Hep-1-FVIII_rBD produziu cerca de 0,37 UI/mL ou 74 ng/mL de FVIII_r em 30 mL de sobrenadante. Esta linhagem é conhecida por seu potencial em expressar fatores de coagulação (MEI *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2012). Recentemente, foi mostrado que a utilização de células da linhagem celular Sk-Hep-1 podem ser adaptadas ao crescimento em suspensão em meio livre de soro (BIAGGIO *et al.*, 2015). Isso

diminuiria os riscos de contaminação xenogênica e o desenvolvimento de epítomos imunogênicos, além de reduzir os custos da produção. Todas essas características são extremamente vantajosas aos processos industriais de escalonamento do FVlllr. Também foi mostrado na tabela que as células desta linhagem apresentam cerca de 0,68 UI/mL ou 136 ng/mL de FVlllr biologicamente ativo.

5.8 Comparação entre as diferentes quantificações analíticas

Ao todo foram utilizadas cerca de três metodologias para quantificação do FVIII humano. Cada uma destas possui diferentes abordagens analíticas que permite detectar a presença da proteína nas amostras. Os ensaios imunoenzimático e proteômico fornecem quantificações totais, já o ensaio de atividade biológica configura uma quantificação mais específica. Portanto, optou-se apenas em comparar os resultados obtidos pelas quantificações totais (**Tabela 11**).

Tabela 11. Comparação entre os diferentes valores obtidos das quantificações totais realizadas pelos ensaios imunoenzimático (ELISA), proteômico (MRM).

Triplicatas biológicas	MRM	ELISA
Injeções	(ng/mL)	(ng/mL)
1A	291,6 ± 14,81	216,0
2A	309,74 ± 14,81	
3A	320,94 ± 14,81	
1B	120,64 ± 5,34	74,0
2B	109,96 ± 5,34	
3B	115,26 ± 5,34	

A – plasma de referência (FVllldp), B – sobrenadante celular (FVlllr).

5.9 Estabelecimento de outros peptídeos para quantificação total

Ao todo foram selecionados 15 peptídeos que poderiam ser utilizados na quantificação total do FVIII humano pela abordagem do MRM. Posteriormente, escolheu-se 4 peptídeos para realização das análises quantitativas pela LC-MS/MS. Desta maneira, fez-se uso do *software Skyline* para estimar o tempo de retenção dos outros peptídeos com intuito de serem observados virtualmente por meio da abordagem do MRM. Essa estratégia possibilitou detectar 5 peptídeos sem utilizar padrões internos na amostra.

O plasma de referência possui algumas proteínas participantes da coagulação sanguínea, tais como os Fatores VII e IX, além do FVIII. Assim, foi possível estabelecer os peptídeos das outras duas glicoproteínas citadas anteriormente que, também, podem ser implementados na quantificação total (**Tabela 12**). Estas proteínas também são produzidas em linhagens humanas recombinantes pela FUNDHERP, sendo importantes para o tratamento de coagulopatias.

Tabela 12. Detecção dos peptídeos representativos dos Fatores VII, VIII e IX pela abordagem do MRM virtual.

FVII	FVIII	FIX
ANAFLEELRPGSLER	SLPGLIGCHR	LEEFVQGNLER
SEPRPGVLLR	FDDDNSPSFIQIR	VVCSCTEGYR
	SQYLNNGPQR	SCEPAVPFPCGR
	DLASGLIGPLLICYPK	VDAFCGGSIVNEK
	GELNEHHLGLLGPYIR	

Discussão

6 Discussão

A HEMA é uma doença caracterizada pela deficiência quantitativa ou qualitativa do FVIII que resulta na incapacidade dos pacientes em produzir adequadamente um coágulo estável após a lesão tecidual. A incidência desta doença, na sua forma mais grave, ocorre aproximadamente em 50% de todos os hemofílicos do mundo (WHITE *et al.*, 2001). O tratamento da HEMA consiste na administração intravenosa do FVIII_{dp} ou da proteína recombinante produzida em células murinas, contudo essas abordagens terapêuticas apresentam alto custo e risco de transmissão de vírus e príons (FULCHER *et al.*, 1984). Além disso, cerca de 20 a 30% dos pacientes com HEMA grave, submetidos à terapia de reposição, desenvolvem anticorpos que inibem a atividade do FVIII infundido (SCHAUB, 2011).

Observa-se atualmente que diferentes grupos de pesquisa vêm estudando maneiras de melhorar a expressão, secreção e aumentar o tempo de meia-vida das proteínas recombinantes humanas. A maioria dos trabalhos publicados, assim como a indústria farmacêutica, utilizam células murinas para produção destas proteínas. Isso pode ocasionar em reações de imunogenicidade, visto que as células murinas apresentam um perfil de glicosilação diferente das células humanas. Desta maneira, novas plataformas de produção destas proteínas estão sendo desenvolvidas utilizando-se células humanas, dado que possuem perfis de glicosilação correto e modificações pós-traducionais essenciais à atividade proteica.

A FUNDHERP tem uma vasta experiência no desenvolvimento de pesquisas direcionadas à produção do FVIII_r utilizando linhagens celulares humanas (PICANÇO *et al.*, 2007; PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008; RUSSO-CARBOLANTE *et al.*, 2011; SWIECH *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013; CORREA *et al.*, 2014), o que resultou em duas patentes ao FVIII (US 2014/0051122

A1 e US 2010/0172891 A1). A proposta de clonagem e expressão desta proteína em linhagens celulares humanas como Sk-Hep-1 (**Figura 10**) objetiva produzir um FVIIIr mais seguro e eficiente, sem epítomos imunogênicos e com baixo custo financeiro. O desenvolvimento de bioprocessos, associado às novas estratégias biotecnológicas, é fundamental para aumentar o rendimento da produção recombinante de proteínas expressas no sobrenadante celular. Por exemplo, todas as etapas de implementação de linhagens humanas sem adição do SFB são desenvolvidas na FUNDHERP.

A linhagem celular Sk-Hep-1 é conhecida pelo seu alto potencial de expressar fatores de coagulação, tal como FVIIIr (ROSA *et al.*, 2012). Outra característica é que esta linhagem pode ser adaptada ao crescimento em suspensão sem SFB (BIAGGIO *et al.*, 2015). A ausência de componentes animais em meios de cultura diminui os riscos inerentes de contaminação pelo desenvolvimento de epítomos imunogênicos, garantindo a qualidade e segurança do FVIIIr durante as etapas de sua produção. Desta maneira, a utilização de cultura em suspensão possibilita reduzir os custos durante a produção de biofármacos nos processos industriais.

De acordo com um estudo realizado sobre a produção de FVIIIr demonstrou-se que as células da linhagem Sk-Hep-1 conseguem expressar aproximadamente 5,03 UI/mL em 10^6 células, enquanto que as células da linhagem 293T expressaram apenas 1,85 UI/mL em 10^6 células (PICANÇO *et al.*, 2007). Isso permite afirmar que a utilização de células Sk-Hep-1 para expressão de FVIIIr é considerada uma importante plataforma de produção desta proteína. Sendo, portanto, escolhida para realização dos experimentos de quantificação em vista da sua alta expressão proteica quando comparada com outras células humanas.

A expressão de FVIIIr ocorre no meio de cultura extracelular cujo sobrenadante é recuperado por filtração. Após este processo, realiza-se a quantificação de FVIIIr pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), seguido do ensaio de atividade biológica (Cromogênico).

A principal justificativa para o desenvolvimento de metodologias quantitativas baseadas na abordagem do MRM, não é realizar a substituição dos ensaios imunoenzimáticos, os quais são utilizados com relativa especificidade e sensibilidade. Mas sim, implementá-los de maneira conjunta frente às limitações analíticas de detectabilidade pelo uso de anticorpos. A utilização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), em algumas situações, será a melhor opção devido à relação custo-benefício. Entretanto, nos casos onde existam diferentes isoformas de proteínas na amostra será mais interessante aplicar a abordagem do MRM para identificação de isoformas. Esta abordagem, também, pode ser utilizada para determinar a ocorrência de mutações em diferentes regiões da estrutura proteica.

Conforme houver a disponibilização de novas tecnologias desenvolvidas para agilizar o processamento de amostras, os ensaios proteômicos (MRM) consequentemente ganharão popularidade. A interface da LC-MS/MS ainda precisa ser simplificada para sua completa disseminação cuja instrumentalização requer um conhecimento avançado do operador na obtenção de resultados satisfatórios. Todavia, isso não deverá acontecer a qualquer momento por causa da necessidade de instrumentos que sejam mais automatizados do que os sistemas atuais. Outro fator importante seria o desenvolvimento de *softwares*, utilizados nas análises de dados, sem a necessidade da supervisão de técnicos. Além disso, será preciso que haja alguma mudança por parte das agências reguladoras, tais como ANVISA, FDA, EMEA e WHO objetivando a padronização das metodologias baseadas na

abordagem do MRM inter e intra laboratorial para facilitar a sua utilização rotineira no ambiente de trabalho.

O avanço da proteômica permitiu a criação de técnicas como a ESI cuja descoberta foi realizada pelo químico *John Bennett Fenn*, ganhador do prêmio Nobel em Química no ano de 2002. Podemos destacar, também, que a miniaturização e automatização da cromatografia líquida contribuiu para este avanço. Além disso, houve o surgimento de novos espectrômetros de massas com maior sensibilidade, resolução e exatidão em suas análises. Todos esses aspectos fizeram da MS uma poderosa ferramenta analítica direcionada à identificação e quantificação de proteínas em amostras (MALLICK e KUSTER, 2010). Com isso enfatizamos a sua importância dentro do campo biotecnológico.

A bem-sucedida interface da LC-MS/MS permitiu aumentar a sensibilidade analítica e a robustez dos métodos baseados na abordagem do MRM, além de diminuir o custo total das análises. Uma outra característica que tem perpetuado na popularização desta interface é a sua multiplicidade analítica.

A bioinformática também contribuiu decisivamente para o avanço da proteômica quantitativa no sentido de organizar a integração comparativa dos dados cuja complexidade e variação dificultava as análises proteômicas. Sob esse aspecto, as análises *in silico* vem sendo aplicadas antes das experimentações *in vitro* e *in vivo*. Em vista disso, entende-se que o uso dos bancos de dados e *softwares* disponibilizados gratuitamente permitiram agilizar as dificuldades envolvidas no processamento dos resultados.

Essas contribuições permitiram a aquisição de equipamentos com maior sensibilidade. Com isso a complexidade dos experimentos proteômicos aumentaram bem como suas análises. Entretanto, não podemos esquecer que etapas, tais como

extração, separação, identificação e quantificação de proteínas totais apresentam certas limitações analíticas que podem interferir na obtenção de dados (PALSON, 2002). Para isso é necessário implementar estratégias apropriadas que diminuam as limitações presentes em cada etapa experimental. Desta forma, o sucesso de um experimento proteômico é determinado tanto pelo seu correto planejamento quanto pela escolha de ferramentas que consigam mostrar resultados com alguma relevância. Não existe, portanto, um *pipeline* considerado de uso comum para execução dos experimentos.

Todas as informações obtidas de experimentos proteômicos, ao longo dos anos, possibilitaram a criação dos bancos de dados. Isso facilitou a integração e o compartilhamento de arquivos para otimização de experimentos *in silico*. Atualmente, existem muitos tipos de ferramentas que podem ser utilizadas na otimização de análises proteômicas, tais como *Skyline*, UniProt e *PeptideAtlas* (Figura 17).

O *Skyline* permite a otimização de metodologias baseadas no MRM, além de reduzir a complexidade das análises proteômicas quantitativas. Este *software* utiliza a interface *Panorama* que, por meio da importação dos dados obtidos por MS, permite armazenar, analisar e exportar os resultados sob a forma de cromatogramas (SHARMA *et al.*, 2014).

O UniProt é um banco de dados que disponibiliza publicamente as informações sobre diversas sequências de proteínas obtidas por diferentes fontes, por exemplo, *Swiss-Prot*, TrEMBL, PIR-PSD, EML, *Ensembl*, IPI, PDB, RefSeq, *Flybase*, *WormBase* e escritórios de patentes europeia, americana e japonesa (APWEILER *et al.*, 2004). Utilizou-se, também, o *PeptideAtlas* que reúne informações sobre diversos experimentos proteômicos gerados por diferentes

laboratórios. Esses resultados são processados pelo *Institute for Systems Biology* que os disponibilizam à comunidade. O *PeptideAtlas* está ligado ao consórcio *ProteomExchange* que apresenta outros participantes, tais como *Tranche*, *Global Proteome Machine Database* (GPMDB), *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e *Protein identifications Database* (PRIDE) (DEUTSCH *et al.*, 2008).

Figura 17. Uma visão geral do processo de compilação das ferramentas utilizadas na proteômica quantitativa. (A) Skyline é software gratuito que permite desenvolver metodologias e analisar os experimentos proteômicos. **(B)** Resource Protein Universal (UniProt) é um recurso que abrange as informações sobre sequências de proteínas. UniProt Knowledgebase (UniProtKB), UniProt Reference Clusters (UniRef) e UniProt Archive (UniParc) são as bases de dados do UniProt. **(C)** PeptideAtlas é construído pelo depósito de dados experimentais validados com Trans Proteomic Pipeline (TPP). Tranche, Global Proteome Machine Database (GPMDB), National Institute of Standards and Technology (NIST) e Protein Identification Database (PRIDE) são os principais participantes no consórcio ProteomExchange.

Após a escolha dos peptídeos proteotípicos do FVIII humano mediante as informações obtidas no UniProt e *PeptideAtlas*, seguiu-se com a síntese orgânica de

peptídeos em fase sólida (SOFS) cuja técnica utiliza polímeros insolúveis que, inertes às condições de reação, permitem otimizar o processo de síntese peptídica. O princípio geral desta metodologia é manter o substrato (aminoácido) ligado covalentemente ao polímero (resina). A utilização de aparelhos para automatização durante as etapas de lavagens facilitou a recuperação e purificação dos polímeros. Quando o produto final (peptídeo) é clivado com TFA, conseguimos um produto com índice de pureza relativamente alto. Isto ocorre devido à rapidez do processo de purificação que diminui a possibilidade de degradação peptídica, aumentando assim, o rendimento da reação. Essas são algumas das vantagens que determinam a viabilidade econômica da SOFS. A escolha adequada do polímero, solventes, reagentes e substratos são extremamente importantes na obtenção de bons rendimentos durante a síntese. Devemos, portanto, observar a estrutura do produto que se deseja obter, os métodos de acompanhamento das reações e a metodologia utilizada para clivar o peptídeo da resina.

Neste projeto, utilizamos a resina de Hidroxi-alkil PS como suporte polimérico para sintetizar os peptídeos do FVIII humano. Também conhecida por resina *Wang*, esta possui uma hidroxila em sua estrutura ligada à região N-terminal do aminoácido caracterizando a reação de acoplamento. Com relação à solvatação, esta resina apresenta alta expansão em DMSO, média em DMF e baixa em DCM (COSQUER *et al.*, 1999).

Os peptídeos sem marcação isotópica, sintetizados manualmente, foram utilizados para determinar o tempo de retenção e as transições iônicas. Posteriormente, eles foram substituídos pelos peptídeos com marcação isotópica para gerar resultados quantitativos mais confiáveis. Para isso, realizou-se uma mistura desses peptídeos que, quando, adicionados nas amostras são

caracterizados como padrões internos, além de permitirem a comparação dos seus espectros com aqueles dos peptídeos endógenos. Em contrapartida, os peptídeos sintéticos sem marcação isotópica, não podem ser distinguidos dos peptídeos endógenos e, por isso, não devemos adicioná-los nas amostras..

Existem duas estratégias aplicadas em análises proteômicas para determinar a abundância de proteínas: quantificação relativa cuja estratégia envolve o uso de peptídeos sem marcação isotópica, ou quantificação absoluta que utiliza peptídeos com marcação isotópica. Ambas as estratégias são utilizadas nos experimentos de proteômica quantitativa, contudo possuem reprodutibilidade e sensibilidade diferentes.

A quantificação relativa envolve a utilização de peptídeos sem marcação isotópica que, pode ser determinada pela contagem espectral ou por meio da intensidade do peptídeo. O princípio da contagem espectral baseia-se que, quanto mais abundante a proteína estiver na amostra, maior será o número de vezes que o peptídeo será detectado e, maior será o número de espectros desse peptídeo. Contudo, esta abordagem possui baixa acurácia na quantificação de proteínas pouco abundantes devido ao menor número de contagens de espectros. Uma outra abordagem utilizada na quantificação relativa é a intensidade do peptídeo, obtida pela área do cromatograma, apresenta maior acurácia do que a contagem espectral.

A quantificação absoluta envolve a utilização de peptídeos com marcação isotópica nos resíduos de arginina (Arg) ou lisina (Lys) na parte N-terminal da sequência. Os peptídeos com esse tipo de marcação apresentam propriedades químicas iguais ao seu equivalente na forma nativa, além do mesmo comportamento nos processos de LC e ESI. Os peptídeos marcados e não marcados isotopicamente, quando submetidos à colisão no espectrômetro de massas,

produzem fragmentos com diferentes massas. Esta estratégia envolve a adição de quantidades e concentrações conhecidas dos peptídeos na amostra cuja quantificação baseia-se na razão entre os valores das áreas médias totais dos peptídeos marcados e não marcados. Conseguimos, assim, calcular a concentração da proteína considerando os valores desta razão e do volume adicionado dos peptídeos com marcação isotópica na amostra.

Antes de executar as análises proteômicas pela abordagem do MRM, temos que realizar a quantificação das proteínas totais nas amostras. Existem diversos tipos de metodologias para estimar a concentração média das proteínas, tais como Absorção em ultra-violeta, Biureto, *Lowry*, Ácido bicinconínico, O-ftalaldeído e *Bradford*. É importante avaliar o ensaio mais adequado ao tipo de amostra e experimento realizado. Escolheu-se, portanto, a metodologia de *Bradford* que se baseia na interação entre o corante *Coomassie brilliant blue BG-250* e os aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas das proteínas. A ligação do corante ocorre nos resíduos de arginina (Arg), histidina (His), lisina (Lys), tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe) que provoca um deslocamento do pico de absorbância de 495 nm para 595 nm (BRADFORD, 1976). O ensaio de *Bradford* é utilizado para determinar a concentração média de proteínas totais em diversos meios, por exemplo, plasma ou soro sanguíneo e sobrenadantes de cultura celular.

Uma vez determinada a concentração relativa de proteínas nas amostras por espectrofotometria, faz-se a digestão enzimática cujo procedimento é aplicado para geração de peptídeos clivados nos resíduos de lisina (Lys) ou arginina (Arg) quando utilizada a tripsina. A eficiência do processo foi avaliada em três diferentes tempos – 10, 16 e 22 horas de incubação com intuito de analisar a influência do tempo no processo de digestão enzimática. Essas análises foram baseadas na avaliação da

qualidade entre os espectros obtidos das amostras pela comparação dos três tempos de incubação referentes aos peptídeos representativos das cadeias pesada e leve do FVIII humano. Desta maneira, conseguimos determinar que 16 horas de incubação é o tempo ideal para digestão enzimática de glicoproteínas. Além disso, estabeleceu-se que a proporção de 1:25 (enzima:proteína) apresenta melhor eficiência quando comparamos as áreas médias totais dos peptídeos representativos do FVIII através dos resultados obtidos pela interface da LC-MS/MS (SONG *et al.*, 2012; DONEANU *et al.*, 2012).

As amostras digeridas foram submetidas ao processo de extração em fase sólida (SPE) utilizando as colunas C₁₈ OASIS-HBL (Waters®). Para isso, foi necessário o uso de acetonitrila em diferentes concentrações que permite a eluição dos peptídeos. Existem alguns cuidados que devem ser tomados para não comprometer a eficiência das colunas C₁₈ durante a SPE, tais como nunca deixar a membrana secar completamente durante o procedimento de purificação, controlar a velocidade do fluxo e não aplicar volumes além de sua capacidade de utilização.

Após o processo de purificação, as amostras foram concentradas sob vácuo utilizando a *SpeedVac* e, posteriormente, ressuspendidas em ACN 5% em TFA 0,1% para serem analisadas no espectrômetro de massas. Todas as análises foram processadas em triplicatas técnicas e biológicas com objetivo de avaliar a sensibilidade do equipamento e, conseqüentemente, a eficácia da abordagem do MRM na identificação das transições iônicas do FVIII humano. Cada transição é específica de um íon produto, o qual é originado da fragmentação do íon precursor, quando este é colidido por um gás nobre, o argônio. A escolha da melhor energia de colisão deve ser muito bem executada, porque ela determina a qualidade da fragmentação dos peptídeos ionizados. A partir da fragmentação, obteve-se os íons

produtos que são tidos como “impressões digitais” das proteínas e, portanto, utilizados no desenvolvimento da abordagem do MRM.

Sabemos que cada peptídeo, quando fragmentado, origina diferentes transições iônicas, também denominadas de íons produtos, que foram selecionadas pelo valor de sua intensidade. A partir disso, desenvolveu-se a abordagem do MRM para quantificação do FVIII humano utilizando o *software Skyline* que estabelece qual a energia de colisão mais adequada à fragmentação peptídica. Este *software* também possibilita exportar uma lista com os valores das áreas de cada fragmento que, somadas, determinam o valor da área total do peptídeo. Todas as análises do espectrômetro de massas foram realizadas adicionando-se peptídeos com marcação isotópica nas amostras. Ou seja, fez-se uma solução desses peptídeos para identificar os seus correspondentes endógenos oriundos da digestão enzimática.

A razão entre as áreas totais dos peptídeos, com e sem marcação isotópica, além da concentração dos peptídeos marcados isotopicamente adicionados nas amostras permitem estimar a quantificação total do FVIII humano por LC-MS/MS.

O custo financeiro entre os ensaios imunoenzimático e proteômico foi avaliado para estabelecer um valor médio entre as metodologias. Estimamos que o ensaio de ELISA tenha um valor aproximado de US\$ 30,00 por amostra, pois cada anticorpo custa no mínimo US\$ 300,00. Em contrapartida, o ensaio de MRM tem um valor aproximado de US\$ 10,00 por amostra, pois cada peptídeo padrão custa em torno de US\$ 20,00. Devido à comparação de custos, conclui-se que o ensaio proteômico é três vezes mais barato em relação ao ensaio imunoenzimático. Essa estimativa não considerou os custos de manutenção do equipamento.

A abordagem do MRM, também, pode ser aplicada para quantificação de outras glicoproteínas recombinantes de interesses terapêuticos como Fator VII

recombinante (FVIIIr) e Fator IX recombinante (FIXr), que estão sendo desenvolvidas pela FUNDHERP objetivando o tratamento destas coagulopatias. O FVIIIr pode ser utilizado no tratamento das hemofilias A e B em pacientes que desenvolveram anticorpos contra o FVIIIr ou FIXr, porém sua administração deve ser controlada devido à possibilidade de reações adversas como formação de trombose. Além destas coagulopatias, o FVIIIr também é usado no tratamento de pacientes com deficiência do FVII da coagulação sanguínea. Já o FIXr é direcionado ao tratamento de pacientes com hemofilia B.

Este trabalho, portanto, teve como contrapartida o desenvolvimento de uma nova metodologia analítica baseada nos conceitos da proteômica quantitativa utilizando a LC-MS/MS para determinar a quantificação total do FVIII humano em amostras de sobrenadante celular e do plasma de referência. Portanto, fez-se uso da abordagem do MRM e, posteriormente, do *Skyline* para realizar as análises quantitativas.

Conclusão

7 Conclusão

No presente trabalho, foi implementado uma metodologia analítica para quantificação total do FVIII humano de origem recombinante ou plasmática. Para isso, utilizou-se os conceitos da proteômica quantitativa na validação e aplicabilidade da abordagem do MRM pela LC-MS/MS. Conseguimos, portanto, selecionar dois peptídeos representativos que podem ser tidos como referenciais para realizar a identificação das cadeias pesada e leve do FVIII, além de estabelecer as condições ideais no processo da digestão enzimática para glicoproteínas. Desta maneira, podemos implementar esta abordagem de monitoramento para outras proteínas recombinantes de base terapêutica que se encontram em fase de desenvolvimento na FUNDHERP.

Referências

8 Referências

- AEBERSOLD R, MANN M (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v. 422, p. 198-207.
- ALY AM, HOYER LW (1999). Factor VIII-East Hartford (arginine 1689 to cysteine) has procoagulant activity when separated from von Willebrand factor. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 89, p. 1382-1387.
- APOSTOL I, SCHOFIELD T, KOELLER G, POWERS S, STAWICKI M, WOLFE RA (2008). A Rational Approach for Setting and Maintaining Specifications for Biological and Biotechnology-Derived Products Part 1. *BioPharm International*, v. 21, p. 42-54.
- APWEILER R, BAIROCH A, WU CH, BARKER WC, BOECKMANN B, FERRO S, GASTEIGER E, HUANG H, LOPEZ R, MAGRANE M, MARTIN MJ, NATALE DA, O'DONAVAN C, REDASHI N, YEH LSL (2004). Uniprot: the Universal Protein Knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 115-119.
- BECKER RC (2005). Cell-based models of coagulation: a paradigm in evolution. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 20, p. 65-68.
- BIAGGIO RT, ABREU-NETO MS, COVAS DT, SWIECH K (2015). Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth, and cryopreservation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 38, p. 1495-1507.
- BOLTON-MAGGS PHB, PASI JK (2003). Haemophilias A and B. *Lancet*, v. 361, p. 1801-1809.
- BOVENSCHEN N, RIJKEN DC, HAVEKES LM, VAN VLIJMEN BJ, MERTENS K (2005). The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 3, p. 1257-1265.
- BOWEN DJ (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Journal of Clinical Pathology*, v. 55, p. 127-144.
- BRASIL. COORDENAÇÃO DA POLÍTICA NACIONAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS (2009). Relatório de Gestão 2008. Brasília.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA ATENÇÃO À SAÚDE. COORDENAÇÃO GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS. Perfil das Coagulopatias Hereditárias no Brasil: 2010 – 2014. Brasília.
- BRADFORD MA (1976). Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.
- BROZE GJ (1995). Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annual Review of Medicine*, v. 46, p. 103-112.

CELIE PH, VAN STEMPOORT G, JORIEUX S, MAZURIER C, VAN MOURIK JA, MERTENS K (1999). Substitution of Arg527 and Arg531 in factor VIII associated with mild haemophilia A: characterization in terms of subunit interaction and cofactor function. *British Journal of Haematology*, v. 106, p. 792-800.

CORREA DE FREITAS MC, FONTES AM, CASTILHO FERNANDES A, PICAÑO-CASTRO V, SOUSA RUSSO EM, COVAS DT (2014). Murine leukemia virus-derived retroviral vector has differential integration patterns in human cell lines used to produce recombinant factor VIII. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 36, p. 213-218.

COSQUER A, PICHEREAU V, LE MÉE D, LE ROCH M, RENAULT J, CARBONI B, URIAC P, BERNARD T. Toxicity and osmoprotective activities of analogues of glycine betaine obtained by solid phase organic synthesis towards *Sinorhizobium meliloti*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 9, p. 49-54.

COTRAN RS, KUMAR VK, COLLINS T (2001). *Patologia estrutural e funcional*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

DASS C (2007). *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.

DAVIE EW (2003). A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 50819-50832.

DAVIE EW, RATNOFF OD (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, v. 145, p. 1310-1312.

DEUTSCH EW, LAM H, AEBERSOLD R (2008). PeptideAtlas: A resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. *EMBO Reports*, v. 9, p. 429-434.

DOMON B, AEBERSOLD R (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, v. 312, p. 212-217.

DONEAU C, YANG H, RAINVILLE P, BOUVIER E, PLUMB R (2012). Optimization of trypsin digestion for MRM quantification of therapeutic proteins in serum. *Application note – Waters*, p. 1-7.

DORNER AJ, BOLE DG, KAUFMAN RJ (1987). The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *Journal of Cell Biology*, v.105, p. 2665-2674.

EATON DL, RODRIGUEZ H, VEহার GA (1986). Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*, v. 25, p. 505-512.

EATON DL, VEহার GA (1986). Factor VIII structure and proteolytic processing. *Hemostasis & Thrombosis Program*, v. 8, p. 47-70.

ELIAS A, BONFILS S, DAOUD-ELIAS M, GAUTHIER B, SIÉ P, BOCCALON H, BONEU B (1993). Influence of long term oral anticoagulants upon prothrombin fragment 1 + 2, thrombin-antithrombin III complex and D-Dimer levels in patients affected by proximal deep vein thrombosis, v. 69, p. 302-305.

FAY PJ, HAIDARIS PJ, SMUDZIN TM (1991). Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. *Journal of Biological Chemistry*, v. 14, p. 8957-8962.

FOWLER WE, FAY PJ, ARVAN DS, MARDER VJ (1990). Electron microscopy of human factor V and factor VIII: correlation of morphology with domains structure and localization of factor V activation fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, p. 7648-7652.

FULCHER CA, GARDINER JE, GRIFFIN JH, ZIMMERMAN TS (1984). Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood*, v. 63, p. 486-489.

FRANCHINI M, TAGLIAFERRI A, MENGOLI C, CRUCIANI M (2012). Cumulative inhibitor incidence in previously untreated patients with severe hemofilia A treated with plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates: A critical systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 81, p. 82-93.

FREITAS MCC, FONTES AM, FERNANDES AC, PICANÇO-CASTRO V, RUSSO EMS, COVAS DT (2014). Murine leukemia virus-derived retroviral vector has differential integration patterns in human cell lines used to produce recombinant factor VIII. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*, v. 36, p. 213-218.

GALE AJ, CRAMER TJ, ROZENSHTEYN D, CRUZ JR (2008). Detailed mechanisms of the inactivation of factor VIIIa by activated protein C in the presence of its cofactors, protein S and factor V. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, p. 16355-16362.

GILLETTE MA, CARR SA (2013). Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nature Methods*, v. 10, p. 28-34.

GITSCHER J, WOOD WI, GORALKA TM (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, v. 312, p. 326-330.

GRILLBERGER L, KREIL TR, NASR S, REITER M (2009). Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnology Journal*, v. 4, p. 186-201.

GSTAIGER M, AEBERSOLD R (2009). Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, p. 617-627.

HANDIN RI, LUX SE, STOSSEL TP (2003). *Blood: principles and practice of hematology*. 2ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 2304.

- HANSSON K, STENFLO J (2005). Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 3, p. 2633-2648.
- HEALTHCARE B (2009). Kogenate® Prescribing Information. Bayer HealthCare, Leverkusen.
- HOFFMAN M, MONROE DM (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 85, p. 958-965.
- HOFFMAN M (2003). A cell-base model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Reviews*, v. 17, p. 1-5.
- HOLMAN S, SIMS PFG, EYERS CE (2012). The use of selected reaction monitoring in quantitative proteomics. *Bioanalysis*, v. 4, p. 1763-1786.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (2014). Compendium of Chemical Terminology. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>>. Acesso em 10 Mar 2016.
- HORTIN G, FOLZ R, GORDON JI, STRAUSS AW (1986). Characterization of sites of tyrosine sulfation in proteins and criteria for predicting their occurrence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 141, p. 326-333.
- KALTASHOV IA, BOBST CE, ABZALIMOV RR, BERKOWITZ SA, HOUDE D (2010). Conformation and Dynamics of Biopharmaceuticals: Transition of Mass Spectrometry-Based Tools from Academe to Industry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 21, p. 323-337.
- KANE WH, DAVIE EW (1988). Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood*, v. 71, p. 539-555.
- KAUFMAN RJ (1990). The impact of gene technology on plasma proteins. In: *Blood separation and plasma fractionation*. New York: James Robinson Harris, p. 449-466.
- KESSNER D, CHAMBERS M, BURKE R, AGUS D, MALLICK P (2008). ProteoWizard: Open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics*, v. 24, p. 2534-2536.
- KIM YJ, DOYLE ML (2010). Structural mass spectrometry in protein therapeutics discovery. *Analytical Chemistry*, v. 82, p. 7083-7089.
- KINTER M, SHERMAN NE (2000). Protein sequence and identification using tandem mass spectrometry. New York: John Wiley and Sons.
- LAVIGNE-LISSALDE G, ROTHCHILD C, POUPLARD C, LAPALUD P, GRUEL Y, SCHVED JF, GRANIER C (2009). Characteristics, Mechanisms of Action, and Epitope Mapping of Anti-factor VIII Antibodies. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 37, p. 67-79.

- LEE CA, BERNTORP EE, HOOTS WK (2011). Textbook of Hemophilia. 2ed. West Sussex: John Wiley & Sons, p.476.
- LENTING PJ, VAN MOURIK JA, MERTENS K (1998). The life cycle of coagulation factor VIII view of its structure and function. *Blood*, v. 92, p. 3983-3996.
- LIEBLER D, ZIMMERMAN LJ (2013). Targeted Quantification of Proteins by Mass Spectrometry, v. 52, p. 3797-3806.
- MACFARLANE RG (1964). An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, v. 202, p. 498-499.
- MACLEAN B, TOMAZELA DM, SHULMAN N, CHAMBERS M, FINNEY GL, FREWEN B, KERN R, TABB DL, LIEBLER DC, MACCOSS MJ (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*, v. 26, p. 966-968.
- MALLICK P, KUSTER B (2010). Proteomics: a pragmatic perspective. *Nature Biotechnology*, v. 28, p. 695-709.
- MALÝ MA, TOMASOV P, HÁJEK P, BLASKO P, HRACHOVINOVÁ I, SALAJ P, VESELKA J (2007). The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. *Physiological Research*, v. 56, p. 685-695.
- MANN M, KELLEHER NL (2008). Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, p. 18132-18138.
- MANNUCCI PM (2003). Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *Journal Thrombosis and Haemostasis*, v. 1, p. 1349-1355.
- MEI B, CHEN Y, CHEN J, PAN CQ, MURPHY JE (2006). Expression of human coagulation factor VIII in a human hybrid cell line, HKB11. *Molecular Biotechnology*, v. 34, p. 165-178.
- MIYOSHI H, BLÖMER U, TAKAHASHI M, GAGE FH, VERMA IM (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of Virology*, v. 72, p. 8150-8157.
- MONROE DM, HOFFMAN M (2009). The coagulation cascade in cirrosis. *Clinical Liver Disease*, v. 13, p. 1-9.
- NEILSON KA, ALI NA, MURALIDHARAN S, MIRZAEI M, MARIANI M, ASSADOURIAN G, LEE A, VAN SLUYTER SC, HAYNES PA (2011). Less label, more free: approaches in lable-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*, v. 11, p. 535-553.
- NEMERSON Y (1988). Tissue factor and haemostasis. *Blood*, v. 71, p. 1-8.

- ONG SE, FOSTER LJ, MANN M (2003). Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*, v. 29, p. 124-130.
- OLDENBURG J, ANANYEVA NM, SAENKO EL (2004). Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia*, v. 10, p. 133-139.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (1992). Convenção sobre Diversidade Biológica. Ministério do Meio Ambiente, Artigo 2 – Utilização de termos.
- PALSSON B (2002). In silico biology through “omics”. *Nature Biotechnology*, v. 20, p. 649-650.
- PICANÇO V, HEINZ S, BOTT D, BEHRMANN M, COVAS DT, SEIFRIED E, TONN T (2007). Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. *Cytotherapy*, v. 9, p. 785-794.
- PICANÇO-CASTRO V, FONTES AM, RUSSO-CARBOLANTE EMS, COVAS DT (2008). Lentiviral mediated gene transfer – a patente view. *Expert Opin ther patents*, v. 18, p. 525-539.
- PICOTTI P, AEBERSOLD R (2012). Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nature Methods*, v. 9, p. 555-566.
- PIPE SW (2008). Recombinant clotting factor. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 99, p. 840-850, 2008.
- RIDDEL JP, AOUIZERAT BE, MIASKOWSKI C, LILLICRAP DP (2007). Theories of blood coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, v. 24, p. 123-131.
- RODRIGUES ES, PICANÇO-CASTRO V, ESPANHOL MR, ANDRADE LAM, PALMA PVB, KASHIMA S, FONTES AM, COVAS DT (2013). Quantitative correlation between transcriptional levels of ER chaperone, peroximal protein and FVIII productivity in human Hek-293 cell line. *Springerplus*, v. 2, p. 1-7.
- ROEPSTORFF P, FOHLMAN J (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, v. 35, p. 601.
- ROSA NG, SWIECH K, PICANÇO-CASTRO V, RUSSO-CARBOLANTE EM, SOARES NETO MA, CASTILHO-FERNANDES A, FAÇA VM, FONTES AM, COVAS DT (2012). SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. *Biotechnology Letters*, v. 34, p. 1435-1443.
- RUSSO-CARBOLANTE EM, PICANÇO-CASTRO V, ALVES DC, FERNANDES AC, ALMEIDA-PORADA G, TONN T, COVAS DT (2011). Integration pattern of HIV-1 based lentiviral vector carrying recombinant coagulation factor VIII in Sk-Hep and 293T cells. *Biotechnology Letters*, v. 33, p. 23-31.

SCHAUB RG (2011). Recent advances in the development of coagulation factors and procoagulants for the treatment of hemophilia. *Biochemical Pharmacology*, v. 82, p. 91-98.

SHARMA V, ECKELS J, TAYLOR GK, SHULMAN NJ, STERGACHIS AB, JOYNER SA, YAN P, WHITEAKER JR, HALUSA GN, SCHILLING B, GIBSON BW, COLANGELO CM, PAULOVICH AG, CARR SA, JAFFE JD, MACCOSS MJ, MACLEAN B (2014). Panorama: a targeted proteomics knowledge base, v. 5, p. 4205-4210.

SHI T, FILLMORE TL, SUN X, ZHAO R, SCHEPMOES AA, HOSSAIN M, XIE F, WU S, KIM JS, JONES N, MOORE RJ, PASA-TOLIC L, KAGAN J, RODLAND KD, LIU T, TANG K, CAMP DG, SMITH RD, QIAN WJ (2012). Antibody-free, targeted mass spectrometric approach for quantification of proteins at low picogram per milliliter levels in human plasma/serum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, p. 15395–15400.

SONG E, PYREDDY S, MECHREF Y (2012). Quantification of glycopeptides by Multiple Reaction Monitoring LC-MS/MS. *Rapid communications in mass spectrometry*, v. 26, p. 1-22.

SPENCER HT, DENNING G, GAUTNEY RE, DROPULIC B, ROY AJ, BARANYI L, GANGADHARAN B, PARKER ET, LOLLAR P, DOERING CB (2011). Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. *Molecular Therapy*, v. 19, p. 302-309.

STENN H, MANN M (2004). The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, p. 699-711.

STRYJEWSKA A, KIEPURA K, LIBROWSKI T, LOCHYNSKI S (2013). Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. *Pharmacological Reports*, v. 65, p. 1075-1085.

SWIECH K, KAMEN A, ANSORGE S, DUROCHER Y, PICANÇO-CASTRO V, RUSSO-CARBOLANTE EM, NETO MS, COVAS DT (2011). Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for eficiente prodction of human rFVIII. *BMC Biotechnology*, v. 24, p. 1-10.

TABB DL, SMITH LL, BRECI LA, VYSOCKI VH, LIN D, YATES JR (2003). Statistical characterization of ion trap tandem mass spectra from doubly charged tryptic peptides. *Analytical Chemistry*, v. 75, p. 1155-1163.

TOOLE JJ, KNOPF JL, WOZNEY JM, SULTZMAN LA, BUECKER JL, PITTMAN DD, KAUFMAN RJ, BROWN E, SHOEMAKER C, ORR EC (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature*, v. 312, p. 342-347.

TRONO D (2000). Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Therapy*, v.7, p. 20-23.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO. Elisa Maria de Souza Russo Carbolante, Kamilla Swiech, Dimas Tadeu Covas, Virgínia Picanço e Castro. Large scale and stable production of human fVIII in the human cell line sk-hep-1. US 2014/0051122 A1, 19 Jan. 2012, 20 Feb. 2014. Disponível em: <<https://www.google.com.br/patents/US20140051122?dq=US2014/0051122+A1&hl=ptBR&sa=X&ei=vw8wVdKF9LHsQStj4HwBw&ved=0CB4Q6AAA>>. Acesso em: 15 Fev. 2016.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO. Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas. Recombinant human blood coagulation factor VIII protein, composition, use of a recombinant factor VIII protein, use of a composition, method of obtaining a recombinant human blood coagulation factor VIII protein and use thereof. US 2010/0172891 A1, 18 Set. 2009, 8 Jul. 2010. Disponível em: <<http://www.google.com.br/patents/US20100172891?dq=US20100172891+A1&hl=ptBR&sa=X&ei=SAIxVYLDaLbsASJ04DAAQ&ved=0CB8Q6AEwAA>>. Acesso em: 15 Fev. 2016.

VEHAR GA, KEYT B, EATON D, RODRIGUEZ H, O'BRIEN DP, ROTBLAT F, OPPERMANN H, KECK R, WOOD WI, HARKINS RN, TUDDENHAM EG, LAWN RM, CAPON DJ (1984). Structure of human factor VIII. *Nature*, v. 312, p. 337-342.

VERSTEEG HH, HEEMSKERK JWM, LEVI M, REITSMA PH (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiological Reviews*, v. 93, p. 327-358.

VINE AK (2009). Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina*, v. 29, p. 1-7.

WAKABAYASHI H, KOSZELAK ME, MASTRI M, FAY PJ (2001). Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity. *Biochemistry*, v. 40, p. 10293-10300.

WALSH G (2003). *Biopharmaceuticals – Biochemistry and Biotechnology*. 2ed. Chichester: John Wiley & Sons.

WHITE GC, POSENDAAL F, ALEDORT LM, LUSHER JM, ROTHSCILD, INGERSLEV J. (2001). Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis Haemostasis*, v. 85, p. 560.

WION KL, KELLY D, SUMMERFIELD JA, TEDDENHAM EGD, LAWN RM (1985). Distribution of factor VIII Mrna and antigen in human liver and other tissues. *Nature*, v. 317, p. 716-729.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA (2015). Report on the Annual Global Survey 2014. Disponível em: <<http://http://www1.wfh.org/publication/files/pdf1231.pdf>> Acesso em: Fev/2016.

WRIGHT IS (1962). The nomenclature of blood clotting factors. Canadian Medical Association Journal, v. 86, p. 373-374.

WYETH PHARMA PFIZER (2007). ReFacto® Prescribing Information. Wyeth Pharma Pfizer, Madison.

Apêndices

9 Apêndices

Apêndice A. Sequência completa da proteína nativa do FVIII humano. As regiões em alaranjado (peptídeo sinal), vermelho (domínio B) e verde (região ácida) são excisadas da proteína na sua forma ativa. Já as regiões em azul correspondem aos peptídeos selecionados nas cadeias pesada e leve.

MQIELSTCFF	LCLLRFCFSA	TRRYYLGAVE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP	PRVPKSFPPFN	TSVVYKKTLE
VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY	DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR
EKEDDKVFP	GSHTYVWQVL	KENGPMASDP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE	GSLAKEKTQT
LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM	HTVNGYVNR	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG
TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH	RQASLEISPI	TFLTAQTLLM	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVK V DSCPE
EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPKT	WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA
PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY	TDETFKTREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDITL	LIIFKNQASR
PYNIYPHGIT	DVRPLYSRRL	PKGKVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR	YYSSFVNMER
DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE	NRSWYLTEI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS
NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL	HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MYEDTILTLF	PFSGETVFMS
MENPGLWILG	CHNSDFRNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYED	SYEDISAYLL	SKNNAIEPRS	FSQNSRHPST
RQKQFNATTI	PENDIEKTD	WFAHRTMPK	IQNVSSDDL	MLLRQSPTPH	GLSLSDLQEA	KYETFSDDP
PGAIDSNNSL	SEMTHFRPQ	HHSGLDMVFT	ESGLQLRLNE	KLGTAAATEL	KKLDFKVSST	SNNLISTIPS
DNLAAGTDNT	SSLGPPSMPV	HYDSQLDITL	FGKKSPLTE	SGGPLSLSEE	NNDSKLLESG	LMNSQESSWG
KNVSSTESGR	LFGKGRAHGP	ALLTKDNALF	KVSISLLKTN	KTSNNSATNR	KTHIDGPSLL	IENSPSVWQN
ILESDETEFK	VTPLIHDRML	MDKNATALRL	NHMSNKTTS	KNMEMVQKK	EGPIPPDAQN	PDMSFFKMLF
LPESARWIQR	THGKNSLNSG	QGPSKQLVS	LGPEKSVEGQ	NFLSEKNKV	VKGGEFTKDV	GLKEMVFPSS
RNLFLTNDLN	LHENNTHNQ	KKIQEEIEKK	ETLIQENVVL	POIHTVTGK	NFMKNLFLS	TRQNVESYD
GAYAPVLQDF	RSLNDSTNRT	KKHTAHFSKK	GEENLEGLG	NOTKQIVEKY	ACTTRISPNT	SOQNFVTQ
KRALKQFRLP	LEETELEKRI	IVDDTSTQWS	KNMKHLTPST	LTQIDYNEKE	KGAITQSPLS	DCLTRSHSIP
QANRSPLPIA	KVSSFPSIRP	IYLTRVLFQD	NSSHLPAASY	RKKDSGVQES	SHFLQGAKN	NLSLAILTLE
MTGDQREVGS	LGTSATNSVT	YKKVENTVLP	KPDLPKTSK	VELLPKVHIY	QKDLFPTETS	NGSPGHLDLV
EGSLLQGTEG	AIKWNEANRP	GKVPFLRVAT	ESSAKTPSKL	LDPLAWDNHY	GTQIPKEEWK	SQEKSPKTA
FKKKDTILSL	NACESNHAIA	AINEGQNKPE	IEVTWAKQGR	TERLCSQNPP	VLKRHRQREIT	RTTLQSDQEE
IDYDDTISVE	MKKEDFDIYD	EDENQSPRSF	QKTRHYFIA	AVERLWDYGM	SSSPHVLNR	AQSGSVPPQFK
KVVFQEFIDG	SFTQPLYRGE	LNEHLGLLGP	YIRAEVEDNI	MVTFRNQASR	PYSFYSSLIS	YEEDQRQGA
PRKNFVKPNE	TKTYFWKVQH	HMAPTKDEFD	CKAWAYFSDV	DLEKDVHSG	IGPLLVCHTN	TLNPAHGRQV
TVQEFALFFT	IFDETKSWYF	TENMERNCR	PCNIQMEDPT	FKENYRFHAI	NGYIMDTLPG	LVMAQDQIR
WYLLSMGSNE	NIHSIHFSGH	VFTVRKKEEY	KMALYNLYPG	VFETVEMLPS	KAGIWRVECL	IGELHAGMS
TLFLVYSNKC	QTPLGMASGH	IRDFQITASG	QYGQWAPKLA	RLHYSGSINA	WSTKEPFSWI	KVDLLAPMII
HGIKTQGARQ	KFSSLYISQF	IIMYSLDGKK	WQTYRGNSTG	TLMVFFGNVD	SSGIKHNI	FPPIIARYIRL
HPTHYSIRST	LRMELMGCDL	NSCSMPLGME	SKAISDAQIT	ASSYFTNMFA	TWSPSKARLH	LQGRSNAWRP
QVNNPKEWLQ	VDFQKTMKVT	GVTTQGVKSL	LTSMYVKEFL	ISSSQDGHQW	TLFFQNGKVK	VFQGNQDSFT
PVVNSLDPPL	LTRYLRIHPQ	SWVHQIALRM	EVLGCEAQDL	Y		

Anexos

10 Anexos

Fundação
Hemocentro RP

Ribeirão Preto, 28 de abril de 2015.

O projeto de pesquisa intitulado "Utilização do monitoramento de reações múltiplas para quantificação de produtos de interesse biotecnológico", em nome de Edson Galdino do Nascimento Filho, orientada pelo Dr Vinor Marcel Faça, foi avaliado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2015.004-01**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório final da pesquisa.

Simone Kashima Haddad

Presidente da CIBio

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto