UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Clonagem e expressão de fator IX recombinante em células 293T e SK-Hep-1 e caracterização das células produtoras

Aline de Sousa Bomfim

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Clonagem e expressão de fator IX recombinante em células 293T e SK-Hep-1 e caracterização das células produtoras

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia.

Orientada: Aline de Sousa Bomfim

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria de
Sousa Russo**

Ribeirão Preto
2013

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Bomfim, Aline de Sousa

Clonagem e expressão de fator IX recombinante em células 293T e
SK-Hep-1 e caracterização das células produtoras. Ribeirão Preto, 2013.

141 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração:
Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Russo, Elisa Maria de Sousa.

1. Hemofilia B. 2. Fator IX recombinante. 3. Vetores lentivirais. 4.
Linhagens celulares humanas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline de Sousa Bomfim

Clonagem e expressão de fator IX recombinante em células 293T e SK-Hep-1 e caracterização das células produtoras

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha família, por todo amor, carinho e dedicação.
Sem o apoio incondicional dessas pessoas especiais
esta dissertação não seria possível.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Elcir e Ana Lucia, por serem pessoas tão especiais sendo um porto seguro na minha vida, pelo amor, confiança, compreensão, incentivo e pelas palavras tão necessárias nos momentos mais oportunos.

À minha querida irmã Paloma que dividiu comigo os momentos bons e ruins desta trajetória, por todo apoio, carinho e compreensão.

À minha família, em especial aos meus queridos avós Antônio, Zaira e Maria e às minhas queridas tias Arli e Arlete, pela convivência, apoio, incentivo, carinho e confiança.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Elisa Maria de Sousa Russo, pela oportunidade, orientação, por ter acreditado em mim e, sobretudo, pela amizade construída.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Biotecnologia, Luiza, Lílían, Virgínia, Ana Paula, Bruno, Nayara e aos agregados Everton, Camila e Marina que são pessoas muito especiais que eu tive o privilégio de conhecer e conviver todos os dias. Agradeço todos os momentos e alegrias vividos, em especial a Marcela que me ajudou muito na elaboração deste trabalho, sempre solícita e com um ombro amigo nos momentos difíceis.

Às minhas queridas amigas Fernanda, Daniella, Gabriela, Aline e Luciana por todo apoio e paciência nos momentos que eu mais precisei.

À Florência Tellechea pela amizade e apoio na elaboração deste trabalho.

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

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

À minha querida Amanda Mizukami por toda a ajuda e amizade construída ao longo desse período.

Ao Laboratório de Terapia Celular, em especial a Maristela Delgado, Sâmia e Taísa.

Ao laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela pronta disponibilidade e apoio na realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Biologia Molecular pela amizade e apoio para que este trabalho fosse finalizado.

Ao Centro de Química de Proteínas, em especial à Carolina Thomé e ao Rodrigo, pela disponibilidade e auxílio na realização deste trabalho.

À Sandra pela disponibilidade e ajuda na formatação gráfica deste trabalho.

À Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini do Laboratório de Bioquímica da FCFRP por todo apoio, dedicação e ensinamentos prestados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao secretário da pós-graduação Henrique, pela disponibilidade e atenção com que sempre me atendeu.

Ao CNPQ e à FINEP pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À todos os funcionários da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Aos integrantes da banca examinadora, por disponibilizarem o seu tempo para a análise desse trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho, que confiaram no meu potencial e caminharam ao meu lado, meus mais sinceros agradecimentos.

O sucesso nasce do querer,
da determinação e persistência
em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.
(José de Alencar)

RESUMO

BOMFIM, A. S. **Clonagem e expressão de fator IX recombinante em células 293T e SK-Hep-1 e caracterização das células produtoras.** 2013. 141f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O fator IX (FIX) da coagulação sanguínea é uma proteína dependente de vitamina K de grande valor farmacêutico no tratamento da Hemofilia B, o qual é baseado na administração do fator de coagulação derivado de plasma humano ou da proteína recombinante produzida em células murinas. A terapia baseada nestas abordagens apresenta alto custo e está associada às contaminações com vírus e príons, além do desenvolvimento de inibidores de FIX. Esses efeitos aumentam o risco de morbidade e mortalidade relacionadas às hemorragias. Neste trabalho, clonamos o cDNA do FIX em um vetor lentiviral e avaliamos a expressão da proteína recombinante em duas linhagens celulares humanas. A clonagem do cDNA do FIXh no vetor de expressão lentiviral 1054 foi confirmada através da análise com enzimas de restrição específicas obtendo-se as bandas esperadas de 1407 pb e 10054 pb visualizadas em gel de agarose. As linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 foram transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX gerado em nosso laboratório e as células que apresentaram maior expressão de EGFP foram selecionadas e separadas por citometria de fluxo. A quantificação da expressão de FIXrh foi realizada por ensaios de ELISA e cromogênico. A quantificação de FIXrh total foi de 500 ng/10⁶ células para a linhagem 293T e 803 ng/10⁶ células para a linhagem SK-Hep-1. A atividade biológica específica de FIXh nas células 293T e SK-Hep-1 foi 0,047 UI/10⁶ células e 0,186 UI/10⁶ células, respectivamente. Com o intuito de avaliar o perfil de produção de FIXrh ativo ao longo do tempo, foi realizado um acompanhamento de 180 dias, no qual foi observado que a linhagem SK-Hep-1 cessou a expressão de FIX, enquanto as células 293T mantiveram a expressão durante o período. O FIXrh foi caracterizado por *western blot* confirmando a presença de uma banda imunoreativa esperada de 57 kDa. As linhagens 293T e SK-Hep-1 apresentaram 7,67 e 17 cópias do vetor inserido/célula, respectivamente. Considerando a importância do processo de γ -carboxilação, foi realizada uma análise da expressão gênica dos genes envolvidos neste processo, tais como o VKORC1, γ -carboxilase e o inibidor calumenina, nas linhagens celulares. Os resultados demonstraram razões elevadas entre os genes VKORC1 e calumenina e VKORC1 e γ -carboxilase nas duas linhagens. A cinética de crescimento das células foi realizada por um período de 7 dias apresentando diferenças significativas entre as células SK-Hep-1 transduzidas e não transduzidas, enquanto que as células 293T não apresentaram diferenças estatísticas no crescimento celular. A suplementação do meio de cultura com íons Ca⁺² e Mg⁺² foi testada para avaliar sua influência na expressão de FIXrh ativo. As células 293T apresentaram melhor desempenho nas concentrações de 0,5 mmol/L de Ca⁺² e 1,0 mmol/L de Mg⁺² e as células SK-Hep-1 no meio de cultura não suplementado. Nossos dados indicam que a linhagem hepática SK-Hep-1 é a melhor produtora de FIXrh funcional e as comparações realizadas entre os dois tipos celulares são importantes na caracterização do comportamento de linhagens geneticamente modificadas voltadas para a expressão de proteínas recombinantes heterólogas e abre novos caminhos para futuros estudos que visam o melhoramento da produção desse tipo de proteína.

Palavras-chave: Hemofilia B, fator IX recombinante, vetores lentivirais, linhagens celulares humanas.

ABSTRACT

BOMFIM, A. S. Cloning and expression of recombinant factor IX in 293T and SK-Hep-1 cells and characterization of producing cells. 2013. 141f. Dissertation (Master degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Blood coagulation factor IX is a vitamin K-dependent protein, and it has become a valuable pharmaceutical in the treatment of Hemophilia B which is based on the plasma-derived coagulation factors or recombinant protein produced in murine cells. Coagulation therapy based on these approaches has high costs and is closely associated with prion and virus contamination besides the FIX inhibitors development. These effects increase the risk for bleeding-related morbidity and mortality. The purpose of this study was to clone hFIX into a lentiviral vector and evaluate the expression of the recombinant protein in two human cell lines. The cloning of the hFIX cDNA into 1054 lentiviral expression vector was confirmed by enzymatic restriction obtaining the expected 1407 bp and 10054 bp bands in agarose gel. The 293T and SK-Hep-1 cell lines have been stable transduced with 1054-FIX lentiviral vector generated in our laboratory and the cells with higher expression of EGFP were selected and separated by flow cytometry. The quantification of the expression of rhFIX was performed by ELISA and chromogenic assays. The concentration of total rhFIX was 500 ng/10⁶ cells in 293T cell line and 803 ng/10⁶ cells in SK-Hep-1 cell line. The biological activity of FIX secreted by 293T and SK-Hep-1 was 0,047 UI/10⁶ cells and 0,186 UI/10⁶ cells, respectively. In order to evaluate the active rhFIX production profile over time, we conducted a monitoring of 180 days, which was noted that the SK-Hep-1 cell line ceased FIX expression, while 293T cells maintained the expression during this period. rhFIX was characterized by western blot analysis confirming the presence of a expected 57 kDa immunoreactive band. The 293T and SK-Hep-1 cell lines showed 7.67 and 17 integrated vector copies/cell, respectively. Considering the importance of the γ -carboxylation process, we performed a gene expression analysis of genes involved in this process, such as VKORC1, γ -carboxylase and calumenin, in cell lines. The results showed high ratios among the genes VKORC1 and calumenin and among VKORC1 and γ -carboxylase in both cell lines. The cell growth kinetics was performed by a 7-day period, showed significant differences between SK-Hep-1 transduced cells and non-transduced cells, whereas 293T cells showed no difference in cell growth. Enrichment of culture medium with Ca⁺² and Mg⁺² ions was tested to evaluate its influence on the expression of active FIX. 293T cells showed better performance in 0.5 mmol/L Ca⁺² and 1.0 mmol/L Mg⁺² concentrations and SK-Hep-1 cells in culture medium control. Our data indicate that transduced SK-Hep-1 cells are the best producer of functional rhFIX, and comparisons between these two cell lines are important in characterizing the behavior of genetically modified cell lines focused on the heterologous expression of recombinant proteins and opens new avenues for future studies aimed at improving the production of this type of protein.

Keyword: Hemophilia B, recombinant factor IX, lentiviral vectors, human cell lines.

RESÚMEN

BOMFIM, A. S. **Clonaje y expresión de factor IX recombinante en células 293T y SK-Hep-1 y caracterización de células productoras.** 2013. 141f. Disertación (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

El factor IX (FIX) de la coagulación sanguínea es una proteína dependiente de vitamina K de gran valor farmacéutico en el tratamiento de la Hemofilia B, lo cual se basa en la administración del factor de coagulación derivado de plasma humano o de la proteína recombinante producida en células murinas. La terapia basada en estos abordajes presenta alto costo y está asociada a contaminaciones con virus y priones, además de la inducción de inhibidores de FIX. Esos efectos aumentan el riesgo de morbilidad y mortalidad relacionadas a las hemorragias. En este trabajo, clonamos el cDNA del FIX en un vector lentiviral y evaluamos la expresión de la proteína recombinante en dos líneas celulares humanas. La clonación del cDNA de FIXh en el vector de expresión lentiviral 1054 fue confirmada a través del análisis con enzimas de restricción específicas obteniendo las bandas esperadas de 1407 pb y 10054 pb visualizadas en gel de agarosa. Las líneas celulares 293T y SK-Hep-1 fueron transducidas con el vector lentiviral 1054-FIX generado en nuestro laboratorio y las células que presentaron mayor expresión de EGFP fueron seleccionadas y separadas por citometría de flujo. La cuantificación de la expresión de FIXrh fue realizada por ensayos de ELISA y cromogénico. La cuantificación de FIXrh total fue de 500 ng/10⁶ células para la línea 293T y 803 ng/10⁶ células para la línea SK-Hep-1. La actividad biológica específica de FIXrh en las células 293T y SK-Hep-1 fue 0,047 UI/10⁶ células y 0,186 UI/10⁶ células, respectivamente. Con la finalidad de evaluar el perfil de producción de FIXrh activo a lo largo del tiempo, fue realizado un acompañamiento de 180 días, en el cual fue observado que la línea SK-Hep-1 cesó la expresión de FIX, mientras que las células 293T mantuvieron la expresión durante el período. El FIXrh fue caracterizado por *western blot* confirmando la presencia de una banda inmunoreactiva esperada de 57 kDa. Las líneas 293T y SK-Hep-1 presentaron 7,67 y 17 copias del vector integrado/célula, respectivamente. Considerando la importancia del proceso de γ -carboxilación, fue realizado un análisis de la expresión génica de los genes involucrados en este proceso, tales como VKORC1, γ -carboxilasa y el inhibidor calumenina, en las líneas celulares. Los resultados demostraron razones elevadas entre los genes VKORC1 y calumenina y VKORC1 y γ -carboxilasa en las dos líneas. La cinética de crecimiento de las células fue realizada por un período de 7 días presentando diferencias significativas entre las células SK-Hep-1 transducidas y no transducidas, mientras que las células 293T no presentaron diferencias estadísticas en el crecimiento celular. La suplementación del medio de cultivo con iones Ca⁺² y Mg⁺² fue testada para evaluar su influencia en la expresión de FIXrh activo. Las células 293T presentaron mejor desempeño en las concentraciones de 0,5 mmol/L de Ca⁺² y 1,0 mmol/L de Mg⁺² y las células SK-Hep-1 en medio de cultivo no suplementado. Nuestros datos indican que la línea SK-Hep-1 es la mejor productora del FIXrh funcional y las comparaciones realizadas entre los dos tipos celulares son importantes en la caracterización del comportamiento de líneas genéticamente modificadas direccionadas para la expresión de proteínas recombinantes heterólogas y abre nuevos caminos para futuros estudios que visualizan el mejoramiento de la producción de ese tipo de proteína.

Palabras clave: Hemofilia B, factor IX recombinante, vectores lentivirales, líneas celulares humanas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localização do gene do FIX. O gene do FIX está situado no braço longo do cromossomo X na banda Xq27.1..... 8
- Figura 2. Representação esquemática do gene do FIX que apresenta 34 Kb com 7 íntrons e 8 éxons. O seu transcrito é composto por 2802 nucleotídeos e possui uma pequena região 5' não traduzida (29 bases), uma região entre o códon iniciador e o códon de término (1383 bases) e uma região 3' não traduzida (1390 bases)..... 9
- Figura 3. Fases de maturação do FIX. A proteína é sintetizada como uma forma precursora contendo um pré-peptídeo sinal e um pró-peptídeo. Esses dois segmentos peptídicos são removidos antes da proteína ser secretada para a circulação. Durante esse processo, o FIX sofre outras modificações pós-traducionais como glicosilação, sulfatação e fosforilação. A ativação do FIX ocorre no plasma após a liberação do peptídeo de ativação, resultando na formação de duas cadeias, a leve, contendo os domínios Gla e EGF 1 e 2, e a pesada formada pelo domínio serina-protease unidas por uma ponte dissulfeto. As cores dos éxons do gene do FIX correspondem às suas respectivas estruturas traduzidas. Abreviações: Pre - pré-peptídeo, Pro - pró-peptídeo, GLA - domínio do ácido γ -carboxiglutâmico, γ GLA - domínio γ -carboxilado, EGF 1 e 2 - semelhante ao fator de crescimento epidérmico 1 e 2..... 10
- Figura 4. Estrutura primária do FIX humano com sua sequência de aminoácidos e respectivos domínios. Os aminoácidos que apresentam modificação pós-traducional se encontram destacados. No pré-peptídeo, o aminoácido metionina (M) é destacado em rosa. No domínio Gla, os 12 resíduos de Glu estão sublinhados e em laranja. No domínio EGF-1 as S53 e S61 estão em verde, e o D64 em vermelho. A posição de clivagem do peptídeo de ativação é encontrada em azul R145 e R180. No peptídeo de ativação, a Y155 sulfatada é destacada em amarelo, em vermelho e em roxo os resíduos glicosilados N157, N167, T159, T169, T172. Em verde, a S158 fosforilada..... 11
- Figura 5. Esquema estrutural da proteína FIX. S - pré-peptídeo sinal, P - pró-peptídeo, Gla - domínio Gla, EGF1 e EGF2 - domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico, PA - peptídeo de ativação, Protease - domínio serina-protease. Sítios de modificações pós-traducionais: Gla - γ -carboxilação, Hya - β -hidroxilação, S - sulfatação, F - fosforilação, $\blacklozenge$ - N-glicosilação, $\bullet$ - O-glicosilação. Os pontos de clivagem estão representados por triângulos..... 12

Figura 6. Esquema do processo de γ -carboxilação de proteínas dependentes de vitamina K. **A)** A enzima γ -carboxilase utiliza a oxigenação da hidroquinona de vitamina K (KH_2) para carboxilar as proteínas dependentes de vitamina K no lúmen do retículo endoplasmático (RE). Essa modificação pós-traducional é responsável pela atividade biológica dessas proteínas. **B)** A vitamina K epóxido, produzida pela γ -carboxilase, é reduzida pela enzima vitamina K 2,3 epóxido redutase (VKOR) no intuito de regenerar KH_2 no ciclo da vitamina K, que é necessária para a contínua atividade da γ -carboxilase. Gla - ácido γ -carboxiglutâmico; Glu - ácido glutâmico..... 13

Figura 7. Reação de γ -carboxilação realizada pela enzima γ -carboxilase. A epoxidação da vitamina K inicia-se quando a γ -carboxilase desprotona a KH_2 permitindo a reação com o O_2 para a formação de uma base forte altamente reativa ($K^\cdot$). Esta base desprotona os resíduos Glu gerando um carbânion que reage com o CO_2 originando os resíduos Gla. A protonação da base de vitamina K resulta na formação de KO, e este produto é, subsequentemente, reciclado a KH_2 por uma redutase, a VKOR..... 14

Figura 8. Modelo celular da coagulação sanguínea. Após um dano na parede vascular, ocorre a exposição dos componentes subendoteliais à corrente sanguínea, que promovem a adesão e ativação das plaquetas e a formação de tampões plaquetários. O fator tecidual (FT) é exposto e se liga ao FVII, o qual é ativado a FVIIa. O complexo FT/FVIIa ativa subsequentemente traços de FX e protrombina. A pequena quantidade de trombina (FIIa) produzida, ativa o FXI que ativa o FIX na superfície das plaquetas. O FIXa ativa, então, FX adicional. Simultaneamente, os traços de trombina gerados ativarão os fatores VIII (cofator do FIX) e V (cofator do FX), os quais aumentam drasticamente a atividade catalítica dos fatores IX e X, respectivamente. Finalmente, a ativação de trombina leva a conversão de fibrinogênio em fibrina. Em paralelo, a liberação de polifosfato (poli P) pelas plaquetas ativadas pode estimular a ativação adicional de FXII, FV e FXI e inibir a lise do coágulo formado..... 16

Figura 9. Esquema do genoma do HIV-1. Flanqueado pelas regiões LTR, que controlam a expressão dos genes virais, estão os três genes que codificam proteínas estruturais e enzimas (*gag*, *pol* e *env*), além de genes que codificam proteínas regulatórias (*tat* e *rev*) e proteínas acessórias (*vif*, *vpu*, *vpr* e *nef*). Abreviações: CA - capsídeo, IN - integrase, MA - matriz, NC - nucleocapsídeo, PR - protease, RT - transcriptase reversa, SU - superfície, TM - transmembrana, LTR - repetições terminais longas, RRE - elemento de resposta rer..... 19

Figura 10. Sistema de terceira geração do vetor derivado de HIV-1 independente de *tat*. Os vetores *SIN* possuem um promotor interno para promover a expressão do transgene, bem como elementos como o IRES que permite a expressão de duas proteínas independentes, e o WPRE que aumenta a estabilidade do RNA. O cassete do capsídeo contém apenas os genes *gag*, *pol*, *tat* e *rev*. O cassete do envelope é derivado do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) no lugar do envelope do HIV-1..... 21

Figura 11. Esquema dos vetores utilizados na produção viral através de co-transfecção tripla. A) Vetor de 3 ^a geração derivado do HIV-1, bicistrônico, que codifica para EGFP (p1054-CIGWS); B) Vetor que codifica para o capsídeo viral (pCMVΔR8.91); C) Vetor para o envelope viral (pMD2.VSVG), que codifica para a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular.....	31
Figura 12. Visualização em gel de agarose 1% da banda referente ao cDNA do FIXh, após a amplificação por PCR. Marcador de peso molecular 1Kb (10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000, 500 pb).....	50
Figura 13. Visualização em gel de agarose 1% das bandas das reações de digestão com <i>Sall</i> e <i>SmaI</i> dos vetores PCR2.1 com os insertos do cDNA do FIXh. As raias de 1 a 5 representam diferentes colônias de bactérias das quais foram extraídos os vetores PCR2.1-FIX. As setas à direita indicam o vetor PCR2.1 (3.900 pb) e o FIXh (1407 pb). Marcador de peso molecular 1Kb (10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000, 500 pb).....	51
Figura 14. Visualização em gel de agarose 1% da banda referente ao vetor de expressão lentiviral 1054, após digestão com as enzimas <i>Sall</i> e <i>SmaI</i> e purificação. Marcador de peso molecular 1Kb (12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 506 pb).....	52
Figura 15. Visualização em gel de agarose 1% das bandas das reações de digestão com <i>Sall</i> e <i>SmaI</i> dos vetores 1054 com os insertos do cDNA do FIXh. As raias de 1 a 3 representam diferentes colônias de bactérias das quais foram extraídos os vetores 1054-FIX. As setas à direita indicam o vetor 1054 (10.054 pb) e o cDNA do FIXh (1407 pb). Marcador de peso molecular 1Kb (10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000, 500 pb).....	53
Figura 16. Expressão do gene repórter EGFP nas células 293T transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX medida através de citometria de fluxo.....	54
Figura 17. Fotografias mostrando a morfologia das células 293T e SK-Hep-1 transduzidas com o vetor de expressão lentiviral 1054-FIX e não transduzidas. Imagens de microscopia óptica. A) Células 293T transduzidas expressando EGFP (microscopia de fluorescência). B) Células 293T não transduzidas (microscopia de contraste de fase). C) Células SK-Hep-1 transduzidas expressando EGFP (microscopia de fluorescência). D) Células SK-Hep-1 não transduzidas (microscopia de contraste de fase).....	55
Figura 18. <i>Dot plots</i> de citometria de fluxo exemplificando o processo de seleção das células 293T e SK-Hep-1 infectadas com vetor lentiviral 1054-FIX. As células que apresentaram maior expressão de EGFP foram selecionadas e separadas.....	57

Figura 19. Caracterização da proteína FIXrh no sobrenadante das linhagens celulares 293T e SK-Hep-1. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie ColoidalG-250. Em cada canaleta foram aplicados 10 µg de proteínas. 1- 293T; 2- 293T-1054-FIX; 3- SK-Hep-1; 4-SK-Hep-1-1054-FIX. B) Identificação da proteína FIXrh por <i>western blot</i> . Observa-se uma banda imunoreativa de tamanho esperado de 57 kDa nas células produtoras de FIXrh e ausência da mesma nas células controle. Marcador de peso molecular (140, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20 kDa).....	60
Figura 20. Produção específica de FIX recombinante humano ativo nas células SK-Hep-1 e 293T transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX durante um período de 180 dias.....	62
Figura 21. Comparação da expressão de EGFP nas linhagens celulares humanas transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX ao longo de 180 dias. Valores obtidos por ensaios de citometria de fluxo.....	63
Figura 22. Expressão relativa dos genes Calumenina, γ -Carboxilase e VKORC1 nas linhagens celulares humanas, utilizando como genes endógenos GAPDH e β -actina.....	64
Figura 23. Curvas de crescimento e viabilidade celular das linhagens 293T e SK-Hep-1 ao longo de 7 dias de cultivo. As células foram cultivadas em placas de cultura de 100 mm em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, a 37°C com uma concentração celular inicial de 1×10^5 cél/mL. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 amostras diferentes de cada célula, bem como seus respectivos desvios padrão (barras verticais).....	66
Figura 24. Número de células 293T-1054-FIX viáveis em meios de cultura DMEM suplementados com diferentes concentrações de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 5 dias de cultivo celular.....	70
Figura 25. Número de células SK-Hep-1-1054-FIX viáveis em meios de cultura DMEM suplementados com diferentes concentrações de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 5 dias de cultivo celular.....	71
Figura 26. Avaliação da influência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na produção volumétrica de FIX recombinante ativo em células 293T-1054-FIX.....	72
Figura 27. Avaliação da influência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na produção específica de FIXrh ativo em células 293T após 72 horas de cultivo utilizando o Teste t.....	73
Figura 28. Avaliação da influência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na produção volumétrica de FIX recombinante ativo em células SK-Hep-1-1054-FIX.....	74
Figura 29. Avaliação da influência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na produção específica de FIXrh ativo em células SK-Hep-1 após 72 horas de cultivo utilizando o Teste t.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência de hemofilia B em países com maior número de casos relatados em 2011.....	2
Tabela 2 - Classificação fenotípica da hemofilia B e suas características clínicas.....	4
Tabela 3 - Principais países consumidores de concentrados de FIX.....	5
Tabela 4 - Transdução das linhagens celulares com o vetor lentiviral 1054-FIX. Determinação da eficiência de transdução por citometria de fluxo (células EGFP positivas) para cada linhagem celular.....	55
Tabela 5 - Quantificação total de FIX recombinante nas linhagens celulares 293T e SK-Hep-1.....	58
Tabela 6 - Análise da atividade biológica de FIX recombinante nas linhagens celulares 293T e SK-Hep-1.....	59
Tabela 7 - Comparação entre a eficiência de γ -carboxilação do FIX recombinante pelas linhagens celulares humanas através dos dados obtidos pelos ensaios ELISA e cromogênico.....	59
Tabela 8 - Razão entre a expressão dos genes calumenina, γ -carboxilase e VKORC1 nos dois tipos celulares analisados.....	65
Tabela 9 - Comparação dos valores de crescimento máximo ($X_{m\acute{a}x}$), de velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) e tempo de duplicação (t_d) das linhagens celulares 293T e SK-Hep-1.....	67
Tabela 10 - Quantificação do número de cópias do vetor lentiviral 1054-FIX inseridas no genoma das linhagens celulares 293T e SK-Hep-1.....	68
Tabela 11 - Caracterização das linhagens celulares transduzidas quanto à produção de FIXrh total e ativo por cópia viral inserida no genoma celular.....	69
Tabela 12 – Expressão de FIX recombinante em diferentes sistemas <i>in vitro</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Adenina

AIDS - *Acquired immunodeficiency syndrome* (síndrome da imunodeficiência adquirida)

ALA/A - Aminoácido alanina

aPTT - Tempo parcial de tromboplastina ativada

Arg/R - Aminoácido arginina

Asp/D - Aminoácido ácido aspártico

BHK - *Baby Hamster Kidney cells*

C - Citosina

CA - Capsídeo

Ca²⁺ - Íon Cálcio

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

cDNA - DNA complementar

CHO - *Chinese Hamster Ovary cells*

CMV - Promotor do citomegalovírus humano

CO₂ - Dióxido de carbono

cPPT/CTS - *Central polypurine do HIV-1/ central termination sequence*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

Dp - Derivado de plasma

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EGF-1 - Domínio do fator de crescimento epidérmico 1

EGF-2 - Domínio do fator de crescimento epidérmico 2

EGFP - *Enhanced green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente melhorada)

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FII - Fator II

FIIa - Fator II ativo

FITC - *Fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

FIV - *Feline immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência felina)

FIX - Fator IX

FIXa - Fator IX ativo

fs - Fita simples

FT - Fator tecidual

FV - Fator V

FVa - Fator V ativo

FVII - Fator VII

FVIIa - Fator VII ativo

FVIII - Fator VIII

FVIIIa - Fator VIII ativo

FX - Fator X

FXa - Fator X ativo

FXII - Fator XII

FXIII - Fator XIII

G - Guanina

Gla - Domínio do ácido γ -carboxiglutâmico

Gln/Q - Aminoácido glutamina

Glu/E - Aminoácido ácido glutâmico

HBV - *Hepatitis B virus* (vírus da hepatite B)

HCV - *Hepatitis C virus* (vírus da hepatite C)

HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico)

His - Aminoácido histidina

HIV - *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

IgG - imunoglobulina G

IN - Integrase

IRES - *Internal ribosome entry site* (Sítio interno de ligação ao ribossomo)

KH₂ - Hidroquinona de vitamina K

KO - Vitamina K epóxido

LB - Luria Bertani

LTR - *Long terminal repeat* (plural ou singular) (repetição terminal longa)

Lys - Aminoácido lisina

MA - Matriz

Mg²⁺ - Íon magnésio

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MLV - *Murine leukemia virus* (virus da leucemia murina)

MOI - *Multiplicity of infection* (multiplicidade de infecção)

NaCl - Cloreto de Sódio

NC - Nucleocapsídeo

Neu5Gc - ácido N-glicolilneuramínico

O₂ - Oxigênio

pA - Poliadenilação

PACE - *Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme*

PBS - *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)

PCR - *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pNA - Ácido nucléico peptídico

Poli P - Poli fosfato

PR - Protease

qPCR - PCR quantitativo

R - Recombinante

RNA_m - RNA mensageiro

RRE - *Rev-responsive element do HIV-1* (elemento de resposta a rev do HIV-1)

RT - *Reverse transcriptase* (Transcriptase reversa)

SBF - soro bovino fetal

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando SDS como agente desnaturante

Ser/S - Aminoácido serina

sf - RNA fita simples

SIN - *Self inactivated vector* (vetor autoinativante)

SIV - *Simian immunodeficiency virus* (virus da imunodeficiência símia)

SU - Superfície

T - Timina

TAE - Tampão Tris-EDTA Acetato

TEMED - N,N,N',N'-Tetrametil etilenodimetilamina

TM - Transmembrana

TRIS - Tris (hidroxi-metil) amino metano

Tris-HCl - Tris hidróclorido

TU - Título viral

Val/V - Aminoácido valina

vif - *Viral infectivity factor* (fator de infectividade viral)

VKOR - vitamina K 2,3 epóxido redutase

vpr - *Viral protein R* (proteína viral R)

vpu - *Viral protein U* (proteína viral U)

VSV-G - *Vesicular stomatitis virus glycoprotein* (glicoproteína do vírus da estomatite vesicular)

WPRE - *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (element regulatório pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota)

LISTA SÍMBOLOS E UNIDADES

cm - centímetro

g - grama

kb - kilobase

kDa - kilodálton

L - Litro

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mmol - milimol

ng - nanograma

nm - nanômetro

pb - pares de base

pg - picograma

pmol - picomol

™ - Trademark

U - Unidades

UI - Unidade internacional

α - alfa

β - beta

μ g - micrograma

μ L - microlitro

μ m - micrômetro

® - Marca Registrada

Ψ – sinal de empacotamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	HEMOFILIA B	2
1.2	TERAPIA	4
1.3	BASES MOLECULARES DA HEMOFILIA B	7
1.3.1	GENE DO FATOR IX	7
1.3.2	PROTEÍNA DO FATOR IX	9
1.3.3	HEMOSTASIA	15
1.3.4	MUTAÇÕES NO GENE DO FATOR IX E SUAS CONSEQUÊNCIAS NO NÍVEL DA PROTEÍNA.....	17
1.4	SISTEMA DE EXPRESSÃO LENTIVIRAL.....	18
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
4.1.1	CEPA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	28
4.1.2	VETORES.....	28
4.1.3	LINHAGENS CELULARES	31
4.2	METODOLOGIA.....	31
4.2.1	CLONAGEM DO FIX HUMANO NO VETOR DE EXPRESSÃO LENTIVIRAL 1054.....	31
4.2.1.1	Preparação do inserto de DNA relativo ao cDNA do FIX	32
4.2.1.2	Preparação do vetor de expressão	33
4.2.1.3	Separação de fragmentos de DNA por eletroforese	34
4.2.1.4	Purificação do fragmento amplificado	34
4.2.1.5	Ligação do cDNA isolado no vetor pCR2.1-TOPO® - Subclonagem.....	34
4.2.1.6	Preparo de bactérias competentes para choque térmico	35
4.2.1.7	Transformação bacteriana	35
4.2.1.8	Extração de DNA plasmidial.....	36
4.2.1.9	Análise da extração de DNA plasmidial	36
4.2.1.10	Ligação do cDNA isolado no vetor de expressão lentiviral 1054	37
4.2.1.11	Maxipreparação de plasmídeos	37
4.2.2	CONDIÇÕES GERAIS PARA CULTURA DE CÉLULAS.....	38
4.2.2.1	Cultivo de células 293T e SK-Hep-1	38
4.2.3	PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS LENTIVIRAIS E DETERMINAÇÃO DO TÍTULO VIRAL.....	39
4.2.4	TRANSDUÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES.....	40

4.2.5	ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO E SELEÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA EGFP	40
4.2.6	CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FIX RECOMBINANTE NAS LINHAGENS CELULARES	41
4.2.6.1	Análise da atividade biológica de FIX recombinante	41
4.2.6.2	Análise da quantidade total de FIX recombinante	41
4.2.6.3	Deteção de FIX por <i>western blot</i>	42
4.2.7	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES PRODUTORAS DE FIX RECOMBINANTE	44
4.2.7.1	Análise do perfil de expressão de RNAm dos genes relacionados à γ -carboxilação	44
4.2.7.2	Avaliação do crescimento celular	45
4.2.7.3	Determinação do número de cópias virais inseridas	46
4.2.7.4	Avaliação do efeito de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na expressão de FIX recombinante.....	48
5	<u>RESULTADOS.....</u>	50
5.1	CLONAGEM E EXPRESSÃO DE FIX RECOMBINANTE HUMANO NAS LINHAGENS CELULARES. 50	
5.1.1	CLONAGEM DO CDNA DO FIXRH NO VETOR DE EXPRESSÃO 1054.....	50
5.1.2	PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS LENTIVIRAIS E DETERMINAÇÃO DO TÍTULO VIRAL	53
5.1.3	TRANSDUÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES.....	54
5.1.4	SELEÇÃO DAS CÉLULAS TRANSDUZIDAS	56
5.1.5	CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FIXRH NAS LINHAGENS CELULARES	57
5.1.5.1	Determinação da quantificação total de FIXrh.....	57
5.1.5.2	Análise da atividade biológica de FIXrh.....	58
5.1.5.3	Caracterização da proteína FIXrh por <i>western blot</i>	60
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PRODUTORAS DE FIXRH.....	61
5.2.1	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FIXRH ATIVO	61
5.2.2	PERFIL DE EXPRESSÃO DE RNAm DOS GENES RELACIONADOS À Γ -CARBOXILAÇÃO.....	63
5.2.3	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR.....	65
5.2.4	NÚMERO DE CÓPIAS VIRAIS INSERIDAS	68
5.2.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ÍONS Ca^{+2} E Mg^{+2} NA PRODUÇÃO DE FIXRH.....	69
6	<u>DISCUSSÃO.....</u>	77
7	<u>CONCLUSÃO</u>	90
8	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	92
9	<u>APÊNDICES</u>	110

Introdução

1 Introdução

1.1 Hemofilia B

A hemofilia B, também conhecida como doença de Christmas, é uma doença hemorrágica de herança recessiva ligada ao cromossomo X, caracterizada pela deficiência quantitativa ou qualitativa do fator de coagulação IX (FIX) (BRUNETTI-PIERRI *et al.*, 2009), o que leva os pacientes a uma incapacidade de produzir adequadamente um coágulo estável após um dano no tecido (DUNN, 2010).

A prevalência da doença é de 1 em cada 25.000 a 30.000 homens no mundo (CASAÑA, 2009). No Brasil, cerca de 16% dos hemofílicos apresentam a coagulopatia hereditária do tipo B (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2011). A Tabela 1 apresenta a incidência de hemifilia B nos 10 países com maior número de casos relatados no ano de 2011.

Tabela 1 - Incidência de hemofilia B em países com maior número de casos relatados em 2011.

<i>Países</i>	<i>Hemofilia A</i>	<i>Hemofilia B</i>
Estados Unidos	13.276	4.209
Brasil	8.839	1.719
Índia	11.586	1.687
China	8.921	1.261
Reino Unido	5.424	1.151
França	4.704	1.031
Japão	4.475	971
Egito	3.861	967
Irã	4.386	932
Turquia	3.926	725

(WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2011)

Essa enfermidade manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de sangramentos, que ocorrem após traumatismos de intensidade mínima, hemartroses e sangramentos musculares que acontecem, muitas vezes, sem associação com traumas evidentes. A frequência e a gravidade do quadro hemorrágico estão, geralmente, relacionadas com as concentrações plasmáticas do fator deficiente. De modo geral, a hemofilia B é classificada em leve, moderada e grave, correspondendo a níveis plasmáticos do fator IX entre 5% e 30%, 1% e 5% e inferiores a 1%, respectivamente (Tabela 2) (RODGERS; GREENBERG, 1999). A proporção de pacientes distribuídos entre os graus de gravidade da doença ainda não é bem estabelecida, entretanto, dados da comunidade científica sugerem que aproximadamente 60-70% dos pacientes desenvolvem as formas moderada ou grave (KATZ, 1996; NERICH *et al.*, 2008; AZNAR *et al.*, 2009). No Brasil, dados obtidos do sistema Hemovida Web Coagulopatias em 2010 e apresentados pela Coordenação de Política Nacional de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde mostram que 33,06% dos diagnósticos referem-se à forma moderada, seguida de 28,22% relativos à forma grave e 23,93% relacionados à forma leve. Há cerca de 14,79% dos pacientes cujos dados não trazem informações sobre a gravidade de seus sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Os pacientes com altas deficiências apresentam manifestações hemorrágicas de repetição (2 a 4 por mês) e hemartroses graves, as quais, quando não tratadas adequadamente, evoluem para artropatias crônicas e incapacitantes (RODGERS; GREENBERG, 1999). Estes pacientes estão sujeitos a hemorragias agudas, que podem comprometer órgãos vitais. As manifestações hemorrágicas são intermitentes e alguns pacientes podem não apresentar sangramentos por semanas ou meses (ROBERTS; HOFFMAN, 1995). Na hemofilia moderada, os hematomas e hemartroses nem sempre estão associados a traumatismos evidentes. Embora essas manifestações não sejam tão intensas quanto na hemofilia grave, se não tratadas adequadamente podem evoluir com instabilidade articular, resultando em sangramentos importantes e frequentes, fazendo com que a doença se expresse de maneira mais intensa do que poderia indicar o nível plasmático do fator deficiente.

Nas formas leves de hemofilia, os sangramentos somente ocorrem após traumas ou cirurgias, porém pode haver hemartroses espontâneas, especialmente em articulações onde previamente ocorreram hemorragia pós-traumática não tratada corretamente (BRETTLER; LEVINE, 1994). Muitas vezes, essa forma de hemofilia é diagnosticada somente na idade adulta (RIZZA, 1994).

Tabela 2 - Classificação fenotípica da hemofilia B e suas características clínicas.

<i>Classificação</i>	<i>Nível de FIX (IX:C)</i>	<i>Fenótipo Clínico</i>
Grave	<0,01 UI/mL (<1% da atividade normal)	Hemorragias espontâneas músculo-esquelética e de tecidos moles
Moderada	0,01 – 0,05 UI/mL (1 – 5% da atividade normal)	Hemorragias nas articulações e em músculos após pequenas lesões ou intervenção cirúrgica
Leve	0,05 – 0,40 UI/mL (5 – 40% da atividade normal)	Hemorragias somente em pós- operatórios e traumas

(WHITE *et al.*, 2001)

1.2 Terapia

Estima-se que haja cerca de 6,9 milhões de pessoas com doenças hemorrágicas no mundo. Destas, 75% permanecem não diagnosticadas e recebem tratamento inadequado ou não recebem nenhum tipo de assistência (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2013).

O intuito do tratamento das hemofilias é a prevenção ou controle de episódios hemorrágicos através da reposição dos fatores de coagulação ausentes. A terapia de reposição para o tratamento da hemofilia B disponível baseia-se na infusão intravenosa do concentrado do fator deficiente, que pode ser de origem plasmática como o FIX derivado de plasma de pureza intermediária (*Konyne-80 & Bebulin*[®]); de alta pureza (*AlphaNine*[®] SD); de ultra pureza (*Mononine*[®]; *Nonafact*[®]) ou recombinante (*Benefix*[®]) (GATER *et al.*, 2011).

O Brasil não apresenta tecnologia para a produção de concentrados de FIX. O plasma brasileiro é fracionado por companhias europeias e retorna ao país na forma de concentrado de fator liofilizado, tendo assim um elevado custo. O FIX recombinante também precisa ser importado, o que acarreta em um alto valor de mercado. Em 2011, o Brasil utilizou mais de 55 milhões de unidades internacionais (UI) de concentrado de FIX, dos quais 100% eram derivados de plasma humano (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2011). A Tabela

3 apresenta um *ranking* mundial com os 10 principais consumidores de concentrados de FIX e a discriminação entre as frações derivada de plasma e recombinante.

Tabela 3 - Principais países consumidores de concentrados de FIX.

<i>Países</i>	<i>Total UI</i>	<i>FIXdp</i>	<i>FIXr</i>	<i>% total de FIXdp</i>	<i>% total de FIXr</i>
Alemanha	81.726.000	-	-	-	-
Reino Unido	78.779.490	9.150.670	69.628.820	12	88
Rússia	70.000.000	70.000.000	0	100	0
França	67.956.750	31.768.000	36.188.750	47	53
Brasil	55.316.950	55.316.950	0	100	0
Canadá	42.975.510	7.474.134	35.501.376	17	83
Rep. da Coréia	26.647.250	3.148.250	23.499.000	12	88
Austrália	26.189.500	3.277.500	22.912.000	13	87
Turquia	21.427.200	21.427.200	0	100	0
Polônia	19.794.000	19.637.000	157.000	99	1

Abreviações: dp – derivado de plasma; r – recombinante
(WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2011)

Os produtos derivados do plasma humano apresentavam o risco de transmissão de agentes infecciosos como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e os vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV). A utilização destes produtos contaminados, por exemplo, foi responsável pela transmissão generalizada do HIV em pacientes hemofílicos no início dos anos 1980 e pelo aumento subsequente da taxa de mortalidade ocasionada pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (DARBY *et al.*, 1995; DARBY *et al.*, 2007). Avanços nas tecnologias de triagem, de purificação e de inativação de patógenos do plasma melhoraram a segurança dos produtos modernos. Entretanto, há ainda o risco de transmissão de *prions* que causam a nova variante da doença de Creutzfeldt Jacob e de agentes infecciosos emergentes que podem ultrapassar a barreira interespecífica ou serem resistentes aos processos de inativação viral como o vírus aviário da influenza A (H5N1) (UNGCHUSAK *et al.*, 2005; LUDLAM *et al.*, 2006) ou vírus não envelopados como o parvovírus B19 (PIPE, 2006;

SCHNEIDER *et al.*, 2008). Outra limitação na segurança dos concentrados derivados de plasma reside na presença de quantidades detectáveis de FIX ativo e níveis residuais de outros fatores pró-coagulantes, os quais resultam em um risco significativo de provocar episódios trombóticos (ORLOVA *et al.*, 2012).

O principal efeito colateral da infusão de concentrados de FIX é o desenvolvimento de inibidores, que são anticorpos policlonais da classe IgG direcionados contra o FIX (aloanticorpos). Neste caso, os pacientes passam a não responder a infusão do fator deficiente e apresentam episódios hemorrágicos de difícil controle (FRANCHINI; MANNUCCI, 2011).

A prevalência de inibidores na hemofilia B é de cerca de 6%, acometendo mais frequentemente os pacientes com hemofilia grave e após as primeiras infusões do fator deficiente, em geral dentro dos primeiros 150 dias de exposição ao concentrado de FIX (BERNTORP; SHAPIRO, 2012).

O risco de se adquirir inibidores é, até certo ponto, determinado por fatores genéticos, particularmente grandes deleções do gene do FIX. Estas deleções estão relacionadas à ocorrência de reações anafiláticas após a infusão do FIX (JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2011). Outros determinantes genéticos, tais como histórico familiar de inibidores, raça, bem como vários fatores não genéticos, como técnicas de manufatura de concentrados do fator, tipo de produto utilizado, unicidade *versus* multiplicidade de diferentes produtos infundidos, idade do paciente à primeira infusão de concentrado, uso intensivo durante cirurgia, dentre outros, também podem ser responsáveis pelo desenvolvimento destes aloanticorpos (JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2011).

Atualmente, há apenas um produto de FIX recombinante licenciado pelo *US Food and Drug Administration* para o uso clínico no tratamento da hemofilia B, o BeneFIX[®] produzido pela *Pfizer*, aprovado em 1997. A proteína recombinante é produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO), cultivadas em meio livre de componentes de origem animal. A purificação do FIX é feita em 4 etapas e a inativação viral é realizada por nanofiltração (HARRISON *et al.*, 1998).

Alguns estudos sugerem que a utilização de produtos recombinantes produzidos em células murinas podem estar associados a um aumento no risco de desenvolvimento de inibidores (WIGHT; PAISLEY, 2003; JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2011). Isso pode acontecer devido a duas diferenças críticas encontradas entre os humanos e a maioria dos mamíferos: os humanos perderam a habilidade de biosintetizar os epítomos Gal•1-3Galβ1-(3)4GlcNac (α-Gal) e um importante ácido siálico, o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc),

estruturas que estão presentes em uma grande variedade de células de mamíferos. Estes epítomos glicanos não-humanos podem afetar potencialmente a imunogenicidade e/ou a eficácia de glicoproteínas terapêuticas (PADLER-KARAVANI; VARKI, 2011). Ainda, diferenças adicionais nas modificações pós-traducionais da molécula de FIX recombinante de murino como redução na sulfatação da tirosina 155 e ausência de fosforilação na serina 158 (GRIFFITH *et al.*, 2007; POON *et al.*, 2002), fazem com que sua recuperação *in vivo* seja, aproximadamente, 30% menor se comparada com o concentrado derivado de plasma (SHAPIRO *et al.*, 2005; FRANCHINI *et al.*, 2013).

Em suma, os obstáculos oferecidos pelas duas opções de tratamento para a hemofilia B, tem incentivado a comunidade científica ao desenvolvimento de novas formulações de FIX recombinante mais eficientes ou menos imunogênicas, tornando-o mais acessível à população de hemofílicos B (LAMBERT *et al.*, 2007).

1.3 Bases moleculares da hemofilia B

Para um melhor entendimento da hemofilia B, será descrito seu *locus* gênico, tradução da proteína, assim como mutações dentro do *locus* e suas consequências no nível proteico.

1.3.1 Gene do fator IX

Em 1982, iniciaram-se os estudos de caracterização molecular do gene e do DNA complementar (cDNA) do FIX (KURACHI; DAVIE, 1982; CHOO *et al.*, 1982). Nestes estudos, a caracterização parcial do gene foi estabelecida. Posteriormente, os mesmos grupos de pesquisa mostraram a caracterização completa do gene e do cDNA do FIX (YOSHITAKE *et al.*, 1985; ANSON *et al.*, 1984), passos esses críticos em futuros estudos que visavam a clonagem e expressão do FIX em células de mamíferos. Neste mesmo período, Camerino e colaboradores (1984) demonstraram a localização do gene do FIX no braço longo do cromossomo X na banda Xq27.1 (Figura 1).

Figura 1 - Localização do gene do FIX. O gene do FIX está situado no braço longo do cromossomo X na banda Xq27.1 (modificado de SPATZ *et al.*, 2004).

O gene do FIX contém 34 kilobases (Kb), incluindo 7 íntrons e 8 éxons. O maior éxon possui 1935 pares de bases (pb) (YOSHITAKE *et al.*, 1985). O seu transcrito é composto por 2802 nucleotídeos e possui uma pequena região 5' não traduzida (29 bases), uma região entre o códon iniciador e o códon de término (1383 bases) e uma região 3' não traduzida (1390 bases) (ANSON *et al.*, 1984) (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática do gene do FIX que apresenta 34 Kb com 7 íntrons e 8 éxons. O seu transcrito é composto por 2802 nucleotídeos e possui uma pequena região 5' não traduzida (29 bases), uma região entre o códon iniciador e o códon de término (1383 bases) e uma região 3' não traduzida (1390 bases) (modificado de JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2011).

1.3.2 Proteína do fator IX

O fator IX é uma glicoproteína plasmática cuja síntese é dependente de vitamina K e pertence à família das proteases que incluem a protrombina, os fatores VII (FVII) e X (FX) e a proteína C (DAVIE *et al.*, 1991). Sua síntese ocorre nos hepatócitos como uma proteína precursora de 461 aminoácidos e 57 kDa contendo um pré-peptídeo sinal de 28 resíduos e um pró-peptídeo de 18 resíduos.

O pré-peptídeo sinal é responsável por encaminhar a proteína para o retículo endoplasmático, sendo clivado pela enzima peptidase sinal. O pró-peptídeo é reconhecido pela enzima γ -carboxilase dependente de vitamina K, responsável pela γ -carboxilação de resíduos de ácido glutâmico, uma modificação pós-traducional. Esses dois segmentos peptídicos são removidos antes da proteína ser secretada para a circulação (BOWEN, 2002).

A proteína madura, também conhecida como zimogênio de serina-protease apresenta 415 aminoácidos (HIGH; ROBERTS, 1995), peso molecular de 55 kDa, e sua ativação proteolítica ocorre via complexo FVIIa/fator tecidual ou fator XI ativo (FXIa) de acordo com o modelo celular da coagulação sanguínea, resultando na formação da sua forma ativada denominada FIXa (SCHMIDT; BAJAJ, 2003) (Figura 3).

Figura 3 - Fases de maturação do FIX. A proteína é sintetizada como uma forma precursora contendo um pré-peptídeo sinal e um pró-peptídeo. Esses dois segmentos peptídicos são removidos antes da proteína ser secretada para a circulação. Durante esse processo, o FIX sofre outras modificações pós-traducionais como glicosilação, sulfatação e fosforilação. A ativação do FIX ocorre no plasma após a liberação do peptídeo de ativação, resultando na formação de duas cadeias, a leve, contendo os domínios Gla e EGF 1 e 2, e a pesada formada pelo domínio serina-protease unidas por uma ponte dissulfeto. As cores dos éxons do gene do FIX correspondem às suas respectivas estruturas traduzidas. Abreviações: Pre - pré-peptídeo, Pro - pró-peptídeo, GLA - domínio do ácido γ -carboxiglutâmico, γ GLA - domínio γ -carboxilado, EGF 1 e 2 - semelhante ao fator de crescimento epidérmico 1 e 2 (modificado de CHAVALI *et al.*, 2011).

A ativação do FIX ocorre no plasma após a clivagem em duas regiões (Arg¹⁴⁵-Arg¹⁴⁶ e Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹) liberando o peptídeo de ativação e resultando na formação de duas cadeias, a leve (resíduos 1-145) e a pesada (resíduos 181-415) unidas por uma ponte dissulfeto (SCHMIDT; BAJAJ, 2003).

Como todos os fatores de coagulação dependentes de vitamina K, o FIX apresenta quatro domínios. Na cadeia leve estão os domínios Gla (ácido γ -carboxiglutâmico) e EGF-like (semelhante ao fator de crescimento epidérmico) 1 e 2. Na cadeia pesada, localiza-se o domínio serina-protease (SCHMIDT; BAJAJ, 2003) (Figuras 4 e 5).

PRÉ-PEPTÍDEO

-46 MQRVNMIMAE SPSLITICLL GYLLSAE

PRÓ-PEPTÍDEO

-19 CTVFLDHENA NKILNRPKR

DOMÍNIO GLA

1 YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEPRE VFENTEKTTE

REGIÃO HIDROFÓBICA

41 FWKQYV

DOMÍNIO EGF-1

47 DGDQ CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCPCFGFEGK NCE

LINKER

84 LDVT

DOMÍNIO EGF-2

88 CNI KNGRCEQFCK NSADNKVVCS CTEGYRLAEN QKSCEPAVPF

131 PCGRVSVSQT SKLTR

PEPTÍDEO DE ATIVAÇÃO

146 AEAVFPDVDY VNSTEAEITL DNTIQGTQSF NDFTR

DOMÍNIO CATALÍTICO

181 VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG KVDAFCGCSI VNEKWIVTAA HCVETGVKIT

231 VVAGEHNIEE TEHTEQKRVN IRAIIPHHYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV

281 LNSYVTPICI ADKEYTNIFL KFGSGYVSGW ARVFHKGRSA LVLQYLRVPL

331 VDRATCLRST KFTIYNMFC AGFHEGGRDS CQGDSSGPHV TEVEGTSFLT

381 GHSWGEECA MKGKYGIYTK VSRVYNWIKI KTKLT

Figura 4 - Estrutura primária do FIX humano com sua sequência de aminoácidos e respectivos domínios. Os aminoácidos que apresentam modificação pós-traducional se encontram destacados. No pré-peptídeo, o aminoácido metionina (M) é destacado em rosa. No domínio Gla, os 12 resíduos de Glu estão sublinhados e em laranja. No domínio EGF-1 as S53 e S61 estão em verde, e o D64 em vermelho. A posição de clivagem do peptídeo de ativação é encontrada em azul R145 e R180. No peptídeo de ativação, a Y155 sulfatada é destacada em amarelo, em vermelho e em roxo os resíduos glicosilados N157, N167, T159, T169, T172. Em verde, a S158 fosforilada.

O domínio Gla compreende da tirosina 1 ao ácido glutâmico 40. Neste domínio ocorre a γ -carboxilação de 12 resíduos de ácido glutâmico (Glu) em ácido γ -carboxiglutâmico, pela enzima γ -carboxilase, necessários para a ligação do fator IX aos fosfolípidos e às células endoteliais. Esse domínio é codificado pelos éxons 2 e 3 e compreende a região N-terminal e esta organização reflete a função principal do domínio Gla, ou seja, ancorar e concentrar o

fator de coagulação em uma membrana primariamente ativada via pontes de Ca^{+2} (ZOGG; BRANDSTETTER, 2009).

Os domínios EGF-like 1 e 2 são formados pelo ácido aspártico 47 até a arginina 145. O domínio EGF-like 1 apresenta dois tipos de modificações pós-traducionais: a β -hidroxilação do ácido aspártico 64 e a glicosilação dos aminoácidos serina (Ser^{53} e Ser^{61}). As regiões N-terminal dos domínios EGF-like se ligam ao Ca^{+2} , que medeia uma interface para interações de ligação (HANDFORD *et al.*, 1990), e possivelmente, também ao Mg^{+2} (SHIKAMOTO *et al.*, 2003). Estes domínios estão relacionados com a propriedade de ligação do FIX aos fatores VIII e X e à incorporação do fator IX ativado ao complexo tenase (complexo FIXa/FVIIIa). Esses domínios são codificados pelos éxons 4 e 5. (HIGH; ROBERTS, 1995).

O peptídeo de ativação do FIX é codificado pelo éxon 6 e compreende da alanina 146 a arginina 180, sendo rico em glutamato e aspartato. São encontradas três modificações pós-traducionais principais: sulfatação na tirosina 155, N-glicosilação nos resíduos de asparagina 157 e 167 e O-glicosilação nos resíduos de treonina 159, 167 e 172 e fosforilação na serina 158 (MAKINO *et al.*, 2000). Essas modificações conferem alta solubilidade ao zimogênio e suprimem sua clivagem e ativação prematuras. A atividade enzimática do FIX só ocorre após a ativação proteolítica envolvendo a liberação do peptídeo de ativação do domínio catalítico (ZOGG; BRANDSTETTER, 2009).

No domínio catalítico se localiza o sítio ativo serina-protease do FIX. Compreende do resíduo de valina 181 ao resíduo de treonina 415. Possui a tríade catalítica conservada das enzimas serina-proteases (His^{221} , Ser^{365} e Asp^{264}). É codificado pelos éxons 7 e 8. (VYSOTCHIN *et al.*, 1993).

Figura 5 - Esquema estrutural da proteína FIX. S - pré-peptídeo sinal, P - pró-peptídeo, Gla - domínio Gla, EGF1 e EGF2 - domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico, PA - peptídeo de ativação, Protease - domínio serina-protease. Sítios de modificações pós-traducionais: Gla - γ -carboxilação, Hya - β -hidroxilação, S - sulfatação, F - fosforilação, ♦ - N-glicosilação, ● - O-glicosilação. Os pontos de clivagem estão representados por triângulos (modificado de ORLOVA *et al.*, 2012).

O FIX sofre complexas modificações pós-traducionais durante sua passagem pelo retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi, como a β -hidroxilação, a glicosilação, a sulfatação e a fosforilação citadas anteriormente. Entretanto, a γ -carboxilação é a modificação crucial na formação do FIX funcional, e que leva à conversão de 12 resíduos de ácido glutâmico em resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico por uma enzima dependente de vitamina K, a γ -carboxilase, no domínio Gla do FIX (RISHAVY; BERKNER, 2012).

A γ -carboxilase é uma enzima integral de membrana que reside no retículo endoplasmático e carboxila as proteínas dependentes de vitamina K durante sua secreção da célula ou para a superfície celular. O processo é complexo e a carboxilação total dos múltiplos resíduos Glu é necessária para sua atividade (RISHAVY; BERKNER, 2012).

As proteínas γ -carboxiladas são sintetizadas em uma forma precursora intracelular e são marcadas por uma sequência sinal N-terminal, o pró-peptídeo, de aproximadamente 18 aminoácidos. Essa sequência é reconhecida pela γ -carboxilase no retículo endoplasmático. O pró-peptídeo N-terminal ligado à enzima γ -carboxilase permite que o domínio Gla sofra as múltiplas γ -carboxilações nos resíduos Glu, utilizando energia da oxigenação da vitamina K (hidroquinona de vitamina K - KH_2) (BLOSTEIN *et al.*, 2008) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema do processo de γ -carboxilação de proteínas dependentes de vitamina K. **A)** A enzima γ -carboxilase utiliza a oxigenação da hidroquinona de vitamina K (KH_2) para carboxilar as proteínas dependentes de vitamina K no lúmen do retículo endoplasmático (RE). Essa modificação pós-traducional é responsável pela atividade biológica dessas proteínas. **B)** A vitamina K epóxido, produzida pela γ -carboxilase, é reduzida pela enzima vitamina K 2,3 epóxido redutase (VKOR) no intuito de regenerar KH_2 no ciclo da vitamina K, que é necessária para a contínua atividade da γ -carboxilase. Gla - ácido γ -carboxiglutâmico; Glu - ácido glutâmico (modificado de RISHAVY; BERKNER, 2012).

A epoxidação da vitamina K inicia-se quando a Lys²¹⁸ no sítio ativo da γ -carboxilase desprotona a KH_2 permitindo a reação com o oxigênio (O_2) para a formação de uma base forte altamente reativa (K^-). Esta base, que se apresenta na forma alcóxida ou dialcóxida, desprotona os resíduos Glu gerando um carbânion que reage com o dióxido de carbono (CO_2) originando os resíduos Gla (Figura 7). A protonação da base de vitamina K resulta na formação de vitamina K epóxido (KO) e este produto é, subsequentemente, reciclado a KH_2 por uma redutase, a vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKOR) (TIE; STAFFORD, 2008).

Figura 7 - Reação de γ -carboxilação realizada pela enzima γ -carboxilase. A epoxidação da vitamina K inicia-se quando a γ -carboxilase desprotona a KH_2 permitindo a reação com o O_2 para a formação de uma base forte altamente reativa (K^-). Esta base desprotona os resíduos Glu gerando um carbânion que reage com o CO_2 originando os resíduos Gla. A protonação da base de vitamina K resulta na formação de KO, e este produto é, subsequentemente, reciclado a KH_2 por uma redutase, a VKOR (modificado de BERKNER, 2008).

A conversão enzimática dos resíduos de Glu em Gla ocorre de maneira em que a enzima permanece ligada ao substrato durante o processo. Deste modo, uma ligação entre o pró-peptídeo e a enzima resulta em muitos Glu sendo convertidos a Gla em uma única proteína.

A sequência sinal é clivada, no complexo de Golgi, por uma enzima conhecida como PACE/furina (*Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme*). Este evento é necessário para a produção de uma proteína totalmente funcional (FURIE; FURIE, 1990; BRISTOL *et al.*, 1996).

A γ -carboxilação confere a habilidade de ligação do FIX à bicamada fosfolipídica das plaquetas na qual exerce sua atividade biológica na coagulação sanguínea mediante a presença de íons Ca^{+2} (HALLGREN *et al.*, 2002).

1.3.3 Hemostasia

Durante a hemostasia primária, após um dano na parede vascular, ocorre a exposição dos componentes subendoteliais, tais como o colágeno, células musculares lisas e fibroblastos à corrente sanguínea, que promovem a adesão e ativação das plaquetas e a formação de tampões plaquetários (BAKER; BRASSARD, 2011).

A hemostasia secundária, segundo o modelo celular da coagulação sanguínea, é dividida em três fases: iniciação, amplificação e propagação. A fase de iniciação, começa imediatamente após a lesão e envolve a exposição de um iniciador chave da coagulação, o fator tecidual (FT), o qual é uma proteína integral de membrana das células do subendotélio, que se liga ao FVII como um cofator, promovendo sua proteólise e ativação (FVIIa) (MCMICHAEL, 2012). O complexo FT/FVIIa cliva proteoliticamente traços de FIX e FX em FIX ativo (FIXa) e FX ativo (FXa), respectivamente. Essa ativação permite ao FX se associar ao seu cofator, fator V (FV) ativado pelo FXII, formando o complexo protrombinase nas células apresentadoras de FT. Este complexo tem por função converter protrombina em trombina (FIIa) (VERSTEEG *et al.*, 2013).

Na fase de amplificação, a pequena quantidade de trombina acumulada ativa as plaquetas que irão se aderir ao sítio do dano vascular. Em paralelo, a trombina converte mais FV em FVa, amplificando a atividade protrombinase, e converte o FVIII em FVIIIa, que atua

como cofator do FIXa na superfície das plaquetas ativadas e na presença de íons cálcio, aumentando a geração de FXa. Em adição, a trombina converte o FXI em FXIa (VERSTEEG *et al.*, 2013) (Figura 8).

Figura 8 - Modelo celular da coagulação sanguínea. Após um dano na parede vascular, ocorre a exposição dos componentes subendoteliais à corrente sanguínea, que promovem a adesão e ativação das plaquetas e a formação de tampões plaquetários. O fator tecidual (FT) é exposto e se liga ao FVII, o qual é ativado a FVIIa. O complexo FT/FVIIa ativa subsequentemente traços de FX e protrombina. A pequena quantidade de trombina (FIIa) produzida, ativa o FXI que ativa o FIX na superfície das plaquetas. O FIXa ativa, então, FX adicional. Simultaneamente, os traços de trombina gerados ativarão os fatores VIII (cofator do FIX) e V (cofator do FX), os quais aumentam drasticamente a atividade catalítica dos fatores IX e X, respectivamente. Finalmente, a ativação de trombina leva a conversão de fibrinogênio em fibrina. Em paralelo, a liberação de polifosfato (poli P) pelas plaquetas ativadas pode estimular a ativação adicional de FXII, FV e FXI e inibir a lise do coágulo formado (modificado de VERSTEEG *et al.*, 2013).

A fase de propagação ocorre em superfícies contendo fosfolipídeos pró-coagulantes como nas plaquetas ativadas. O FXIa converte mais FIX em FIXa, que se associa ao FVIIIa. Esse complexo tenase formado (FIXa/FVIIIa) juntamente com os íons cálcio, catalisa a

conversão de FX em FXa, o qual forma o complexo FXa/FVa que resulta na formação de uma grande quantidade de trombina que converte fibrinogênio em fibrina. Como etapa final, a trombina ativa o fator XIII que estabiliza o coágulo formado (VERSTEEG *et al.*, 2013).

1.3.4 Mutações no gene do fator IX e suas consequências no nível da proteína

Há cerca de 1.101 tipos de mutações que podem ocorrer ao longo de todo o gene do FIX como mutações pontuais, deleções, inserções, rearranjos e inversões que provocam a hemofilia B. Os polimorfismos podem ser de dois tipos: polimorfismo de um único nucleotídeo e polimorfismo de comprimento, também conhecido como microsatélite. Informações adicionais sobre mutações e polimorfismos do FIX encontram-se na Internet (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F9>) com explicações sobre a complexidade das bases moleculares da hemofilia B (JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2011).

As mutações pontuais são o defeito genético mais comum e estão presentes em, aproximadamente, 90% dos pacientes (JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2011). Entre essas, destacam-se as mutações *missense* que levam à troca de um aminoácido da proteína e causam um decréscimo ou perda total da sua atividade (MUKHERJEE *et al.*, 2008). Sommer e colaboradores (1992) estimaram que as mutações *missense* causam 59% das hemofilias B moderada e grave e que essas mutações são, na maioria das vezes, de origem independente. Em contraste, esse tipo de mutação foi encontrada em virtualmente todas as famílias (97%) com a doença de quadro leve e somente a minoria delas (41%) era de origem independente.

As mutações *nonsense*, no qual um códon de parada é adicionado, ocorrem geralmente em códons CGA. O gene do FIX apresenta 6 desses códons e a transição da base nitrogenada C para T resulta no códon de parada TGA, levando, geralmente, a uma forma de hemofilia grave (BOWEN, 2002).

As deleções são o segundo tipo de mutação mais encontrada, presentes em aproximadamente 5 a 10% dos pacientes. Essas mutações incluem a deleção inteira ou parcial do gene, bem como deleções internas e microdeleções de um ou vários pares de bases, podendo ocasionar perda de domínios da proteína e da sua atividade. Estão normalmente associadas ao quadro grave da doença (BOWEN, 2002).

As inserções, assim como as deleções, podem ser grandes ou somente de um nucleotídeo e afetam a função gênica ou o seu produto de maneira adversa. Rearranjos e inversões são muito raros na população hemofílica (BOWEN, 2002).

O tipo de mutação designa não somente a gravidade da hemofilia B, como também a probabilidade que o paciente tem de desenvolver anticorpos inibidores durante a terapia de substituição. As mutações associadas com a ausência do produto gênico, tais como as deleções ou mutações *nonsense*, proporcionam um alto risco para o desenvolvimento de inibidores. Mutações associadas com a presença do produto gênico, mesmo que em pequenas quantidades, proporcionam um risco menor de desenvolvimento dos mesmos (BOWEN, 2002). Entretanto, a caracterização da mutação ainda não possibilita prever o tipo de resposta imune que será desenvolvido pelo paciente, sendo que outros loci gênicos, como o complexo de histocompatibilidade principal (MHC), podem estar envolvidos (LOLLAR, 1999).

1.4 Sistema de expressão lentiviral

Nas últimas décadas, o aumento na demanda de produção de proteínas recombinantes visando estudos estruturais, funcionais e pré-clínicos estimulou as pesquisas para o desenvolvimento de novos sistemas de expressão, os quais podem produzir rapidamente quantidades significativas de proteínas recombinantes (GAILLET *et al.*, 2010).

Tendo isso em mente, foram desenvolvidos os vetores lentivirais derivados dos lentivírus que compreendem um gênero da família Retroviridae, que incluem os patógenos humanos HIV-1, HIV-2, vírus da imunodeficiência símia (SIV) e outros vírus que infectam felinos (FIV) e ungulados (vírus da anemia infecciosa equina, vírus da artrite-encefalite caprina, vírus da imunodeficiência bovina, Maedi-Visna em ovinos) (SCHWEIZER; MERTEN, 2010).

A grande maioria dos vetores lentivirais é derivada do genoma do HIV-1, o qual é organizado em nove genes, dentre eles, três genes, *gag*, *pol* e *env* que carregam a informação necessária para a produção de proteínas estruturais (proteínas da matriz, capsídeo e nucleocapsídeo), de enzimas envolvidas na replicação (protease, transcriptase reversa e integrase) e da glicoproteína precursora do envelope (*env*). *Gag* codifica as proteínas estruturais, enquanto o gene *pol* codifica as enzimas que acompanham o RNA fita simples

(fs), e o gene *env* codifica o envelope viral (KATZ; SKALKA, 1994; ESCORS; BRECKPORT, 2010).

Outros componentes importantes do genoma retroviral são elementos regulatórios *cis-acting*, tais como duas repetições terminais longas (LTR), que além de possibilitarem a integração do genoma viral na célula hospedeira, são também responsáveis pela regulação da transcrição dos genes virais. As LTR contêm sequências sinal de poliadenilação, sequências promotoras (TATA Box), além de sítios de ligação para fatores de transcrição das células hospedeiras. Existem também elementos necessários para a expressão, transcrição reversa e integração nos cromossomos do hospedeiro. Além disso, o genoma retroviral contém um sinal de empacotamento (ψ ou ψ), necessário para o empacotamento do RNA nos vírions recém-formados (WATANABE; TEMIN, 1982; CHARNEAU *et al.*, 1992; ESCORS; BRECKPORT, 2010) (Figura 9).

Figura 9 - Esquema do genoma do HIV-1. Flanqueado pelas regiões LTR, que controlam a expressão dos genes virais, estão os três genes que codificam proteínas estruturais e enzimas (*gag*, *pol* e *env*), além de genes que codificam proteínas regulatórias (*tat* e *rev*) e proteínas acessórias (*vif*, *vpu*, *vpr* e *nef*). Abreviações: CA - capsídeo, IN - integrase, MA - matriz, NC - nucleocapsídeo, PR - protease, RT - transcriptase reversa, SU - superfície, TM - transmembrana, LTR - repetições terminais longas, RRE - elemento de resposta rer (modificado de ROBINSON, 2002).

Várias modificações foram realizadas no genoma do HIV-1 com o objetivo de construir vetores eficientes e seguros. Há três gerações de vetores lentivirais, os quais são classificados de acordo com as deleções de genes virais realizadas. Os vetores de primeira geração não possuem um sinal de empacotamento funcional e nem o gene *env* completo (responsável pela codificação do envelope). Essa configuração garante que as células infectadas não produzam vírus replicantes, porém a presença do LTR, um promotor endógeno forte, poderia ativar proto-oncogenes por mutagênese insercional, e a presença de alguns

elementos virais (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) no cassete do capsídeo levantaram a questões relacionadas à segurança devido as suas atividades citotóxicas e citostáticas (COCKRELL; KAFRI, 2007).

Alguns problemas foram solucionados nos vetores de segunda geração, com a deleção de mais quatro genes (*vpr*, *vif*, *vpu* e *nef*), responsáveis pela virulência, entretanto, alguns continuaram sem solução, como a transcrição dependente de *tat* e o uso do 3' LTR como o promotor para dirigir a expressão do transgene (ZUFFEREY *et al.*, 1997).

Para otimizar o sistema lentiviral, os vetores de terceira geração foram desenvolvidos com a remoção do gene *tat* do cassete do capsídeo e a inativação do LTR do cassete do vetor. Dessa maneira, no cassete do capsídeo restaram apenas três dos nove genes originais do genoma do HIV-1 (*gag*, *pol* e *rev*), característica que aumenta a segurança do vetor reduzindo a probabilidade de formação de lentivírus competentes em replicação. Além disso, a substituição da região U3 do 5' LTR do HIV-1 pelos promotores do citomegalovírus (CMV) ou do vírus do Sarcoma de Rous (RSV) eliminou a dependência de *tat* sem afetar a eficiência de transdução (DULL *et al.*, 1998; PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008).

Outra melhoria foi o desenvolvimento dos vetores autoinativantes (*self-inactivating*) (*SIN*), que inclui uma deleção da região *enhancer* e promotor na região U3 do 3'LTR do cassete de expressão (mostrado na Figura 10 como Δ). Essa deleção será duplicada durante a transdução, de modo que no provírus integrado tanto a região 5' como a 3' LTR terão a atividade promotora desligada. Essa característica leva à inativação transcricional, reduzindo a probabilidade de mobilização do vetor após uma infecção pelo HIV-1 (ZUFFEREY *et al.*, 1997; ZUFFEREY *et al.*, 1998; DULL *et al.*, 1998; COCKRELL; KAFRI, 2007; PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008). A adição das sequências cPPT (*central polypurine tract*) e CTS (*central termination sequence*) e do elemento WPRE são outras modificações importantes. As duas primeiras facilitam a entrada do cDNA viral no núcleo e explicam a capacidade do lentivírus de infectar células estacionárias, aumentando a eficiência de transdução dos vetores em células em divisão ou não (ZENNOU *et al.*, 2000; COCKRELL; KAFRI, 2007). A adição da sequência WPRE, que é um elemento regulatório do vírus da hepatite, na região 3' do transgene aumenta a estabilidade do transcrito, aumentando, consequentemente, a expressão do transgene (Figura 10) (ZUFFEREY *et al.*, 1999; POPA *et al.*, 2002).

Figura 10 - Sistema de terceira geração do vetor derivado de HIV-1 independente de *tat*. Os vetores *SIN* possuem um promotor interno para promover a expressão do transgene, bem como elementos como o IRES que permite a expressão de duas proteínas independentes, e o WPRE que aumenta a estabilidade do RNA. O cassete do capsídeo contém apenas os genes *gag*, *pol*, *tat* e *rev*. O cassete do envelope é derivado do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) no lugar do envelope do HIV-1 (modificado de PIKANÇO-CASTRO *et al.*, 2008).

A transdução realizada por vetores lentivirais possibilita a geração rápida de linhagens celulares de mamíferos produtoras de proteínas. Esse sistema é flexível, permitindo a inserção de grandes genes na cromatina do hospedeiro. A transdução de células com as partículas lentivirais é simples e as linhagens de células, teoricamente, são capazes de produzir proteínas por um tempo indefinido devido à integração estável do genoma proviral no genoma hospedeiro (SPENCER *et al.*, 2011).

Os níveis elevados de produção proteica resultam, primordialmente, de dois aspectos da transdução lentiviral. Primeiro, é a habilidade de se obter um grande número de cópias do transgene, através de múltiplas rodadas de transdução. Segundo, é o contexto genômico no qual os vetores lentivirais se integram, demonstrando uma preferência distinta de integração em elementos codificantes do gene (SPENCER *et al.*, 2011).

Devido às suas características, os vetores lentivirais podem infectar diferentes tipos de células estacionárias ou em divisão com alta eficiência, como neurônios (NALDINI *et al.*, 1996), macrófagos (MIYAKE *et al.*, 2007), células-tronco hematopoéticas (ZHANG *et al.*, 2007), entre outras, sendo utilizados na expressão de proteínas recombinantes como o fator VIII da coagulação sanguínea (SPENCER *et al.*, 2011; GONSALES DA ROSA, *et al.*, 2012).

Em conjunto, essas características demonstram que o sistema lentiviral é apropriado para a produção do FIX recombinante e permite a geração de linhagens celulares com expressão estável e duradoura do mesmo.

Assim, neste trabalho optamos pelo uso de um vetor lentiviral de terceira geração não comercial denominado p1054CIGWS (1054) para a construção de uma molécula recombinante de FIX e testamos a sua eficiência de produção em duas linhagens celulares humanas, 293T e SK-Hep-1.

Justificativa

2 Justificativa

Atualmente não há nenhum produto de FIX recombinante produzido no Brasil. O tratamento dos hemofílicos B brasileiros é feito pela importação de FIX derivado de plasma humano ou do fator IX recombinante. O plasma humano apresenta três principais problemas: o risco de causar infecções virais por patógenos presentes no plasma dos doadores, como o HIV, os vírus das Hepatites B e C, o vírus linfotrófico de células T humanas (HTLV), o parvovírus B19 e outros vírus emergentes; o alto custo do produto no mercado nacional e o fato da demanda de plasma de doadores sanguíneos saudáveis não ser suficiente para atender a população de hemofílicos. O recombinante apresenta, além do alto valor no mercado brasileiro, a possibilidade de provocar uma resposta imunológica por ser produzido em células murinas. A resposta imunológica gera inibidores do FIX, que podem desencadear reações anafiláticas potencialmente graves ou a necessidade de utilização de concentrações cada vez mais altas de FIX, encarecendo ainda mais o tratamento.

A utilização de linhagens celulares humanas como a 293T que apresenta alta eficiência de transdução e expressão de níveis elevados de proteínas recombinantes e a SK-Hep-1 que por ser uma linhagem hepática pode ser capaz de realizar todas as modificações pós-traducionais corretas e necessárias para a atividade dos fatores de coagulação, diminuirá ou eliminará a geração de inibidores de FIX, reduzindo os efeitos colaterais e os custos do tratamento.

Ainda, a comparação destas duas linhagens quanto à eficiência de produção de FIX e quanto à qualidade do produto formado é de grande interesse para se atingir uma produção de fatores da coagulação recombinantes de alta qualidade, produzidas em células humanas.

Desse modo, a produção de FIX recombinante em sistema de expressão de células humanas é, portanto, uma inovação de grande valia para o tratamento da hemofilia B no Brasil, visto que este projeto objetivou a produção deste fator de coagulação utilizando vetor de expressão lentiviral para uma expressão duradoura, eficaz e, sobretudo, mais segura quanto ao risco de infecções virais e resposta imunológica que o tratamento existente atualmente.

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- ✓ Clonar e expressar o FIX recombinante em duas linhagens celulares humanas (293T e SK-Hep-1) e caracterizar as células produtoras.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver um vetor lentiviral contendo o cDNA do FIX humano seguido do gene de seleção EGFP.
- ✓ Transduzir as linhagens celulares humanas 293T e SK-Hep-1 com o vetor lentiviral 1054-FIX.
- ✓ Determinar os níveis de FIX recombinante total e ativo secretado no meio de cultura das células produtoras.
- ✓ Identificar o FIX recombinante por Western blot.
- ✓ Avaliar o crescimento das células 293T e SK-Hep-1 em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino.
- ✓ Caracterizar as linhagens celulares humanas quanto a expressão dos genes envolvidos no processo de γ -carboxilação.
- ✓ Quantificar o número de cópias inseridas em cada célula.
- ✓ Avaliar o efeito dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na produção de FIX recombinante no sobrenadante celular.

Material e Métodos

Fluxograma da metodologia empregada neste trabalho

4 Material e Métodos

4.1 Material Biológico

4.1.1 Cepa de *Escherichia coli*

A cepa de *E. coli* DH10 β foi utilizada como receptora para transformação, clonagem e propagação dos vetores de DNA plasmidial.

4.1.2 Vetores

- p1054-CIGWS (1054)

Este é um vetor de expressão lentiviral de terceira geração derivado de HIV-1, no qual mais da metade do genoma do HIV-1 foi deletado (TRONO, 2000). Esse vetor possui próximo ao cassete de expressão poucas sequências do HIV-1, como as sequências cPPT/CTS (*central polypurine tract/central termination sequence*) do gene *pol*, que são elementos de transporte constitutivo, inseridas no final 5' do promotor interno CMV (*Cytomegalovirus*) antes do cassete de expressão, e atuam otimizando a eficiência de transdução de células estacionárias, visto que protege a importação do DNA viral retro-transcrito para o núcleo da célula-alvo. As sequências LTR encontram-se bastante modificadas no vetor de expressão, de modo que no provírus integrado tanto a região 5' como a região 3' LTR terão a atividade promotora desligada, garantindo que o RNA viral do provírus não seja transcrito na célula-alvo, havendo apenas a produção do RNAm controlado pelo promotor interno (CMV), característica dos vetores auto-inativados (*SIN – self inactivated vector*) (MIYOSHI *et al.*, 1998).

O cassete de expressão do 1054 contém um promotor interno, o transgene e alguns elementos regulatórios. O promotor CMV (promotor forte) é ativo em quase todos os tipos celulares. A região 3' do transgene apresenta um elemento regulatório do vírus da hepatite de marmota denominado WPRE (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*) (DONELLO *et al.*, 1998). A sua presença no final 3' do RNA aumenta a eficiência do transporte do RNA do núcleo para o citoplasma e, possivelmente, também aumenta a eficiência do processamento do RNA, assim como a poliadenilação (ZUFFEREY *et al.*, 1999; POPA *et al.*, 2002). Dessa maneira, há um aumento da concentração de RNAm na célula-alvo e, conseqüentemente, da produção da proteína (ZUFFEREY *et al.*, 1999).

Na construção do 1054 utilizada nesse trabalho são expressas duas proteínas (FIX e EGFP – *Enhanced Green Fluorescent Protein*) (vetor bicistrônico) em um plasmídeo transgênico. Isso se torna possível pela inserção de um sítio interno de ligação ao ribossomo (IRES), e dessa maneira, um segundo DNA transgênico (o gene marcador EGFP) pode ser inserido entre o IRES e o WPRE, permitindo a tradução de duas proteínas diferentes a partir de uma única molécula de RNAm (HENNECKE *et al.*, 2001).

- pCMVΔR 8.91

O pCMVΔR 8.91 é um vetor de segunda geração, responsável pela formação do capsídeo. Neste vetor encontram-se apenas os genes do HIV-1 relacionados à produção de proteínas estruturais e enzimas (*gag*, *pro*, *pol*), o gene *ver*, que regula a expressão de *gag*, *pro* e *pol* e o gene *tat*, que funciona como um ativador da transcrição na região LTR. A transcrição desse vetor inicia-se pelo promotor heterólogo CMV e termina no sinal de poliadenilação (pA).

- pMD2.VSVG

O terceiro vetor utilizado para a produção viral é um vetor responsável por um envelope derivado do vírus vesicular stomatitis vírus VSV-G no lugar do envelope do HIV-1. A troca do envelope permite que as partículas lentivirais formadas não tenham tropismo apenas por células T e macrófagos, mas por uma ampla variedade de células humanas primárias, células animais e linhagens celulares (MASTROMARINO *et al.*, 1987).

A divisão dos genes virais em 3 plasmídeos e a deleção das regiões LTR são extremamente importantes para a produção viral, pois impedem a formação de vírus competentes em replicação nas células transduzidas e diminui a patogenicidade (MIYOSHI *et al.*, 1998). Nesse sistema, o surgimento de vírus competentes para replicação é extremamente improvável, pois seriam necessários milhares de recombinações homólogas do vetor com outras sequências para substituir todas as regiões deletadas.

Figura 11 - Esquema dos vetores utilizados na produção viral através de co-transfecção tripla. **A)** Vetor de 3^a geração derivado do HIV-1, bicistrônico, que codifica para EGFP (p1054-CIGWS); **B)** Vetor que codifica para o capsídeo viral (pCMVΔR8.91); **C)** Vetor para o envelope viral (pMD2.VSVG), que codifica para a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular.

4.1.3 Linhagens Celulares

293T - linhagem celular de rim humano da fase embrionária. Está depositada no American Type Culture Collection (ATCC) sob o número de acesso **CRL-11268™**.

SK-Hep-1 - linhagem celular de hepatócito humano, derivada de adenocarcinoma. Está depositada no American Type Culture Collection (ATCC) sob o número de acesso HTB-52™.

4.2 Metodologia

4.2.1 Clonagem do FIX humano no vetor de expressão lentiviral 1054

4.2.1.1 Preparação do inserto de DNA relativo ao cDNA do FIX

O plasmídeo pCMV5FIX contendo o cDNA do FIX humano foi comprado da empresa American Type Culture Collection (ATCC) sob o número de acesso 79870™.

Para a construção dos oligonucleotídeos sintéticos, *primers*, foi utilizado como referência a sequência de nucleotídeos depositados no *GenBank* (NCBI – National Center for Biotechnology Information) sob o número de acesso NM_000133.3 com a denominação de *Homo sapiens coagulation factor IX (F9), RNAm*.

Os *primers* utilizados para amplificar o cDNA do FIX possuem sítios de restrição para *Sall* e uma sequência Kozak no *primer sense* e *SmaI* no *primer antisense*. Os pares de *primers* estão representados abaixo.

Primer sense – GTC GAC GCC GCC ACC ATG CAG CGC GTG AAC ATG ATC
Sall

Primer antisense – CCC GGG CTT TCA TTA AGT GAG CTT TG
SmaI

A amplificação da sequência nucleotídica correspondente ao cDNA do FIX foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o termociclador *GeneAmp PCR Sistem 9700* (*Applied Biosystems*). Para uma reação com volume final de 50 µL foram utilizados: 20 ng de plasmídeo, 10 mmol/L dos dNTPs; 1,0 µL de primer 5' (10pmoles/ µL); 1,0 µL de primer 3' (10pmoles/ µL); 1U da enzima Taq DNA polimerase (*Platinum High Fidelity – Invitrogen*) e 5,0 µL do seu tampão (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3, 500 mmol/L KCl, 15 mMol/L MgCl₂ e 0,01% de gelatina (m/v). O programa de amplificação foi inicialmente composto por desnaturação inicial a 94°C durante dois minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 7 minutos. Finalmente, seguiu-se uma extensão final de 72°C durante 10 minutos.

4.2.1.2 Preparação do vetor de expressão

Paralelamente ao preparo do inserto foi realizado o preparo do vetor. O vetor utilizado foi o 1054 (10.054 pb) que foi linearizado utilizando as enzimas de restrição *Sall* e *SmaI* (*Biolabs*), conforme instruções do fabricante. Como as enzimas utilizadas eram incompatíveis, após cada reação o DNA era purificado com fenol-clorofórmio.

Neste procedimento, à solução de DNA foi adicionado o mesmo volume de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), para desnaturação de proteínas. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fase superior (aquosa) foi cuidadosamente coletada e transferida para outro tubo eppendorf. A esta fase foi adicionado igual volume da mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e os procedimentos de agitação em vortex e centrifugação foram repetidos. Novamente, a fase superior foi cuidadosamente coletada e transferida para outro tubo. Subsequentemente, foi realizada a precipitação do DNA, acrescentando-se 10% do volume de acetato de sódio 2 mol/L, pH 5,4 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. A mistura foi incubada 12 horas a -80°C e, posteriormente, centrifugada a 10.000 x g, por 30 minutos a 4°C, em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado e novamente centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente por 15 minutos. Após a secagem, o precipitado foi dissolvido em 20 µL de água milli-Q estéril.

O DNA plasmidial linearizado foi desfosforilado com a finalidade de reduzir a possibilidade de recircularização do mesmo. Este procedimento foi realizado utilizando fosfatase alcalina de camarão (SAP) e respectivo tampão *Shrimp Alkaline Phosphatase Buffer* da seguinte maneira: adicionou-se ao DNA 3 µL do tampão de desfosforilação, 1 µL da enzima fosfatase alcalina (1U/µL), para um volume final de 30 µL em água milli-Q estéril. Incubou-se por 60 minutos a 37°C. Subsequentemente, a reação foi interrompida pela incubação a 75°C por 15 minutos, para inativação da enzima.

4.2.1.3 Separação de fragmentos de DNA por eletroforese

Foram utilizados géis de agarose 1%. Para isso, 1g de agarose foi dissolvida em 100 mL de TAE (Tris-HCl 40 mmol/L; ácido acético 20 mmol/L; EDTA 1 mmol/L, pH 8,0) e levada ao microondas até dissolver totalmente a agarose. Em seguida, foi adicionado brometo de etídio (0,5 µg/mL). Às amostras foi adicionado glicerol 70%. Na corrida eletroforética foram utilizados o tampão TAE e potencial de 110V por, aproximadamente, 1 hora.

4.2.1.4 Purificação do fragmento amplificado

O produto da reação de amplificação, correspondendo ao cDNA do FIX foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (vide seção 4.2.1.3) e a banda de 1,4 Kb foi recortada do gel e purificada utilizando o kit de purificação de produto de PCR em gel de agarose -*Illustra GFX PCR DNA and Band Purification Kit* (GE) – seguindo as recomendações do fabricante. Este procedimento permite a eliminação dos contaminantes antes de prosseguir com a subclonagem no vetor desejado.

4.2.1.5 Ligação do cDNA isolado no vetor pCR2.1-TOPO® - Subclonagem

Foi realizada a reação de ligação incubando 1µL do tampão da enzima (*Salt Solution - Invitrogen*), 1µL do vetor pCR2.1-TOPO® (*Invitrogen*) e 4µL do produto de PCR relativo ao cDNA do FIX para um volume final de 7 µL. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 40 minutos.

4.2.1.6 Preparo de bactérias competentes para choque térmico

Para o preparo de bactérias competentes foi utilizado o método do CaCl_2 (SAMBROOK *et al.*, 1989). As bactérias da linhagem DH10 β foram semeadas em meio LB ágar (10g de Triptona, 10g de NaCl, 5g de Extrato de levedura, 15g de Ágar para um volume de 1 L) e incubadas a 37°C, por 16 horas. Em seguida, uma das colônias isoladas foi inoculada em 5 mL de meio LB (10g de Triptona, 10g de NaCl, 5g de Extrato de levedura para um volume de 1 L) e incubada sob agitação nas mesmas condições anteriores. Subsequentemente, 500 μL dessa mini-cultura foram inoculados em 50 mL de meio LB e esta cultura foi incubada sob as mesmas condições até atingir a densidade óptica a 600 nm de, aproximadamente, 0,4 a 0,6. Uma fração de 30 mL desta cultura foi resfriada em gelo e centrifugada a 2000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 15 mL de Tris-HCl-Cálcio (Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0; CaCl_2 70 mmol/L) e colocado no gelo por 20 minutos.

A solução foi centrifugada a 2000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 1 mL de Tris-cálcio (pH 8,0) e deixado no gelo por 45 minutos. Em alíquotas de 200 μL foram adicionados 100 μL de glicerol 70% para serem estocados a -80°C até serem utilizadas nas transformações.

4.2.1.7 Transformação bacteriana

As bactérias foram transformadas através de choque térmico, utilizando o seguinte protocolo: ao tubo eppendorf contendo uma alíquota de 300 μL de bactérias competentes, previamente descongelada e mantida no gelo, foram adicionados 7 μL da ligação entre o fragmento de FIX e o vetor TOPO, prosseguindo com o choque térmico da seguinte maneira:

- incubação no gelo por 30 minutos;
- incubação a 42°C por 60 segundos;
- incubação no gelo por 2 minutos.

Em seguida, foram adicionados 250 μL de meio SOC (SOB contendo MgCl_2 1 mmol/L; MgSO_4 1mmol/L; glicose 20 mmol/L), incubando-se a mistura a 37°C sob agitação moderada, por 1 hora. Após este período, 200 μL foram plaqueados por espalhamento em placas contendo meio LB ágar contendo o antibiótico ampicilina (100 mg/mL) e para a seleção de colônias azuis e brancas foi usado 40 μL de X-Gal e 20 μL de IPTG (ambos a 40 mg/mL) e incubados a 37°C , por 14 horas aproximadamente.

4.2.1.8 Extração de DNA plasmidial

Colônias isoladas obtidas após transformação foram inoculadas, separadamente, em 5 mL de meio LB/ampicilina e incubadas sob agitação a 37°C , por aproximadamente 16 horas. Decorrido este período, 3 mL destas culturas foram centrifugados a $12.000 \times g$ por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado foi utilizado para isolar o DNA plasmidial através do Kit de Miniprep (*Axygen*) seguindo as recomendações do fabricante.

A quantificação e a pureza da amostra do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria utilizando os comprimentos de onda de 260 a 280 nm. A razão entre essas leituras deve estar entre 1,8 e 2,0. A qualidade do DNA foi observada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (vide seção 4.2.1.3).

4.2.1.9 Análise da extração de DNA plasmidial

A confirmação da clonagem do cDNA do FIX foi feita com o uso das endonucleases de restrição específicas (*Sall* e *SmaI*) (*Biolabs*) conforme instruções do fabricante. Como os tampões das enzimas eram incompatíveis, após cada reação o DNA foi purificado utilizando-se o *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*) segundo recomendações do fabricante. O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (vide seção 4.2.1.3).

4.2.1.10 Ligação do cDNA isolado no vetor de expressão lentiviral 1054

Foi realizada a reação de ligação do fragmento do cDNA do FIX com o vetor lentiviral 1054 incubando-se 50 ng/ μ L do vetor 1054 linearizado, 150 ng/ μ L do cDNA do FIX, 1U da T4 DNA ligase (Invitrogen) e 4 μ L do tampão específico da enzima (Tris-HCl 250 mmol/L, pH 7,6, MgCl₂ 500 mmol/L, ATP 5 mmol/L, DTT 5 mmol/L, 25% polietilenoglicol 8000), para um volume de reação final de 20 μ L. A reação foi incubada por 16 horas a 16°C no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Após a ligação do cDNA do FIX no vetor 1054 foram realizadas: transformação bacteriana (vide seção 4.2.1.7 sem a utilização de X-Gal e IPTG), extração de DNA plasmidial (vide seção 4.2.1.8) e análise da extração do DNA plasmidial (vide seção 4.2.1.9).

4.2.1.11 Maxipreparação de plasmídeos

Este método foi utilizado para a obtenção de DNA plasmidial em larga escala (>100 μ g) e de boa qualidade (livre de endotoxinas) para ser usado na transfecção. Este procedimento consiste na lise das bactérias com tampão alcalino, o lisado é adicionado a uma coluna de troca iônica, esta coluna possui uma resina que permite a ligação do DNA. A utilização de tampão com uma determinada concentração de sal permite a retirada de RNA e proteínas da coluna. Em seguida, o DNA é eluído com tampão com alta concentração de sal, o DNA é precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e eluído em H₂O.

Para este procedimento foi utilizado o *illustra plasmidPrep Midi Flow Kit* (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante.

4.2.2 Condições gerais para cultura de células

Todas as células foram cultivadas em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂. Meio de cultura e PBS (Tampão fosfato-salino: NaCl 137 mmol/L; KCl 2,7 mmol/L;+ Na₂HPO₄ • 2H₂O 10 mmol/L; KH₂PO₄ 2 mmol/L; pH 7,4) foram usados pré-aquecidos a 37°C.

Para a análise de viabilidade e densidade de células foi utilizado o método de exclusão do corante azul de Tripan em câmara de Neubauer (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). A solução de azul de Tripan (0,4%) foi utilizada na relação de 1:1 (células:Tripan), de modo que as células mortas permitem a entrada do corante e as vivas não.

4.2.2.1 Cultivo de células 293T e SK-Hep-1

A linhagem 293T é originária de rim embrionário humano e transformada com o adenovírus Typ-5 e com o antígeno T do SV40, de modo que a transfecção de plasmídeos podem ser amplificados nessas células (GRAHAM *et al.*, 1977; FAIRMAN; STILLMAN, 1988).

As células 293T e SK-Hep-1 são aderentes ao plástico e foram cultivadas em meio DMEM 10% SFB (soro fetal bovino) inativado a 56°C por 30 minutos (*Seromed*), 4 mmol/L de L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de streptomicona.

A tripsinização das células para o replaqueamento consistiu em primeiro lavar as células com PBS e, posteriormente, incubar em estufa úmida com solução Tripsina-EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) (0,25% tripsina - 0,02% EDTA). Após alguns minutos as células começaram a desprender e foram delicadamente agitadas para obtenção de uma suspensão com células isoladas. A tripsina foi inativada pela adição de meio apropriado para a célula com 10% de SFB, as células foram sedimentadas por centrifugação e meio de cultura fresco foi adicionado ao pellet.

Para a manutenção de estoques das células geradas, as linhagens celulares foram congeladas utilizando um meio de congelamento composto por 90% SFB + 10% Dimetil sulfóxido (DMSO). Os tubos foram congelados a -80°C e após 24 horas foram transferidos para o nitrogênio líquido.

Para os descongelamentos, os tubos foram incubados a 37°C por alguns minutos, as células foram postas em meio pré-aquecido e centrifugadas por 10 minutos a 200 x g. O pellet de células foi transferido para frascos de cultura com meio fresco e incubadas em estufa úmida.

4.2.3 Produção de partículas lentivirais e determinação do título viral

Para a produção de partículas lentivirais foi utilizado o método dos lipídios catiônicos. Vinte e quatro horas antes da transfecção, 4×10^6 células foram plaqueadas em placas de cultura de 10 cm. O cDNA do FIX foi introduzido na monocamada de células 293T, em confluência de aproximadamente 90%, por tripla transfecção, contendo o vetor 1054-FIX (10 µg), o vetor pCMVΔR8.91 (6,5 µg) responsável pela formação do capsídeo viral e o vetor pMD2.VSVG (3,5 µg) responsável pela formação do envelope viral utilizando-se Lipofectamine™ 2000 (o preparado comercial de lipídios catiônicos, lipofectamina) (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante.

Seis horas após a transfecção, o meio foi trocado por meio DMEM 10% SFB fresco e as células foram incubadas por 48 horas.

Após esse período, o sobrenadante contendo os vírus foi coletado, filtrado em filtro para seringa 0,45 µm (*Millex*) e armazenado a -80°C. Nessa temperatura, os títulos se mantêm estáveis durante pelo menos dois meses.

A construção utilizada possui EGFP como marcador, de modo que a eficiência de transdução possa ser quantificada por citometria de fluxo. O título viral foi determinado como a concentração de partículas capazes de transduzir células 293T (linhagem usada como referência).

Células 293T foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 2×10^5 células/poço. Vinte e quatro horas depois, essas células foram transduzidas com 1 mL de vírus suplementado com polibreno (1mg/mL) (*Sigma*). Em seguida, as placas foram incubadas em câmara úmida de CO₂ por 14 a 18 horas, após esse período o meio de cultura foi trocado por meio fresco e após 48 horas de incubação, as células foram tripsinizadas com tripsina-EDTA e as células transduzidas foram detectadas pela expressão de EGFP em um citômetro de fluxo FACSCalibur (*BD Biosciences*).

O título viral (TU/mL, TU: *transducing units*) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{TU/mL} = (\text{número de células plaqueadas}) \times (\text{porção de células transduzidas}) \times (\text{fator de diluição}).$$

4.2.4 Transdução das linhagens celulares

As transduções foram realizadas em placas de 6 poços. 2×10^5 células das linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 foram plaqueadas e a transdução realizada cerca de 24 horas depois para que ocorra na fase exponencial de crescimento celular. A incubação da célula alvo com o sobrenadante lentiviral (1 mL) na presença de 0,6 µg/ml de polibreno (*Sigma*) foi realizada *overnight* resultando no primeiro ciclo de transdução. Para garantir uma transdução eficiente foram repetidos dois ciclos adicionais, sob as mesmas condições acima mencionadas. Dois dias após as transduções, as células foram tripsinizadas e transferidas para placa de 100 mm com meio DMEM 10% SFB para serem expandidas.

4.2.5 Análise por citometria de fluxo e seleção de células positivas para EGFP

Após a transdução das linhagens 293T e SK-Hep-1 com o vetor bicistrônico 1054-FIX, as células foram expandidas. Três semanas após a transdução as células foram selecionadas pela expressão de EGFP na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brasil. Para este procedimento, as células foram tripsinizadas com Tripsina/EDTA. Cada linhagem celular transduzida foi submetida à seleção em um Citômetro de Fluxo de Alta Velocidade (FACS Aria) (*BD Biosciences*), com *software* FACSDiva (*BD Biosciences*), as células que apresentaram maior expressão de EGFP foram selecionadas e expandidas em DMEM 10% SFB. Células não transduzidas, que não exprimem EGFP, foram usadas como controle negativo.

4.2.6 Caracterização da expressão de FIX recombinante nas linhagens celulares

4.2.6.1 Análise da atividade biológica de FIX recombinante

Para a análise da atividade biológica do FIXr presente no sobrenadante das linhagens celulares recombinantes foi empregado o ensaio Cromogênico *Biophen Factor IX* (Hyphen BioMed) segundo recomendações do fabricante. Neste ensaio, o FXIa na presença de trombina, fosfolipídeos e cálcio, ativa o FIX em FIXa, o qual forma um complexo com o FVIII, fosfolipídeos e cálcio que ativa o FX. O FXa gerado é medido por sua atividade específica no substrato cromogênico do FXa (SXA-11). O FXa cliva esse substrato e libera o ácido nucleico peptídico (pNA). A quantidade de pNA gerado é diretamente proporcional à atividade do FIXa. Deste modo, há uma relação direta entre a quantidade de FIX na amostra e a atividade de FXa gerado, medida pela quantidade de pNA liberado, determinada por cor a 405 nm. Considera-se que 100% de atividade representa 1 UI/mL.

Anteriormente à avaliação da atividade biológica do FIX, as células 293T e SK-Hep-1 transduzidas e não transduzidas foram tratadas por, no mínimo 10 dias, com 5 µg/mL de vitamina K (BUSBY *et al.*, 1985). Após esse período, as culturas foram mantidas com vitamina K continuamente.

Para a realização do ensaio de atividade, foram adicionados 6 mL de meio de cultura DMEM 10% SFB + vitamina K, nas culturas celulares apresentando confluência de cerca de 80% em garrafas de cultura T75. Após 48 horas, o sobrenadante das culturas foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 200 x g. O ensaio de atividade foi realizado em duplicata.

4.2.6.2 Análise da quantidade total de FIX recombinante

A determinação da quantidade total de FIX recombinante humano foi realizada pelo teste ELISA *VisuLize™ FIX Antigen Kit* (Affinity Biologicals) segundo recomendações do fabricante. Esse kit apresenta os valores de quantificação da proteína recombinante em UI/mL. Segundo Busby e colaboradores (1985), os valores obtidos em UI/mL representam a

atividade presente no plasma normal e podem ser convertidos a ng/mL utilizando-se um valor padrão de 3 µg/mL de FIX no plasma. Dessa maneira, através de uma regra de três, podemos converter os valores obtidos pelo kit em UI/mL para ng/mL.

O procedimento para a obtenção do sobrenadante das culturas celulares foi descrito anteriormente (vide seção 4.2.6.1). O experimento foi realizado em duplicata.

4.2.6.3 Detecção de FIX por *western blot*

Os sobrenadantes das culturas celulares de 293T e SK-Hep-1 transduzidas com o FIX, cultivadas em DMEM sem SFB por 24 horas, foram concentrados por centrifugação a 3.000 x g a 4°C utilizando filtros *Centriprep® Centrifugal Filter Devices YM-10 (Millipore)* de acordo com as recomendações do fabricante. O tempo mínimo de centrifugação foi de 50 minutos, variando de acordo com o volume inicial de amostra processada. Com o intuito de retirar a glicerina presente na membrana do filtro, estes foram previamente lavados com 15 mL de água milli-Q a 3.000 x g a 4°C por 30 minutos.

4.2.6.3.1 Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas do meio extracelular foi feita utilizando-se o kit da Bio-Rad DC (*Bio-Rad*), baseado no método descrito por Bradford (1976). O ensaio foi realizado em microplacas com volume total de 220 µL por poço, com faixa de linearidade 0,5 a 2,0 µg de proteínas. Foram utilizados 20 µL de amostra diluída em água milli-Q e 200 µL do reagente de Bradford. O volume total utilizado em cada poço da microplaca foi mantido constante (220 µL). Após 15 minutos de incubação, as absorbâncias foram lidas a 595 nm em leitor de Elisa (*Versamarx Tunable Microplate Reader, Molecular Devices*). Uma curva padrão com 5 pontos correspondentes a quantidades conhecidas de BSA (0,0 a 2,0 µg) foi feita a cada ensaio realizado. Foram feitas triplicatas para cada amostra. A concentração das amostras foi determinada usando-se duas quantidades diferentes de proteína para cada amostra. Os desvios padrões dos resultados obtidos nas triplicatas foram menores que 10%.

4.2.6.3.2 Separação das proteínas por SDS-PAGE

O gel SDS (10 cm x 10 cm x 1,0 mm) foi preparado, contendo 12,5% de acrilamida, seguindo o protocolo de Laemmli (1970). As amostras de proteínas do meio extracelular foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 mol/L, SDS 2%, DTT 1%, glicerol 10%, pH 6,8) e fervidas por 5 minutos em microtubos. A separação foi realizada nas seguintes condições: 300 V, sob uma amperagem constante de 12 mA por gel, 10 W e um total de 2 horas de corrida. A eletroforese foi feita em tampão Tris 25 mol/L, glicina 192 mmol/L pH 8,3, SDS 0,1% à temperatura ambiente. Todos os sistemas de eletroforese e reagentes utilizados são *GE Healthcare*. A detecção das proteínas no gel foi feita de acordo com protocolo de Coomassie coloidal G-250 (*Serva*) descrito por Neuhoff e colaboradores (1988). A fixação da proteína no gel foi feita em solução contendo etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) em água durante 1 hora. A coloração foi feita overnight em solução contendo Coomassie G-250 0,1% (m/v) em ácido fosfórico 2% (v/v), sulfato de amônio 10% (m/v) e metanol 20% (v/v). Após o período de coloração o gel foi lavado com metanol 25% (v/v). Todo o procedimento foi realizado com agitação lenta e constante. O sistema de aquisição de imagem utilizado foi o *ImageScanner (GE)*.

4.2.6.3.3 Imunodetecção

As proteínas do meio extracelular separadas no gel SDS-PAGE foram eletrotransferidas para a membrana de PVDF (*Hybond-P, GE*). A transferência foi realizada em tampão Tris 25 mmol/L, glicina 192 mmol/L, metanol 20%, por 1 hora e 30 minutos a 100 V, 300 mA, a 4°C. Para bloquear sítios inespecíficos, a membrana foi incubada em tampão Tris-HCl 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, Tween 20 0,1%, pH 7,6 (TBS-T) com 5% (m/v) de leite desnatado por 1 hora. Depois a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com TBS-T. Feito isso, a membrana foi incubada com o anticorpo primário monoclonal anti-humano FACTOR IX (*Clone HIX-5 - F 1020, Sigma*) na diluição 1:500 em TBS-T com 5% (m/v) de leite desnatado por 2 horas à temperatura ambiente. Depois, foi novamente lavada 3 vezes por 10 minutos com TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura

ambiente sob agitação com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a peroxidase (#7076, *Cell Signaling*) na diluição 1:2000. A detecção foi feita usando o kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagents* (*GE HealthCare*), de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.7 Caracterização das linhagens celulares produtoras de FIX recombinante

4.2.7.1 Análise do perfil de expressão de RNAm dos genes relacionados à γ -carboxilação

As linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 transduzidas e não transduzidas foram caracterizadas quanto ao nível de expressão de RNAm dos genes relacionados à γ -carboxilação: γ -carboxilase, vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKOR) e calumenina pelo método de PCR em tempo real.

Para isso, foi realizada a reação de Transcriptase Reversa (RT-PCR). A partir de 5×10^6 células, foi efetuada a extração de RNA total utilizando o *RNeasy Plus Mini Kit* (*Qiagen*), conforme as instruções do fabricante. A quantificação e a pureza do RNA total foram avaliados por meio da análise em gel de agarose 1% (vide seção 4.2.1.3) e leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O grau de pureza do RNA é estimado pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm, que deve estar entre os valores de 1,8 e 2,0.

Para a produção do cDNA, foi utilizado o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*). Foi realizada uma reação com volume final de 50 μ L, adicionou-se 2 μ g de RNA total, 5 μ L de tampão RT 10X, 10 mmol/L de dNTPs, 5 μ L de *random primer*, 0,15 μ L de inibidor de ribonuclease e 2,5 μ L da enzima *MultiScribe Transcriptase*. A reação foi incubada a 25°C por 10 minutos e 37°C por 2 horas no termociclador *GeneAmp PCR Sistem 9700* (*Applied Biosystems*).

A análise quantitativa da expressão foi realizada pela metodologia TaqMan (*Applied Biosystems*), cujos *primers* e sondas foram adquiridos pelo sistema *AssayOnDemand*. Para a normalização das amostras foi utilizada a média geométrica dos Cts dos genes endógenos,

GAPDH e β -actina, obtidos pelo sistema PDAR (*Applied Biosystems*) cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilitou a análise pela metodologia de $10.000/2^{\Delta Ct}$, fórmula esta que não necessita de gene calibrador para a análise (ALBESIANO *et al.*, 2003).

4.2.7.2 Avaliação do crescimento celular

Para caracterizar o crescimento celular das linhagens transduzidas e não transduzidas foi realizada uma cinética de crescimento por um período de 7 dias na qual foi avaliada a velocidade específica máxima de crescimento celular, $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) como parâmetro de cultivo.

No dia zero, em cada placa de cultura de 100 mm foram plaqueadas 1×10^5 células em um volume final de 10 mL de DMEM 10% SFB suplementado com vitamina K ($5\mu\text{g/mL}$) (*Kanakion[®] MM – Roche*), totalizando 21 placas. A cada 24 horas, três dessas placas de cultura foram tripsinizadas com solução de Tripsina-EDTA e as células foram contadas pelo método de exclusão do azul de tripan para avaliar a viabilidade celular. O experimento foi realizado em triplicata.

Com os valores encontrados de crescimento celular, foi montado um gráfico de concentração celular ao longo do tempo, bem como um de viabilidade celular por tempo.

Para a determinação da velocidade específica de crescimento celular máxima, foi utilizada a seguinte equação (MILLER; REDDY, 1998; HISS, 2001):

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (4.1)$$

Onde: μ - velocidade específica de crescimento (h^{-1})

X – concentração de células (cél/mL)

t – tempo (h)

Na fase exponencial de crescimento da célula pode-se considerar que:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \text{cte} = \mu_{\text{máx}} \quad (4.2)$$

Integrando esta equação da concentração inicial de células X_0 a uma concentração X em um intervalo de tempo t , tem-se que,

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad (4.3)$$

Nesta expressão, o valor de $\mu_{\text{máx}}$ é o coeficiente angular do gráfico de $\ln X$ em função do tempo. Uma vez determinado o valor de $\mu_{\text{máx}}$, é possível determinar o tempo de duplicação (t_d) na fase de crescimento exponencial através da equação abaixo:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (4.4)$$

Para a análise da diferença estatística entre o crescimento celular das linhagens celulares transduzidas e não transduzidas foi utilizado o Teste t, método paramétrico e não pareado. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.

4.2.7.3 Determinação do número de cópias virais inseridas

O número de cópias do vetor lentiviral 1054-FIX inseridas no genoma celular foi calculado através de PCR quantitativa (qPCR), por ensaio de *SYBR[®] Green*, uma metodologia que utiliza o *SYBR Green I dye (Applied Biosystems)* o qual detecta produto de PCR ligando-se ao DNA dupla fita formado durante a PCR.

Para essa determinação por Real Time foram utilizados *primers* para a amplificação do vetor 1054 específicos para a região LTR viral. Como controle interno foi utilizado o gene endógeno da β -globina para normalizar a quantidade de DNA genômico de cada amostra.

Os *primers* utilizados para a sequência do LTR viral foram: P5 – 5'-TGCTTTTGTGCTTGTACTGGG - 3' e P3 – 5'-CTAGTTACCAGAGTCACACAA - 3'. E para o gene endógeno da β -globina foram: β -globinaF – 5'-CAACTTCATCCACGTTTACC - 3'; β -globinaR – 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC - 3'). Os *primers* utilizados foram desenhados com o programa *Primer Express* (*Applied Biosystems*) a partir de sequências obtidas do banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para a normalização das amostras, duas curvas padrão foram criadas, uma curva do plasmídeo de interesse (vetor 1054 utilizando a região LTR) e uma curva para o gene interno (β -globina). Para a obtenção da curva padrão para o vetor, inicialmente, foi calculada a quantidade de picogramas que teriam 2×10^6 cópias de 1054. Da seguinte maneira: $1 \text{ mol} = 1 \text{ g} = 6,022 \times 10^{23} \text{ Da}$; $1 \text{ Da} = 1,6606 \times 10^{-24} \text{ g}$; uma cópia do vetor 1054 = $9,7 \times 10^6 \text{ Da}$. Seguindo a regra de três: $2 \times 10^6 \text{ cópias de } 1054 = 1,94 \times 10^{13} \text{ Da}$, o que equivale a X g. Assim:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ Da} \text{ ----- } 1,6606 \times 10^{-24} \text{ g} \\ X = 32,24 \text{ g} \end{array}$$

Desta forma, 2×10^6 cópias de 1054 tem 32,24 g. Com este dado foi realizada uma diluição seriada a partir de 10^6 plasmídeos até 10^1 .

A curva padrão para o gene interno foi criada com a extração do DNA genômico de 3×10^6 células de 293T e SK-Hep-1 transduzidas (*DNeasy Blood & Tissue Kit* - *Qiagen*), calculando-se em pg/ μL a partir da massa (pg) do DNA, obtida pela multiplicação do peso do genoma contido em uma célula (3,3 pg) pela concentração do DNA extraído da célula. Foram feitas diluições do DNA da célula de 10^5 a 10^1 , e essa curva foi utilizada na reação com o *primer* para o gene endógeno β -globina (*Applied Biosystems*).

A reação foi realizada com 7,5 μL do *SYBR[®]Green PCR Master Mix* juntamente com 3,2 pmol do *primer* P5-LTR ou β -globinaF e 3,2 pmol do *primer* P3-LTR ou β -globinaR em um volume final de 15 μL , sendo 2 μL de DNA. A amplificação foi realizada a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 10 minutos (50 ciclos).

Para a análise da reação de amplificação, foi estabelecido o limiar onde a curva de amplificação estava mais acentuada, tanto para a região LTR viral como para o controle interno. Cada amostra foi submetida a quantificação em duplicata e, a partir dos dados gerados, foi possível obter a média dos valores obtidos referentes às regiões LTR e β -globina.

A média encontrada para o LTR em cada uma das linhagens foi dividida pela média para a β -globina para obtenção do número de cópias virais por célula.

4.2.7.4 Avaliação do efeito de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na expressão de FIX recombinante

Para a avaliação do efeito dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na expressão de FIX recombinante humano, foi realizada uma cinética de produção por um período de 5 dias. Para isso, as linhagens celulares humanas foram, inicialmente, mantidas em cultura por um período de no mínimo 10 dias com meio de cultura DMEM 10% SFB suplementado com concentrações variáveis de CaCl_2 e MgCl_2 . Como controle do experimento, foi utilizado meio DMEM + 10% SFB.

Os meios de cultura utilizados estão descritos abaixo:

1. DMEM + 0,5 mMol/L CaCl_2 /1,0 mMol/L MgCl_2
2. DMEM + 1,0 mMol/L CaCl_2 /0,5 mMol/L MgCl_2
3. DMEM + 1,0 mMol/L CaCl_2 /1,0 mMol/L MgCl_2

A cinética de produção do FIX recombinante foi realizada plaqueando-se 3×10^6 células (cerca de 70% de confluência) em garrafas de cultura T75 no dia 1 com um volume de meio de 15 mL. No dia seguinte, com as células aderidas, o meio foi trocado por 6 mL dos diferentes meios. A cada 24 horas, durante três dias, foram retiradas alíquotas de 500 μL de sobrenadante que foram centrifugados por 10 minutos a $200 \times g$ e congelados a -80°C para posterior análise da atividade biológica por ensaio cromogênico. O mesmo volume de meio das alíquotas de sobrenadante retiradas era adicionado de volta à garrafa de cultura para que o volume final se mantivesse em 6 mL. O experimento foi realizado em duplicata.

Para a análise da influência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na expressão de FIX recombinante foi utilizado o Teste t, método paramétrico e não pareado.

Para a análise das diferenças estatísticas na expressão de FIX recombinante ativo entre os diferentes tempos escolhidos para cada condição foi utilizado o Teste one way ANOVA e o Teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.

Resultados

5 Resultados

5.1 Clonagem e expressão de FIX recombinante humano nas linhagens celulares

5.1.1 Clonagem do cDNA do FIXrh no vetor de expressão 1054

O fragmento de DNA relativo ao cDNA completo do FIX de coagulação humano foi isolado do plasmídeo pCMV5FIX (*American Type Culture Collection* - ATCC) através de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos.

Após a termociclagem, foi observada em gel de agarose a amplificação de uma banda única de 1.407 pb. A figura 12 mostra o fragmento de interesse amplificado.

Figura 12 - Visualização em gel de agarose 1% da banda referente ao cDNA do FIXh, após a amplificação por PCR. Marcador de peso molecular 1Kb (10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000, 500 pb).

Após a amplificação, esse fragmento foi purificado e subclonado no vetor TOPO-PCR2.1 (*Invitrogen*). Foi realizada uma digestão com as enzimas de restrição *SalI* e *SmaI* para

verificar quais os clones de bactérias transformadas com o vetor clonado possuíam o inserto de interesse. Os clones positivos liberaram a banda de 1407 pb, referente ao FIXh e uma banda de 3,9 Kb referente ao vetor PCR 2.1.

A figura 13 mostra um gel de agarose 1% contendo 5 clones positivos para o cDNA do FIXh (PCR 2.1-FIX), após a digestão com as enzimas citadas acima. A banda de maior peso molecular que aparece nas raias 1 a 5 é referente ao vetor PCR 2.1, e a banda de peso molecular de 1407 pb ao FIXh.

Figura 13 - Visualização em gel de agarose 1% das bandas das reações de digestão com *Sall* e *SmaI* dos vetores PCR2.1 com os insertos do cDNA do FIXh. As raias de 1 a 5 representam diferentes colônias de bactérias das quais foram extraídos os vetores PCR2.1-FIX. As setas à direita indicam o vetor PCR2.1 (3.900 pb) e o FIXh (1407 pb). Marcador de peso molecular 1Kb (10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000, 500 pb).

Paralelamente à obtenção do inserto, foi realizado o preparo do vetor 1054. Esse vetor foi digerido com *Sall* (5') e *SmaI* (3'). Após a digestão, prosseguiu-se com a extração com fenol-clorofórmio, defosforilação e purificação da banda em gel de agarose. Observa-se na figura 14 a banda do vetor após a purificação.

Figura 14 - Visualização em gel de agarose 1% da banda referente ao vetor de expressão lentiviral 1054, após digestão com as enzimas *Sall* e *SmaI* e purificação. Marcador de peso molecular 1Kb (12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 506 pb).

Após linearização e purificação dos DNAs, o vetor e o inserto foram ligados com o auxílio da T4 ligase. O produto da ligação foi usado para transformar bactérias. Posteriormente, foi realizada a minipreparação de plasmídeos e análise de restrição conforme descrito anteriormente (vide seção 4.2.1.9) para checar a ligação.

A análise de restrição dos clones 1054 ligados ao cDNA do FIXh foi efetuada com as enzimas *Sall* e *SmaI*. A banda esperada após a digestão com as enzimas de restrição é de 1407 pb. A figura 15 mostra 3 clones 1054 com o cDNA do FIXh após a digestão com as enzimas *Sall* e *SmaI*. As bandas de maior peso molecular representam o vetor 1054 (10.054 pb) e as bandas de menor peso molecular o FIXh (1407 pb).

Figura 15 - Visualização em gel de agarose 1% das bandas das reações de digestão com *Sall* e *SmaI* dos vetores 1054 com os insertos do cDNA do FIXh. As raias de 1 a 3 representam diferentes colônias de bactérias das quais foram extraídos os vetores 1054-FIX. As setas à direita indicam o vetor 1054 (10.054 pb) e o cDNA do FIXh (1407 pb). Marcador de peso molecular 1Kb (10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000, 500 pb).

5.1.2 Produção das partículas lentivirais e determinação do título viral

A produção das partículas lentivirais foi feita por transfecção das células 293T utilizando-se Lipofectamine™ 2000. A titulação viral foi determinada pela medida da expressão de EGFP das células transduzidas por citometria de fluxo.

O título viral obtido foi de $13,26 \times 10^6$ vírus/mL e a multiplicidade de infecção (MOI) obtida pela divisão do título viral pelo número de células plaqueadas foi de 66,3 vírus/célula. A figura 16 mostra a porcentagem, medida por FACS, das células 293T transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX expressando EGFP. O valor 66,30%, descontando-se a porcentagem obtida nas células não transduzidas (0,30%), foi utilizado no cálculo do título viral.

Figura 16 - Expressão do gene repórter EGFP nas células 293T transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX medida através de citometria de fluxo.

5.1.3 Transdução das linhagens celulares

As duas linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 foram transduzidas com o vetor 1054-FIX a fim de expressar o FIX recombinante.

Para a transdução, foram plaqueadas 2×10^5 células de cada linhagem que foram incubadas com $13,26 \times 10^6$ vírus (1054-FIX). A MOI utilizada foi de 66,3 vírus/célula. A tabela 4 mostra a eficiência de transdução entre as duas linhagens utilizadas após 3 ciclos de transduções.

Tabela 4 - Transdução das linhagens celulares com o vetor lentiviral 1054-FIX. Determinação da eficiência de transdução por citometria de fluxo (células EGFP positivas) para cada linhagem celular.

<i>Linhagem celular</i>	<i>Transdução - 1054-FIX</i> (% de células EGFP ⁺)	<i>Controle negativo</i> (% células EGFP ⁺)
293T	84,5	< 1
SK-Hep-1	82,0	< 1

A figura 17 mostra a morfologia das células 293T e SK-Hep-1 não transduzidas e transduzidas com vetor 1054-FIX. As células 293T-1054-FIX mostradas em A e SK-Hep-1-1054-FIX mostradas em C apresentam expressão de EGFP como pode ser visualizada nas fotografias de microscopia óptica de fluorescência. As células controles 293T (em B) e SK-Hep-1 (em D) são visualizadas por fotografias de microscopia óptica de contraste de fase.

Figura 17 - Fotografias mostrando a morfologia das células 293T e SK-Hep-1 transduzidas com o vetor de expressão lentiviral 1054-FIX e não transduzidas. Imagens de microscopia óptica. A) Células 293T transduzidas expressando EGFP (microscopia de fluorescência). B) Células 293T não transduzidas (microscopia de contraste de fase). C) Células SK-Hep-1 transduzidas expressando EGFP (microscopia de fluorescência). D) Células SK-Hep-1 não transduzidas (microscopia de contraste de fase).

5.1.4 Seleção das células transduzidas

As células transduzidas, após 15 dias de cultura, foram selecionadas por citometria de fluxo (FACSARIA). A seleção foi baseada na expressão de EGFP. Após a seleção, as células foram expandidas para posterior avaliação da expressão de FIX recombinante.

A figura 18 mostra a eficiência da citometria em selecionar células que expressam EGFP. As letras A e C mostram as linhagens 293T e SK-Hep-1 não transduzidas, respectivamente, usadas como controle. As letras B e D mostram células 293T e SK-Hep-1 transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX, respectivamente. As células dentro do quadrante Q2 referente às células 293T-1054-FIX (em B) e Q2-1 referente às células SK-Hep-1-1054-FIX (em D) são EGFP positivas. Porém, os quadrantes P3 com 72% (em B) e P2 com 57% (em D) representam as células com maior expressão de EGFP e que foram selecionadas para expansão.

A)

B)

C)

D)

Figura 18 – *Dot plots* de citometria de fluxo exemplificando o processo de seleção das células 293T e SK-Hep-1 infectadas com vetor lentiviral 1054-FIX. As células que apresentaram maior expressão de EGFP foram selecionadas e separadas.

5.1.5 Caracterização da expressão de FIXrh nas linhagens celulares

Após a determinação da eficiência de transdução em cada uma das linhagens celulares, as populações selecionadas foram submetidas à análise de quantificação total de proteína, à avaliação da expressão de FIXrh biologicamente ativo e à caracterização da proteína presente nos sobrenadantes celulares.

5.1.5.1 Determinação da quantificação total de FIXrh

A avaliação da quantificação total de FIX recombinante expresso pelas linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 foi realizado pelo ensaio ELISA, utilizando-se o sobrenadante dessas células, após 48 horas de incubação, após a última troca de meio.

Considerando que o FIX é uma proteína dependente de vitamina K, as células foram tratadas com vitamina K por um período mínimo de 10 dias antes da análise. Todos os valores obtidos em porcentagem de atividade de FIX foram comparados com valores obtidos de plasma humano como referência e calculados em ng/10⁶ células.

Tabela 5 - Quantificação total de FIX recombinante nas linhagens celulares 293T e SK-Hep-1

<i>Linhagem celular</i>	<i>FIX - ng/10⁶ céls (48 horas)</i>
293T	-
293T-1054-FIX	500,0
SK-Hep-1	-
SK-Hep-1-1054-FIX	803,0

Conforme a tabela 5, as células SK-Hep-1 produzem 803 ng por 10⁶ células de FIXrh, o que representa 1,6 vezes mais que a quantidade de FIXrh expresso pelas células 293T (500 ng/10⁶ céls).

5.1.5.2 Análise da atividade biológica de FIXrh

A análise da atividade biológica de FIX recombinante nas linhagens renal e hepática foi realizada pelo ensaio cromogênico. O mesmo sobrenadante celular obtido, após 48 horas de incubação com meio DMEM 10% SFB, para realização do ensaio ELISA foi utilizado para a realização do ensaio de atividade. Todos os valores obtidos em porcentagem de atividade de FIX foram comparados com valores obtidos de plasma humano como referência e calculados em UI/mL (1 UI/mL = 100% de atividade).

Tabela 6 - Análise da atividade biológica de FIX recombinante nas linhagens celulares 293T e SK-Hep-1

<i>Linhagem celular</i>	<i>Atividade (%)</i>	<i>FIX - UI/10⁶ céls (48 horas)</i>
293T	-	-
293T-1054-FIX	25	0,047
SK-Hep-1	-	-
SK-Hep-1-1054-FIX	12,2	0,186

De acordo com a tabela 6, as células SK-Hep-1 transduzidas apresentam o dobro da atividade biológica das células 293T-1054-FIX. Analisando-se a produção específica de FIXrh, podemos notar que a linhagem hepática produz, aproximadamente, 4 vezes mais FIX recombinante ativo que a linhagem renal.

Com os dados obtidos através da quantificação total e da produção específica de FIX recombinante ativo podemos comparar a eficiência de γ -carboxilação da proteína realizada pelas linhagens celulares humanas (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação entre a eficiência de γ -carboxilação do FIX recombinante pelas linhagens celulares humanas através dos dados obtidos pelos ensaios ELISA e cromogênico.

Linhagens Celulares	Razão entre FIX total e FIX ativo
293T-1054-FIX	3,54
SK-Hep-1-1054-FIX	1,44

Analisando os dados da tabela 7, podemos observar que a linhagem celular 293T expressa, aproximadamente, 3,5 proteínas recombinantes inativas para cada proteína biologicamente ativa, enquanto que as células SK-Hep-1 expressam, praticamente, todas as suas proteínas funcionais. Isto demonstra que as células hepáticas possuem uma maior eficiência de γ -carboxilação do FIXrh, modificação pós-traducional crucial para o papel do FIX na coagulação sanguínea.

5.1.5.3 Caracterização da proteína FIXrh por *western blot*

As amostras de meio de cultura concentradas das linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 transduzidas estavelmente com o vetor 1054-FIX e das células não transduzidas foram submetidas à análise da proteína recombinante por *western blot*.

Para tanto, 24 horas antes da coleta do sobrenadante, foi adicionado às culturas celulares o meio DMEM isento de soro fetal bovino. Em seguida, as proteínas presentes no sobrenadante das linhagens humanas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE.

Conforme mostra a figura 19 A, a análise do perfil eletroforético das proteínas presentes no sobrenadante das células 293T e SK-Hep-1 transduzidas e não transduzidas mostra um perfil proteico complexo com presença de proteínas de distintos pesos moleculares, com enriquecimento na faixa entre 60 e 70 kDa.

Figura 19 – Caracterização da proteína FIXrh no sobrenadante das linhagens celulares 293T e SK-Hep-1. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie ColoidalG-250. Em cada canaleta foram aplicados 10 µg de proteínas. 1- 293T; 2- 293T-1054-FIX; 3- SK-Hep-1; 4-SK-Hep-1-1054-FIX. B) Identificação da proteína FIXrh por *western blot*. Observa-se uma banda imunoreativa de tamanho esperado de 57 kDa nas células produtoras de FIXrh e ausência da mesma nas células controle. Marcador de peso molecular (140, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20 kDa).

O *western blot* foi realizado utilizando-se o anticorpo monoclonal específico para o FIX e observou-se uma banda imunoreativa do tamanho aproximado de 57 kDa no sobrenadante das duas células produtoras de FIXrh (Figura 19 B, raias 2 e 4), confirmando a secreção deste fator de coagulação recombinante pelas células 293T e SK-Hep-1 transduzidas e a ausência desta proteína no sobrenadante das células não transduzidas (Figura 19 B, raias 1 e 3).

5.2 Caracterização das células produtoras de FIXrh

As linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 produtoras de FIXrh foram submetidas a um acompanhamento da expressão de FIXrh ao longo do tempo; à análise do perfil de expressão de RNAm dos genes relacionados à γ -carboxilação; à avaliação do crescimento celular; à determinação do número de cópias lentivirais integradas e à avaliação da influência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na expressão de FIXrh a fim de caracterizar o perfil de expressão dessas células geneticamente modificadas.

5.2.1 Avaliação da expressão de FIXrh ativo

Com o intuito de avaliar o perfil de produção de FIX recombinante humano ativo ao longo do tempo, foi realizado um acompanhamento de cerca de 180 dias. As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram mantidas em cultura, após a seleção por citometria de fluxo, durante o período mencionado e ao longo desse tempo foram realizados ensaios de atividade biológica por meio do teste cromogênico, baseando-se no protocolo descrito na seção 4.2.6.1.

De acordo com a figura 20, a produção de FIXrh ativo pelas células SK-Hep-1 apresentou um pico de $0,44 \text{ UI}/10^6$ células nos primeiros dias após a seleção por citometria de fluxo e ao longo de cerca de 90 dias variou sua produção entre $0,10$ e $0,18 \text{ UI}/10^6$ células. Entretanto, após 180 dias, a expressão de FIXrh nestas células não se manteve, caindo para $0,0025 \text{ UI}/10^6$ células.

Com relação às células 293T, os picos de produção de FIXrh ativo ocorreram mais tardiamente, 0,139 UI/10⁶ células e 0,071 UI/10⁶ células entre 42 e 63 dias, respectivamente. Após esse período, a produção se manteve estável com 0,040 UI/10⁶ células.

Figura 20 – Produção específica de FIX recombinante humano ativo nas células SK-Hep-1 e 293T transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX durante um período de 180 dias.

Ao longo do mesmo período, foi avaliada também a expressão de EGFP nas duas linhagens celulares humanas, como pode ser observado na figura 21. A linhagem SK-Hep-1 apresentava 82% de células EGFP positivas antes da seleção por citometria de fluxo, entretanto, ao final de 180 dias, a expressão desta proteína repórter chegou a 5,54%. A expressão de EGFP nas células 293T antes do *sorting* era de 84,5% e durante o período avaliado constatou-se uma queda na expressão desta proteína de cerca de 27,4% chegando a 57,13%.

Figura 21 - Comparação da expressão de EGFP nas linhagens celulares humanas transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX ao longo de 180 dias. Valores obtidos por ensaios de citometria de fluxo.

5.2.2 Perfil de expressão de RNAm dos genes relacionados à γ -carboxilação

Com o intuito de caracterizar as linhagens celulares humanas quanto à expressão dos genes envolvidos no processo de γ -carboxilação, foi realizada a quantificação por PCR em tempo real da expressão dos genes γ -Carboxilase e vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKORC1), além do gene inibitório Calumenina como mostra a figura 22 abaixo.

Figura 22 - Expressão relativa dos genes Calumenina, γ -Carboxilase e VKORC1 nas linhagens celulares humanas, utilizando como genes endógenos GAPDH e β -actina.

Fazendo a análise das expressões destes genes nas duas células, encontramos que em relação aos genes envolvidos no processo de γ -carboxilação, a linhagem celular 293T é a que mais expressa γ -carboxilase e, principalmente, VKORC1. As células não transduzidas expressaram 591,13 unidades relativas de expressão (URE) do gene γ -carboxilase e 8.598,07 URE do gene VKORC1. As células transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX apresentaram maior expressão desses genes, 721,06 URE e 11.091,91 URE, respectivamente. Contudo, as células SK-Hep-1 apresentaram expressão bem inferior, com 242,22 URE do gene da γ -carboxilase e 892,64 URE do gene VKORC1. As células hepáticas transduzidas expressaram ainda menos γ -carboxilase (120,56 URE), entretanto, a expressão do gene VKORC1 foi maior (1.113,08 URE).

Como observado no gráfico, as células 293T não transduzidas e transduzidas foram as que mais expressaram o gene inibitório calumenina, na ordem de 750,91 e 1302,34 URE, respectivamente. Enquanto que as células SK-Hep-1 não transduzidas e transduzidas apresentaram expressão menor desse gene inibitório, 434,05 e 483,23 URE, respectivamente.

A tabela 8 demonstra a razão entre a expressão do gene inibitório calumenina e a expressão dos genes envolvidos no processo de γ -carboxilação.

Tabela 8 - Razão entre a expressão dos genes calumenina, γ -carboxilase e VKORC1 nos dois tipos celulares analisados.

<i>Linhagem celular</i>	<i>Razão (VKORC1/ Calumenina)</i>	<i>Razão (VKORC1/γ- carboxilase)</i>	<i>Razão (Calumenina/ γ-carboxilase)</i>
293T	11,50	14,5	1,28
293T-1054-FIX	8,52	15,4	1,81
SK-Hep-1	2,06	3,7	1,80
SK-Hep-1-1054-FIX	2,30	9,2	4,00

Como mostrado na tabela 8, as células 293T apresentaram a maior razão entre a expressão dos genes VKORC1 e calumenina, bem como entre os genes VKORC1 e γ -carboxilase e a menor razão entre os genes calumenina e γ -carboxilase.

Analisando somente as células 293T-1054-FIX e SK-Hep-1-1054-FIX, podemos notar que as células renais apresentaram uma razão, aproximadamente, 4 vezes maior entre os genes VKORC1 e calumenina, e 1,7 vezes maior entre os genes VKORC1 e γ -carboxilase. Com relação à razão dos genes calumenina e γ -carboxilase, encontramos um valor 2 vezes menor.

Desta maneira, as linhagens celulares transduzidas apresentaram maior expressão dos genes envolvidos no processo de γ -carboxilação, e as diferenças de expressão dos genes analisados em cada célula influencia a expressão de FIXrh.

5.2.3 Avaliação do crescimento celular

Para caracterizar o crescimento celular das linhagens humanas foi realizada uma cinética de crescimento por um período de 7 dias para determinar a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) e o tempo de duplicação (t_d) (Figura 23).

Figura 23 – Curvas de crescimento e viabilidade celular das linhagens 293T e SK-Hep-1 ao longo de 7 dias de cultivo. As células foram cultivadas em placas de cultura de 100 mm em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, a 37°C com uma concentração celular inicial de 1×10^5 cél/mL. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 amostras diferentes de cada célula, bem como seus respectivos desvios padrão (barras verticais).

As células 293T transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX, apresentou uma velocidade específica máxima de crescimento celular, $\mu_{\text{máx}}$, de $0,0362 (\pm 0,0021) \text{ h}^{-1}$. Essa velocidade específica máxima de crescimento celular corresponde a um tempo de duplicação de 19,15 horas (Tabela 9). Essa linhagem cresceu até o sétimo dia, atingindo um número máximo de células de $1,09 \times 10^7$, o que representa uma expansão de 109 vezes, considerando o número de células plaqueadas. As células 293T-1054-FIX apresentaram diferenças estatísticas nos dias 3, 5 e 7 de cultivo ($p < 0,05$) em relação ao crescimento das células 293T não transduzidas.

As células SK-Hep-1-1054-FIX apresentaram um $\mu_{\text{máx}}$ de $0,0264 (\pm 0,0010) \text{ h}^{-1}$. Essa velocidade específica máxima de crescimento celular corresponde a um tempo de duplicação de 26,26 horas. Diferentemente das células 293T, a linhagem hepática atingiu seu crescimento máximo no sexto dia de cultivo ($2,22 \times 10^6$ células) (Tabela 9), apresentando uma expansão de cerca de 22,2 vezes, considerando o número inicial de células. Essas células apresentaram diferenças significativas de crescimento em relação às células SK-Hep-1 não transduzidas em todos os dias de cultivo, com exceção do primeiro dia ($p < 0,05$).

Com relação à viabilidade celular, todas as linhagens analisadas apresentaram, no mínimo, 90 % de células viáveis durante todo o experimento (Figura 23).

Tabela 9 - Comparação dos valores de crescimento máximo ($X_{\text{máx}}$), de velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (t_d) das linhagens celulares 293T e SK-Hep-1.

<i>Linhagem celular</i>	<i>$X_{\text{máx}}$</i>	<i>Dia</i>	<i>$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$</i>	<i>$t_d (\text{h})$</i>
293T	$8,03 \times 10^6$	7	$0,0333 (\pm 0,0012)$	20,86
293T-1054-FIX	$1,09 \times 10^7$	7	$0,0362 (\pm 0,0021)$	19,15
SK-Hep-1	$8,23 \times 10^6$	6	$0,0323 (\pm 0,0022)$	21,46
SK-Hep-1-1054-FIX	$2,22 \times 10^6$	6	$0,0264 (\pm 0,0010)$	26,26

Conforme mostrado na tabela 9, as células 293T-1054-FIX apresentaram uma expansão de 109 vezes, enquanto as células não transduzidas apresentaram uma expansão aproximada de 80 vezes, considerando o número inicial de células. Essa diferença representa 1,3 vezes a mais de crescimento da célula transduzida em comparação com a não transduzida. Nas células hepáticas, as transduzidas apresentaram uma expansão, aproximadamente, 4 vezes menor que as células não transduzidas.

Desse modo, o tempo de duplicação das células renais foi menor que o da linhagem hepática.

5.2.4 Número de cópias virais inseridas

O DNA das células transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX foi coletado para a identificação do número de cópias integradas através de qPCR pela metodologia de *SYBR[®]Green*.

Para a determinação do número de cópias por qPCR foram utilizados oligonucleotídeos específicos para a região 3' do LTR para a amplificação do vetor derivado do HIV-1. Como controle interno, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene da β -globina, para normalizar a quantidade de DNA genômico de cada amostra.

Cada amostra foi submetida à quantificação em duplicata e, a partir dos dados gerados, foi possível obter a média dos valores obtidos referentes às regiões LTR e β -globina. A média encontrada para o LTR em cada uma das linhagens foi dividida pela média para a β -globina para obtenção do número de cópias virais por célula.

A quantificação do número de cópias virais de cada linhagem está disposta na tabela 10.

Tabela 10 - Quantificação do número de cópias do vetor lentiviral 1054-FIX inseridas no genoma das linhagens celulares 293T e SK-Hep-1.

<i>Linhagem celular</i>	<i>Nº de cópias virais inseridas (vírus/célula)</i>
293T	7,67
SK-Hep-1	17,0

Como mostrado na tabela 10, a linhagem SK-Hep-1 transduzida com o vetor lentiviral 1054-FIX apresentou uma média de 17 cópias do vetor/célula, valor este que representa 2,2 vezes mais integrações do que a célula renal 293T que apresentou, em média, 7,67 cópias do vetor/célula.

A tabela 11 apresenta a quantificação de FIXrh total bem como a produção específica de FIXrh ativo por cópia viral inserida no genoma celular das linhagens 293T e SK-Hep-1.

Tabela 11 - Caracterização das linhagens celulares transduzidas quanto à produção de FIXrh total e ativo por cópia viral inserida no genoma celular.

<i>Linhagem celular</i>	<i>FIXrh total - ng/10⁶ céls (48 hs)</i>	<i>ng FIXrh total de 1 cópia/célula</i>	<i>FIXrh ativo - UI/10⁶ céls (48 hs)</i>	<i>UI de FIXrh ativo de 1 cópia/célula</i>
293T	500,0	65,2	0,047	0,006
SK-Hep-1	803,0	47,2	0,186	0,011

A produção de FIXrh total da célula hepática de 1 cópia/célula (47,2 ng/10⁶ céls) foi cerca de 1,4 vezes menor que a 293T (65,2 ng/10⁶ céls) enquanto que a produção de FIXrh ativo de 1 cópia/célula foi, aproximadamente, 2 vezes maior nas células SK-Hep-1.

5.2.5 Avaliação do efeito dos íons Ca⁺² e Mg⁺² na produção de FIXrh

Para a avaliação do efeito dos íons Ca⁺² e Mg⁺² na expressão de FIX recombinante humano foi realizada uma cinética de produção por um período de 5 dias, no qual as células atingiram sua confluência máxima.

Neste experimento, foram avaliadas 3 concentrações de íons Ca⁺² e Mg⁺². Foram plaqueadas 3 x 10⁶ células de cada linhagem celular transduzida para cada condição de cultura e, ao final de 5 dias, estas células foram contadas pelo método de exclusão do azul de tripan. A figura 24 apresenta um gráfico de número de células 293T-1054-FIX viáveis em cada uma das condições de cultura celular após 5 dias de cultivo.

Figura 24 – Número de células 293T-1054-FIX viáveis em meios de cultura DMEM suplementados com diferentes concentrações de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 5 dias de cultivo celular.

Como mostrado na figura 24, a condição de cultura DMEM suplementado com 1 mmol/L Ca^{+2} e 0,5 mmol/L Mg^{+2} apresentou o maior número de células viáveis ($1,67 \times 10^7$), enquanto que o meio DMEM suplementado com 1 mmol/L Ca^{+2} e 1 mmol/L Mg^{+2} teve o menor número de células vivas ($8,23 \times 10^6$). Entretanto, não houve diferenças estatísticas entre o crescimento das células renais nos meios suplementados com os íons já mencionados em relação ao meio de cultura DMEM.

A figura 25 apresenta o gráfico de número de células SK-Hep-1-1054-FIX viáveis em cada uma das condições de cultura celular após 5 dias de cultivo.

Figura 25 – Número de células SK-Hep-1-1054-FIX viáveis em meios de cultura DMEM suplementados com diferentes concentrações de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 5 dias de cultivo celular.

Com relação às células SK-Hep-1-1054-FIX, podemos observar que houve diferença estatística entre a condição controle (DMEM) que apresentou o maior número de células viáveis ($7,6 \times 10^6$) e a condição DMEM suplementado com 0,5 mmol/L Ca^{+2} e 1 mmol/L Mg^{+2} que apresentou o menor número de células viáveis ($5,3 \times 10^6$) ($p < 0,05$).

A cinética de produção volumétrica de FIXrh nas linhagens celulares nos diferentes meios foi realizada coletando-se alíquotas de sobrenadante da cultura celular a cada 24 horas durante 3 dias e realizando-se o ensaio cromogênico. A figura 26 mostra a cinética de produção volumétrica de FIXrh nas células 293T-1054-FIX.

Figura 26 - Avaliação da influência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na produção volumétrica de FIX recombinante ativo em células 293T-1054-FIX.

Em todas as concentrações testadas, observaram-se diferenças estatísticas entre as mesmas e a condição controle (DMEM) nas primeiras 24 horas avaliadas, destacando-se o meio suplementado com 0,5 mmol/L Ca^{+2} e 1 mmol/L Mg^{+2} (0,068 UI/mL) ($p < 0,05$). Avaliando-se o período de 48 horas, podemos notar que houve diferença estatística somente entre o meio controle (0,078 UI/mL) e o meio DMEM suplementado com 0,5 mmol/L Ca^{+2} e 1 mmol/L Mg^{+2} (0,124 UI/mL) ($p < 0,05$). Com relação ao período final de 72 horas, não foi possível observar diferenças significativas entre a produção volumétrica de FIXrh entre as condições de cultura analisadas.

Finalmente, foi avaliado qual o melhor período de tempo para a obtenção de FIXrh para as condições que apresentaram diferenças estatísticas (controle e o meio DMEM suplementado com 0,5 mmol/L Ca^{+2} e 1 mmol/L Mg^{+2}). Para a condição controle, não houve diferenças significativas entre os três tempos analisados, entretanto, para o meio DMEM suplementado com 0,5 mmol/L Ca^{+2} e 1 mmol/L Mg^{+2} , o período de 48 horas se mostrou estatisticamente melhor ($p < 0,05$).

A produção específica de FIXrh nas células 293T foi avaliada no período de 72 horas, quando foi possível a contagem das células devido ao fim do experimento. Não houve

diferenças estatísticas entre o meio controle (0,046 UI/10⁶ células) e as suplementações de Ca⁺² e Mg⁺² (0,074 UI/10⁶ células, 0,045 UI/10⁶ células e 0,072 UI/10⁶ células) (Figura 27).

Figura 27 - Avaliação da influência dos íons Ca⁺² e Mg⁺² na produção específica de FIXrh ativo em células 293T após 72 horas de cultivo utilizando o Teste t.

Com relação à cinética de produção volumétrica da linhagem celular SK-Hep-1, podemos observar que houve diferenças estatísticas entre a condição controle (0,191 UI/mL) e os meios suplementados com 1 mmol/L Ca⁺² e 0,5 mmol/L Mg⁺² (0,114 UI/mL) e 0,5 mmol/L Ca⁺² e 1 mmol/L Mg⁺² (0,134 UI/mL) ($p < 0,05$) nas primeiras 24 horas. Entretanto, nos demais tempos não houve diferenças estatísticas entre as condições testadas, sendo obtida a maior produção de FIXrh no meio controle (0,236 UI/mL em 48 horas e 0,275 UI/mL em 72 horas) (Figura 28).

Figura 28 - Avaliação da influência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na produção volumétrica de FIX recombinante ativo em células SK-Hep-1-1054-FIX.

Como não foram observadas diferenças significativas entre as condições testadas nos demais tempos, foi realizada uma análise para definir qual o melhor período de tempo para a obtenção de FIXrh para o meio DMEM. Da mesma maneira que para as células 293T, não foram observadas diferenças estatísticas entre os períodos de tempo analisados.

A figura 29 mostra a produção específica de FIXrh da linhagem SK-Hep-1 ao final de 72 horas.

Figura 29 - Avaliação da influência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na produção específica de FIXrh ativo em células SK-Hep-1 após 72 horas de cultivo utilizando o Teste t.

Como mostrado na figura 29, podemos observar que o meio DMEM suplementado com 0,5 mmol/L Ca^{+2} e 1 mmol/L Mg^{+2} apresentou a maior produção de FIX (0,256 UI/10⁶ células), entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre as condições testadas e a controle.

Discussão

6 Discussão

A hemofilia B é uma doença caracterizada pela deficiência quantitativa ou qualitativa do FIX, o que leva os pacientes a uma incapacidade de produzir adequadamente um coágulo estável após um dano no tecido. A incidência dessa doença na sua forma mais grave representa, aproximadamente, 20% de todos os hemofílicos do mundo (ORLOVA *et al.*, 2012). Atualmente, o tratamento dessa doença é baseado na administração do FIX de coagulação derivado de plasma humano ou da proteína recombinante produzida em células murinas, porém essas abordagens apresentam alto custo (EVATT *et al.*, 2004; SCHAUB, 2011), estão intimamente associadas à contaminações com vírus e príons (FULCHER *et al.*, 1984), além do desenvolvimento de inibidores de FIX (SHAPIRO *et al.*, 2005; RAGNI *et al.*, 2002; VERMA *et al.*, 2010; SCHAUB, 2011). O FIX derivado do plasma ainda apresenta quantidades detectáveis de FIX ativo e níveis residuais de outros fatores pró-coagulantes, os quais podem resultar em risco significativo de episódios trombóticos (ORLOVA *et al.*, 2012).

Os sistemas de expressão baseados em células humanas podem prover características únicas aos produtos biofarmacêuticos, incluindo baixa imunogenicidade, maior atividade biológica e aumento na meia-vida dessas proteínas (JACOBS; CALLEWAERT, 2009).

Não existe ainda nenhum produto comercial derivado de linhagem celular humana que expresse esse fator de coagulação, desta maneira, para a sua produção é necessário a modificação genética de células com vetores contendo o FIX. Por consequência, o trabalho descrito teve como objetivo principal clonar e expressar o FIX de coagulação sanguínea humana recombinante em linhagens celulares humanas utilizando o sistema de expressão lentiviral.

A molécula recombinante FIX gerada nesse trabalho contém a região codificante completa do cDNA relativo ao FIX e foi isolada do plasmídeo pCMV5FIX (ATCC). O cDNA do FIX foi subclonado no vetor lentiviral de terceira geração 1054, por PCR, e o mesmo foi utilizado para a geração de duas linhagens celulares humanas carreadoras do cDNA relativo ao FIX de coagulação sanguínea humana integrado em seus genomas.

A construção escolhida para transduzir as linhagens celulares foi um vetor lentiviral bicistrônico pseudotipado. Esses vetores integram no cromossomo da célula alvo e são capazes de expressar o gene terapêutico por um longo período de tempo. A troca do envelope viral do HIV-1 pelo do vírus VSV-G permite que as partículas lentivirais formadas tenham a habilidade de transduzir vários tipos celulares (BONTEMPO *et al.*, 1987). A utilização do

promotor CMV, que não é tecido-específico, permite a expressão de uma variedade de proteínas. O gene repórter utilizado, EGFP, tem a vantagem de não necessitar da adição de fatores externos, como substratos, anticorpos ou enzimas, para que a fluorescência seja detectada.

A eficiência de transdução das linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 foi muito semelhante, apresentando valores elevados de expressão de EGFP, 84,5% e 82%, respectivamente, confirmando a habilidade desse tipo de vetor em transduzir diversos tipos celulares.

A análise da expressão de FIXrh no sobrenadante mostrou que as linhagens celulares testadas foram capazes de produzir o fator de coagulação recombinante. Através dos ensaios ELISA que quantifica o total de FIXrh secretado, e cromogênico, que quantifica o FIXrh ativo, podemos observar que as células 293T apresentaram 500 ng de proteína em 10^6 células e 0,047 UI de proteína biologicamente ativa em 10^6 células. As células hepáticas apresentaram valores de produção e atividade superiores no ELISA (803 ng/ 10^6 células) e no cromogênico (0,186 UI/ 10^6 células).

Pela técnica de *western blot* foi possível detectar o FIXrh apenas nas linhagens celulares transduzidas. A banda imunoreativa de FIXrh referente ao sobrenadante das células 293T-1054-FIX demonstrou maior quantidade dessa proteína em relação ao sobrenadante das células SK-Hep-1-1054-FIX. Isso ocorreu devido ao fato desta quantificação proteica não estar normalizada para número de células, como foi realizado para os ensaios de ELISA e cromogênico.

Diversas linhagens celulares veem sendo testadas quanto a sua capacidade em expressar FIX. A tabela 12 apresenta os últimos trabalhos publicados e as linhagens celulares utilizadas.

Pela análise desta tabela podemos observar que a produção de FIXrh é geralmente pequena, não alcançando 1 UI/mL ou 1 UI/ 10^6 células.

Tabela 12 – Expressão de FIX recombinante em diferentes sistemas *in vitro*.

Célula	Vetor	FIXrh	Tempo de medida (hs)	Dosagem de FIXrh	Referência
HepG2	Retrovírus	0,59 UI/10 ⁶	24	aPTT*	FERNANDES <i>et al.</i> , 2011
Hek 293	Retrovírus	0,32 UI/10 ⁶	24	aPTT	FERNANDES <i>et al.</i> , 2011
S2	Plasmídeo	0,157 UI/mL	72	aPTT	VATANDOOST <i>et al.</i> , 2012
CHO	Plasmídeo	0,022 UI/mL	72	aPTT	VATANDOOST <i>et al.</i> , 2012
Miotubos	Adenovírus	0,91 UI/mL	24	aPTT	ARRUDA <i>et al.</i> , 2001
HepG2	Plasmídeo	1,1 ng/mL/10 ⁶ céls	96	ELISA	SAM <i>et al.</i> , 2010
BHK	Retrovírus	3µg/10 ⁶ céls	24	aPTT	WAJIH <i>et al.</i> , 2006
CHO	Plasmídeo	2,7x10 ⁻⁸ UI/cél	48	aPTT	DADEHBEIGI <i>et al.</i> , 2008
Hek 293	Plasmídeo	6,25x10 ⁻⁸ UI/cél	48	aPTT	DADEHBEIGI <i>et al.</i> , 2008
CHO	Plasmídeo	0,25 UI/mL	192	aPTT	KIM <i>et al.</i> , 2009

*aPTT – *activated Partial Thromboplastin Time* (teste da tromboplastina parcial ativada)

Devido as diferentes possibilidades de quantificar a expressão de FIXrh nas linhagens celulares, a comparação entre a produção desta proteína na literatura se torna uma tarefa difícil (Tabela 12). Entretanto, podemos notar as discrepâncias de produção da proteína em trabalhos de comparação entre linhagens diferentes como entre a HepG2 e a Hek 293 (FERNANDES *et al.*, 2011) e entre as células S2 e CHO (VATANDOOST *et al.*, 2012), diferenças que também ocorreram nas linhagens escolhidas para este trabalho.

A variedade no nível de expressão de FIXrh pode ser explicada por diferentes razões: a maior ou menor susceptibilidade a infecção viral; locais distintos de inserção no DNA

genômico; número de cópias virais presentes no genoma; diferenças na maquinaria de transcrição; maior ou menor estabilidade do RNAm relativo ao FIX recombinante; diferenças na maquinaria traducional e pós-traducional, entre outras.

A diferença nos valores encontrados para as duas linhagens celulares humanas avaliadas neste estudo sugere que a linhagem hepática secreta o FIXrh de maneira mais eficiente, quando comparado com a linhagem renal, haja vista que a linhagem hepática SK-Hep-1 produziu 1,6 vezes mais FIXrh e 4 vezes mais FIXrh ativo que as células renais 293T.

Fernandes e colaboradores (2011) avaliaram a expressão de FIXrh nas linhagens Hek 293 e HepG2 (linhagem celular de hepatócito humano, derivada de carcinoma hepatocelular) e constataram que as células hepáticas produziram cerca de 2 vezes mais proteína recombinante ativa que as células Hek 293.

Picanço e colaboradores (2007), em estudo sobre a expressão de FVIII, demonstraram que as células SK-Hep-1 expressaram cerca de 5,03 UI/mL em 10^6 células dessa proteína recombinante, enquanto que as células 293T expressaram somente 1,85 UI/mL em 10^6 células.

As diferenças observadas nos valores obtidos através dos ensaios ELISA e cromogênico, neste trabalho, se devem a complexa estrutura do fator de coagulação que necessita de diversas modificações pós-traducionais para desempenhar sua função na cascata de coagulação sanguínea.

A γ -carboxilação é a modificação pós-traducional responsável pela atividade biológica do FIX e consiste na conversão de 12 resíduos de Glu em resíduos de Gla por uma enzima dependente de vitamina K, a γ -carboxilase, no domínio Gla do FIX (HALLGREN *et al.*, 2002). Essa modificação pós-traducional ocorre em todas as proteínas dependentes de vitamina K, como o FVII e o FX.

A γ -carboxilase necessita da forma reduzida da vitamina K (hidroquinona de vit K - KH_2) como cofator. Ela converte a KH_2 em vitamina K epóxido e este produto é, subsequentemente, reciclado a KH_2 por uma redutase, a vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKOR) (PUDOTA *et al.*, 2000). Esse ciclo de redox da vitamina K é conhecido como ciclo da vitamina K (SUTTIE, 1978).

Através dos dados obtidos pelos ensaios de ELISA e cromogênico e fazendo uma razão entre eles, podemos observar que a linhagem celular SK-Hep-1 secreta, praticamente todas as suas proteínas ativas e, portanto, γ -carboxiladas, enquanto que somente uma proteína ativa é secretada para cada 3,5 proteínas inativas nas células renais.

Devido a essa condição, nas últimas décadas, o obstáculo fundamental para a produção de fatores de coagulação dependentes de vitamina K foi o baixo rendimento na expressão dessas proteínas recombinantes isoladas do sobrenadante celular para uso farmacêutico (WAJIH *et al.*, 2005; BERKNER, 1993; KAUFMAN *et al.*, 1986). Há registros na literatura que comprovam essa dificuldade na obtenção de fatores de coagulação com atividade biológica. Kaufman e colaboradores (1986) obtiveram concentrações de FIXrh total em células CHO de até 180 µg/mL, entretanto, a fração ativa, ou seja, completamente carboxilada, de FIXrh no meio foi somente 1,5 µg/mL.

Outros estudos envolvendo expressão de FIXrh em células CHO demonstraram que somente 60% das moléculas apresentavam todos os 12 resíduos de ácido glutâmico γ -carboxilados, 35% e 5% das proteínas apresentavam 11 ou 10 resíduos γ -carboxilados, respectivamente. Entretanto, o subfracionamento de cada uma dessas formas indicou que todas exibiam atividade pró-coagulante normais (GILLIS *et al.*, 1997; BOND *et al.*, 1998).

Vatandoost e colaboradores (2012) produziram níveis elevados de FIXrh total em células de *Drosophila Schneider* (S2) comparados com a produção em células CHO (cerca de 12 vezes mais), todavia, a fração de proteínas completamente carboxiladas foi cerca de 18-22%. As proteínas remanescentes secretadas (80%) eram pouco ou não carboxiladas.

Outros sistemas de expressão para a produção de FIXrh foram testados como a utilização de sementes de soja transgênicas. Essas sementes expressaram de 0,138 a 0,158 mg/mL de antígeno do FIXrh, entretanto, somente 1- 1,4% de atividade biológica (CUNHA *et al.*, 2011).

A análise de outras proteínas recombinantes da coagulação estruturalmente homólogas ao FIX e que apresentam conservação nas modificações pós-traducionais, como por exemplo, o FX da coagulação sanguínea também mostrou a dificuldade de se obter elevados níveis da proteína biologicamente ativa nas linhagens celulares CHO e Hek 293 (HIMMELSPACH *et al.*, 2000; CAMIRE *et al.*, 2000). Esses estudos demonstraram a geração de uma linhagem celular CHO recombinante com elevados níveis do antígeno do FX (120 µg/mL/24 h) embora somente 25% dessa proteína secretada era biologicamente ativa (HIMMELSPACH *et al.*, 2000). Em estudo envolvendo a linhagem celular Hek 293 foi demonstrado o aumento de 2,6 vezes na quantidade de FX secretado com todos os resíduos de ácido glutâmico carboxilados após a geração de uma molécula quimera, em que, a sequência pró-peptídica foi substituída pela sequência homóloga da protrombina (CAMIRE *et al.*, 2000).

Contudo, Enjolras e colaboradores (2012) expressaram FIXrh em uma linhagem celular hepática denominada HuH-7, derivada de carcinoma hepatocelular humano

caracterizada por Nakabayashi e colaboradores em 1982 (NAKABAYASHI *et al.*, 1982), que possui, entre as linhagens celulares mais utilizadas (HEK, CHO-K1, HepG2), a melhor capacidade de fosforilar resíduos de serina (DEWPURA *et al.*, 2008). A expressão transiente nessas células foi de 0,5 µg/mL/36 hs de FIXrh e a produção de proteína biologicamente ativa no sobrenadante foi de 300 UI/mg. A completa atividade do FIXrh secretado pelas células HuH-7 sugere que o grau de γ -carboxilação das proteínas estava similar ao nível encontrado no recombinante comercial Benefix® ou no FIX derivado de plasma comercial Mononine®.

Como a γ -carboxilação é extremamente importante na produção de FIXrh, a caracterização das linhagens celulares humanas quanto à expressão dos genes envolvidos nesse processo se fez necessária. Para isso, foi realizada a quantificação por PCR em tempo real dos genes γ -carboxilase e vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKORC1), além do gene inibitório calumenina.

É sabido que o sistema de γ -carboxilação dependente de vitamina K é uma etapa limitante importante na produção de FIXrh funcional em células eucarióticas. A γ -carboxilação incompleta é um grande problema; menos de 10% de todas as proteínas recombinantes dependentes de vitamina K secretadas são totalmente carboxiladas e funcionais (KAUFMAN *et al.*, 1986).

Analisando os dados encontrados nas células 293T e SK-Hep-1 transduzidas com o vetor lentiviral 1054, podemos observar que ocorre um desequilíbrio na expressão das enzimas relacionadas à γ -carboxilação. A razão entre os genes VKORC1 e γ -carboxilase é 15,4 unidades relativas de expressão (URE) e 9,2 URE, respectivamente. Esse desequilíbrio reflete na baixa expressão de FIXrh biologicamente ativo.

A limitação no fornecimento de KH_2 pode explicar porque células de mamífero não são eficientes na carboxilação de proteínas dependentes de vitamina K. A KH_2 é o cofator da enzima γ -carboxilase que converte os resíduos de Glu em Gla. A maioria da KH_2 provém da reciclagem da vitamina K epóxido (KO). Essa reciclagem é realizada pela VKORC, a qual, assim como a γ -carboxilase, está localizada no retículo endoplasmático, onde as proteínas são modificadas. A carboxilação de uma única proteína dependente de vitamina K requer múltiplas reduções de KO pela VKORC e, assim, a eficiência de redução da VKORC em fornecer KH_2 para a carboxilase tem o potencial de regular o sistema (HALLGREN *et al.*, 2006). Dessa maneira, níveis elevados de expressão de proteínas recombinantes dependentes de vitamina K saturam a capacidade de carboxilação da carboxilase porque essa enzima não é suficientemente rápida para carboxilar a grande quantidade de proteínas sintetizadas e, deste

modo, proteínas não-carboxiladas são secretadas entre proteínas completamente carboxiladas (BERKNER, 2008).

Estudos demonstraram que a superexpressão de γ -carboxilase não aumentou a carboxilação (HALLGREN *et al.*, 2002; REHEMTULLA *et al.*, 1993) porque o seu cofator (KH_2) é um fator limitante. Estudos subsequentes mostraram que a superexpressão de VKORC e, conseqüentemente o aumento na reciclagem de KH_2 , resultou no aumento da carboxilação de proteínas dependentes de vitamina K (HALLGREN *et al.*, 2006; WAJIH *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2005). Entretanto, o efeito dessa superexpressão é relativamente pequeno se comparado com a quantidade de VKORC superexpressa (cerca de 2 vezes mais carboxilação). Isso pode ter acontecido porque a superexpressão de VKORC saturou outro componente do sistema de carboxilação e esse componente, provavelmente, seria uma proteína redox necessária para a atividade da VKORC. A VKORC é oxidada e inativada em cada conversão de KO a KH_2 e a sua atividade enzimática é restaurada por essa proteína redox que ainda é desconhecida (HALLGREN *et al.*, 2006).

Segundo relatos da literatura, a calumenina, uma proteína que apresenta funções de chaperona (HONORÉ; VORUM, 2000), pode desempenhar um papel importante na regulação do sistema de γ -carboxilação e na biosíntese de proteínas dependentes de vitamina K funcionais. Em 2004, Wajih e colaboradores identificaram a proteína calumenina como um dos fatores capazes de regular o sistema de γ -carboxilação. Os autores propuseram um modelo no qual a calumenina se ligaria na γ -carboxilase como uma chaperona inibitória e também afetaria a proteína VKOR. Esta conclusão é baseada em dados que incluem: 1) a inibição da atividade da γ -carboxilase com transfecção de uma construção contendo o cDNA da calumenina, 2) o silenciamento do gene calumenina por um Smart siRNA, e 3) uma abordagem proteômica que demonstra a existência de interações proteína-proteína entre a γ -carboxilase e a calumenina (WAJIH *et al.*, 2004).

Em 2006, os mesmos pesquisadores concluíram que o silenciamento da calumenina utilizando siRNA e a superexpressão de VKORC1 em células BHK aumentaram significativamente a capacidade dessas células de carboxilar o FIXrh (WAJIH *et al.*, 2006).

Nossos resultados de expressão gênica, no qual as razões entre os genes calumenina e γ -carboxilase encontradas para as células 293T e SK-Hep-1 transduzidas foram 1,81 e 4,0 URE, respectivamente, sugerem que a produção de FIXrh ativo pode estar sendo influenciado pela presença desta proteína inibitória.

A baixa produtividade de proteínas dependentes de vitamina K funcionais, como o FIX, pode ser explicada também pela liberação ineficiente do produto carboxilado pela γ -

carboxilase, já que a γ -carboxilação ocorre de maneira em que a enzima permanece ligada ao substrato por alguns ciclos catalíticos. Deste modo, uma ligação entre o propeptídeo e a enzima resulta em muitos ácidos glutâmicos sendo convertidos a ácidos γ -carboxiglutâmicos em uma única proteína. Hallgren e colaboradores (2002) mostraram que *in vitro* a liberação das proteínas dependentes de vitamina K completamente carboxiladas é bem mais lenta que a conversão dos resíduos Glu em Gla. Estudos realizados utilizando complexos FIX-carboxilase em um único processo de γ -carboxilação mostraram uma rápida γ -carboxilação (minutos), porém uma lenta liberação da proteína (horas) e, experimentos com substratos contendo o propeptídeo de ativação e o domínio Gla demonstraram que a liberação do produto totalmente carboxilado é 50 vezes mais lenta que a γ -carboxilação (LIN *et al.*, 2004).

Outras modificações pós-traducionais também podem influenciar na atividade biológica do FIX recombinante humano como a sulfatação da tirosina 155 e a fosforilação da serina 158. Na proteína recombinante, menos de 15% da tirosina 155 é sulfatada e a fosforilação da serina 158 é insignificante (WHITE *et al.*, 1997).

Desse modo, existem muitas variáveis que podem influenciar a produção de FIXrh funcional que podem, inclusive, atuar concomitantemente promovendo a baixa expressão desse fator de coagulação.

A análise do número de cópias lentivirais inseridas no genoma celular das linhagens escolhidas permitiu constatar que as células SK-Hep-1 apresentaram 17 cópias inseridas, enquanto que as células 293T apresentaram 7,67 cópias. Apesar das integrações na linhagem hepática serem, aproximadamente, 2 vezes maiores, ainda assim essas células apresentaram maior expressão de FIX por cópia inserida.

Com o intuito de avaliar o perfil de produção de FIX recombinante humano ativo ao longo do tempo, foi realizado um acompanhamento de 180 dias. Durante esse período, a produção de FIX ativo variou nas duas linhagens celulares testadas, chegando a cessar completamente na linhagem SK-Hep-1 (Figura 20). O que também pôde ser constatado pela expressão de EGFP (Figura 21).

Esse decaimento na expressão de FIXrh nas células SK-hep-1 pode ser justificado pelo possível silenciamento transcricional ou efeitos dependentes do local de integração do vetor 1054 no genoma. A expressão de transgenes dirigida por vetores lentivirais pode estar sujeita ao silenciamento epigenético por várias vias incluindo metilações de DNA e modificações da cromatina (HAMAGUCHI *et al.*, 2000; YAO *et al.*, 2004; HONG *et al.*, 2007). Os mecanismos de silenciamento genômico podem depender do tipo celular, do estado de diferenciação celular e do promotor específico utilizado. Um estudo utilizando um vetor

lentiviral auto-inativado para a expressão de FIX em quimera de medula óssea mostrou decréscimo na expressão do transgene dentro de poucas semanas da realização do transplante utilizando o promotor EF-1 α , resultando na expressão quase indetectável de FIX na trigésima semana. Contudo, a expressão estável do transgene foi mantida ao longo do tempo quando essa foi dirigida pela região de controle do locus da β -globina (CHANG *et al.*, 2006).

Desse modo, o grande número de integrações nas células SK-Hep-1 pode ter influência no decréscimo nos níveis de expressão de FIX recombinante humano, podendo ter ocorrido alguma mutação de inserção no genoma dessas células.

A análise do crescimento celular das linhagens 293T e SK-Hep-1 realizada por uma cinética de crescimento ao longo de 7 dias apresentou resultados discrepantes entre as linhagens (Figura 23) que podem também ter sido influenciados pelo número de cópias virais integradas no genoma das células hepáticas. Através dos cálculos da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) e do tempo de duplicação (t_d), foi possível demonstrar que as células 293T transduzidas apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ de 0,0362 h⁻¹. Essa velocidade específica máxima de crescimento celular corresponde a um tempo de duplicação de 19,15 horas. Pelas análises estatísticas realizadas, podemos observar que somente nos tempos de 3, 5 e 7 dias ocorreram diferenças significativas com relação ao crescimento das células controle. Entretanto, as células SK-Hep-1-1054-FIX apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ de 0,0264 h⁻¹ com um t_d de 26,26 horas e crescimento celular significativamente menor que as células controle em todos os dias de experimento, com exceção do primeiro.

O crescimento regulado de células de mamífero tem sido proposto como um artifício para melhorar os processos de produção de proteínas de interesse farmacêutico (GESERICK *et al.*, 2000). As linhagens celulares, quando estão em proliferação, utilizam a maior parte da energia metabólica para o processo de divisão celular em detrimento da produção de proteínas heterólogas (SANCHEZ-BUSTAMANTE *et al.*, 2006). Portanto, as células que apresentam níveis elevados de expressão de proteínas heterólogas canalizam suas fontes metabólicas para a produção da proteína e, consequentemente, apresentam taxas de crescimento celular inferiores (BROWNE; AL-RUBEAI, 2007).

Baseando-se nessas informações, os dados encontrados na cinética de crescimento celular bem como nos níveis de expressão do FIXrh corroboram com a literatura, pois as células SK-Hep-1 apresentaram a menor velocidade máxima de crescimento e maior tempo de duplicação, em contrapartida, os maiores valores de FIXrh total e ativo.

Com o intuito de melhorar a expressão de FIXrh nas linhagens celulares 293T e SK-Hep-1, foram utilizadas diversas concentrações de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} como suplemento no meio de cultura.

Com relação às células 293T, podemos observar que as condições de suplementação utilizadas não influenciaram significativamente o crescimento das células e que o meio DMEM suplementado com 0,5 mMol/L de Ca^{+2} e 1,0 mMol/L de Mg^{+2} mostrou-se melhor na indução da expressão de FIXrh no período de 24 e 48 horas em relação ao meio controle. Em 72 horas, não ocorreram diferenças significativas entre os meios utilizados. Entre os 3 tempos testados, o período de 48 horas se mostrou estatisticamente melhor para a produção de FIXrh no meio DMEM suplementado com 0,5 mMol/L de Ca^{+2} e 1,0 mMol/L de Mg^{+2} , entretanto, na condição controle não foi possível observar diferenças significativas entre os tempos analisados. A produção específica de FIXrh medida no tempo final de 72 horas não apresentou diferenças significativas entre as condições testadas.

As células SK-Hep-1 apresentaram diferenças no crescimento celular entre a condição controle e o meio DMEM suplementado com 0,5 mMol/L de Ca^{+2} e 1,0 mMol/L de Mg^{+2} . Essa concentração de íons parece influenciar negativamente o crescimento dessa linhagem.

A produção volumétrica de FIXrh apresentou diferenças estatísticas entre o meio controle (0,191 UI/mL) e os meios suplementados com 1,0 mMol/L de Ca^{+2} e 0,5 mMol/L de Mg^{+2} (0,114 UI/mL) e 0,5 mMol/L de Ca^{+2} e 1,0 mMol/L de Mg^{+2} (0,134 UI/mL), destacando-se esse último como melhor indutor no tempo de 24 horas. Entretanto, nos demais tempos analisados não foi possível observar melhora significativa na produção de FIXrh. Deste modo, assim como ocorreu com as células 293T, em meio sem suplementação não observamos diferenças estatísticas entre os períodos de tempo testados.

A produção específica da proteína recombinante também não apresentou diferenças estatísticas entre as condições de suplementação.

Os íons Ca^{+2} são componentes essenciais da cascata de coagulação sanguínea (MORRISSEY *et al.*, 2008; RODRÍGUEZ *et al.*, 2008). A grande maioria das etapas da coagulação requer este íon (SADAGOPAN *et al.*, 2003). Com relação ao FIX, íons Ca^{+2} interagem fisicamente com este fator de coagulação em múltiplos sítios de ligação dentro dos domínios Gla, EGF1 e catalítico da proteína (AMPHLETT *et al.*, 1981). A ligação do Ca^{+2} no domínio Gla desempenha um papel importante na sua estrutura e no ancoramento na membrana fosfolipídica carregada negativamente (SHIKAMOTO *et al.*, 2003; OHKUBO; TAJKHORSHID, 2008). Três íons Ca^{+2} podem ser substituídos por íons Mg^{+2} com até mais afinidade, sugerindo um papel fisiológico para Mg^{+2} na ligação na membrana (SHIKAMOTO

et al., 2003). A ligação do Ca^{+2} ao domínio EGF1 aumenta tanto a afinidade ao cofator FVIII como a atividade do complexo tenase (LENTING *et al.*, 1996). Com relação ao domínio catalítico, o Ca^{+2} é necessário para o completo rearranjo provocado pela ativação proteolítica do FIX em FIX ativo (BAJAJ *et al.*, 1992) e também protege essas formas de FIX da degradação (BAJAJ *et al.*, 1992; TURKINGTON, 1992).

A estrutura terciária do FIX requer não somente íons Ca^{+2} , mas também íons Mg^{+2} . Esses íons aumentam a atividade de coagulação do FIX ativo através do aumento da afinidade desta enzima ao seu cofator FVIII em detrimento dos fosfolipídios (SEKIYA *et al.*, 1996), potencializando todos os processos dependentes do FIX na cascata de coagulação.

Kim e colaboradores (2009) testaram várias concentrações de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} na expressão de FIX recombinante em células CHO em suspensão em meio livre de soro fetal bovino. Eles observaram que os íons Ca^{+2} são mais importantes para a produção de FIX ativo do que os íons Mg^{+2} , pois na concentração de 1,0 mmol/L Ca^{+2} e 0 mmol/L de Mg^{+2} a expressão de FIX foi de 0,82 UI/mL, enquanto na concentração de 0 mmol/L Ca^{+2} e 1,0 mmol/L de Mg^{+2} , a expressão de FIX decaiu para 0,16 UI/mL. A concentração de íons que apresentou melhor produção de FIX ativo foi a de 1,0 mmol/L de Ca^{+2} e 1,0 mmol/L de Mg^{+2} (1,36 UI/mL), porém este valor decaiu com o passar dos dias para 0,16 UI/mL. Entretanto, nas concentrações de 0,5 mmol/L de Ca^{+2} e 1,0 mmol/L de Mg^{+2} , a produção de FIX foi relativamente mais baixa (1,33 UI/mL), mas esse valor não apresentou decréscimo tão rápido como o observado com a outra concentração de íons mencionada.

Os dados encontrados no nosso trabalho, estão de acordo com os dados encontrados na literatura com relação às células 293T que apresentaram melhor expressão de FIXrh na condição de 0,5 mmol/L de Ca^{+2} e 1,0 mmol/L de Mg^{+2} . As células SK-Hep-1 apresentaram melhor expressão do fator de coagulação em meio de cultura sem suplementação. Essa diferença pode ser devido aos diferentes tipos celulares utilizados e também às condições de cultivo, pois na literatura foi utilizada uma célula murina em suspensão cultivada em meio IMDM (*Iscove's Dulbecco's Medium*) livre de soro, enquanto neste trabalho as células são humanas cultivadas em garrafas estáticas em meio DMEM suplementado com soro bovino fetal.

Em suma, nosso trabalho demonstrou a geração de duas linhagens celulares humanas produtoras de FIX recombinante funcional utilizando o sistema lentiviral. As comparações realizadas entre os dois tipos celulares são importantes na caracterização do comportamento de linhagens geneticamente modificadas voltadas para a expressão de proteínas

recombinantes heterólogas e abre novos caminhos para futuros estudos que visam o melhoramento da produção desse tipo de proteína.

Conclusão

7 Conclusão

Neste trabalho foram realizadas a clonagem e a expressão do FIX da coagulação sanguínea em duas linhagens celulares humanas, 293T e SK-Hep-1, utilizando o sistema de expressão lentiviral e, após análises comparativas de desempenho entre os dois tipos celulares, podemos inferir que a linhagem celular hepática SK-Hep-1 foi a melhor produtora da proteína recombinante funcional.

É preciso reavaliar, entretanto, a MOI para futuras transduções, pois o elevado número de cópias lentivirais integradas no genoma celular pode influenciar negativamente a expressão prolongada de proteínas heterólogas.

Como futuras possibilidades de continuidade deste trabalho pensamos que essas linhagens poderão ser adaptadas ao crescimento em suspensão para aumentar a quantidade de FIX recombinante humano; protocolos de purificação desta proteína e realização de estudos em modelos animais hemofílicos para avaliar a eficácia e imunogenicidade dessa molécula recombinante *in vivo* também deverão ser realizados.

Referências Bibliográficas

8 Referências Bibliográficas

ALBESIANO, E.; MESSMER, B. T.; DAMLE, R. N.; ALLEN, S. L.; RAI, K. R.; CHIORAZZI, N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. **Blood**, v. 102, p. 3333-3339, 2003.

AMPHLETT, G. W.; BYRNE, R.; CASTELLINO, F.J. The interaction of Ca^{+2} with human factor IX. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 208, p. 576-585, 1981.

ANSON, D. S.; CHOO, K. H.; REES, D. J.; GIANNELLI, F.; GOULD, K.; HUDDLESTON, J. A.; BROWNLEE, G. G. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 5, p. 1053-1060, 1984.

ARRUDA, V. R.; HAGSTROM, J. N.; DEITCH, J.; HEIMAN-PATTERSON, T.; CAMIRE, R. M.; CHU, K.; FIELDS, P. A.; HERZOG, R. W.; COUTO, L. B.; LARSON, P. J.; HIGH, K. A. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 130-138, 2001.

AZNAR, J. A.; LUCÍA, F.; ABAD-FRANCH, L.; JIMÉNEZ-YUSTE, V.; PÉREZ, R.; BATLLE, J.; BALDA, I.; PARRA, R.; CORTINA, V. R. Haemophilia in Spain. **Haemophilia**, Valencia, v. 15, p. 665-675, 2009.

BAJAJ, S. P.; SABHARWAL, A. K.; GORKA, J.; BIRKTOFT, J. J. Antibody-probed conformational transitions in the protease domain of human factor IX upon calcium binding and zymogen activation: putative high-affinity Ca^{+2} -binding site in the protease domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 152-156, 1992.

BAKER, D. C.; BRASSARD, J. Review of Continuing Education Course on Hemostasis. **Toxicologic Pathology**, California, v. 39, p. 281-288, 2011.

BERKNER, K. L. Expression of recombinant vitamin K-dependent proteins in mammalian cells: factors IX and VII. **Methods in Enzymology**, Ohio, v. 222, p. 450-480, 1993.

BERKNER, K. L. The vitamin K-dependent carboxylase. **Journal of Nutrition**, Ohio, v. 130, p. 1877-1880, 2000.

BERKNER, K. L. Vitamin K-dependent carboxylation. **Vitamins & Hormones**, Cleveland, v. 78, p. 131-156, 2008.

BERNTORP, E.; SHAPIRO, A. D. Modern haemophilia care. **Lancet**, Sweden, v. 379, p. 1447-1456, 2012.

BLOSTEIN, M.; CUERQUIS, J.; LANDRY, S.; GALIPEAU, J. The carboxylation efficiency of the vitamin K-dependent clotting factors: studies with factor IX. **Haemophilia**, Montreal, v. 14, p. 1063-1068, 2008.

BOND, M.; JANKOWSKI, M.; PATEL, H.; KARNIK, S.; STRANG, A.; XU, B.; ROUSE, J.; KOZA, S.; LETWIN, B.; STECKERT, J.; AMPHLETT, G.; SCOBLE, H. Biochemical characterization of recombinant factor IX. **Seminars in Hematology**, Andover, v. 35, n. 2, p. 11-17, 1998.

BONTEMPO, F. A.; BONTEMPO, F. A.; LEWIS, J. H.; GORENC, T. J.; SPERO, J. A.; RAGNI, M. V.; SCOTT, J. P.; STARZL, T. E. Liver transplantation in hemophilia A. **Blood**, v. 69, p. 1721-1724, 1987.

BOWEN, D. J. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. **Molecular Pathology**, v. 55, n. 1, p. 1-18, 2002.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DA ATENÇÃO À SAÚDE. COORDENAÇÃO-GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2009-2010**. 2ª Ed. – Ministério da Saúde, Brasília, 2012.

BRETTLER, D. B.; LEVINE, P. H. Clinical manifestations and therapy of inherited coagulation factor deficiencies. In: Colman, R. W. *et al.*, (ed). **Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice**. 3rd, Philadelphia: JB Lippincott, p. 169-183, 1994.

BRISTOL, J. A.; RATCLIFFE, J. V.; ROTH, D. A.; JACOBS, M. A.; FURIE, B. C.; FURIE, B. Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. **Blood**, Boston, v. 88, p. 2585-2593, 1996.

BROWNE, S. M.; AL-RUBEAI, M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 425-432, 2007.

BRUNETTI-PIERRI, N.; GROVE, N. C.; ZUO, Y.; EDWARDS, R.; PALMER, D.; CERULLO, V.; TERUYA, J.; NG P. Bioengineered Factor IX Molecules with Increased

Catalytic Activity Improve the Therapeutic Index of Gene Therapy Vectors for Hemophilia B. **Human Gene Therapy**, Houston, v. 20, p. 479-485, 2009.

BUBSY, S.; KUMAR, A.; JOSEPH, M.; HALFPAP, L.; INSLEY, M.; BERKNER, K.; KURACHI, K.; WOODBURY, R. Expression of active human factor IX in transfected cells. **Nature**, v. 316, p. 271-273, 1985.

CAMERINO, G.; GRZESCHIK, K. H.; JAYE, M.; DE LA SALLE, H.; TOLSTOSHE, V. P.; LECOCQ, J. P.; HEILIG, R.; MANDEL, J. L. Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (hemophilia B locus). **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 81, n. 2, p. 498-502, 1984.

CAMIRE, R. M.; LARSON, P. J.; STAFFORD, D. W.; HIGH, K. A. Enhanced gamma-carboxylation of recombinant factor X using a quimeric construct containing the prothrombin propeptide. **Biochemistry**, Philadelphia, v. 39, n. 46, p. 14322-14329, 2000.

CASAÑA, P.; HAYA, S.; CID, A. R.; OLTRA, S.; MARTÍNEZ, F.; CABRERA, N.; AZNAR, J. A. Identification of deletion carriers in hemophilia B: quantitative real-time polymerase chain reaction or multiple ligation probe amplification. **Translational Research**, v. 153, p. 114-117, 2009.

CHANG, A. H.; STEPHAN, M. T.; SADELAIN, M. Stem cell-derived erythroid cells mediate long-term systemic protein delivery. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, p. 1017-1021, 2006.

CHARNEAU, P.; ALIZON, M.; CLAVEL, F. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. **Journal of Virology**, v. 66, n. 5, p. 2814-2820, 1992.

CHAVALI, S.; MAHAJAN, A.; GHOSH, S.; MONDAL, B.; BHARADWAJ, D. Protein molecular function influences mutation rates in human genetic diseases with allelic heterogeneity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 412, p. 716-722, 2011.

CHOO, K. H.; GOULD, K. G.; REES, D. J.; BROWNLEE, G. G. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. **Nature**, v. 299, n. 5879, p. 178-180, 1982.

COCKRELL, A. S.; KAFRI, T. Gene delivery by lentivirus vectors. **Molecular Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 184-204, 2007.

CUNHA, N. B.; MURAD, A. M.; RAMOS, G. L.; MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M.; ARAÚJO, A. C.; LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J.; COVAS, D. T.; FONTES, A. M.; SOUZA, G. H.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds. **Transgenic Research**, v. 20, n. 4, p. 841-855, 2011.

DADEHBEIGI, N.; OSTAD, S. N.; FARAMARZI, M. A.; GHAHREMANI, M. H. Sex hormones affect the production of recombinant factor IX in CHO and HEK-293 cell lines. **Biotechnology Letters**, Tehran, v. 30, p. 1909-1912, 2008.

DARBY, S. C.; EWART, D. W.; GIANGRANDE, P. L.; DOLIN, P. J.; SPOONER, R. J.; RIZZA, C. R. Mortality before and after HIV infection in the complete UK population of haemophiliacs. UK Haemophilia Centre Directors' Organisation. **Nature**, v. 377, p. 79-82, 1995.

DARBY, S. C.; Wan Kan, S.; Spooner, R. J.; Giangrande, P. L. F.; Hill, F. G. H.; Hay, C. R. M.; Lee, C. A.; Ludlam, C. A.; Williams, M. Mortality rates, life expectancy, and causes of death in people with hemophilia A or B in the United Kingdom who were not infected with HIV. **Blood**, v. 110, p. 815-825, 2007.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DAVIE, E.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v. 30, p. 10363-10370, 1991.

DEWPURA, T.; RAYMOND, A.; HAMELIN, J.; SEIDAH, N. G.; MBIKAY, M.; CHRÉTIEN, M.; MAYNE, J. PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. **FEBS Journal**, Ottawa, v. 275, p. 3480-3493, 2008.

DI SCIPIO, R. G.; KURACHI, K.; DAVIE, E. W. Activation of human factor IX (Christmas factor). **Journal of Clinical Investigation**, v. 61, p. 1528-1538, 1978.

DIETMAIR, S.; HODSON, M. P.; QUEK, L. E.; TIMMINS, N. E.; GRAY, P.; NIELSEN, L. K. A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells. **PLoS One**, Brisbane, v. 7, n. 8, p. 43394-43409, 2012.

DONELLO, J. E.; LOEB, J. E.; HOPE, T. J. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. **Journal of Virology**, v. 72, n. 6, p. 5085-5092, 1998.

DOORISS, K. L.; DENNING, G.; GANGADHARAN, B.; JAVAZON, E. H.; MCCARTY, D. A.; SPENCER, H. T.; DOERING, C. B. Comparison of factor VIII transgenes bioengineered for improved expression in gene therapy of hemophilia A. **Human Gene Therapy**, Atlanta, v. 20, n. 5, p. 465-478, 2009.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**. John Wiley & Sons, Canadá, 1998.

DULL, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 8463-8471, 1998.

DUNN, A. L. Malignancy in patients with haemophilia: a review of the literature. **Haemophilia**, Atlanta, v. 16, p. 427-436, 2010.

ENJOLRAS, N.; PLANTIER, J. L.; RODRIGUEZ, M. H.; REA, M.; ATTALI, O.; VINCIGUERRA, C.; NEGRIER, C. Two novel mutations in EGF-like domains of human factor IX dramatically impair intracellular processing and secretion. **Journal of Thrombosis and Haemophilia**, Lyon, v. 2, p. 1143-1154, 2004.

ENJOLRAS, N.; DARGAUD, Y.; PÉROT, E.; GUILLAUME, F.; BECCHI, M.; NÉGRIER, C. Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications. **Thrombosis Research**, Lyon, v. 130, p. 266-273, 2012.

ESCORS, D.; BRECKPOT, K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis (Warsz)**, v. 58, n. 2, p. 107-119, 2010.

EVATT, B. L.; BLACK, C.; BATOROVA, A.; STREET, A.; SRIVASTAVA, A. Comprehensive care for haemophilia around the world. **Haemophilia**, v. 10, n. 4, p. 9-13, 2004.

FAIRMAN, M. P.; STILLMAN, B. Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. **EMBO Journal**, v. 7, n. 4, p. 1211-1218, 1988.

FERNANDES, A. C.; FONTES, A.; GONSALES, N.; SWIECH, K.; PICANCO-CASTRO, V.; FACA, S.; COVAS, D. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Ribeirão Preto, v. 58, n. 4, p. 243-249, 2011.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. Inhibitors of propagation of coagulation (factors VIII, IX and XI): a review of current therapeutic practice. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, p. 553-562, 2011

FRANCHINI, M.; FRATTINI, F.; CRESTANI, S.; SISSA, C.; BONFANTI, C. Treatment of hemophilia B: focus on recombinant factor IX. **Biologics: Targets and Therapy**, Mantua, v. 7, p. 33-38, 2013.

FRANCO, R. F. Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 229-237, 2001.

FULCHER, C. A.; GARDINER, J. E.; GRIFFIN, J. H.; ZIMMERMAN, T. S. 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, 1984.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. **Blood**, v. 75, p. 1753-1762, 1990.

GAILLET, B.; GILBERT, R.; BROUSSAU, S.; PILOTTE, A.; MALENFANT, F.; MULLICK, A.; GARNIER, A.; MASSIE, B. High-Level Recombinant Protein Production in CHO Cells Using Lentiviral Vectors and the Cumate Gene-Switch. **Biotechnology and Bioengineering**, Montreal, v. 106, n. 2, p. 203-215, 2010.

GATER, A.; THOMSON, T. A.; STRANDBERG-LARSEN, M. Haemophilia B: impact on patients and economic burden of disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 106, n. 3, p. 398-404, 2011.

GESERICK, C.; BONARIUS, H. P.; KONGERSLEV, L.; HAUSER, H.; MUELLER, P. P. Enhanced productivity during controlled proliferation of BHK cells in continuously perfused bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, Braunschweig, v. 69, n. 3, p. 266-274, 2000.

GILLIS, S.; FURIE, B. C.; FURIE, B.; PATEL, H.; HUBERTY, M. C.; SWITZER, M.; FOSTER, W. B.; SCOBLE, H. A.; BOND, M. D. Gamma-carboxyglutamic acids 36 and 40 do not contribute to human factor IX function. **Protein Science**, Boston, v. 6, p. 185-196, 1997.

GONSALES DA ROSA, N.; SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M.; SOARES NETO, M. A.; DE CASTILHO-FERNANDES, A.; FAÇA, V. M.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T. SK-HEP cells and lentiviral vector for

production of human recombinant factor VIII. **Biotechnology Letters**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 1435-1443, 2012.

GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C.; NAIRN, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, n. 1, p. 59-74, 1977.

GRIFFITH, M. J.; MONROE, D. M.; VAN COTT, K. E.; WALKER, A.; WAUGH, S.; DROHAN, W. N. N-glycan sialylation is important for in vivo recovery of recombinant factor IX. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 1, p. 43, 2007.

HALLGREN, K. W.; HOMMEMA, E. L.; MCNALLY, B. A.; BERKNER, K. L. Carboxylase Overexpression Effects Full Carboxylation but Poor Release and Secretion of Factor IX: Implications for the Release of Vitamin K-Dependent Proteins. **Biochemistry**, Cleveland, v. 41, p. 15045-15055, 2002.

HALLGREN, K.W.; QIAN, W.; YAKUBENKO, A. V.; RUNGE, K. W.; BERKNER, K. L. r-VKORC1 expression in factor IX BHK cells increases factor IX carboxylation but is limited by saturation of another carboxylation component or by a shift in the rate limiting step. **Biochemistry**, Cleveland, v. 45, n. 17, p. 5587-5598, 2006.

HAMAGUCHI, I.; WOODS, N. B.; PANAGOPOULOS, I.; ANDERSSON, E.; MIKKOLA, H.; FAHLMAN, C.; ZUFFEREY, R.; CARLSSON, L.; TRONO, D.; KARLSSON, S. Lentivirus vector gene expression during ES cell-derived hematopoietic development in vitro. **Journal of Virology**, Lund, v. 74, p. 10778-10784, 2000.

HANDFORD, P. A.; BARON, M.; MAYHEW, M.; WILLIS, A.; BEESLEY, T.; BROWNLEE, G. G.; CAMPBELL, I. D. The first EGF-like domain from human factor IX contains a high-affinity calcium binding site. **EMBO Journal**, v. 9, p. 475-480, 1990.

HARRISON, S.; ADAMSON, S.; BONAM, D.; BRODEUR, S.; CHARLEBOIS, T.; CLANCY, B.; COSTIGAN, R.; DRAPEAU, D.; HAMILTON, M.; HANLEY, K.; KELLEY, B.; KNIGHT, A.; LEONARD, M.; MCCARTHY, M.; OAKES, P.; STERL, K.; SWITZER, M.; WALSH, R.; FOSTER, W. The manufacturing process for recombinant factor IX. **Seminars in Hematology**, Andover, v. 35, n. 2, p. 4-10, 1998.

HENNECKE, M.; KWISSA, M.; METZGER, K.; OUMARD, A.; KRÖGER, A.; SCHIRMBECK, R.; REIMANN, J.; HAUSER, H. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. **Nucleic Acids Research**, Braunschweig, v. 29, n. 16, p. 3327-3334, 2001.

HIGH, K. A.; ROBERTS, H. R. Factor IX. In: High, K. A., Roberts, H. R. (ed). **Molecular basis of thrombosis and hemostasis**. New York: Marcel Dekker, p. 215-237, 1995.

HIMMELSPACH, M.; PFLEIDERER, M.; FISCHER, B. E.; PLAIMAUER, B.; ANTOINE, G.; FALKNER, F. G.; DORNER, F.; SCHLOKAT, U. Recombinant human factor X: high yield expression and the role of furin in proteolytic maturation in vivo and in vitro. **Thrombosis Research**, Orth/Donau, v. 97, n. 2, p. 51-67, 2000.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (ed). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, v. 2, p. 93-122, 2001.

HONG, S.; HWANG, D. Y.; YOON, S.; ISACSON, O.; RAMEZANI, A.; HAWLEY, R. G.; KIM, K. S. Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Molecular Therapy**, Belmont, v. 15, p. 1630-1639, 2007.

HONORÉ, B.; VORUM, H. The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca(2+)-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. **FEBS Letters**, v. 466, n. 1, p. 11-18, 2000.

JACOBS, P. P.; CALLEWAERT, N. N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems. **Current Molecular Medicine**, v. 9, p.774-800, 2009.

JAYANDHARAN, G. R.; SRIVASTAVA, A. Hemophilia: Disease, Diagnosis and Treatment. **Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy**, doi:10.4172/2157-7412.S1-005, 2011.

KALEKO, M.; GARCIA, J. V.; MILLER, A. D. Persistent gene expression after retroviral gene transfer into liver cells in vivo. **Human Gene Therapy**, Seattle, v. 2, n. 1, p. 27-32, 1991.

KATZ, J. Prevalence of factor IX inhibitors among patients with haemophilia B: results of a large-scale North American survey. **Haemophilia**, v. 2, p. 28-31, 1996.

KATZ, R. A.; SKALKA, A. M. The retroviral enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 133-173, 1994.

KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; FURIE, B. C.; FURIE, B.; SHOEMAKER, C. B. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX

synthesized in Chinese hamster ovary cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 9622-9628, 1986.

KIM, W. H.; KIM, J. S.; YOON, Y.; LEE, G. M. Effect of Ca^{+2} and Mg^{+2} concentration in culture medium on the activation of recombinant factor IX produced in Chinese hamster ovary cells. **Journal of Biotechnology**, v. 142, p. 275-278, 2009.

KURACHI, K.; DAVIE, E. W. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 79, n. 21, p. 6461-6464, 1982.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBERT, T.; RECHT, M.; VALENTINO, L. A.; POWELL, J. S.; UDATA, C.; SULLIVAN, S. T.; ROTH, D. A. Reformulated BeneFix : efficacy and safety in previously treated patients with moderately severe to severe haemophilia B. **Haemophilia**, v. 13, p. 233-243, 2007.

LENTING, P. J.; CHRISTOPHE, O. D.; TER MAAT, H.; REES, D. J. G.; MERTENS, K. Ca^{+2} binding to the first epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX promotes enzyme activity and factor VIII light chain binding. **The Journal of Biological Chemistry**, Amsterdam, v. 271, p. 25332-25337, 1996.

LIN, P. J.; STRAIGHT, D. L.; STAFFORD, D. W. Binding the factor IX gamma-carboxyglutamic acid domain to the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase active site an allosteric effect that may ensure processive carboxylation and regulate the release of carboxylated product. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 6560-6566, 2004.

LOLLAR, P. Characterization of FVIII B-cell inhibitory epitopes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 505-508, 1999.

LUDLAM, C. A.; TURNER, M. L. Managing the risk of transmission of variant Creutzfeldt Jakob disease by blood products. **British Journal of Haematology**, v. 132, p. 13-24, 2006.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.

MAKINO, Y.; OMICHI, K.; KURAYA, N.; OGAWA, H.; NISHIMURA, H.; IWANAGA, S.; HASE, S. Structural analysis of N-linked sugar chains of human blood clotting factor IX. **The Journal of Biochemistry**, Toyonaka, v. 128, p. 175-180, 2000.

MASTROMARINO, P.; CONTI, C.; GOLDONI, P.; HAUTTECOEUR, B.; ORSI, N. Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. **Journal of General Virology**, Roma, v. 68, p. 2359-2369, 1987.

MCMICHAEL, M. New Models of Hemostasis. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 27, p. 40-45, 2012.

METZNER, H. J.; WEIMER, T.; KRONTHALER, U.; LANG, W.; SCHULTE, S. Genetic fusion to albumin improves the pharmacokinetic properties of factor IX. **Thrombosis Haemostasis**, Marburg, v. 102, p. 634-644, 2009.

MILLER, W. M.; REDDY, A. Quantitative analysis of cell growth, metabolism, and product formation. In: DOYLE, A. & GRIFFITHS, J. B. (ed). **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**. Guildford: John Wiley & Sons, p. 133-159, 1998.

MIYAKE, K.; MIYAKE, N.; SHIMADA, T. Development of targeted gene transfer into human primary T lymphocytes and macrophages using high-titer recombinant HIV vectors. **Journal of Biotechnology**, v. 129, p. 532-538, 2007.

MIYOSHI, H.; BLÖMER, U.; TAKAHASHI, M.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M. Development of a self-inactivating lentivirus vector. **Journal of Virology**, La Jolla, v. 72, p. 8150-8157, 1998.

MORRISSEY, J. H.; PUREZA, V.; DAVIS-HARRISON, R. L.; SLIGAR, S. G.; OHKUBO, Y. Z.; TAJKHORSHID, E. Blood clotting reactions on nanoscale phospholipid bilayers. **Thrombosis. Research**, Urbana, v. 122, p. 23-26, 2008.

MUKHERJEE, S.; SAHA, A.; BISWAS, P.; MANDAL, C.; RAY, K. Structural analysis of factor IX protein variants to predict functional aberration causing haemophilia B. **Haemophilia**, Kolkata, v. 14, n. 5, p. 1076-1081, 2008.

NAKABAYASHI, H.; TAKETA, K.; MIYANO, K.; YAMANE, T.; SATO, J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. **Cancer Research**, v. 42, p. 3858-3863, 1982.

NALDINI, L.; BLÖMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M.; TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, La Jolla, v. 272, p. 263-267, 1996.

NERICH V.; TISSOT, E.; FARADJI, A.; DEMESMAY, K.; BERTRAND, M. A.; LORENZINI, J. L.; BRIQUEL, M. E.; POUZOL, P.; WORONOFF-LEMSI, M. C. Cost-of-illness study of severe haemophilia A and B in five French haemophilia treatment centres. **Pharmacy World & Science**, Besancon, v. 30, p. 287–292, 2008.

NEUHOFF, V.; AROLD, R.; TAUBE, P.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing using gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

OHKUBO, Y. Z.; TAJKHORSHID, E. Distinct structural and adhesive roles of Ca^{+2} in membrane binding of blood coagulation factors. **Structure**, v. 16, p. 72-81, 2008.

ORLOVA, N. A.; KOVNIR, S. V.; VOROBIEV, I. I.; GABIBOV, A. G. Coagulation Factor IX for Hemophilia B Therapy. **Acta naturae**, v. 4, n. 13, p. 62-73, 2012.

PADLER-KARAVANI, V.; VARKI, A. Potential impact of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid on transplant rejection risk. **Xenotransplantation**, v. 18, n. 1, p. 1-5, 2011.

PICANÇO, V.; HEINZ, S.; BOTT, D.; BEHRMANN, M.; COVAS, D. T.; SEIFRIED, E.; TONN, T. 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, n. 8, p.785-794, 2007.

PICANÇO-CASTRO, V.; FONTES, A. M.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; COVAS, D. T. Lentiviral mediated gene transfer – a patent review. **Expert Opin ther patents**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 5, p. 525-539, 2008.

PIPE S. Management of hemophilia in the midst of emerging pathogens: 6 a social perspective. **Seminars in Hematology**, v. 43, n. 3, p. 1-3, 2006.

POON, M. C.; LILICRAP, D.; HENSMAN, C.; CARD, R.; SCULLY, M. F. Recombinant factor IX recovery and inhibitor safety: a Canadian post-licensure surveillance study. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Alberta, v. 87, p. 431-435, 2002.

POPA, I.; HARRIS, M. E.; DONELLO, J. E.; HOPE, T. J. CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element. **Molecular and Cellular Biology**, Chicago, v. 22, n. 7, p. 2057-2067, 2002.

PUDOTA, B. N.; MIYAGI, M.; HALLGREN, K. W.; WEST, K. A.; CRABB, J. W.; MISONO, K. S.; BERKNER, K. L. Identification of the vitamin K-dependent carboxylase active site: Cys-99 and Cys-450 are required for both epoxidation and carboxylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Cleveland, v. 97, p. 13033-13038, 2000.

RAGNI, M.V.; PASI, K. J.; WHITE, G. C.; GIANGRANDE, P. L.; COURTER, S. G.; TUBRIDY, K. L.; RECOMBINANT FIX SURGICAL STUDY GROUP. Use of recombinant factor IX 21 in subjects with haemophilia B undergoing surgery. **Haemophilia**, Pittsburgh, v. 8, p. 91-97, 2002.

REHEMTULLA, A.; ROTH, D. A.; WASLEY, L. C.; KULIOPULOS, A.; WALSH, C. T.; FURIE, B.; FURIE, B. C.; KAUFMAN, R. J. In vitro and in vivo functional characterization of bovine vitamin K-dependent gamma-carboxylase expressed in Chinese hamster ovary cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Cambridge, v. 90, n. 10, p. 4611-4615, 1993.

RISHAVY, M. A.; BERKNER, K. L. Vitamin K Oxygenation, Glutamate Carboxylation, and Processivity: Defining the Three Critical Facets of Catalysis by the Vitamin K-Dependent Carboxylase. **Advances in Nutrition**, v. 3, p. 135-148, 2012.

RIZZA, C. R. Haemophilia and related inherited coagulation defects. In: Bloom, A. L., *et al.*, (ed). **Haemostasis and thrombosis**. 3rd. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 819-841, 1994.

ROBERTS, H. R.; HOFFMAN, M. Hemophilia and related conditions – inherited deficiencies of prothrombin (factor II), factor V, and factors VII to XII. In: Beutler, E. *et al.*, (ed). **Hematology**, 5ed. New York: McGraw-Hill, p. 1413-1439, 1995.

ROBINSON, H. L. New hope for an aids vaccine. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 239-250, 2002.

RODGERS, G. M.; GREENBERG, C. S. Inherited coagulation disorders. In: Lee, G. R., *et al.*, (ed). **Wintrobe's Clinical Hematology**, 10ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 1682-1732, 1999.

RODRÍGUEZ, Y.; MEZEI, M.; OSMAN, R. The PT1-Ca⁺² Gla domain binds to a membrane through two dipalmitoylphosphatidylserines. A computational study. **Biochemistry**, New York, v. 47, p. 1326-13278, 2008.

SADAGOPAN, N. P.; LI, W.; COOK, J. A.; GALVAN, B.; WELLER, D. L.; FOUNTAIN, S. T.; COHEN, L. H. Investigation of EDTA anticoagulant in plasma to improve the throughput of liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Ann Arbor, v. 17, p. 1065-1070, 2003.

SAM, M. R.; ZOMORODIPOUR, A.; SHOKRGOZAR, M. A.; ATAELI, F.; HADDAD-MASHADRIZEH, A.; AMANZADEH, A. Enhancement of the human factor IX expression, mediated by an intron derived fragment from the rat aldolase B gene in cultured hepatoma cells. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1385-1392, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, USA, 1989.

SANCHEZ-BUSTAMANTE, C. D.; KELM, J. M.; MITTA, B.; FUSSENEGGER, M. Heterologous protein production capacity of mammalian cells cultivated as monolayers and microtissues. **Biotechnology and Bioengineering**, Zurich, v. 93, n. 1, p. 169-180, 2006.

SAVAGE, C. R. JR.; HASH, J. H.; COHEN, S. Epidermal growth factor. Location of disulfide bonds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 7669-7672, 1973.

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

SCHMIDT, A. E.; BAJAJ, S. P. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 13, n. 1, p. 39-45, 2003.

SCHNEIDER, B.; FRYER, J. F.; OLDENBURG, J.; BRACKMANN, H. H.; BAYLIS, S. A.; EIS-HÜBINGER, A. M. Frequency of contamination 24 of coagulation factor concentrates with novel human parvovirus PARV4. **Haemophilia**, Bonn, v. 14, p. 978-986, 2008.

SCHWEIZER, M.; MERTEN, O. W. Large-Scale Production Means for the Manufacturing of Lentiviral Vectors. **Current Gene Therapy**, v. 10, p. 474-486, 2010.

SEKIYA, F.; YOSHIDA, M.; YAMASHITA, T.; MORITA, T. Magnesium(II) is a crucial constituent of the blood coagulation cascade. **The Journal of Biological Chemistry**, Tanashi, v. 271, p. 8541-8544, 1996.

SHAPIRO, A. D.; DI PAOLA, J.; COHEN, A.; PASI, K. J.; HEISEL, M. A.; BLANCHETTE, V. S.; ABSHIRE, T. C.; HOOTS, W. K.; LUSHER, J. M.; NEGRIER, C.; ROTHSCCHILD, C.; ROTH, D. A. The safety and efficacy of recombinant human blood coagulation factor IX in previously untreated patients with severe or moderately severe hemophilia B. **Blood**, Indianapolis, v. 105, p. 518-525, 2005.

SHIKAMOTO, Y.; MORITA, T.; FUJIMOTO, Z.; MIZUNO, H. Crystal structure of Mg^{+2} - and Ca^{+2} -bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Tsukuba, v. 278, p. 24090-24094, 2003.

SOMMER, S.S.; BOWIE, E. J.; KETTERLING, R. P.; BOTTEMA, C. D. Missense mutations and the magnitude of functional deficit: the example of factor IX. **Human Genetics**, Rochester, v. 89, n. 3, p. 295-297, 1992.

SPATZ, A.; BORG, C.; FEUNTEUN, J. X-Chromosome Genetics and Human Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 617-629, 2004.

SPENCER, H. T.; DENNING, G.; GAUTNEY, R. E.; DROPULIC, B.; ROY, A. J.; BARANYI, L.; GANGADHARAN, B.; PARKER, E. T.; LOLLAR, P.; DOERING, C. B. Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. **Molecular Therapy**, Atlanta, v. 19, n. 2, p. 302-309, 2011.

SUN, Y. M.; JIN, D. Y.; CAMIRE, R. M.; STAFFORD, D. W. Vitamin K epoxide reductase significantly improves carboxylation in a cell line overexpressing factor X. **Blood**, Chapel Hill, v. 106, p. 3811-3815, 2005.

SUTTIE, J. W. Handbook of Lipid Research (Deluca, H. F., ed). Plenum Press, New York, p. 211-277, 1978.

TIE, J. K.; STAFFORD, D. W. Structure and function of vitamin K epoxide reductase. **Vitamins & Hormones**, v. 78, p. 103-130, 2008.

TRONO, D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. **Gene Therapy**, v. 7, n. 1, p. 20-23, 2000.

TURKINGTON, P. T. Cathepsin G, a regulator of human vitamin K, dependent clotting factors and inhibitors. **Thrombosis Research**, v. 67, p. 147-155, 1992.

UEDA, N.; SHIRAHARA, H.; FUJIKAWA, T.; TAKAOKA, N.; NAKANISHI, Y.; SUZUKI, M.; MATSUO, N.; TANAKA, S.; NISHINA, S.; UEMURA, M.; TAKAKI, A.; SHIRATORI, Y.; YAMAMOTO, K. Exon 2 deletion splice variant of gamma-glutamyl carboxylase causes des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma cell lines. **Molecular Oncology**, Okayama, v. 2, p. 241-249, 2008.

UNGCHUSAK, K.; AUEWARAKUL, P.; DOWELL, S. F.; KITPHATI, R.; AUWANIT, W.; PUTHAVATHANA, P.; UIPRASERTKUL, M.; BOONNAK, K.; PITTAYAWONGANON, C.; COX, N. J.; ZAKI, S. R.; THAWATSUPHA, P.; CHITTAGANPITCH, M.; KHONTONG, R.; SIMMERMAN, J. M.; CHUNSUTTHIWAT, S. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). **The New England Journal of Medicine**, Nonthaburi, v. 352, p. 333-340, 2005.

VATANDOOST, J.; ZOMORODIPOUR, A.; SADEGHIZADEH, M.; ALIYARI, R.; BOS, M. H.; ATAIEI, F. Expression of biologically active human clotting factor IX in *Drosophila* S2 cells: γ -carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme. **Biotechnology Progress**, Tehran, v. 28 n. 1, p. 45-51, 2012.

VERMA, D.; MOGHIMI, B.; LODUCA, P. A.; SINGH, H. D.; HOFFMAN, B. E.; HERZOG, R. W.; DANIELL, H. Oral delivery of bioencapsulated coagulation factor IX prevents inhibitor formation and fatal anaphylaxis in hemophilia B mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Orlando, v. 13, n. 15, p. 7101-7106, 2010.

VERSTEEG, H. H.; HEEMSKERK, J. W. M.; LEVI, M.; REITSMA, P. H. New fundamentals in hemostasis. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 327-358, 2013.

VYSOTCHIN, A.; MEDVED, L. V.; INGHAM, K. C. Domain structure and domain-domain interactions in human coagulation factor IX. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 268, p. 8436-8446, 1993.

WAJIH, N.; SANE, D. C.; HUTSON, S. M.; WALLIN, R. The Inhibitory Effect of Calumenin on the Vitamin K-dependent γ -Carboxylation System. **The Journal of Biological Chemistry**, Winston-Salem, v. 279, n. 24, p. 25276-25283, 2004.

WAJIH, N.; SANE, D. C.; HUTSON, S. M.; WALLIN, R. Engineering of a Recombinant Vitamin K-dependent γ -Carboxylation System with Enhanced γ -Carboxyglutamic Acid Forming Capacity. **The Journal of Biological Chemistry**, Winston-Salem, v. 280, n. 11, p. 10540-10547, 2005.

WAJIH, N.; HUTSON, S. M.; WALLIN, R. siRNA silencing of calumenin enhances functional factor IX production. **Blood**, Winston-Salem, v. 108, n. 12, p. 3757-3760, 2006.

WATANABE, S.; TEMIN, H. M. Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the gag gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 19, p. 5986-5990, 1982.

WHITE, G. C.; BEEBE, A.; NIELSEN, B. Recombinant factor IX. **Thrombosis Haemostasis**, Chapel Hill, v. 78, n. 1, p. 261-265, 1997.

WHITE, G. C.; ROSENDAAL, F.; ALEDORT, L. M.; LUSHER, J. M.; ROTHSCCHILD, C.; INGERSLEV, J.; 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 and Haemostasis**, Chapel Hill, v. 85, p. 560, 2001.

WIGHT, J.; PAISLEY, S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. **Haemophilia**, v. 9, p. 418-435, 2003.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA. Apresenta registros sobre as doenças hemorrágicas no mundo em 2013. Disponível em: <<http://www.wfh.org/en/page.aspx?pid=1391>> Acesso em 10 de maio de 2013.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA. **Report on the Annual Global Survey 2011**. Disponível em : < <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1488.pdf>> Acesso em 10 de maio de 2013.

YAO, S.; SUKONNIK, T.; KEAN, T.; BHARADWAJ, R. R.; PASCERI, P.; ELLIS, J. Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. **Molecular Therapy**, Toronto, v. 10, p. 27-36, 2004.

YOSHITAKE, S.; SCHACH, B. G.; FOSTER, D. C.; DAVIE, E. W.; KURACHI, K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). **Biochemistry**, v. 24, n. 14, p. 3736-3750, 1985.

ZENNOU, V.; PETIT, C.; GUETARD, D.; NERHBASS, U.; MONTAGNIER, L.; CHARNEAU, P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. **Cell**, Paris, v. 101, n. 2, p. 173-185, 2000.

ZHANG, F. THORNHILL, S. I.; HOWE, S. J.; ULAGANATHAN, M.; SCHAMBACH, A.; SINCLAIR, J.; KINNON, C.; GASPAR, H. B.; ANTONIOU, M.; THRASHER, A. J. Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells. **Blood**, v. 110, p. 1448-1457, 2007.

ZOGG, T.; BRANDSTETTER, H. Activation mechanisms of coagulation factor IX. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 390, p. 391-400, 2009.

ZUFFEREY, R.; NAGY, D.; MANDEL, R. J.; NALDINI, L.; TRONO, D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 871-875, 1997.

ZUFFEREY, R.; DULL, T.; MANDEL, R. J.; BUKOVSKY, A.; QUIROZ, D.; NALDINI, L.; TRONO, D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. **Journal of Virology**, Geneva, v. 72, n. 12, p. 9873-9880, 1998.

ZUFFEREY, R.; DONELLO, J. E.; HOPE, T. J. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 2886-2892, 1999.

Apêndices

9 Apêndices

APÊNDICE A - Crescimento das células 293T e 293T-1054-FIX e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 23).

293T						293T-1054-FIX					
Tempo (dias)	Triplicata			Média	Desvio Padrão	Triplicata			Média	Desvio Padrão	p- valor *
1	8,00x10 ⁴	1,35x10 ⁵	1,80x10 ⁵	1,32x10 ⁵	5,0x10 ⁴	1,30x10 ⁵	2,00x10 ⁵	9,00x10 ⁴	1,40x10 ⁵	5,56x10 ⁴	p=0,856
2	2,45x10 ⁵	2,55x10 ⁵	2,25x10 ⁵	2,42x10 ⁵	1,52x10 ⁴	3,50x10 ⁵	1,90x10 ⁵	3,40x10 ⁵	2,93x10 ⁵	8,96x10 ⁴	p=0,380
3	5,45x10 ⁵	6,30x10 ⁵	5,45x10 ⁵	5,73x10 ⁵	4,90x10 ⁴	9,40x10 ⁵	1,08x10 ⁶	7,70x10 ⁵	9,30x10 ⁵	1,55x10 ⁵	p=0,019
4	1,16x10 ⁶	1,35x10 ⁶	1,20x10 ⁶	1,24x10 ⁶	1,0x10 ⁵	1,98x10 ⁶	1,66x10 ⁶	1,12x10 ⁶	1,59x10 ⁶	4,34x10 ⁵	p=0,245
5	3,46x10 ⁶	3,57x10 ⁶	3,46x10 ⁶	3,50x10 ⁶	6,35x10 ⁴	7,02x10 ⁶	4,59x10 ⁶	6,51x10 ⁶	6,04x10 ⁶	1,28x10 ⁶	p=0,026
6	6,00x10 ⁶	7,17x10 ⁶	5,07x10 ⁶	6,08x10 ⁶	1,05x10 ⁶	6,30x10 ⁶	1,06x10 ⁷	9,70x10 ⁶	8,87x10 ⁶	2,26x10 ⁶	p=0,125
7	7,45x10 ⁶	8,95x10 ⁶	7,20x10 ⁶	7,87x10 ⁶	9,46x10 ⁵	1,11x10 ⁷	9,50x10 ⁶	1,10x10 ⁷	1,05x10 ⁷	8,96x10 ⁵	p=0,023

*referente ao Teste t

APÊNDICE B - Crescimento das células SK-Hep-1 e SK-Hep-1-1054-FIX e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 23).

SK-Hep-1						SK-Hep-1-1054-FIX					
Tempo (dias)	Triplicata			Média	Desvio Padrão	Triplicata			Média	Desvio Padrão	p-valor *
1	1,50x10 ⁵	1,50x10 ⁵	9,00x10 ⁴	1,30x10 ⁵	3,46x10 ⁴	1,20x10 ⁵	1,00x10 ⁵	1,00x10 ⁵	1,07x10 ⁵	1,15x10 ⁴	p=0,3305
2	4,90x10 ⁵	4,60x10 ⁵	6,30x10 ⁵	5,27x10 ⁵	9,07x10 ⁴	2,20x10 ⁵	1,00x10 ⁵	2,00x10 ⁵	1,73x10 ⁵	6,42x10 ⁴	p=0,0053
3	6,60x10 ⁵	7,10x10 ⁵	6,05x10 ⁵	6,58x10 ⁵	5,25x10 ⁴	3,30x10 ⁵	4,60x10 ⁵	2,90x10 ⁵	3,60x10 ⁵	8,88x10 ⁴	p=0,0075
4	2,05x10 ⁶	1,97x10 ⁶	1,18x10 ⁶	1,73x10 ⁶	4,80x10 ⁵	6,50x10 ⁵	8,30x10 ⁵	8,10x10 ⁵	7,63x10 ⁵	9,86x10 ⁴	p=0,0267
5	3,27x10 ⁶	4,14x10 ⁶	3,42x10 ⁶	3,61x10 ⁶	4,65x10 ⁵	1,70x10 ⁶	1,40x10 ⁶	1,20x10 ⁶	1,43x10 ⁶	2,51x10 ⁵	p=0,0020
6	7,68x10 ⁶	8,08x10 ⁶	7,44x10 ⁶	7,73x10 ⁶	3,23x10 ⁵	1,98x10 ⁶	2,10x10 ⁶	2,52x10 ⁶	2,20x10 ⁶	2,83x10 ⁵	p=0,0001
7	9,05x10 ⁶	6,50x10 ⁶	5,95x10 ⁶	7,17x10 ⁶	1,65x10 ⁶	2,04x10 ⁶	2,40x10 ⁶	2,07x10 ⁶	2,17x10 ⁶	1,99x10 ⁵	p=0,0065

*referente ao Teste t

APÊNDICE C - Quantificação total de FIX recombinante expresso pelas linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX (dados referentes à tabela 5).

Linhagem Celular	Quadruplicata				Média	Desvio Padrão
293T	-	-	-	-	-	-
293T-1054-FIX	0,452	0,575	0,434	0,539	0,500	0,067
SK-Hep-1	-	-	-	-	-	-
SK-Hep-1-1054-FIX	1,211	0,641	0,639	0,723	0,803	0,274

APÊNDICE D – Produção específica de FIX recombinante expresso pelas linhagens celulares 293T e SK-Hep-1 transduzidas com o vetor lentiviral 1054-FIX (dados referentes à tabela 6).

Linhagem Celular	Triplicata			Média	Desvio Padrão
293T	-	-	-	-	-
293T-1054-FIX	0,055	0,042	0,044	0,047	0,007
SK-Hep-1	-	-	-	-	-
SK-Hep-1-1054-FIX	0,182	0,201	0,175	0,186	0,013

APÊNDICE E - Produção específica de FIX recombinante expresso pelas linhagens celulares 293T-1054-FIX e SK-Hep-1-1054-FIX e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 20).

Linhagem Celular	UI/10 ⁶ células					
	23 Dias	42 Dias	63 Dias	77 Dias	89 Dias	181 Dias
293T-1054-FIX	0,07	0,176	0,077	0,049	0,041	0,048
	0,03	0,101	0,065	0,032	0,043	0,028
Média	0,05	0,138	0,071	0,041	0,042	0,038
Desvio Padrão	0,028	0,053	0,008	0,012	0,001	0,014
SK-Hep-1-1054-FIX	0,514	0,147	0,074	0,133	0,165	0
	0,365	0,205	0,113	0,140	0,198	0,005
Média	0,439	0,176	0,093	0,136	0,181	0,0025
Desvio Padrão	0,105	0,041	0,027	0,004	0,023	0,003

APÊNDICE F – Número de células de 293T-1054-FIX após 5 dias de cultivo em diferentes meios de cultura suplementados com íons Ca⁺² e Mg⁺² e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 24).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	1,67x10 ⁷	1,35x10 ⁷	1,51x10 ⁷	2,26x10 ⁶	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca⁺² + 1 mmol/L Mg⁺²	1,4x10 ⁷	1,17x10 ⁷	1,28x10 ⁷	1,66x10 ⁶	p=0,3172
DMEM + 1 mmol/L Ca⁺² + 0,5 mmol/L Mg⁺²	2,08x10 ⁷	1,26x10 ⁷	1,67x10 ⁷	5,79x10 ⁶	p=0,7510
DMEM + 1 mmol/L Ca⁺² + 1 mmol/L Mg⁺²	9,05x10 ⁶	7,4x10 ⁶	8,23x10 ⁶	1,16x10 ⁶	p=0,0622

*referente ao Teste t entre o número de células em cultura no meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca⁺² e Mg⁺²

APÊNDICE G - Número de células de SK-Hep-1-1054-FIX após 5 dias de cultivo em diferentes meios de cultura suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 25).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	7,25x10 ⁶	7,95x10 ⁶	7,60x10 ⁶	4,94x10 ⁵	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	5,25x10 ⁶	5,35x10 ⁶	5,30x10 ⁶	7,07x10 ⁴	p=0,0228
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 0,5 mmol/L Mg^{+2}	6,45x10 ⁶	6,55x10 ⁶	6,50x10 ⁶	7,07x10 ⁴	p=0,0896
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	7,7x10 ⁶	6,0x10 ⁶	6,85x10 ⁶	1,20x10 ⁶	p=0,5003

*referente ao Teste t entre o número de células em cultura no meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2}

APÊNDICE H – Produção volumétrica de FIX recombinante ativo pelas células 293T-1054-FIX em meio DMEM suplementado com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} por um período de 24 horas e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 26).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	0,022	0,022	0,022	0	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,059	0,077	0,068	0,013	p=0,0371
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 0,5 mmol/L Mg^{+2}	0,047	0,042	0,045	0,003	p=0,0132
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,036	0,034	0,035	0,001	p=0,079

*referente ao Teste t entre a produção volumétrica das células em meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 24 horas.

APÊNDICE I - Produção volumétrica de FIX recombinante ativo pelas células 293T-1054-FIX em meio DMEM suplementado com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} por um período de 48 horas e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 26).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	0,075	0,081	0,078	0,004	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,119	0,129	0,124	0,007	p=0,0157
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 0,5 mmol/L Mg^{+2}	0,109	0,095	0,102	0,009	p=0,0877
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,081	0,095	0,088	0,009	p=0,3196

*referente ao Teste t entre a produção volumétrica das células em meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 48 horas.

APÊNDICE J - Produção volumétrica de FIX recombinante ativo pelas células 293T-1054-FIX em meio DMEM suplementado com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} por um período de 72 horas e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 26).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	0,144	0,089	0,117	0,038	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,129	0,109	0,119	0,014	p=0,9397
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 0,5 mmol/L Mg^{+2}	0,152	0,162	0,157	0,007	p=0,2844
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,085	0,109	0,097	0,016	p=0,5824

*referente ao Teste t entre a produção volumétrica das células em meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 72 horas.

APÊNDICE L - Comparação entre os diferentes tempos de produção volumétrica de FIX recombinante para as células 293T-1054-FIX (dados referentes à figura 26).

Meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM (24 hs)	0,022	0,022	0,022	0	p=0,0552
DMEM (48 hs)	0,075	0,081	0,078	0,004	
DMEM (72 hs)	0,144	0,089	0,117	0,038	
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2} (24 hs)	0,059	0,077	0,068	0,013	p=0,0301
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2} (48 hs)	0,119	0,129	0,124	0,007	
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2} (72 hs)	0,129	0,109	0,119	0,014	

*referente ao Teste one-way ANOVA entre a produção volumétrica das células nos diferentes tempos avaliados em meio DMEM e em meio DMEM suplementado com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} .

APÊNDICE M - Produção específica de FIX recombinante ativo pelas células 293T-1054-FIX em meio DMEM suplementado com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} por um período de 72 horas e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 27).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	0,052	0,040	0,046	0,008	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,037	0,052	0,045	0,010	p=0,8902
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 0,5 mmol/L Mg^{+2}	0,065	0,083	0,074	0,012	p=0,1224
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,056	0,088	0,072	0,022	p=0,2675

*referente ao Teste t entre a produção específica das células em meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 72 horas.

APÊNDICE N - Produção volumétrica de FIX recombinante ativo pelas células SK-Hep-1-1054-FIX em meio DMEM suplementado com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} por um período de 24 horas e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 28).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	0,196	0,186	0,191	0,007	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,145	0,122	0,134	0,016	p=0,0440
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 0,5 mmol/L Mg^{+2}	0,122	0,106	0,114	0,011	p=0,0147
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,151	0,165	0,158	0,009	p=0,0617

*referente ao Teste t entre a produção volumétrica das células em meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 24 horas.

APÊNDICE O - Produção volumétrica de FIX recombinante ativo pelas células SK-Hep-1-1054-FIX em meio DMEM suplementado com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} por um período de 48 horas e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 28).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	0,233	0,239	0,236	0,004	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,218	0,157	0,188	0,043	p=0,2544
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 0,5 mmol/L Mg^{+2}	0,186	0,151	0,169	0,024	p=0,0627
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,226	0,202	0,214	0,016	p=0,2173

*referente ao Teste t entre a produção volumétrica das células em meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 48 horas.

APÊNDICE P - Produção volumétrica de FIX recombinante ativo pelas células SK-Hep-1-1054-FIX em meio DMEM suplementado com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} por um período de 72 horas e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 28).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	0,245	0,304	0,275	0,041	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,231	0,222	0,227	0,006	p=0,2490
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 0,5 mmol/L Mg^{+2}	0,233	0,224	0,229	0,006	p=0,2631
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,261	0,267	0,264	0,004	p=0,7571

*referente ao Teste t entre a produção volumétrica das células em meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 72 horas.

APÊNDICE Q - Comparação entre os diferentes tempos de produção volumétrica de FIX recombinante para as células SK-Hep-1-1054-FIX (dados referentes à figura 28).

Meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM (24 hs)	0,196	0,186	0,191	0,007	p=0,0936
DMEM (48 hs)	0,233	0,239	0,236	0,004	
DMEM (72 hs)	0,245	0,304	0,275	0,041	

*referente ao Teste one way ANOVA entre a produção volumétrica das células nos diferentes tempos avaliados em meio DMEM.

APÊNDICE R - Produção específica de FIX recombinante ativo pelas células SK-Hep-1-1054-FIX em meio DMEM suplementado com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} por um período de 72 horas e estatísticas descritivas (dados referentes à figura 29).

Suplementação do meio de cultura	Duplicata		Média	Desvio Padrão	p-valor*
DMEM	0,204	0,229	0,217	0,017	-
DMEM + 0,5 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,263	0,249	0,256	0,010	p=0,1111
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 0,5 mmol/L Mg^{+2}	0,217	0,205	0,211	0,008	p=0,7299
DMEM + 1 mmol/L Ca^{+2} + 1 mmol/L Mg^{+2}	0,203	0,267	0,235	0,044	p=0,6441

*referente ao Teste t entre a produção específica das células em meio DMEM e nos meios DMEM suplementados com íons Ca^{+2} e Mg^{+2} após 72 horas.