UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem, expressão e caracterização do fator estimulador de
colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em
Escherichia coli.**

Fillipe Luiz Rosa do Carmo

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem, expressão e caracterização do fator estimulador de
colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em
Escherichia coli.**

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.

Orientado: Fillipe Luiz Rosa do Carmo

Orientador: Profa. Dra. Elisa Maria de
Sousa Russo

Ribeirão Preto
2014

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

Carmo, Fillipe Luiz Rosa do

Clonagem, expressão e caracterização do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli*. Ribeirão Preto, 2014

52p.: il. ; 30cm.

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. Proteína recombinante.
2. Fator estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante (rhG-CSF).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fillipe Luiz Rosa do Carmo

Clonagem, expressão e caracterização do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em Escherichia coli.

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.

Orientador(a): Profa. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais e à minha esposa Luciana

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por enfrentarem tudo para que eu pudesse ter uma educação de qualidade;

A minha amada esposa Luciana, pelo seu amor, carinho e por ser minha fortaleza;

Aos meus queridos irmãos Frederico, Franscilene, Ana Flávia, Enzo e Thatyana;

A Comunidade Zen Budista de Ribeirão Preto e ao Monge Kōjun pelos ensinamentos;

Aos grandes amigos que fiz em Ribeirão Preto Florência, Rodrigo, João, Isabel, Raquel, Nildes Juliana, Sarah, muito obrigado por estarem presentes;

A Eliza Vieira Davi, grande amiga que me ajudou em todas as etapas;

Aos amigos Kazinho, Dona Cleide e família por me acolherem e ajudarem no início dessa jornada;

Aos amigos que sempre estiveram presentes, Matheus, Pré-Natal, Mané, Gurpião, Dona, Kambitu, Amir;

Aos colegas de bancada José Eduardo, Henrique, Nathalia Indolfo, Juliana, Thaís, Adriana, Gisele pelos bons momentos;

A Laís, Fernanda, Silveli, Luciana Ambrosio, Luiz Miguel pela ajuda durante o desenvolvimento desse projeto;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro para realização desse projeto;

Aos docentes, colegas e funcionários da FCFRP;

A professora Dra. Elisa Maria de Sousa Russo, pela oportunidade, paciência, confiança depositada para realizar esse trabalho;

Meu sincero agradecimento

Vi veri veniversum vivus vici

RESUMO

Carmo, F. L. R. **Clonagem, expressão e caracterização do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli***. Ribeirão Preto, 2014. 52f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O sistema de expressão em *Escherichia coli* foi o primeiro a ser utilizado para produzir produtos farmacêuticos recombinantes e tem muitas vantagens quando comparado com sistemas eucarióticos, como o fácil cultivo, baixo custo e alto potencial de produção. O fator estimulador de colônias de granulócito (G-CSF) atua principalmente promovendo a maturação dos neutrófilos e estimulando sua atividade fagocítica e quimiotática, além de estar envolvido com o processo de segmentação nuclear dessas células. O fator estimulador de colônias de granulócitos humano recombinante (rhG-CSF) tem sido produzido por engenharia genética em *Escherichia coli*, e é usado no tratamento de diversas patologias, sobretudo em neutropenias provocadas pela quimioterapia usada no tratamento de tumores, pela radioterapia e pelo uso de drogas que suprimem a produção de células mieloides. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo a expressão da proteína rhG-CSF em bactérias *Escherichia coli*. A clonagem do gene rhG-CSF no vetor de expressão pET-28a(+) foi realizada nos sítios de restrição das enzimas EcoRI e XhoI, e a expressão da proteína recombinante em cepas de bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 foi obtida com sucesso. A proteína rhG-CSF, fundida à cauda de seis histidinas, foi purificada com êxito e identificada pelas técnicas de *Western Blotting* e por espectrometria de massas. São necessários estudos para avaliar a integridade estrutural e atividade biológica da proteína produzida, que se confirmada, possibilita que esta seja produzida em escala piloto.

Palavras chave: Filgrastima, rhG-CSF, G-CSF, expressão heteróloga, proteína recombinante, sistema procarioto, BL21DE3.

ABSTRACT

Carmo, F.L.R. **Cloning, expression and characterization of the colony-stimulating factor recombinant human granulocyte (rhG-CSF) in *Escherichia coli***. Ribeirão Preto, 2014. 52F. Master's Thesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The expression system in *Escherichia coli* was the first to be used to produce recombinant pharmaceuticals and has many advantages compared to eukaryotic systems, such as easy cultivation and high production potential at low costs. The granulocyte colony (G-CSF) stimulating factor acts primarily by promoting the maturation of neutrophils and stimulating their phagocytic and chemotactic activity. G-CSF is also involved with the process of neutrophils nuclear segmentation. The recombinant human granulocyte colonies stimulating factor (rhG-CSF) has been produced by genetic engineering in *Escherichia coli*, and it is used to treat of several conditions, especially neutropenia caused by chemotherapy used in the treatment of tumors, by radiotherapy and by the use of drugs that suppress the production of myeloid cells. The present study aimed the expression of rhG-CSF protein in *Escherichia coli* bacteria. The cloning of rhG-CSF gene in the expression vector pET-28a (+) was carried out on the restriction sites of the EcoRI and XhoI enzymes. Expression of the recombinant protein in *Escherichia coli* BL21DE3 was successfully achieved. The rhG-CSF protein, fused with a six histidine tag, was obtained and successfully purified and identified by the *Western Blotting* and by mass spectrometry techniques. Studies are needed to assess the structural integrity and biological activity of the protein produced, which, if confirmed, enables the production on a pilot scale.

Keywords: rhG-CSF, G-CSF, recombinant protein, prokaryotic system, BL21DE3.

RESUMEN

Carmo, F. L. R. **Clonación, expresión y caracterización del factor estimulador de colonia de granulocitos humano recombinante (rhG-CSF) en *Escherichia coli***. Ribeirão Preto, 2014. 52f. Disertación de Maestría. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

El sistema de expresión en *Escherichia coli* fue el primero en ser utilizado para producir productos farmacéuticos recombinantes y tiene muchas ventajas comparado con sistemas eucarióticos, como el fácil cultivo, bajo costo y alto potencial de producción. El factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) actúa principalmente promoviendo la maduración de los neutrófilos y estimulando su actividad fagocítica y quimiotáctica, además de estar involucrado en el proceso de segmentación nuclear de esas células. El factor estimulador de colonias de granulocitos humano recombinante (rhG-CSF) ha sido producido por ingeniería genética en *Escherichia coli*, y es usado en el tratamiento de diversas patologías, especialmente en neutropenias provocadas por la quimioterapia usada en el tratamiento de tumores, por la radioterapia y por el uso de drogas que suprimen la producción de células mieloides. De este modo, el presente estudio tuvo como objetivo la expresión de la proteína rhG-CSF en bacterias *Escherichia coli*. La clonación del gen rhG-CSF en el vector de expresión pET-28a(+) fue realizada en los sitios de restricción de las enzimas EcoRI y XhoI, y la expresión de la proteína recombinante en cepas de bacteria *Escherichia coli* BL21DE3 fue obtenida con éxito. La proteína rhG-CSF, unida a una terminación de seis histidina, obtenida fue purificada e identificada por las técnicas de *Western Blotting* y por espectrometría de masas. Son necesarios estudios para evaluar la integridad estructural y actividad biológica de la proteína producida, que una vez confirmada, posibilita la producción de la misma en escala piloto.

Palabras clave: rhG-CSF, G-CSF, proteína recombinante, sistema procariota BL21DE3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática do processo geral de hematopoese.....	2
Figura 2. Estrutura do fator estimulador de colônias de granulócitos recombinante humano (rhG-CSF)	4
Figura 3. Sequência de aminoácidos (estrutura primária) do rhG-CSF (Filgrastima)	5
Figura 4. Mapa do vetor de expressão pET-28a(+)	18
Figura 5. Screening de colônias de bactérias DH10 β após a transformação com o vetor de clonagem pUC57::rhG-CSF resistente a ampicilina	26
Figura 6. Amplificação do gene da proteína rhG-CSF a partir do vetor de clonagem pUC57	27
Figura 7. Digestão do vetor de clonagem pUC57 contendo a sequência correspondente proteína rhG-CSF com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI.	27
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1%. Digestão do vetor de expressão pET28a(+) com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI.....	28
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1%. Purificação do fragmento correspondente ao gene da proteína rhG-CSF e do vetor pET28a(+) digerido com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI	28
Figura 10. Screening de colônias de bactérias DH10 β após a transformação com o vetor de expressão pET28a::rhG-CSF resistente a canamicina.....	29
Figura 11. Screening de colônias de bactérias BL21DE3 após a transformação com o vetor de expressão pET28a::rhG-CSF que confere resistência à canamicina	30
Figura 12. Expressão da proteína rhG-CSF por colônias de bactérias BL21DE3. Indução da expressão por 1 mM de IPTG por 4 horas, a temperatura de 37°C	31
Figura 13 A. Amplificação do fragmento correspondente ao inserto rhG-CSF do DNA plasmidial purificado (pET28::rhG-CSF) de uma colônia de bactérias BL21DE3 selecionada.....	31
Figura 13 B. Vetor pET28::rhG-CSF, extraído da colônia selecionada, digerido com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI.....	31

- Figura 14.** Expressão da proteína rhG-CSF a partir de uma colônia de BL21DE3 recombinante selecionada após confirmação por sequenciamento nucleotídico. Indução da expressão realizada com 1 mM de IPTG por 24 horas a 37°C..... 32
- Figura 15.** Detecção por *Western Blotting* da proteína rhG-CSF expressa em BL21DE3. Membrana de Nitrocellulose 33
- Figura 16.** Análise do eluato da purificação da fração insolúvel de proteínas expressas por BL21DE3 recombinante. Proteínas purificadas em coluna HisTrap™ 1 mL HP (GE Healthcare, EUA) em condições desnaturantes (ureia 8 M) 34
- Figura 17.** Detecção por *Western Blotting* da proteína rhG-CSF expressa em BL21DE3 após processo de purificação e do medicamento Filgrastine® 34
- Figura 18.** Resultado da análise por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF da proteína rhG-CSF purificada 35
- Figura 19.** Resultado da análise por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF da Filgrastine® 36
- Figura 20.** Indução e expressão da proteína rhG-CSF com diferentes concentrações de IPTG e em diferentes temperaturas. Ensaio realizado em bactérias *Escherichia coli* BL21DE3..... 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Margem de Preferência aplicada nos processos de licitação para produtos produzidos no Brasil9

Tabela 2: Primers utilizados para amplificação do gene da proteína recombinante rhG-CSF 15

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

6xHis - Cauda de poli-histidina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAse I - Ácido desoxirribonuclease I

dNTP - Desoxirribonucleotídeo

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DO- Densidade ótica no comprimento de onda (λ)

DTT - Ditionitreitol

EDTA- Ácido etileno-diamino tetra-acético (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

FDA- Food and Drug Administration

g - grama

G-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos (Granulocyte Colony Stimulating Factor)

GE - General Electric

IgG- Imunoglobulina do tipo G

IPTG- Isopropil- β -D-tiogalactopirosídeo

K₂HPO₄ - Fosfato de potássio dibásico

Kb- quilo base (1000 pb)

KCl - Cloreto de Potássio

kDa- quilo Dalton

KH₂PO₄ - Fosfato de potássio monobásico

L - Litro

LB - Luria Bertani

LB- Meio Luria Bertani

M - Mol/litro

mA - Miliampère

mAb- Anticorpo monoclonal

mg- Miligrama

MgCl₂- Cloreto de magnésio

Min- Minuto(s)

mL- Mililitro

mM- Milimolar

MALDI Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz

MS Espectrometria de massas (mass spectrometry)

MS/MS Espectrometria de massas em tandem

NaCl- Cloreto de Sódio

NaOH- Hidróxido de Sódio

nm- nanômetro

ORF- open reading frame

pb- Pares de bases

PCR- Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)

POD - Peroxidase

PVDF - fluoreto de polivinilideno

r.p.m- Rotações por minuto

rhG-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos humano recombinante
(recombinant human Granulocyte Colony Stimulating Factor)

RNA- Ácido Ribonucléico

SDS- Dodecil Sulfato Sódio (Sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (Sodium dodecyl sulfate -polyacrilamide gel electrophoresis)

TE- Tampão Tris-EDTA

TEMED- N, N, N', N'- Tetrametiletenodiamina

TOF - Time of Flight

Tris- Tris (hidroximetil) aminometano

U - Unidade enzimática

U- Unidade (s)

UV- luz ultravioleta

V - Volt

µL- Microlitro

µM- Micromolar

TB - Terrific Broth

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O Fator estimulador de colônias de granulócito humano	2
1.2 Caracterização molecular do G-CSF humano e recombinante hG-CSF	3
1.3 O fator estimulador de colônias de granulócitos humano recombinante	4
1.4 Uso clínico e sua importância.....	5
1.5 Produção do biofármaco	7
1.6 Brasil e patentes.....	8
2 JUSTIFICATIVA.....	11
3 OBJETIVO	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 Estratégia Experimental	13
4.1.1 Fluxograma da metodologia utilizada.....	13
4.2 Desenho e otimização da sequência do gene rhG-CSF para o sistema procarioto (Escherichia coli)	13
4.3 Preparo de células competentes	14
4.4 Transformação por choque térmico de células quimiocompetentes.....	14
4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	15
4.6 Eletroforese em gel de Agarose	16
4.7 Purificação do plasmídeo contendo o inserto.....	16
4.8 Digestão dupla dos plasmídeos	17
4.9 Clonagem do gene rhG-CSF no vetor de expressão pET-28a(+)	17
4.10 Sequenciamento nucleotídico da região codificadora da proteína de interesse.....	18

4.11 Expressão da proteína rhG-CSF	19
4.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida	20
4.13 Detecção da proteína recombinante por Western blot (WB)	21
4.14 Purificação da proteína recombinante por Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	22
4.15 Confirmação da identidade da proteína recombinante por espectrometria massas	23
4.15.1 Digestão tripsínica <i>in situ</i> de proteínas separadas por SDS-PAGE.	23
4.15.2 MALDI-TOF/TOF	24
5 RESULTADOS.....	25
5.1 Otimização da sequência para produção da proteína rhG-CSF em <i>E. coli</i>	25
5.2 Clonagem do gene da proteína rhG-CSF no vetor de expressão pET28a(+)	25
5.3 Indução e expressão da proteína rhG-CSF em <i>E. coli</i> BL21DE3.....	30
5.4 Detecção da expressão da proteína recombinante por <i>Western Blotting</i> com anticorpo anti-histidina	33
5.5 Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	33
5.6 Detecção da expressão da proteína recombinante por <i>Western Blotting</i> com anticorpo Anti-G-CSF	34
5.7 Confirmação da identidade da proteína recombinante por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF.....	35
5.8 Ensaio de indução e expressão da proteína rhG-CSF com diferentes concentrações de IPTG e em diferentes temperaturas.	36
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÕES	43
8 PERPESCTIVAS FUTURAS.....	44
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

As células sanguíneas se originam de um precursor comum, a célula-tronco hematopoiética. Esse precursor comum origina dois tipos de progenitores celulares que são as células progenitoras da linhagem mieloide e células progenitoras da linhagem linfoide.

Células progenitoras linfoide podem ser comprometidas com a formação dos linfócitos B ou com a formação dos linfócitos T. As células progenitoras da linhagem mieloide se diferenciarão em linhagens comprometidas com a formação de hemácias e plaquetas (linhagem eritroide-megacariocítica) e com a formação de granulócitos e monócitos (linhagem granulocítica-monocítica), e dessa forma geram células conhecidas como Unidades Formadoras de Colônia (CFU). Por serem mais diferenciadas, as CFU originarão apenas alguns tipos celulares, como monócitos, macrófagos, células dendríticas, megacariócitos e os granulócitos. Os granulócitos são assim denominados por possuírem grânulos densamente coráveis no citoplasma. Entre eles estão os eosinófilos, basófilos e os neutrófilos, células responsáveis pela resposta imune inata na defesa contra bactérias e fungos (ZAGO, 2001).

Durante o processo de diferenciação celular, as citocinas têm um papel primordial por estimularem o desenvolvimento e a proliferação de células precursoras. São glicoproteínas secretadas por células do sistema imune ou por outros tipos celulares em resposta a uma estimulação (ZAGO, 2001; ALBERTS, 2011). Muitas dessas citocinas são chamadas fatores de estimulação de colônias, pois foram originalmente testadas pela sua habilidade de estimular o crescimento e o desenvolvimento de várias colônias leucocíticas ou eritroides da medula óssea.

Estas citocinas são secretadas pelo estroma que é o espaço medular constituído por fibroblastos, adipócitos, macrófagos, linfócitos, células endoteliais e matriz extracelular. O estroma constitui o microambiente que possibilita o crescimento e a diferenciação das células hematopoiéticas (VANS et al, 2009).

Figura 1. Ilustração esquemática do processo geral de hematopoese. Fonte: (Adaptado Celgene 2014)

1.1 O Fator estimulador de colônias de granulócito humano

O fator estimulador de colônias de granulócitos humano (hG-CSF, em inglês, *human Granulocyte Colony Stimulating Factor*), é uma citocina hematopoiética de grande importância que atua promovendo a maturação dos neutrófilos e estimulando sua atividade fagocítica e quimiotática, além de estar envolvido com o processo de segmentação nuclear dos neutrófilos maduros (GOUGH et al, 1997; BABALOLA et al, 2004; WITTMAN et al, 2006).

A primeira linha de defesa celular contra agentes infecciosos compreende os granulócitos polimorfonucleares, os macrófagos e células NK (Natural Killer) (KURITZKES et al, 1998; WITTMAN et al, 2006). Assim, o hG-CSF é de suma importância, pois estimula e regula a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células precursoras de neutrófilos na medula óssea (HARTUNG T. et al, 1998) que atuarão nessa primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos (METCALF et al, 1986; HÜBE et al, 2003). Outra característica do hG-CSF é a modulação da resposta inflamatória de forma a reduzir a liberação das citocinas pró-

inflamatórias por monócitos e macrófagos ativados (HARTUNG et al, 1998; BONEBERG et al, 2002; BARREDA et al, 2004).

Os monócitos e macrófagos são as células que mais produzem hG-CSF, entretanto também é produzido por fibroblastos, células endoteliais e linfócitos T, . (JANEWAY et al, 2000; BARREDA et al, 2004). A produção e liberação desta citocina encontram-se aumentadas após estímulo com lipopolissacarídeos, que é um componente da parede celular de bactérias Gram negativas, pelas interleucinas (IL-1, IL-3 e IL-4), Fator de necrose Tumoral (TNF- α) e também pelo fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (GOMES et al, 2012)

1.2 Caracterização molecular do G-CSF humano e recombinante hG-CSF

O gene que codifica para o G-CSF em humanos está localizado no cromossomo 17q21-22 (SIMMERS et al, 1987) A forma nativa da proteína G-CSF é glicosilada, o que confere resistência à degradação por proteases, garantindo estabilidade à molécula.. Contudo, as formas nativa e a não-glicosilada apresentam atividade biológica (OH-EDA et al, 1990).

A proteína recombinante hG-CSF (rhG-CSF) é uma molécula monomérica que possui uma sequência de 174 aminoácidos e tem peso molecular de aproximadamente 18,8 kDa. A molécula contém um resíduo de cisteína livre em sua forma reduzida na posição 17 e duas pontes dissulfeto (Cys^{36, 42} e Cys^{64, 74}), assim como na proteína hG-CSF, essas características são importantes para a estabilidade estrutural da proteína, dobramento correto da cadeia de aminoácidos e sua atividade biológica (LU et al, 1989).

A estrutura secundária da molécula contém aproximadamente 69% de α -hélice, 4% de folha- β , 5% de β -curvatura, sendo que o restante da molécula ainda não foi caracterizado (LU et al, 1989). Além disso, é composta por quatro hélices, denominada A, B, C e D. A hélice A forma-se entre os resíduos 11-39, a B entre 71-91, a C entre 100-123 e a D entre 143-172 (HILL et al, 1993).

Figura 2. Estrutura do fator estimulador de colônias de granulócitos recombinante humano (rhG-CSF) Fonte: (Annavarapu modificado 2014)

1.3 O fator estimulador de colônias de granulócitos humano recombinante

Biofármacos são as substâncias e/ou drogas medicinais produzidas pelo emprego da biotecnologia, principalmente pela tecnologia de DNA recombinante. São proteínas ou ácidos nucleicos utilizados para fins terapêuticos ou de diagnóstico *in vivo*. São homologas às proteínas humanas ou têm alto grau de semelhança com as mesmas. Contudo, para dizer que uma proteína terapêutica é um biofármaco, deve-se avaliar qual foi o bioprocesso utilizado na sua obtenção, pois eles são produzidos por outros métodos, do quê pela extração direta de fontes biológicas nativas (não-modificadas) (WALSH et al, 2005; WANG et al, 1999).

O gene G-CSF humano foi clonado e expressado primeiramente por dois grupos de pesquisa (Nagata 1986; Souza 1986). O grupo de pesquisa liderado por Larry Souza clonou o gene do G-CSF e produziu a proteína recombinante, facilitando significativamente tanto o estudo dos seus efeitos no sistema hematopoiético como o entendimento da biologia desse fator (HAMMERLING et al 1995).

et al, 2008; GOMES et al, 2012). Assim, as aplicações clínicas mais estudadas do rhG-CSF foram realizadas principalmente com a finalidade de melhora da neutropenia (ASANO, 1998). Sua administração em humanos promove aumento dose-dependente nos níveis de neutrófilos circulantes, sobretudo por reduzir o tempo de maturação da célula progenitora até o neutrófilo maduro (VANZ et al, 2008; GOMES et al; 2012).

Após a liberação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, o biofármaco foi usado com finalidade de diminuir a incidência de infecções associadas com neutropenia induzida por quimioterapia usada no tratamento de tumores, pela radioterapia e pelo uso de drogas que suprimem a produção de células mieloides (HARTUNG, 1998). Uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer, que passam por tratamento de quimioterapia, é a associação do quadro de neutropenia com a gravidade das infecções ao qual o paciente está suscetível (GARCÍA-CARBONERO et al; 2001).

As áreas de investigação para o uso do biofármaco rhG-CSF, incluem mielossupressão após o uso da quimioterapia contra o câncer seguido de transplantes autólogo ou alogênico da medula óssea (OHNO et al, 1991). O rhG-CSF também tem sido experimentado em tratamentos de várias neutropenias crônicas associadas com a anemia aplástica, síndromes mielodisplásicas, neutropenia idiopática, neutropenia cíclica (HANADA e ONO, 1990).

Na última década, outros alvos para o uso de hG-CSF vem sendo apresentados com sucesso, como reforçar o sistema imunológico em pacientes com HIV, pneumonia, infecções decorrentes da diabetes, leucemia e neutropenia febril (KURITZKES et al, 1998; HAROUSSEAU et al, 2000; GARCÍA-CARBONERO et al; 2001; BABALOLA et al, 2004). Estudos demonstram que o hG-CSF pode ser utilizado com resultados satisfatórios para o tratamento de infecções em pacientes não neutropênicos, como medida para fortalecer sua defesa imune, bem como prevenção (KURITZKES et al, 1998; WITTMAN et al, 2006). Relatos também sugerem benefícios em caso de peritonites e infecção tecidual em ratos e camundongos (WITTMAN et al, 2006).

Um estudo realizado em camundongos sugere que citocinas hematopoéticas, como G-CSF, melhoram a função cardíaca e reduzem a taxa de mortalidade após o infarto do miocárdio (HARADA et al, 2005). Essa ação é possível devido ao efeito protetor sobre os cardiomiócitos, a promoção da angiogênese e a prevenção da remodelação cardíaca do ventrículo esquerdo após infarto.

1.5 Produção do biofármaco

O sistema de expressão em *Escherichia coli* foi o primeiro a ser utilizado para produzir produtos farmacêuticos recombinantes e tem muitas vantagens quando comparado aos sistemas eucarióticos, como o fácil cultivo, baixo custo e alto potencial de produção (VANZ et al, 2008; GOMES et al, 2012; BASSO et al, 2013). Entre os diversos sistemas de expressão heteróloga disponíveis, a bactéria *E. coli* é um dos mais atraentes devido ao seu rápido crescimento em meio de cultura, sua genética bem descrita e a disponibilidade de inúmeros vetores bacterianos e cepas mutantes (VANZ et al, 2008; GOMES et al, 2012; BASSO et al, 2013).

A expressão de proteínas recombinante no sistema da *E. coli* apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade da expressão citoplasmática da proteína de interesse, o que pode acarretar na proteína com uma conformação indesejável e possivelmente sem atividade biológica desejada. A bactéria apresenta alto conteúdo de endotoxinas, que podem degradar a proteína recombinante expressa. Algumas combinações de códons são encontradas em baixa frequência em *E. coli*, podendo prejudicar a tradução da proteína, e como alternativa ao problema do uso preferencial de códons (*codon usage*) pode ser realizado a otimização do codons. O sistema também não permite fazer modificações pós-traducionais, o que acaba limitando seu uso para proteínas que não necessitam dessas alterações químicas.

Durante o processo de expressão de proteínas recombinantes no sistema procarioto a expressão em níveis elevados resulta, muitas vezes, na deposição da proteína desejada na forma inativa de agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão (BANEYX e MUJACIC, 2004; JEVSEVAR et al, 2005). A conformação da proteína, também pode ser prejudicada pelo o uso de promotores fortes e altas concentrações de indutores, que apesar de permitir uma alta produção de proteína, em alguns casos, acaba afetando o dobramento correto da proteína (JEVSEVAR et al, 2005).

Algumas estratégias podem ser usadas para evitar a formação dos corpos de inclusão, uma delas é realizar a expressão do gene a baixas temperaturas, o que resulta na diminuição do grau de transcrição, tradução e redução da força de interação hidrofóbica, a qual contribui para o dobramento errôneo da proteína (JEVSEVAR et al, 2005; CHALMERS et al, 1990; VASINA et al, 1997). Promotores fracos ou baixas concentrações de indutores também reduzem a taxa de síntese da

proteína alvo, alcançado um dobramento adequado da proteína alvo (JEVSEVAR et al, 2005).

Os agregados de proteínas recombinantes não possuem atividade biológica e se faz necessário realizar protocolos para solubilizá-los e devolver a conformação ativa da proteína por renaturação *in vitro* para então purificá-la (VALLEJO, 2004).

1.6 Brasil e patentes

O uso rhG-CSF como um medicamento biotecnológico, começou em 1989. O laboratório americano AMGEN, que patenteou o processo (Patente US 4,810,643) , lançou no mercado o produto nomeado como Neupogem® (Filgrastima) (NAGATA et al, 1986; SOUZA, 1989). Em 1991, a agência reguladora dos Estados Unidos U. S. FDA aprovou o uso clínico do rhG-CSF, com a finalidade de diminuir a incidência de infecções associadas à neutropenia induzida por quimioterapia de pacientes com câncer. No Brasil esse medicamento foi registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2002. O biofármaco se encontra disponível para uso terapêutico no Brasil sob os nomes comerciais de: Filgrastine® (Blausiegel), Filgrastim® (Biosintética), Granomax® (Dr. Reddys), Granulokine® (Roche), Myograft® (Bergamo), Leucin® (Bergamo) e Tevafilgras® (Teva).

Em 2006 a Filgrastima, produzida pelo laboratório Amgen Inc, perdeu sua proteção por patente. Ao longo dos anos com a expiração das patentes sobre medicamentos desenvolvidos por tecnologia recombinante, surge a possibilidade para a produção desses medicamentos, conhecidos na Europa pelo termo “*biosimilar*” e nos EUA pela expressão “*follow-on biologic product*” ou “*follow on proteins*”. , Esses biofármacos devem ter sua segurança e a eficácia comprovadas e serem equivalentes. Esses medicamentos não são considerados medicamentos “genéricos”, uma vez que os testes exigidos para desenvolver estes produtos são muito mais rigorosos que os realizados para um genérico tradicional produzido por síntese química.

O Programa Inova Saúde é uma iniciativa do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) e da Finep, em cooperação com o Ministério da Saúde (MS), o BNDES e o CNPq, que teve início em abril de 2013, com duração prevista até dezembro de 2017. O programa foi criado para apoiar atividades de

projetos de PD&I em farmoquímicos obtidos por processos de síntese química, biotecnológicos e extrativos, para desenvolvimento de medicamentos, novos ou genéricos, tanto para atendimento às demandas do Sistema Único de Saúde (SUS), quanto para o atendimento ao mercado nacional e internacional (Finep - Inova Saúde).

O programa está inserido no Plano Inova Empresa e destina R\$ 3,6 bilhões para as atividades de inovação do Complexo da Saúde para que haja uma diminuição efetiva da dependência tecnológica do Brasil em relação ao fornecimento de importantes insumos utilizados no campo da saúde humana (Finep - Inova Saúde).

Em Brasília, no dia 18 de Junho de 2014, foram apresentadas as medidas da política industrial que será adotada nos próximos anos. Um aspecto importante são as margens de preferência de 25%, nas compras Governamentais para todos os setores, inclusive do Complexo Saúde que abrange medicamentos (Biofármacos), materiais e equipamentos, para ser aplicada nos processos de licitação para produtos manufaturados e serviços nacionais. Essas medidas terão validade até 2020 (Tabela 1).

Tabela 1: Margem de Preferência aplicada nos processos de licitação para produtos produzidos no Brasil. (Fonte: Receita Federal do Brasil 2014)

SETOR	Margem de preferência	
	Produto	Valor
COMPLEXO SAÚDE	Medicamentos	8%
	Fármacos	20%
	Biofármacos	25%
	Materiais e equipamentos	8%, 15%, 20% e 25%

Como os medicamentos biotecnológicos possuem alto valor, esses produtos respondem por parcela importante dos gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com medicamentos. Cerca de um terço dos recursos aplicados na política de medicamentos pelo governo federal é destinado a esses medicamentos considerados excepcionais. De acordo com dados do IMS health, o Ministério da Saúde, o governo federal investiu R\$ 2 bilhões para a aquisição de medicamentos biotecnológicos no ano de 2011, e em 2012 MS gastou R\$ 9,4 bilhões com medicamentos de uma forma geral (DELGADO e ARCURI, 2013).

Entre 2011 e 2013, o total de financiamentos aprovados pelo BNDES para o complexo industrial da saúde, denominação que abrange tanto a cadeia farmacêutica como os fabricantes de equipamentos médicos — cresceu 275%. No ano de 2013, foi aprovado R\$ 1,47 bilhão para o setor. Desse total, R\$ 1,22 bilhão (83%) foi destinado a empreendimentos de biotecnologia. Como mostrado, foi gerado um novo cenário para empresas nacionais trazendo a oportunidade de investimentos nesse novo espaço de atuação, e consequentemente, estimular o desenvolvimento do setor nacional de biotecnologia (VANZ et al, 2008; GOMES et al, 2012).

Todo o medicamento não produzido no Brasil é importado pelo governo e está inserido no Programa de Assistência Farmacêutica do SUS como medicamento excepcional. Tais medicamentos possuem alto custo e são administrados para doenças, geralmente raras, cujo tratamento deve ser continuado (ENCARNAÇÃO, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Especificamente para o rhG-CSF, o investimento do governo federal no período de janeiro de 2006 a agosto de 2007 foi de R\$ 4.807.489,78, e durante os anos de 2011 e 2012 o SUS gastou o equivalente a R\$ 2.487.355,20 com as importações deste medicamento (DATASUS 2013), isso corresponde a 46% de todo o gasto do governo brasileiro com importação de medicamentos. No entanto, o produto representa apenas 4% da variedade de remédios adquiridos.

Foi demonstrado em um estudo que a implantação da produção da proteína rhG-CSF no Brasil pode levar a uma diminuição de custos até cerca de 90% nos valores pagos em compras governamentais, o que corrobora com a importância do desenvolvimento da tecnologia para produção deste medicamento no Brasil (ENCARNAÇÃO, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Nesse contexto, fica evidente a importância do desenvolvimento da tecnologia para obtenção da proteína recombinante rhG-CSF, visando uma futura produção de produtos biotecnológicos nacional, possibilitando ter uma indústria brasileira forte, inovadora e competitiva com os mercados externos.

2 JUSTIFICATIVA

Com o crescimento vertiginoso do setor de biotecnologia mundial e a expiração das patentes de muitos biofármacos originais, surge um cenário propício para o investimento na produção destas proteínas recombinantes nacionalmente. O desenvolvimento de biossimilares é uma alternativa de menor custo, visto que o país possui enormes gastos na aquisição de produtos biotecnológicos, como medicamentos excepcionais, para atender o SUS. Através dos programas nacionais de incentivo ao desenvolvimento do setor produtivo biotecnológico, da medida industrial de preferência na aquisição de produtos nacionais, e o consequente avanço no país nessa área, mostra-se fundamental priorizar pesquisas que possibilitam para atender à crescente demanda nacional por esse produto. Desse modo, o presente estudo é relevante por possibilitar o primeiro passo para o desenvolvimento de tecnologia necessária a produção da proteína rhG-CSF, que possui elevado valor terapêutico à saúde humana. É de fundamental importância desenvolver metodologias para promover a autossuficiência na produção deste biofármaco com tecnologia nacional, sem a dependência de importação dos mesmos, promulgando o desenvolvimento do setor de biotecnologia nacional.

3 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é clonar, expressar e purificar a proteína humana Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (rhG-CSF), em sistema procarioto de *Escherichia coli*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégia Experimental

4.1.1 Fluxograma da metodologia utilizada

4.2 Desenho e otimização da sequência do gene rhG-CSF para o sistema procarioto (*Escherichia coli*)

A sequência nucleotídica codificadora da proteína humana G-CSF foi obtida do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), depositada sob o número de acesso NM_000759. À sequência foram incluídos dois sítios de restrição, um na posição 5' para a enzima EcoRI e outro na posição 3' para a enzima XhoI, para auxiliar nos processos de clonagem. A sequência foi otimizada para a expressão em bactérias *Escherichia coli* no programa OptimumGene™

(GenScript Corporation) e sintetizada pela empresa GenScript Corporation (Piscataway, NJ, EUA) e clonada no vetor de pUC57.

4.3 Preparo de células competentes

As cepas de bactérias utilizadas nesse trabalho foram preparadas para a competência como descrito a seguir. As bactérias foram plaqueadas em meio ágar Luria-Bertani (LB: 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% ágar, pH 7,0) e mantidas a 37°C por 16 horas. Uma colônia isolada desta placa foi selecionada e expandida em tubo cônico de 50 mL em 5 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB: 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,0) e incubada a 37°C sob agitação a 200 rpm em incubadora de bancada ES-20 Shaker-incubator Environmental (Grant) por 16 horas.

Após incubação, todo o conteúdo (5mL) do caldo foi inoculado em 50 mL de meio LB líquido em erlemeyer estéril e incubado a 37°C, sob agitação, até a densidade óptica entre 0,5 e 0,6 a 600 nm (DO600). Ao atingir a DO o conteúdo foi transferido para um tubo falcon de 50 mL, estéril, previamente imerso em gelo, e centrifugado (4.000g a 4°C por 15 min). O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensão gentilmente em 10 mL de solução R1 (KCl 100 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM, KAc 30 mM, CaCl₂·2H₂O 10 mM, Glicerol 15%(v/v)). Após um repouso de 15 minutos, a suspensão de células foi novamente centrifugada (4000g a 4°C por 12 min). Descartou-se o sobrenadante, e o pellet foi gentilmente ressuspensão em 2 mL de solução R2 (KCl 10 mM, Na-MOPS 10 mM, CaCl₂·2H₂O 75 mM, Glicerol 15%(v/v)). A suspensão de células competentes foi fracionada em alíquotas de 200 µL e armazenadas a -80°C na presença de glicerol.

4.4 Transformação por choque térmico de células quimiocompetentes

As bactérias empregadas nesse trabalho foram transformadas pela metodologia de transformação bacteriana por choque térmico. As células competentes foram descongeladas e mantidas em gelo por 15 minutos. A essas células foram adicionados 10 µL dos plasmídeos (recombinados ou não), e a mistura

foi mantida em repouso por 30 minutos no gelo. Em seguida, as células foram levadas no banho-maria a 42°C por 1 minuto e novamente colocadas no gelo por 2 a 3 minutos. Foram adicionados 250 µL do meio de cultura SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM de glicose) e feita uma incubação no equipamento ES-20 Shaker-incubator Environmental (Grant) a 37°C por 1 hora, sob agitação (250 rpm). Todo o conteúdo foi plaqueado em meio de cultura LB ágar contendo os antibióticos adequados e específicos para a seleção, e acondicionados em estufa a 37°C por 16 horas.

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para as reações de amplificação da sequência nucleotídica correspondente à proteína de interesse rhG-CSF foram utilizados *primers* contendo os sítios de restrição EcoRI e XhoI.

Tabela 2: Primers utilizados para amplificação do gene da proteína recombinante rhG-CSF.

Primer	Sequência (‘5 – ‘3)	Tamanho do Fragmento
ForrhG-CSF_EcoRI	GAATTCATGACCCCGCTGGG	537 pb
RevrhG-CSF_XhoI	CTCGAGCGGTTGTGCCAG	

A amplificação foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para reação foram adicionados os seguintes componentes: tampão da polimerase (Ludwig Biotec, Brasil), 1,5 mM de MgCl₂ (Ludwig Biotec, Brasil), 1,0 µL de mix de dNTP (Ludwig Biotec, Brasil), 1µL de *primer forward* (10pmol/µL), 1µL de *primer reverse* (10pmol/µL), 2,5 U da enzima Taq polimerase (Ludwig Biotec, Brasil), quantidade aproximada de 100 ng de material genético a ser amplificado e água ultrapura autoclavada suficiente para completar o volume para 25µL.

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR pela ação da enzima Taq polimerase, após a padronização das condições de reação, no termociclador T100™

Thermal Cycler (BIO-RAD, EUA). Após uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, realizou-se 35 ciclos de amplificação: desnaturação de 95°C por 45 segundos, anelamento de 56°C por 40 segundos e extensão de 72°C por 45 segundos. Uma última etapa de extensão foi realizada na temperatura de 72°C por 10 minutos para o término da extensão e manteve-se a reação a 4°C até o uso.

4.6 Eletroforese em gel de Agarose

Para as análises dos produtos amplificados por PCR, da digestão dos plasmídeos e para purificação do fragmento de interesse foi empregada a eletroforese em gel de agarose. Para as análises foram feitos géis de agarose a 1% ou 0,5% (para purificação da banda) em tampão de corrida TAE (Tris Base 0,04 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 mM, em pH 8) e a eletroforese realizada em cuba Easycast Mini (Thermo Scientific) contendo tampão TAE, fixando a voltagem em 80 V e amperagem livre. O tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 60%) contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA) na proporção 1:1000 foi adicionado as amostras a serem analisadas.

As bandas formadas no gel foram comparadas a marcadores de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific, EUA) ou Ladder 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil). Os resultados foram visualizados e analisados em Fotodocumentador Bio-Rad – Modelo Universal HoodII (Bio-Rad Laboratories, USA).

4.7 Purificação do plasmídeo contendo o inserto

Foi realizado a expansão clonal das colônias de bactérias DH10β ou BL21 DE3 transformadas com os plasmídeos recombinantes em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 ng/ml) para o vetor pUC57 ou canamicina (50 ng/ml) para o vetor pET28a(+) à 37°C sob agitação a 200 rpm por 16 horas. Uma alíquota da cultura foi estocada em glicerol a -80°C e o restante utilizado para a purificação dos plasmídeos. A extração do DNA plasmidial foi realizada usando kit MiniPrep (Axygen Biosciences, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Alternativamente, para processos que exigiam quantidades maiores de DNA

plasmidial, a expansão clonal se deu em volumes de 50 mL e o kit QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, EUA) foi usado para extração do DNA plasmidial, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de DNA plasmidial purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, EUA) à 260nm.

4.8 Digestão dupla dos plasmídeos

A digestão dos plasmídeos foi realizada para a retirada do fragmento de interesse do vetor pUC57::rhG-CSF e para a abertura do vetor de expressão. As reações de digestão dupla foram preparadas com 1 µg de DNA plasmidial, 10 U da enzima de restrição EcoRI (Thermo Scientific, USA), 10 U da enzima de restrição XhoI (Thermo Scientific, USA), tampão Tango 2X (66 mM Tris-acetate pH 7,9, 20 mM Mg(CH₃COO)₂, 122 mM CH₃COOK, 0,1 mg/mL BSA) e água ultrapura autoclavada para um volume final de 50 µL. A reação foi incubada no termociclador T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, EUA) por 2 horas a temperatura de 37°C. As enzimas foram inativadas por 20 minutos a temperatura de 65°C e 20 minutos a temperatura de 80°C. As digestões foram analisadas em eletroforese em gel de agarose.

O fragmento do gene rhG-CSF digerido do vetor pUC57 foi purificado do gel de agarose 0,5 % empregando-se o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit - GE, segundo as instruções do fabricante.

4.9 Clonagem do gene rhG-CSF no vetor de expressão pET-28a(+)

O vetor de expressão pET28a(+) digerido e o fragmento do gene rhG-CSF purificado foram misturados na proporção molar de 10:1 (100 µg inserto/10 µg vetor) com 1 U de enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, EUA) e tampão de ligação 5X (Invitrogen, EUA). A reação foi realizada em volume final de 20µL, a 16°C por 16 horas. A reação de ligação foi utilizada para transformação bacteriana. Colônias transformadas foram selecionadas pela resistência ao antibiótico canamicina. Foi realizada a confirmação da inserção da sequência do gene rhG-CSF por PCR e

análise em eletroforese em gel de agarose. A figura 4 mostra o mapa do vetor de expressão empregado neste trabalho.

Figura 4. Mapa do vetor de expressão pET-28a(+) (Novagen, EUA): Ori: Origem de replicação, Thrombin site: sítio de clivagem para trombina, T7•Tag: sequência codificadora da cauda T7, T7 promoter: sítio de ligação promotor T7 e do respectivo primer, T7 terminator: sítio de terminação da polimerase, KanR: gene de resistência a canamicina, Lac Operator: operador lac, RBS: sítio de ligação do ribossomo, ATG: códon de iniciação, 6xHis: sequência codificadora da cauda de histidina, MCS: *multi cloning site*, sítio de clonagem com as enzimas de restrição indicadas, Stop Codons: códons de parada. Fonte: SnapGene adaptado 2014.

4.10 Sequenciamento nucleotídico da região codificadora da proteína de interesse

O vetor de expressão recombinante (pET28-rhG-CSF) foi sequenciado pelo método da terminação de cadeia, utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, Applied Biosystems, EUA).

Para o sequenciamento foi utilizado o par de *primers* universais *T7 Forward* e *Reverse*. As reações de amplificação ocorreram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e o sequenciamento foi realizado em sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer® 8-capillary (Applied Biosystems, EUA). A sequência obtida foi analisada com o auxílio do programa Bioedit Sequence Alignment Editor vs7.2.5 (Hall, 2013) e da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI).

4.11 Expressão da proteína rhG-CSF

Colônias isoladas de bactérias BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET-28a(+) recombinante foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido com canamicina (50 µg/mL) e glicose 1%, incubadas à 37°C por 16 horas, sob agitação a 200 rpm em incubadora de bancada ES-20 Shaker-incubator Environmental (Grant). No dia seguinte, 500 µL desse pré-inóculo foram adicionados a 10 mL de meio Terrific Broth (TB; Tartof & Hobbs, 1987) com canamicina em tubo cônico de 50 mL estéril e deixado sob agitação constante a 200 rpm à 37°C. A DO foi medida a 600 nm em espectrofotômetro (T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd., UK) e quando atingiu 0,4-0,6, uma alíquota de 1 mL da cultura (tempo zero) foi transferida para tubo 1,5 mL e centrifugada em microcentrifuga refrigerada de bancada Eppendorf 5415R (Eppendorf,) a 13.200 rpm por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet guardado a -20°C. Após a retirada dessa alíquota, foi adicionado IPTG (isopropiltiogalactosídeo) para uma concentração final de 1 mM na cultura para induzir a expressão da proteína recombinante. Foram colhidas amostras de 1 mL em diferentes tempos após a adição de IPTG (4 horas e 24 horas) que também foram centrifugadas nas mesmas condições.

Os *pellets* dos diferentes tempos de indução foram ressuspensos em tampão de lise (50 mM fosfato de potássio pH 7,8, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% Glicerol, 10 mM Imidazol, 0,5% *Triton-X100*), homogeneizados e submetidos a três sônicos de 10 segundos de duração, com intervalo de 10 segundos entre eles, a 50 de amplitude no equipamento Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, EUA). As amostras foram centrifugadas a 16.000g por 2 minutos à 4°C, os sobrenadantes, que correspondem às proteínas solúveis, foram separados dos *pellet* (fração de

proteínas insolúveis), e foram devidamente identificados e estocados a -20°C . As frações solúveis e insolúveis foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

A indução da proteína foi realizada sobre diferentes temperaturas (18°C , 25°C , 30°C , 37°C e 42°C) em Incubadora Refrigerada de Piso Shaker SL 221 (Solab), e diferentes quantidades de IPTG (Zero IPTG, 0,5 mM e 1,0 mM), como forma de avaliar a presença da proteína recombinante nas porções solúveis e insolúveis, em condições alternativas ao protocolo padrão de expressão.

As amostras coletadas da expressão em diferentes temperaturas e concentrações de IPTG, receberam quantidades proporcionais de tampão de lise (50 mM fosfato de potássio pH 7,8, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% Glicerol, 10 mM Imidazol, 0,5% *Triton-X100*,) acrescido de outros dois reagentes (2% N-Lauril Sarcosina e 2% Deoxilato de Sódio), com intuito de melhorar a solubilização da proteína recombinante, passaram pelo mesmo processo descrito anteriormente para análise em eletroforese em gel de poliacrilamida.

4.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Ambas as frações obtidas (solúveis e insolúveis) na preparação da amostra, após o processo de indução com IPTG, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). De acordo com o volume das amostras, foi calculado e adicionado tampão de amostra (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS e 0,2% de azul de bromofenol). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos a 100°C com o tampão de amostra. Foi utilizado 10 μL de cada amostra na SDS-PAGE a 15%. A eletroforese foi realizada em equipamento Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, EUA), com tampão de corrida contendo 25mM Tris-Base, 250 mM Glicina e SDS 0,1%, pH8,3; a amperagem foi mantida constante (25mA para cada gel) por tempo suficiente para separação das bandas.

Após a corrida os géis foram primeiramente mantidos em solução fixadora (50% de metanol e 10% de ácido acético) por 15 minutos e, posteriormente, corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25% de Coomassie Brilliant Blue R-250; 50% metanol; 10% ácido acético) por 1h, seguido de descoloração em solução contendo

30% de metanol e 10% de ácido acético, por 30 minutos. A captura das imagens e análises foram realizadas em equipamento ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, EUA).

4.13 Detecção da proteína recombinante por Western blot (WB)

Para a detecção e identificação imunológica da proteína recombinante produzida foram confeccionadas membranas de nitrocelulose para realização do western blot. As proteínas das frações solúveis e insolúveis, separadas por eletroforese em poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, EUA). A transferência foi realizada em um sistema de eletrotransferência Mini Trans-Blot® (Bio-Rad Laboratories, USA) contendo tampão de transferência (Tris-HCl 0,58% pH 8,4-9,4, metanol 20%, SDS 0,037% e glicina 0,29%). A transferência foi realizada à 100 V durante 60 minutos.

Para avaliar a eficiência da transferência a membrana foi corada com solução de Ponceau (0,2% de Ponceau; 5% de ácido acético). O corante foi removido com água destilada e a membrana incubada por 2 h a temperatura ambiente, em agitação, com solução de bloqueio, 5% de leite desnatado em TBS-Tween (20 mM de Tris-Cl, 500 mM de NaCl, 0,05% de Tween 20).

Para avaliar a expressão da proteína recombinante fusionada à cauda de poli histidina a membrana de Nitrocelulose contendo a proteína alvo foi incubada com o anticorpo primário Anti-His Mouse Monoclonal Amersham GE Healthcare diluído 1:300 na mesma solução de bloqueio por 14 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi submetida a três lavagens consecutivas com TBS-Tween. A incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase Anti Mouse IgG conjugado com peroxidase Amersham GE Healthcare, diluído 1:5000 em 5% de leite desnatado em TBS-Tween foi realizada por um período de 60 minutos a temperatura ambiente. A membrana foi submetida a três lavagens com TBS-Tween, conforme descrito anteriormente e a revelação foi feita pelo kit Amersham™ ECL™ Prime *Western Blotting* reagente (Bio-Rad Laboratories, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Um segundo ensaio de Western Blot foi realizado, dessa vez as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad, EUA), previamente

ativada com metanol por 10 segundos, a transferência também foi realizada em um sistema de eletrotransferência Mini Trans-Blot® (Bio-Rad Laboratories, USA) contendo tampão de transferência (Tris-HCl 0,58% pH 8,4-9,4, metanol 20%, SDS 0,037% e glicina 0,29%). O período de transferência por durante 60 minutos a 100 V. Após a transferência a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-G-CSF (K-15 Sc-49679, Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:500 na mesma solução de bloqueio por 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana passou por três lavagens consecutivas com TBS-Tweenm, sendo em seguida incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase Amersham™ ECL™ Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Whole Antibody (GE Healthcare, EUA) diluído 1:3000 em 5% de leite desnatado em TBS-Tween por um período de 60 minutos a temperatura ambiente. A membrana foi submetida a três lavagens com TBS-Tween, conforme descrito anteriormente e a revelação foi feita pelo kit Amersham™ ECL™ Prime *Western Blotting* reagente (Bio-Rad Laboratories, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após o período de incubação com os reagentes para detecção, a membrana foi colocada em cassete para exposição com um filme fotográfico durante 30 segundos para captação da imagem, o procedimento foi realizado na câmara escura.

4.14 Purificação da proteína recombinante por Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

Um clone produtor da proteína recombinante foi selecionado e expandido em 50 mL de meio de cultura TB, em agitação constante de 200 rpm, a 37°C. Atingida a DO entre 0,4-0,6 a 600 nm, foi realizada a indução da expressão com 1,0 mM de IPTG por 24 horas. Após à indução as células foram centrifugadas a 16000 rpm por 30 minutos a 4°C em centrífuga de bancada refrigerada Eppendorf 5810 R (Eppendorf,). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão de lise (50 mM fosfato de potássio pH 7,8, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% Glicerol, 10 mM Imidazol, 0,5% Triton-X100, 2% N-Lauril Sarcosina e 2% Deoxilato de Sódio) e sonicadas três vezes por 10 segundos, com intervalo de 10 segundos, a 50 de amplitude no equipamento Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, EUA). A solução sonicada foi centrifugada 16000 rpm por 30 minutos a 4°C, e teve o

sobrenadante descartado. Fração insolúvel obtida foi ressuspensa em tampão desnaturante (8 M ureia, 100 mM NaH_2PO_4 e 100 mM Tris-Cl pH 8,0) e homogeneizadas em vortex. Essa suspensão foi filtrada em filtro de acetato de celulose (Macherey-Nagel) para seringa de 0,20 μm e submetida à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). A coluna HisTrap™ 1 mL HP (GE Healthcare, EUA) contém níquel ligado à Sepharose, assim a purificação por IMAC é possível, devido a fato que a proteína recombinante rhG-CSF expressa esta fusionada a duas caudas de poli histidina, C-Terminal e N-Terminal, e conseqüentemente permite a ligação da resina às histidinas da proteína de interesse. O protocolo da coluna níquel HisTrap™ 1 mL HP (GE Healthcare, EUA) foi realizado conforme estabelecido pelo fabricante, em condições desnaturantes (ureia 8 M). A fração com a proteína purificada foi submetida à SDS-PAGE 15 % e a análise da identidade da proteína recombinante por foi feita espectrometria massas.

4.15 Confirmação da identidade da proteína recombinante por espectrometria massas

4.15.1 Digestão tripsínica *in situ* de proteínas separadas por SDS-PAGE.

A amostra em banda separada por eletroforese em gel de poliacrilamida foi submetida à digestão enzimática com tripsina. SDS e corante coomassie blue foram removidos por 3 lavagens com 400 μL de bicarbonato de amônio 100mM contendo 50% de acetonitrila, por ultimo a amostra foi desidratada com acetonitrila pura e secada em centrífuga rotatória à vacuo (SpeedVac, Savant). A banda de gel seco foi rehidratada com uma solução de tripsina (Promega) a 0,5 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ e após o completo intumescimento do gel, adicional volume de bicarbonato de amônio 0,1M foi adicionado para cobrir completamente o gel, sendo incubado a 37°C por 24 horas. A reação foi interrompida pela adição de 5 μL de ácido formico e mantida em temperatura ambiente para extração dos peptídeos. O extrato foi conservado em freezer (-20°C) até o momento da análise por espectrometria de massas.

Os peptídeos tripsínicos da amostra foram preparados em *micro-tip* contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol, equilibrada com ácido formico a 0,2%. A amostra foi carregada

em micro-tip e purificado de sais e outros componentes hidrofílicos com 3 x 100µL de ácido fórmico a 0,2%, sendo os peptídeos eluídos da resina em 30µL de uma solução de metanol a 60% em ácido fórmico 5%. Neste solvente a amostra foi diretamente infundida no espectrômetro de massas.

4.15.2 MALDI-TOF/TOF

Extratos de peptídeos tripsínicos foram misturados à matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (5mg/mL em 0,1% TFA/50% AcN) e analisados em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (Axima Performance, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK), com aquisição automática dos espectros MS e MSMS para os íons mais abundantes. A identificação das proteínas foi realizada por submissão dos espectros de massas obtidos por CID-MS/MS, tratados no software Launchpad 2.8 (Kratos-Shimadzu, Manchester, UK) e exportado no formato *Mascot generic format* para o programa MASCOT (www.matrixscience.com) utilizando o banco de dados nrNCBI, somente peptídeos com escore acima de 35 foram considerados para a identificação das proteínas. A análise MS/MS foi realizada no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em parceria com o Prof. Dr. Jose Cesar Rosa.

5 RESULTADOS

5.1 Otimização da sequência para produção da proteína rhG-CSF em *E. coli*

A partir da sequência nucleotídica do fator estimulador de colônia de granulócitos humanos depositada no National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob o número de acesso NM_000759, foi possível obter uma sequência de 522 pares de base (pb) correspondente ao gene de interesse e otimizá-la para expressão em bactérias *Escherichia coli* através do programa OptimumGene™ (GenScript Corporation). Nessa sequência desenhada, foram adicionadas sítios de restrição, um na posição 5', correspondente a enzima EcoRI e outro na posição 3' para enzima XhoI.

Foram retirados elementos regulatórios de ação *cis* presentes dentro da sequência original, duas regiões Shine-Dalgarno SD-like (AGGAGGU). O software OptimumGene™ (GenScript Corporation) permitiu realizar o cálculo do índice de adaptação de códons (CAI - Codon Adaptation Index). A sequência sem otimização de códons possui o valor CAI de 0,67 e após a análise e otimização o valor foi de 0,86, que pode ajudar a ter elevados níveis de expressão. A sequência final para o gene da proteína rhG-CSF resultou em um fragmento com 537 pb. O gene otimizado foi sintetizado e inserido no vetor de clonagem pUC57 e sequenciado pela empresa GenScript Corporation.

5.2 Clonagem do gene da proteína rhG-CSF no vetor de expressão pET28a(+)

O vetor recombinante pUC57::rhG-CSF foi usado para transformar bactérias *Escherichia coli* DH10 β quimicamente competentes por choque térmico. As colônias recombinantes selecionadas por antibiótico tiveram o fragmento, correspondente ao gene rhG-CSF, amplificado por PCR e analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% como pode visualizado na figura 5.

Figura 5. Screening de colônias de bactérias DH10 β após a transformação com o vetor de clonagem pUC57::rhG-CSF resistente a ampicilina. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, BRA); (1) Controle negativo da reação de PCR para o gene rhG-CSF; (2) Produto da PCR da colônia 1; (3) Produto da PCR da colônia 2; (4) Produto da PCR da colônia 3.

Observou-se que os amplicons obtidos das colônias de bactérias DH10 β recombinantes analisadas possuem o tamanho aproximado ao esperado (537 pares de base).

A colônia de bactéria contendo o vetor pUC57::rhG-CSF selecionada, foi expandida em meio LB líquido contendo Ampicilina (100 μ g/mL) para a purificação do DNA plasmidial utilizando-se o o AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit (Axygen Biosciences, USA). A presença do fragmento de rhG-CSF foi confirmada por PCR do DNA plasmidial purificado e analisada por eletroforese em gel de agarose 1% conforme demonstrado na figura 6.

Figura 6. Amplificação do gene da proteína rhG-CSF a partir do vetor de clonagem pUC57. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, BRA); (1) Controle negativo da reação de PCR para o gene rhG-CSF; (2) Produto da PCR utilizando os *primers* para o gene da proteína rhG-CSF.

O DNA plasmidial do vetor pUC57:rhG-CSF obtido da purificação foi submetido a dupla digestão com as enzimas EcoRI e XhoI para retirar o inserto do vetor de clonagem. A digestão resultou em duas bandas de pesos moleculares de aproximadamente 2170 pb (vetor pUC57) e 537 pb (rhG-CSF) como observado na figura 7.

Figura 7. Digestão do vetor de clonagem pUC57 contendo a sequência correspondente proteína rhG-CSF com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI. Eletroforese em gel de agarose 1%. (1) Vetor pUC57::rhG-CSF não digerido; (2) Vetor pUC57::rhG-CSF digerido com EcoRI e XhoI.

O fragmento obtido da dupla digestão do vetor pUC57:rhG-CSF, foi purificado do gel com o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE) (Figura 9).

O vetor de expressão pET28a(+) também foi submetido a dupla digestão com as enzimas EcoRI e XhoI. Foi produzida uma banda de aproximadamente 5336 pb que corresponde ao vetor digerido (figura 8).

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1%. Digestão do vetor de expressão pET28a(+) com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI. (M) Marcador de peso molecular O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); (1) Vetor pET28a(+) não digerido; (2) Vetor pET28a(+) digerido com EcoRI e XhoI.

O fragmento obtido da dupla digestão do vetor de expressão pET28a(+), foi purificado com o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE) (Figura 9), para permitir que somente fragmentos digeridos fossem usados no protocolo de ligação.

Figura 9. Purificação do fragmento correspondente ao gene da proteína rhG-CSF e do vetor pET28a(+) digerido com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, BRA); (1) Fragmento rhG-CSF purificado; (2) Vetor pET28a(+) digerido com EcoRI e XhoI.

O fragmento rhG-CSF purificado foi ligado ao vetor de expressão pET28a(+) através da reação com a enzima T4 DNA ligase. Foram usados 97 ng de inserto e 8,7 ng de vetor pET28a(+) purificados. O vetor recombinante obtido (pET28::rhG-CSF) foi inserido em bactérias *Escherichia coli* DH10 β quimicamente competentes por choque térmico.

As colônias resistentes ao antibiótico canamicina, característica proporcionada pela presença do vetor pET28a(+), que cresceram na placa de cultura, foram selecionadas, isoladas e expandidas em meio LB líquido (canamicina 50 μ g/ml). Foi realizado um *screening* das colônias para identificar quais plasmídeos continham o inserto, conforme representado na figura 10.

Figura 10. *Screening* de colônias de bactérias DH10 β após a transformação com o vetor de expressão pET28a::rhG-CSF resistente a canamicina. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, BRA); (1) Controle negativo da reação de PCR para o gene rhG-CSF; (2) ao (6) Fragmento amplificado por PCR correspondente ao gene rhG-CSF presente em diferentes colônias.

Uma colônia de bactéria DH10 β contendo o plasmídeo recombinante pET28::rhG-CSF foi selecionada, expandida em meio líquido e teve seu DNA plasmidial purificado. O DNA plasmidial obtido foi utilizado no processo de transformação por choque térmico de bactérias BL21DE3 quimicamente competentes. As colônias de bactérias BL21DE3 presentes nas placas foram selecionadas e expandidas em meio de cultura LB líquido contendo canamicina (50 μ g/mL), para que fosse realizado um *screening* de colônias por PCR para e analisados em eletroforese em gel de agarose com intuito de identificar a aquelas que apresentavam o inserto do tamanho esperado conforme a figura 11.

Figura 11. Screening de colônias de bactérias BL21DE3 após a transformação com o vetor de expressão pET28a::rhG-CSF que confere resistência à canamicina. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, BRA); (1) Controle negativo da reação de PCR para o gene rhG-CSF; (2) ao (5) Fragmento amplificado por PCR correspondente ao gene rhG-CSF presente em diferentes colônias recombinantes .

5.3 Indução e expressão da proteína rhG-CSF em *E. coli* BL21DE3

O vetor pET28a(+) possui uma cauda T7-Tag que acrescenta aproximadamente 3,5 kDa à proteína produzida, juntamente com a cauda de histidina que possui 840 daltons quee somada à massa da proteína recombinante rhG-CSF sintetizada de 18,8 kDa, obtém-se uma proteína com a massa aproximada de 23,7 kDa.

Colônias de bactérias *E. coli* BL21DE3, contendo o vetor de expressão pET28::rhG-CSF foram selecionadas para os testes de expressão. As alíquotas coletadas após a indução com IPTG e analisadas em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. Foi visualizada uma banda compatível com o tamanho esperado da proteína recombinante de 23,7 kDa na fração de 4 horas de indução, em três colônias de um total de 4 colônias testadas (Figura 12).

Figura 12. Expressão da proteína rhG-CSF por colônias de bactérias BL21DE3. Indução da expressão por 1 mM de IPTG por 4 horas, a temperatura de 37°C. Gel de SDS-PAGE 15% corado com comassie blue. (M) Marcador de peso molecular Prestained SDS-PAGE Standards 161-0318 (Bio-Rad); (1),(3),(5) e (7) Proteínas vindas de colônias não induzidas; (2), (4), (6) e (8) proteínas provenientes de colônias induzidas com IPTG.

Um dos clones foi selecionado, expandido em meio LB líquido contendo antibiótico Canamicina (50 µg/mL). Foi realizada a extração do DNA plasmidial e digestão com as enzimas EcoRI e XhoI e, posteriormente, feito o sequenciamento nucleotídico (Figura 13).

Figura 13 A. Amplificação do fragmento correspondente ao inserto rhG-CSF do DNA plasmidial purificado (pET28::rhG-CSF) de uma colônia de bactérias BL21DE3 selecionada. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, BRA); (1) e (2) Fragmento rhG-CSF amplificado por PCR da colônia selecionada; (M') GeneRuler 50 pb DNA Ladder (Fermentas). **B. Vetor pET28::rhG-CSF, extraído da colônia selecionada, digerido com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI.** Eletroforese em gel de agarose 1%.

A análise do sequenciamento demonstrou que o segmento sequenciado possui alta homologia (100%) com o gene do fator estimulador colônias de Granulócitos (G-CSF).

O clone contendo a sequência de DNA desejada, confirmado pelo sequenciamento, foi submetido a um protocolo indução de expressão em bactérias BL21DE3 por 24 horas.

A expressão da proteína recombinante foi induzida com 1 mM de IPTG e foram coletadas 3 alíquotas (tempo zero, tempo 4 horas e tempo 24 horas). Pela análise da expressão por SDS-PAGE foi possível identificar na fração insolúvel, nas amostras de 4 e 24 horas, a presença de uma banda de aproximadamente 23,7 kDa (figura 14).

Figura 14. Expressão da proteína rhG-CSF a partir de uma colônia de BL21DE3 recombinante selecionada após confirmação por sequenciamento nucleotídico. Indução da expressão realizada com 1 mM de IPTG por 24 horas a 37°C. Gel de SDS-PAGE 15% corado com comassie blue. (M) Marcador de peso molecular de proteínas Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad); (1) Fração insolúvel de proteínas provenientes da colônia no tempo inicial (Tempo zero); (2) Fração insolúvel após 4 horas de indução da expressão; (3) Fração insolúvel após 24 horas da indução por IPTG; (4) Fração solúvel no tempo 0 de indução ; (5) Fração solúvel após 4 horas de indução; (6) Fração solúvel após 24 horas da indução.

5.4 Detecção da expressão da proteína recombinante por *Western Blotting* com anticorpo anti-histidina

Para detectar a expressão da proteína recombinante na fração insolúvel, uma amostra da expressão no tempo 4 horas teve suas bandas separadas por SDS-PAGE e depois transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). A membrana, para o *Western Blotting*, foi marcada com o anticorpo Anti-His Mouse Monoclonal (Amersham, GE Healthcare) e a revelação da membrana demonstrou que houve a expressão de uma proteína com cauda de histidina de tamanho aproximado de 23,7 kDa (Figura 15).

Figura 15. Detecção por *Western Blotting* da proteína rhG-CSF expressa em BL21DE3. Membrana de Nitrocellulose. (M) Marcador de peso molecular Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad); (1) Fração insolúvel da indução contendo a proteína rhG-CSF marcada com anticorpo monoclonal anti-histidina. (indução com 1 mM de IPTG por 4 horas).

5.5 Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

A fração insolúvel de proteínas expressas por uma cultura de BL21DE3 recombinante foi purificada na coluna HisTrap™ 1 mL HP (GE Healthcare, EUA) em condições desnaturantes (ureia 8 M). O eluato purificado foi submetido à SDS-PAGE 15 %. A figura 16 apresenta o resultado da purificação, demonstrando que foi possível purificar a proteína recombinante pela técnica de cromatografia de afinidade em uma única fração de eluição com Imidazol.

Figura 16. Análise do eluato da purificação da fração insolúvel de proteínas expressas por BL21DE3 recombinante. Proteínas purificadas em coluna HisTrap™ 1 mL HP (GE Healthcare, EUA) em condições desnaturantes (ureia 8 M). Gel de SDS-PAGE 15% corado com comassie blue. (M) Marcador de peso molecular (kDa) Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad); (1) Proteína rhG-CSF purificada ; (2) Medicamento Filgrastine (marca).

5.6 Detecção da expressão da proteína recombinante por *Western Blotting* com anticorpo Anti-G-CSF

Um novo ensaio de *Western Blotting* foi realizado com a fração insolúvel das proteínas expressas (purificada) e com o medicamento Filgrastine® (Blausiegel Indústria e Comércio Ltda). As amostras passaram por SDS-PAGE 15% e após a transferências das bandas para uma membrana de PVDF, foram incubadas com anticorpo Anti-goat G-CSF K-15 (Santa Cruz Biotechnology).

A figura 17 mostra que a revelação da membrana com o kit Amersham™ ECL™ Prime *Western Blotting* evidenciou a marcação do anticorpo AntiG-CSF com bandas possuindo os padrões de migração esperados para a fração insolúvel da cultura induzida na BL21 DE3, da proteína recombinante purificada e da Filgrastine®.

Figura 17. Detecção por *Western Blotting* da proteína rhG-CSF expressa em BL21DE3 após processo de purificação e do medicamento Filgrastine®. Membrana de PVDF marcada com anticorpo policlonal anti-G-CSF. (1) Banda correspondente à fração insolúvel das proteínas expressas (tempo de indução de 24 h); (2) Banda correspondente a proteína purificada rhG-CSF marcada com anticorpo policlonal anti-G-CSF; (3) Banda correspondente ao medicamento Figrastine®.

5.7 Confirmação da identidade da proteína recombinante por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF

A proteína recombinante rhG-CSF e a Filgrastine® foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). Os dois spots excisados contendo as bandas correspondentes foram digeridos com tripsina e os peptídeos analisados em equipamento MALDI-TOF-TOF do Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram encontradas em ambas as amostras dois peptídeos, que correspondem a 9% da sequência esperada para a proteína G-CSF, sendo que o score respeitado foi de no mínimo 35.

As figuras 18 e 19 são os relatórios provenientes da ferramenta de busca MASCOT (www.matrixscience.com) utilizando o banco de dados nrNCBI, nas figuras são mostradas as sequências dos dois peptídeos e informações sobre o número de score, massa e carga são mostrados.

Figura 18. Resultado da análise por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF da proteína rhG-CSF purificada.

Figura 19. Resultado da análise por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF da Filgrastine®.

5.8 Ensaio de indução e expressão da proteína rhG-CSF com diferentes concentrações de IPTG e em diferentes temperaturas.

A cepa de bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 contendo o vetor pET28::rhG-CSF foi submetida a diferentes condições experimentais, de indução e expressão. O protocolo foi realizado sem a indução por IPTG e com as concentrações de 0,5mM e 1,0mM nas quais as culturas eram expostas a diferentes temperaturas (18°C, 25°C, 30°C, 37°C e 42°C), para avaliar a solubilidade da proteína expressa em diferentes parâmetros. Em todas as condições, a proteína recombinante foi expressa, seja na fração solúvel ou insolúvel, conforme os resultados obtidos pela análise em SDS-PAGE 15% (Figura 20).

Figura 20. Indução e expressão da proteína rhG-CSF com diferentes concentrações de IPTG e em diferentes temperaturas. Ensaio realizado em bactérias *Escherichia coli* BL21DE3. Gel de SDS-PAGE 15% corado com comassie blue. . (M) Marcador de peso molecular (kDa) Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) (Apenas as bandas de 25 kDa e de 20kD a estão presentes); (1,1'),(2,2') e (3,3'): Amostras sem adição de IPTG, T zero, T4 horas e T24 horas, respectivamente; (4,4'),(5,5') e (6,6'): Indução da expressão proteica com 0,5 mM de IPTG Tzero, T4 horas e T24 horas, respectivamente; (7,7'),(8,8') e (9,9'): Indução com 1,0 mM de IPTG Tzero, T4horas e T24horas, respectivamente.

Para aumentar a solubilidade da proteína recombinante, foi adicionado N-lauril sarcosina e deoxilato de sódio ao tampão de lise/sonicação, com isso notam-se diferenças na presença da proteína na fração solúvel e insolúvel das amostras antes da adição dos dois reagentes (Figura 14) e após (Figura 20), o que corrobora seu uso para os testes em diferentes parâmetros de temperatura e concentração de indutor. Observou-se que a proteína rhG-CSF pode ser produzida com uma expressão considerável na fração insolúvel das amostras que foram cultivadas a temperatura de 37°C e 30°C, com ou sem indução por IPTG. Na análise das frações solúveis, a amostra cultivada à temperatura de 25°C, indicou uma presença relativamente maior da proteína recombinante do que nas amostras provenientes das culturas em outras temperaturas, sendo que nas temperaturas de 30°C, 37°C e 42°C, elas aparentam apresentar os mesmos níveis.

6 DISCUSSÃO

O fator estimulador de colônias de granulócito (G-CSF) atua principalmente promovendo a maturação dos neutrófilos e estimulando sua atividade fagocítica e quimiotática, além de estar envolvido com o processo de segmentação nuclear dessas células. Foi produzido por engenharia genética, a proteína recombinante hG-CSF, em sua forma não glicolisa e obtida da expressão heteróloga em bactérias *Escherichia Coli*, e ela tem sido usada amplamente para o tratamento de quadros de neutropenia.

A otimização pelo programa OptimumGente™ (GenScript Corporation), nos permitiu modificar a sequência nucleotídica do *fator estimulador de colônia de granulócitos humanos* NM_000759 depositada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sem perturbar a sequência da proteína, possibilitando que essa fosse expressa, de forma eficiente, em bactérias *Escherichia coli*, sistema escolhido por ser barato e rápido.

A sequência original do gene codificante para hG-CSF possuía uma maior presença de códons raros, o que poderia tornar mais crítico os níveis da expressão heteróloga. A remoção da preferência de codons ajuda a aumentar a eficiência de expressão de genes eucarióticos, em *E. coli* (HU et al, 1996; HALE e THOMPSON, 1998). Na literatura estão disponíveis dados que indicam que o nível de eficiência da expressão da proteína G-CSF humana (não otimizada) em *E. coli* é em torno de 10% (KOMASTU et al, 1987), e que esse nível pode ser aumento para 30%, usando gene sintético (KANG et al, 1995).

O cálculo do índice de adaptação de códons (CAI), uma medida utilizada para as preferências de códons em procariotos (EYRE-WALKER e BULMER, 1993; GUTIERREZ et al., 1994; PERRIÉRE et al., 1994) e que estima o grau de extensão da utilização diferencial de códons em genes altamente expressos (SHARP e LI, 1987), foi realizado. Um valor CAI de 1,0 é considerado perfeito e valores maiores que 0,8 são considerados como bons. Após a otimização, o valor CAI da sequência foi 0,86, um valor considerado bom e que pode resultar em elevados níveis de expressão. Os elementos regulatórios de ação *cis*, como os sítios de ligação do ribossomo, retirados da sequência original, permitiu que não houvesse interferência da sequência clonada na transcrição do mRNA, possibilitando tradução eficiente.

Como o gene rhG-CSF foi sintetizado com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI em sua sequência, a opção por clonar diretamente o fragmento, através da digestão do vetor pUC::rhG-CSF, se enquadraria no objetivo de ter a sequência correta ligada no vetor de expressão e justifica a escolha dessa metodologia para a clonagem. Desse modo, tivemos a sequência rhG-CSF ligada a três vetores de expressão que possuíamos em nosso laboratório. Os vetores são: pET28a(+) (Novagen), pET20b(+) (Novagen) e no plasmídeo de expressão não-comercial pAE (2800pb), cedido pelo Prof. Dr. Paulo Lee Ho do Instituto Butantan. O vetor pAE foi construído para permitir a fusão da proteína recombinante, no caso rhG-CSF, com uma cauda de seis histidinas, facilitando, assim, a purificação por cromatografia de afinidade a níquel (RAMOS et al, 2004).

Os par de *primers* desenhados para obter fragmento específico de 537 pb (tamanho esperado), foi usado nas reações de PCR e os *amplicons* gerados foram visualizados nos géis de agarose, concluindo que a sequência foi amplificada com êxito e consequentemente o gene encontrava-se presente nos vetores de expressão, bem como nas bactérias transformadas com os plasmídeos, tanto na bactéria de estoque (DH10 β), como na bactéria de expressão (BL21 DE3).

Ao realizar a expressão da proteína recombinante, verificou-se que o sistema de indução funcionou com os vetores recombinantes pET28::rhG-CSF, pET20::rhG-CSF e pAE::rhG-CSF, quando analisado por eletroforese SDS-PAGE foi encontrada uma banda específica com perfil de migração eletroforético esperado, condizente com peso molecular para a proteína rhG-CSF. Contudo, durante os ensaios de indução da expressão, o vetor recombinante pET28::rhG-CSF foi o que apresentou maior consistência nos resultados da indução com 1 mM de IPTG à temperatura de 37°C. O nível de expressão foi muito bom, ao passo que a expressão nos outros dois vetores, pAE e pET20b(+), a banda de interesse estava presente, mas com intensidade menor em relação ao pET28::rhG-CSF. Esse achados justificaram a escolha o pET-28a(+) como para a expressão da proteína rhG-CSF sintetizada em células de bactérias BL21DE3.

O plasmídeo escolhido para a clonagem da sequência e expressão da rhG-CSF foi o plasmídeo pET28a(+)(Novagen), possui duas regiões codificantes para uma cauda de seis histidinas, uma região C-terminal e ou outra N-terminal, possibilitando que a proteína de interesse seja mais facilmente purificada (SONG et al, 2009). A presença dessas caudas na proteína recombinante foi usada para

realização de ensaios de *Western Blotting* com anticorpo anti-histidina (POGGE V. STRANDMANN et al, 1995; ZENTGRAF et al, 1995). A marcação da membrana com um anticorpo anti-histidina, e posterior revelação, permitiu mostrar que a proteína expressa observada no gel de poliacrilamida correspondia à banda da proteína recombinante de interesse com um peso molecular ao redor de 23,7 kDa.

A confirmação por SDS-PAGE e por *Western Blotting* (marcação anti-histidina), nos permitiu selecionar o vetor recombinante, pET28::rhG-CSF, para o sequenciamento nucleotídico. O vetor selecionado teve sua sequência confirmada, apresentando 100% de homologia com a sequência otimizada, que também foi analisada por Blastx, apresentando 100% similaridade entre a nossa sequência de nucleotídeos correlacionada com a sequência de aminoácidos existente no banco de dados, confirmando que se tratava da proteína rhG-CSF.

A expressão da proteína recombinante hG-CSF em *Escherichia coli* leva à formação de agregados de proteínas insolúveis, denominado corpos de inclusão, enquanto que a quantidade produzida na forma solúvel é negligenciável por ter baixo rendimento (MARSTON et al, 1986; JEONG et al, 2001). Como objetivo é obter uma quantidade razoável de proteína recombinante, a fração insolúvel da proteína é a opção correta para trabalhar. A cauda de histidina fusionada à proteína rhG-CSF possibilitou que a proteína expressa fosse purificada em coluna de níquel com eluição pelo Imidazol de forma efetiva. A escolha de realizar a purificação em condição desnaturante (ureia 8M), é a que a conformação nativa da proteína, com suas duas pontes dissulfeto, poderia esconder a cauda de histidina, o que impede a interação desta com o níquel presente na resina da coluna, e resultaria em baixos níveis obtidos de proteína purificada (RAMYA e SELVARAJAN, 2012).

Depois de purificada, a fração da solução contendo a proteína recombinante, juntamente com a fração insolúvel obtida da expressão e o medicamento Filgrastine® (como controle positivo), foram submetidos a um novo ensaio de *Western Blotting*, usando dessa vez o anticorpo primário anti-G-CSF K-15 Sc-49679 (Santa Cruz Biotechnology). O resultado permitiu comprovar a identidade da proteína produzida. O fator estimulador de colônias de granulócitos humano recombinante (rhG-CSF) marcado com anticorpo específico apresentou massa molecular esperada

Durante os ensaios de indução e expressão da proteína rhG-CSF, observou-se que as amostras provenientes de cultura mantidas a 37°C e 30°C, apresentaram uma expressão consideravelmente maior na fração insolúvel, que pode gerar

quantidade significativa de proteína recombinante expressa, contudo sem a conformação desejada por estar presente na forma de corpos de inclusão, o pode acarretar subseqüentes passos de purificação e renaturação (GOMES et al, 2012).

Nos resultados apresentados, do teste de expressão em diferentes condições de cultivo, elevados níveis da proteína recombinante foi produzida na ausência de IPTG, nas culturas sem indução. Isso ocorre devido a uma expressão basal da T7 RNA polimerase que está sob controle do promotor *lacUV5* no lisogene DE3 ocasionando, subseqüentemente, uma expressão basal da proteína alvo cuja sequência está inserida posteriormente ao promotor T7 do pET, que é favorecida por meios de cultura complexos, como o Terrif Broth usado, baixo pH e o cultivo se encontrar em fase estacionária (BANEYX F et al, 2004; HARADA et al, 2005; NOVAGEN, 2005; VANZ et al, 2008). A concentração de IPTG é uma variável muito importante no processo de expressão de proteínas recombinantes, principalmente quando o processo será escalonado, pois possui custo elevado e devido sua toxicidade, seu uso é contraindicado para expressão proteínas de uso humano (HANNING e MAKRIDES, 1998).

Na análise das frações solúveis há presença da proteína recombinante, contudo esse resultado foi favorecido pela adição de N-lauril sarcosina e deoxilato de Sódio ao tampão de lise/sonicação, como prova disso, as amostras tratadas sem esses dois reagentes, no teste de expressão piloto, não apresentaram porções consideráveis de proteína recombinante na fração solúvel. O objetivo da adição desses dois componentes é para separar as proteínas possivelmente agregadas às membranas celulares e remover quaisquer restos celulares residuais, (VANZ et al, 2008; LI et al, 2012; CHAOZHAN et al, 2012), dessa maneira obtendo níveis consideráveis de proteína solubilizada em relação à outros estudos (DEHAGHANI, 2010; GOMES et al, 2012;).

A fração solúvel da amostra cultivada à temperatura de 25°C indicou uma presença relativamente maior da proteína recombinante do que nas outras amostras, indicando que baixas temperaturas diminuem a expressão global, mas favorecem a obtenção da proteína na forma solúvel (YANG et al, 2011). A possibilidade de produzir a proteína rhG-CSF na fração solúvel e sem adição de IPTG se mostra vantajosa em relação aos trabalhos publicados (FALLAH et al, 2003; KHALILZADEH et al, 2008;), mesmo apesar da baixa produção, em comparação aos resultados apresentados na forma insolúvel, essa condição permite que estudos

sejam realizados para aperfeiçoar essa condição e futuramente escalar a produção.

A análise por espectrometria de massas das duas bandas, correspondentes à proteína purificada rhG-CSF e a Filgrastine[®], indicaram a presença de dois peptídeos, comuns às amostras, pertencentes a proteína fator estimulador de colônias de granulócitos humana (hG-CSF). A baixa porcentagem de 9% encontrada, referentes aos dois peptídeos em cada amostra, possivelmente deve-se ao fato que a quantidade de amostra não foi suficiente para realizar o ensaio, e que o tratamento enzimático com a tripsina não gerou fragmentos que permitiriam ser identificados por espectrometria de massas. Apesar de o resultado apresentar uma correspondência baixa (9%) na busca por peptídeos, possivelmente a proteína em questão trata-se de uma proteína G-CSF, já que o medicamento Filgrastine[®] apresentou os mesmo peptídeos nas mesmas condições.

7 CONCLUSÕES

- A estratégia de otimização de códons, em combinação com a síntese, do gene correspondente a sequência da proteína rhG-CSF para expressão em bactérias *Escherichia coli* demonstrou-se apropriada e evitou limitações para o processo de expressão;
- A proteína rhG-CSF foi expressa em bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3);
- A proteína rhG-CSF, fundida à cauda de seis histidina foi purificada por cromatografia de afinidade em condição desnaturante;
- Foi possível verificar a identidade da proteína produzida por *Western Blotting* e por espectrometria de massas.
- A produção da proteína na ausência da IPTG mostrou-se viável, o que pode reduzir os custos da produção em larga escala da proteína recombinante.

8 PERPESCTIVAS FUTURAS

A continuidade do trabalho com a produção do Fator Estimulador de Colônias de Granulocítos Humano recombinante permitirá:

- Desenvolver uma metodologia para renaturar a proteína recombinante e produzi-la na forma nativa;
- Avaliar a atividade biológica do rhG-CSF comparando-a com produtos existentes no mercado;
- Desenvolvimento do bioprocesso para produzir a proteína rhG-CSF em escala piloto em biorreatores de bancada para prospectar a produção industrial.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, H. Synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster*: natural selection and translational accuracy. **Genetics**, v.136, p. 927–935, 1994.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. **Biologia molecular da célula**, 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ALTSCHUL, S. F.; THOMAS L. M.; ALEJANDRO A. S.; et al, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ASANO S. The rationale for therapeutical use of recombinant human G-CSF. In: Yamamura Y, ed. Recent progress in cytokine research. Tokyo: **Medicine Review Course**, p. 135-150, 1988.

BABALOLA, C.; NIGHTINGALE, C.; NICOLAU, D.; Adjunctive efficacy of granulocyte colony stimulating factor on treatment of *Pseudomona aeruginosa* pneumonia in neutropenic and non-neutropenic hosts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p.1098-100, 2004.

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia Coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399-408, 2004.

BARREDA, DR.; HANINGTON, PC.; BELOSEVIC, M.; Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 509-54, 2004.

BASSO, A. M. M.; GROSSI DE SÁ, M. F.; PELEGRINI, P. B. Biopharmaceutical and Biosimilar Products in Brazil: From Political To Biotechnological Overview. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 5, p. 060-066, 2013.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 257-74, 2013.

BILES, B. D.; CONNOLLY, B. A. Low-fidelity *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase mutants useful in error-prone PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 22, p. 176-182, 2004.

BONEBERG, E.; HARTUNG, T. Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. **Inflammation Research**, v. 51, n. 3, p. 119-28, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1316, de 23 de Julho de 2002. **Diário Oficial da União**, 2002.

CHALMERS, J. J.; KIM, E.; TELFORD, J.N.; WONG, E. Y.; et al. Effect of temperature on Escherichia Coli overproducing β -lactamase or human epidermal growth factor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p.104-111, 1990.

CODEVILLA, C. F.; BARTH, T.; BRUM JÚNIOR, L.; FRONZA, M.; DALMORA, S. L. Biological potency evaluation and characterization of rhG-CSF in pharmaceutical products. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, p. 104-108, 2004.

DATA SUS [Internet]. [cited 2013 Oct 1];Available from: www.datasus.gov.br

ENCARNAÇÃO, A.; ALMEIDA, C.; BRUM, P.; KARELE, S. Projeto de uma planta para a produção de G-CSF recombinante. Rio de Janeiro (Brasil): **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2005.

EYRE-WALKER, A.; BULMER, M. Reduced synonymous substitution rate at the star of Enterobacterial genes. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 4599-4603, 1993.

FRIEHS, K. Plasmid Copy Number and Plasmid Stability. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.86, p.47–82, 2004.

GARCÍA-CARBONERO, R.; MAYORDOMO, J. I.; TORNAMIRA, M. V.; et al. Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized trial. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 1, p. 31-38, 2001.

GOEDDEL, D. V. Systems for heterologous gene expression. **Methods in Enzymology**, v. 185, p. 3-7, 1990.

GOMES, F. R.; MALUENDA, A. C.; TÁPIAS, J. O.; OLIVEIRA, F. L.; et al. Expression of recombinant human mutant granulocyte colony stimulating factor (Nartograstim) in Escherichia coli. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 7, p. 2593-600, 2012.

GOUGH, A.; CLAPPERTON, M.; ROLANDO, N.; et al. Randomised placebo-controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor in diabetic foot infection. **Lancet**, v.350, n. 9081, p. 855-859, 1997.

GUTIERREZ, A.P.; MILLS, N.J.; SCHREIBER, S. J.; ELLIS, C. K. A physiologically based tritrophic perspective on bottom-up top-down regulation of populations. **Ecology**, v. 75, p. 2227-2242, 1994.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. R. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HALE, R. S., THOMPSON, G. Codon optimization of the gene encoding a domain from the human type 1 neurofibromin protein results in three fold improvement in expression level in Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 12, p. 185–188, 1998.

HAMMERLING, U.; KROON, R.; SJÖDIN, L. In vitro bioassay with enhanced sensitivity for human granulocyte colony-stimulating factor. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 13, n. 1, p. 9-20, 1995.

HANADA, T.; ONO, I. Disappearance of neutrophil oscillation in a child with cyclic neutropenia after treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **European Journal of Haematology**, v. 45, p. 181-182, 1990.

HANNING, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli", **Trends in Biotechnology**, v.16, p.54-60, 1998,.

HARADA, M.; QIN, Y.; TAKANO, H.; MINAMINO, T.; et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jack-Stat pathway in cardiomyocytes. **Nature Medicine**, v. 11, n. 3, p. 305-311, 2005.

HARTUNG, T.; AULOCK, S.; VON, W. A. Role of granulocyte colony-stimulating factor in infection and inflammation. **Medical Microbiology and Immunology**, v.187, n. 2, p. 61–69, 1998.

HILL, C.; OSSLUND, T.; EISENBERG, D. The structure of granulocyte colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. **Biochemistry**, v. 90, p. 5167-5171, 1993.

HU, X.; SHI, Q.; YANG, T.; JACKOWSKI, G. Specific replacement of consecutive AGG codons results in high level expression of human cardiac troponin T in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 7, p. 289–293, 1996.

HÜBEL, K.; ENGERT, A. Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: a update and summary. **Annals of Hematology**, v. 82, n. 4, p. 207–213, 2003.

IKEMURA, T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* system. **Journal of Molecular Biology**, v. 151, p. 389–409, 1981.

IKEMURA, T.; OZEKI, H. Codon usage and transfer RNA contents: organism specific codon choice patterns in reference to the isoacceptor contents. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 47, p. 1087–1097, 1982.

IKEMURA, T. Codon usage and transfer-RNA content in unicellular and multicellular organisms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 2, p. 13–34, 1985.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 289–98, 2005.

JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2000.

JEONG, K. J.; LEE, S. J. Secretory production of human granulocyte colony-stimulating factor in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, p. 311–318, 2001.

JEVSEVAR, S.; GABERC-POREKAR, V.; FONDA, I.; et al. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 2, p. 632–639, 2005.

KANG, S. H.; NA, K. H.; PARK, J. H.; et al. High-level expression and simple purification of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in *E. coli*. **Biotechnology Letter**, v. 17, p. 687–692, 1995.

KOMASTU, Y., MATSUMOTO, T.; KUGA, T.; et al. (1987). cloning of granulocyte colony stimulating factor cDNA and its expression in *Escherichia coli*. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 78, p. 1179–1181, 1987.

KRISHNA D. V.; RAO, J. V.; NARASU, M. L.; et al. Optimization of the AT-content of codons immediately downstream of the initiation codon and evaluation of culture conditions for high-level expression of recombinant human G-CSF in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology**, v. 38, p. 221–232, 2008.

KURITZKES, D.; PARENTI, D.; WARD, D.; et al. Filgrastim prevents severe neutropenia and reduces infective morbidity in patients with advanced HIV infection: results of a randomized, multicenter, controlled trial. **Aids**, v. 12, p. 65-74, 1998.

LI, M.; FAN, H.; LIU, J.; WANG, M.; WANG, L.; et al. High pH solubilization and chromatography-based renaturation and purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor from inclusion bodies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1264–1274, 2012

LU, H. S.; BOONE, T. C.; SOUZA, L. M.; LAI, P. H.; Disulfide and secondary structure of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 268, n. 1, p. 81-92, 1989.

MAKRIDES, S. C. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 512–538, 1996.

MARSTON, F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 240, p.1–12, 1986.

METCALF, D.; The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, v. 67, n. 2, p. 257–267, 1986.

MINISTÉRIO DA SAÚDE [homepage on the Internet]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude>. [2009 out 20].

NAGATA, S.; TSUCHIYA, M.; ASANO, S.; et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. **Nature**, v. 5, n. 319, p. 415-418, 1986.

NOVAGEN. pET System Manual. 11 ed. USA:NOVAGEM,2005. p.80.

OH-EDA, M.; HASEGAWA, M.; HATTORI, K.; et al. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 20, p. 11432–11435, 1990.

OHNO, R.; TOMONAGA, M.; KOBAYASHI, T.; et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor after intensive induction therapy in relapsed or refractory acute leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 871-877, 1991.

PAVLOV, A. R.; PAVLOVA, N. V.; KOZYAVKIN, S. A.; SLESAREV, A. I. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 253-260, 2004.

PERRIÈRE, G.; GOUY, M.; GOJOBORI, T. NRSUB: a non-redundant data base for the *Bacillus subtilis* genome. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 5525-5529, 1994.

POGGE VON STRANDMANN, E.; ZOIDL, C.; NAKHEI, H.; et al. A highly specific and sensitive monoclonal antibody detecting histidine-tagged recombinant proteins. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 7, p. 733–735, 1995.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

RAMYA, M.; SELVARAJAN, E. Purification of human recombinant granulocyte colony stimulating factor from *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 50, p. 11104-11109, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: **Cold Spring Harb Lab Press**, p. 20–25, 1989.

SONG, J.A.; HAN, K.Y.; AHN, K.Y.; et al. Proteolysis and synthetic strategy of human G-CSF in *Escherichia coli* BL21(DE3), **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p.7-14, 2009.

SHARP, P. M.; LI W. H. The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. **Nucleic Acids Research**, v.15, p. 1281-1295, 1987.

SHUMAN, S. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 32678-32684, 1994.

SILVA, M. Clonagem, Expressão e Purificação das Proteínas de superfície, PsaA e Fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae*. São Paulo, SP, 2005. Tese de doutorado em Ciências (Biotecnologia). USP/Instituto Butantan, SP.

SIMMERS, R. N.; WEBBER, L. M.; SHANNON, M. F.; et al. Localization of the G-CSF gene on chromosome 17 proximal to the breakpoint in the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 70, n. 1, p. 330–332, 1987.

SONG, J. A.; HAN, K. Y.; PARK, J. S.; et al. Human G-CSF synthesis using stress-responsive bacterial proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 296, p.60-66, 2009.

SOUZA, L. Production of pluripotent granulocyte colony-stimulating factor.1989. Patente US 4,810,643.

SOUZA, L. M.; BOONE, T. C.; GABRILOVE, J.; et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 61-65, 1986.

SPADA, S.; WALSH, D. G. Directory of Approved Biopharmaceutical Products. CRC Press, 2005.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 211–223, 2006.

U.S. Food and Drug Administration [homepage on the Internet]. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov>. [2009 jul 06].

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 3, p. 1-11, 2004.

VANZ, A. L. S.; RENARD, G.; PALMA, M. S.; et al. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. **Microbial Cell Factories**, v.7, n.13, 2008.

VASINA, J.; BANEYX, F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperature: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. **Protein Expression and Purification**, v. 9, p. 211-218, 1997.

WALSH, G. Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2nd edition. New York: Wiley, 2003.

WANG, W.; Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 185, n. 2, p.129-188, 1999.

WITTMAN, B.; HORAN, J.; LYMAN, G. H. Prophylactic colony-stimulating factor in children receiving myelosuppressive chemotherapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 32, n.4, p. 289-303, 2006.

YANG, Z.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; et al. Highly Efficient Production of Soluble Proteins from Insoluble Inclusion Bodies by a Two-Step-Denaturing and Refolding Method. **PLoS ONE** 6(7): e22981. 2011

ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2001.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. Biologia Molecular Básica. 2nd Edição. Porto Alegre, p. 75-87, 2003.

ZENTGRAF, H.; FREY, M.; SCHWINN, S.; et al. Detection of histidine-tagged fusion proteins by using a high-specific mouse monoclonal anti-histidine tag antibody. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n.16, p. 3347-3348, 1995.