AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EXPRESSÃO DE TIREOTROFINA HUMANA EM
CÉLULAS DE EMBRIÃO DE RIM HUMANO (HEK293)**

PATRÍCIA MARINHO SANT'ANA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Teresa de C. P. Ribela

São Paulo

2016

Dedico este trabalho

À meus pais Sebastião Sant'Ana e Júlia Marinho Sant'Ana por todo carinho e dedicação.

À minha irmã Caroline Marinho Sant'Ana, que suportou os meus piores momentos e que me ajudou quando mais precisei.

À minha orientadora, Prof^ª Maria Teresa C. P. Ribela, que apesar de toda turbulência me apoiou e me trouxe até aqui. Definitivamente eu não teria conseguido sem ela.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que me ajudou a suportar as dificuldades e chegar até aqui.

Ao Dr. Paolo Bartolini, idealizador do projeto.

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares e à Dra. Cibele Nunes Peroni por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho e por todo conhecimento transmitido.

À Beatriz Elaine Almeida, que guiou os meus primeiros passos no laboratório.

À Eliana Rosa Lima Filha (vulgo “curica”), pela ajuda na realização dos testes com animais e por seus trocadilhos hilários.

À Thais Cristina Sevilhano, pelas dicas de PCR e pelas angústias divididas causadas por vetores e pessoas fechadas.

À Eliza Higuti, pelos cigarros doados, dicas de transfecção e cortes de cabelo gratuitos.

À Marina Lima, pelo carinho com que sempre me tratou.

À Paulo Vitor Dias, por ter me mostrado modernidades interessantes, mas que até o momento não consegui utilizar.

À Ed Carlos e Paula Juliana, pelos cafés no fim de tarde e pela ajuda profissional.

À Gustavo de Jesus e Felipe Douglas pela convivência amistosa.

Aos colegas Junqueira e Miriam Suzuki por estarem sempre prontos a ajudar.

Aos colegas João Ezequiel Oliveira, José Maria e Rosângela pela ajuda no processo de purificação.

Aos amigos Cristiane Aparecida Silva, Priscila Gimenez, Fábio Fortes, Clóvis Melo, Luis Dutra, Luiz Piva, Kelly Rosseti e Marlene Tursi, pela torcida, palavras de incentivo, preocupação e paciência.

À CAPES pelo apoio financeiro.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**EXPRESSÃO DE TIREOTROFINA EM
CÉLULAS DE EMBRIÃO DE RIM HUMANO (HEK293)**

PATRÍCIA MARINHO SANT'ANA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Teresa de C. P. Ribela

Versão Corrigida
Versão original disponível no IPEN

São Paulo
2016

EXPRESSÃO DE TIREOTROFINA HUMANA EM CÉLULAS DE EMBRIÃO DE RIM HUMANO (HEK 293)

Patrícia Marinho Sant'Ana

RESUMO

Neste trabalho foi transfectada uma linhagem de células embrionárias de rim humano (HEK293) com os genes das subunidades α e β da tireotrofina humana (hTSH), hormônio glicoproteico secretado pela hipófise. Após 5 dias de cultivo obteve-se uma concentração de hTSH no meio condicionado de 0,95 μ g/mL. O material foi concentrado e purificado utilizando uma estratégia envolvendo duas etapas, uma cromatografia de troca catiônica e uma cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, que permitiu uma recuperação de 55% e uma pureza >90%. O produto purificado (hTSH-HEK) foi analisado e comparado a uma preparação comercial obtida em células CHO (hTSH-CHO) e a uma preparação hipofisária (hTSH-Pit). A identidade e a pureza do hTSH-HEK foram avaliadas por métodos físico-químicos e imunológico (espectrometria de massa MALDI-TOF, HPLC de exclusão molecular e de fase reversa, SDS-PAGE e ensaio imunoradiométrico). A porção glicídica do hTSH-HEK foi avaliada pela análise do perfil dos N-glicanos e o comportamento biológico deste hormônio foi avaliado por bioensaio in vivo e estudo farmacocinético. As 3 preparações apresentaram pureza equivalente (97%) e a massa molecular relativa do hTSH-HEK foi 2,1% menor do que a do hTSH-CHO e 2,7% maior do que a do hTSH-Pit. A maior hidrofobicidade relativa, avaliada por RP-HPLC, foi a do hTSH-HEK. Os N-glicanos identificados no hTSH-HEK foram do tipo complexo, apresentando predominantemente estruturas tri-antenárias, enquanto no hTSH-CHO e no hTSH-Pit as estruturas bi-antenárias foram predominantes. Foram detectadas diferenças significativas relacionadas à composição dos carboidratos para estas preparações, um teor muito menor de ácido siálico e muito maior de fucose foram observados no hTSH-HEK. Foi confirmada a atividade biológica das 3 preparações, sendo a bioatividade do hTSH-HEK 39% e 16% inferior à do hTSH-CHO e hTSH-Pit, respectivamente. A meia-vida circulatória do hTSH-HEK foi menor (1,5 X) que a do hTSH-CHO e a do hTSH-Pit (1,2 X). De acordo com esses resultados o hTSH-HEK pode ser considerado uma alternativa viável para aplicações clínicas especialmente por sua origem humana e composição de carboidratos.

HUMAN TRYOTROPIN EXPRESSION IN HUMAN EMBRIONIC KIDNEY CELLS (HEK293)

Patrícia Marinho Sant'Ana

ABSTRACT

In this work a strain of embryonic human kidney cells (HEK293) was transfected with the genes of the α and β subunits of human thyrotropin (hTSH), a glycoprotein hormone secreted by the pituitary gland. After 5 days of culture, the concentration of hTSH in conditioned medium was 0.95 $\mu\text{g/mL}$. The material was concentrated and purified utilizing a strategy involving two steps, a cation-exchange chromatography and a reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), providing an overall yield of 55% and a purity level > 90%. The purified material (hTSH-HEK) was analyzed and compared to a recombinant commercial preparation obtained from CHO cells (hTSH-CHO) and to a human pituitary preparation (hTSH-Pit). Identity and purity of hTSH-HEK were evaluated through physico-chemical and immunological methods (MALDI-TOF mass spectrometry, size exclusion HPLC, reversed-phase HPLC, SDS-PAGE, immunoradiometric assay). Glycidic portion of hTSH-HEK was evaluated by N-glycoprofiling analysis and the biological behavior of this hormone was evaluated by an *in vivo* bioassay and via a pharmacokinetic study. The 3 preparations showed equivalent purity (97%) and hTSH-HEK molecular mass was 2.1% lower than hTSH-CHO mass and 2.7% higher than hTSH-Pit mass. The highest relative hydrophobicity, evaluated by RP-HPLC, was shown by hTSH-HEK. Remarkable differences related to the carbohydrate moiety were found for these preparations, a much lower sialic acid content and a higher fucose content being observed in hTSH-HEK. Biological activity was confirmed for the three preparations, the hTSH-HEK bioactivity being 39% and 16% lower than hTSH-CHO and hTSH-Pit, respectively. The hTSH-HEK circulatory half-life ($t_{1/2}$) was lower than that of hTSH-CHO (1.5-fold) and hTSH-Pit (1.2-fold). According to these findings, HEK293-derived hTSH can be considered useful for clinical applications, also in view of its human origin and particular N-glycan composition.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVO	12
2.1. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 MATERIAL	13
3.1.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR).....	13
3.1.2 Vetor de expressão.....	13
3.1.3 Transformação de células competentes	13
3.1.3.1 Linhagem celular	13
3.1.3.2. Meio de cultura.....	13
3.1.3.3. Antibiótico	14
3.1.4. Kits de extração e purificação de DNA plasmidial	14
3.1.5 Transfecção.....	14
3.1.5.1 Reagentes.....	14
3.1.5.2 Linhagem celular	14
3.1.6 Preparações hormonais utilizadas.....	14
3.1.7 Cultivo celular	14
3.1.7.1 Reagentes utilizados nos procedimentos de cultura celular	14
3.1.7.2 Material plástico estéril	15
3.1.8 Purificação e análise do hTSH.....	15
3.1.8.1 Colunas cromatográficas	15
a) Coluna de vidro utilizada em cromatografia clássica.....	15
b) Colunas cromatográficas utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ...	15
3.1.8.2 Resinas cromatográficas	15
3.1.8.3 Reagentes químicos	16
3.1.9 Imunoensaios	16
3.1.9.1 Anticorpos	16
3.1.9.2 Reagentes para marcação do anticorpo de detecção.....	16
3.1.9.3 Outros reagentes	16
3.1.10 Ensaio biológico	16
3.1.11 Proteína total.....	17
3.1.12 Equipamentos e acessórios principais	17
3.2 MÉTODOS	19
3.2.1 Obtenção da região codificadora das subunidades α e β do TSH humano.....	19

3.2.2 Purificação do produto de PCR	19
3.2.3 Clonagem das subunidades no vetor de expressão	20
3.2.4 Transformação das células competentes pelo método do choque térmico	21
3.2.5 Seleção dos clones positivos.....	21
3.2.6 Sequenciamento das amostras	21
3.2.7 Transfecção.....	21
3.2.8 Processo de Purificação	22
3.2.9 Cromatografia de troca iônica	22
3.2.10 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa preparativa (RP-HPLC).....	23
3.2.11 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	23
3.2.12 Ensaio imunoradiométrico (IRMA).....	24
3.2.13 Determinação de proteína total.....	24
3.2.14 SDS-PAGE	25
3.2.15 Atividade biológica.....	26
3.2.16 Farmacocinética.....	26
3.2.17 Espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	26
3.2.18 Análise de carboidratos	26
4. RESULTADOS	29
4.1 Purificação dos produtos de PCR	29
4.2 Sequenciamento do vetor.....	29
4.3 Crescimento celular e produtividade do hTSH.....	32
4.4 Processo de obtenção do hTSH-HEK.....	34
4.5 Caracterização do Produto Purificado e Sua Comparação com Preparações de Diferentes Origens	40
4.5.1 Massa Molecular	40
4.5.2 Carboidratos	42
4.5.3 Análise em HPLC	47
4.5.4 Análise em SDS-PAGE.....	50
4.5.5 Farmacocinética.....	51
4.5.6 Atividade biológica.....	51
5.0 DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

A produção de proteínas recombinantes ganhou muita importância nos últimos 20 anos, sendo o principal foco a obtenção de produtos biofarmacêuticos (anticorpos monoclonais, hormônios e diversas proteínas de fusão).

De um modo geral, os principais sistemas de expressão utilizados neste processo são: os microbiológicos (bactérias, fungos e leveduras), animais transgênicos, células de mamíferos, insetos ou vegetais. Vários fatores influenciam na escolha do hospedeiro, especialmente a capacidade de expressar proteínas mais complexas, glicosiladas.

Os sistemas microbiológicos são amplamente utilizados devido à facilidade de manejo, alto rendimento e menor custo de produção. Apesar das vantagens, não são indicados para expressar proteínas glicosiladas. Produtos recombinantes obtidos de bactérias apresentam pouca ou nenhuma glicosilação. As leveduras expressam produtos com estrutura de alta manose. Animais transgênicos podem ser utilizados como sistema de expressão alternativo, pois fornecem proteínas recombinantes de alta qualidade com um baixo custo de produção. No entanto, apresentam como desvantagem a dificuldade de purificar o produto recombinante e a possibilidade de contaminação com patógenos do animal. Os sistemas de expressão baseados em células de vegetais e de insetos podem produzir padrões de glicosilação totalmente diferentes ao humano, resultando em proteínas imunogênicas (Figura 1).

Figura 1. Desenho esquemático das estruturas típicas de glicosilação de diferentes células hospedeiras (Field L e col., 2015)

Na tentativa de aperfeiçoar os padrões de glicosilação, muitos grupos desenvolveram células de leveduras, plantas e *E. coli* geneticamente modificadas, criando ou modificando os seus padrões de glicosilação. No entanto, até agora os sistemas de expressão baseados em células de mamíferos são os preferidos para expressar proteínas recombinantes complexas. Atualmente, 60% dos biofármacos licenciados nos Estados Unidos e Europa são produzidos em células de mamíferos e incluem hormônios, fatores plasmáticos sanguíneos, anticoagulantes, fatores de crescimento, anticorpos, entre outros produtos (Datta P e col., 2013).

A glicosilação é a mais importante modificação pós-traducional e envolve a adição de oligossacarídeos à estrutura da proteína, que ocorre graças à ação de glicotransferases e glicosidases que adicionam o aminoácido específico à cadeia polipeptídica. Existem dois tipos de glicosilação, asparagina N-linked e serina/treonina O-linked. A glicosilação N-linked começa com um processo co-traducional no retículo endoplasmático, onde um glicano pré-sintetizado é adicionado ao nitrogênio da asparagina, que está ligada à cadeia polipeptídica. A glicosilação O-linked ocorre no complexo de Golgi, onde o monossacarídeo é adicionado ao oxigênio da hidroxila, que está ligado à serina ou a resíduos de treonina. A estrutura dos glicanos é subsequentemente construída pela adição individual de monossacarídeos. Além dessas duas vias principais de glicosilação, os glicanos podem ser adicionados à arginina, tirosina, hidroxilisina, hidroxiprolina e resíduos de triptofano. Essas modificações são menos comuns e são restritas à proteínas específicas (Croset A. e col., 2012).

O perfil de glicosilação de uma proteína pode ser muito heterogêneo, já que os sítios de glicosilação podem estar totalmente ocupados ou desocupados simultaneamente e, além disto, a cada sítio pode ser incorporada uma estrutura glicídica. Mecanismos potencialmente diferentes podem ser responsáveis por variações na ocupação dos sítios de glicosilação de uma glicoproteína tais como, disponibilidade do dolicol-fosfato e de nucleotídeos, atividade da glicosiltransferase e seu acesso aos sítios de glicosilação (Gawlitsek M. e col., 2009). A glicosilação afeta as interações proteína-proteína influenciando na biodisponibilidade, biodistribuição, farmacocinética e imunogenicidade do produto recombinante. Uma glicosilação imperfeita pode resultar em um produto imunogênico, farmacologicamente inativo e com depuração indesejada. A qualidade terapêutica de uma glicoproteína pode ser afetada pelo conteúdo de ácido N-acetilneuramínico ou ácido siálico. A sialilação em geral determina a meia-vida da glicoproteína, uma vez que o ácido siálico pode impedir o seu reconhecimento pelos receptores assialoglicoproteícos presentes principalmente no fígado (Takamatsu S. e col.,

2003). Várias doenças, tais como artrite reumatoide, deficiência de adesão dos leucócitos e alguns tipos de cancer, são associadas à alterações na glicosilação (Croset A. e col., 2012).

As indústrias farmacêuticas costumam estabelecer uma linhagem celular geneticamente modificada que expressa constitutivamente a proteína recombinante, o que também é conhecido por expressão gênica estável (SGE). Este processo envolve a clonagem do gene de interesse em um vetor de expressão, que contém um marcador de seleção. As células são transfectadas com o DNA plasmidial e então ocorre a integração da sequência de DNA no genoma celular do hospedeiro. O marcador de seleção permite isolar os clones positivos, que devem ser avaliados individualmente em relação aos seus níveis de expressão. Os clones que apresentarem os maiores níveis de produção da proteína recombinante serão expandidos e estabelecidos. Este processo costuma ser trabalhoso e demorado. A expressão gênica transiente (TGE) é uma alternativa muito mais rápida para se obter um produto recombinante. A expressão do DNA ocorre de forma epissomal, por um período que varia de 2 – 15 dias (Figura 2).

Figura 2. Desenho esquemático da produção de proteínas recombinantes através de expressão estável e expressão transiente (Bandaranayake AD, 2014).

A entrada do DNA plasmidial nas células é facilitada pelo uso de reagentes de transfecção incluindo compostos inorgânicos, como por exemplo, o fosfato de cálcio, polímeros catiônicos tal como a polietilenimina (PEI) e lipídeos catiônicos como a lipofectamina.

A célula hospedeira mais comumente usada para a SGE é a CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e a linhagem celular predominante para a TGE é a HEK293 (*Human Embryonic Kidney*). A última tem vantagens, especialmente quando modificações pós-traducionais humanas, ao contrário daquelas observadas em células de hamster, conferem propriedades benéficas ao

produto. Exemplo clássico disto é a proteína C humana ativada, com o nome comercial Xigris®, que requer modificações pós-traducionais humanas para manter sua atividade biológica. Comparadas à SGE, a TGE permite a produção rápida de biofármacos, mas o título do produto é em geral mais baixo (Geise S e col., 2009). Um dos fatores limitantes da TGE é que o DNA epissomal é perdido conforme as células se dividem. Em consequência, o tempo de produção é pequeno, o que por sua vez limita a capacidade da produção total. Várias linhagens celulares específicas foram desenvolvidas visando maximizar o tempo de produção da TGE (Swiech K e col., 2012). A mais popular é a linhagem celular HEK293T, que expressa constitutivamente o antígeno T do SV40 (simian vírus 40). Esta proteína permite a replicação de vetores contendo a origem de replicação SV40 nas células de mamíferos, portanto aumentando a persistência epissomal (Cervera L e col., 2015 a). O aumento do número de cópias de plasmídeos na população de células transfectadas é o responsável por melhorar a produção da TGE com estas células. Esta foi a linhagem celular usada no presente trabalho.

Na literatura são reportadas várias proteínas recombinantes expressas em diferentes linhagens de células embrionárias de rim humano, obtidas por expressão estável ou transiente (Tabela 1).

Tabela1 Proteínas recombinantes produzidas por diferentes linhagens de células HEK. Adaptada de Picanço-Castro V e col., 2013.

Linhagem celular	Proteína recombinante	Tipo de expressão	Referência
HEK293	Endocan	Estável	Adam E, 2008
	Fator VII de coagulação	Transiente	Wajih N, 2008
	Eritropoetina	Transiente	Zhang P, 2010
HEK-EBNA	Serina/receptor de treonina quinase	Transiente	Fischer S, 2012
	Fragmento de laminina LG4/5	Estável	Belin V, 2006
HEK293-6E EBNA1	Interferon humano alfa 2b	Estável	Loignon M, 2008
	Eritropoetina	Transiente	Sun X, 2006
HEK293E	IgG	Transiente	Beckliwal G, 2008
	Fosfatase alcalina secretada pela placenta humana (SEAP)	Transiente	Pharm P. L, 2005
HEK293F	Fator VIII de coagulação	Estável	Casademunt E, 2012
HEK293SF-3F6	BDD-Fator VIII	Transiente	Swiech K, 2012
	HIV-1 <i>virus like particle</i>	Trasiente	Cervera, L, 2015 b
HEK293H	Fator VIIIFc	Transiente	Dumont J A, 2002
HEK293S	Receptores <i>Alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> (AMPA)	Transiente	Lin C, 2015

A glicosilação nas células de mamíferos é específica da espécie, do órgão e do tipo celular. Em virtude das diferenças existentes entre células HEK e CHO relativas à espécie (humano e murino), ao órgão (rim e ovário) e à origem (embrionária e epitelial), são esperados diferentes perfis de glicosilação para os produtos derivados destas células, o que no caso de glicoproteínas terapêuticas é bastante critico, pois pode modular a sua eficácia. Embora muito

utilizada, a CHO não possui a maquinaria enzimática necessária para reproduzir exatamente a glicosilação humana. Por exemplo, algumas enzimas tais como a α 2-6 sialiltransferase, a α 1-3/4 fucosiltransferase e a *bisecting* N-acetilglucosamina transferase estão ausentes nestas células (Durocher Y & Buttler M, 2009). Diferentemente das células humanas, as células CHO só promovem ligação de ácido siálico-galactose na conformação α 2,3, enquanto as células humanas promovem a sialilação também na conformação α 2,6. Outra diferença é a ausência em humanos de ácido glicosilneuramínico (Neu5Gc), resíduo potencialmente imunogênico. Isso se deve ao fato da enzima citidina monofosfato-N-acetilneuramínico hidroxilase ácida (CMAH), responsável por converter CMP-Neu5Gc em CMP-Neu5Ac, ser inativa em células humanas devido a uma mutação. Em humanos também não há nos N-glicanos a síntese do terminal Gal α 1,3 Gal, o que pode gerar a produção de anticorpos contra esta estrutura quando uma proteína recombinante gerada por linhagens celulares murinas é considerada (Picanço-Castro V. e col., 2013). Reações imunogênicas podem reduzir a eficácia de um biológico em virtude da rápida depuração pelo sistema imune ou pela impossibilidade de readministração da droga, já que potencialmente pode causar resposta imune.

A expressão de proteínas recombinantes terapêuticas em sistemas de expressão baseados em células humanas gera a expectativa de produzir proteínas com modificações pós-traducionais mais semelhantes às naturais, sem qualquer glicoeestrutura imunogênica. Por isto sua utilização é considerada uma potencial alternativa para produção de proteínas terapêuticas para uso humano.

A tireotrofina humana (hTSH), objeto do presente trabalho, é um hormônio glicoproteico formado por duas subunidades (α e β) com 92 aminoácidos e 5 pontes dissulfeto na subunidade α e 118 aminoácidos e 6 pontes dissulfeto na subunidade β (Ribela MTCP e col., 2006). As duas subunidades são ligadas não covalentemente e não possuem atividade biológica quando isoladas. Esse hormônio é produzido pelos tireotropos na hipófise anterior e estimula a glândula tireóide a secretar os hormônios tireoideanos, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que são essenciais para regulação do metabolismo. A subunidade α do hTSH tem dois sítios de glicosilação N, na asparagina (Asn) 52 e Asn 78 e a subunidade β tem um sítio de glicosilação na Asn 23. No hTSH pituitário, os N-glicanos complexos são predominantemente terminados em N-acetilgalactosamina (GalNAc) sulfatada em adição a uma pequena quantidade de ácido siálico, em virtude da expressão de GalNAc-transferase e sulfotransferase nos tireotropos pituitários (Green ED & Baenziger JU, 1988). Entretanto, o hTSH recombinante produzido em células CHO é apenas sialilado, pois nas células CHO está ausente a sulfotransferase, enzima responsável pela sulfatação do carboidrato N-acetilgalactosamina. Em consequência, uma das

terminações mais comuns das glicoproteínas humanas de origem hipofisária, o sulfato, não existe nos produtos derivados de células CHO.

Vários estudos na literatura mostram que a maior sialilação do hTSH recombinante produzido em células CHO resulta em uma maior atividade biológica *in vivo* e uma meia-vida plasmática maior, provavelmente causada pela menor depuração através do receptor hepático manose/GalNac-sulfato e/ou pelo receptor assialoglicoproteico (Simpson DZ e col., 1999, Szkudlinki MW e col., 1993 e 1995).

O hTSH recombinante apresenta várias aplicações no campo diagnóstico e terapêutico e tem sido utilizado para avaliar a função tireoidiana, no tratamento do bócio multinodular e no diagnóstico e tratamento do câncer de tireóide. O único produto recombinante existente no mercado é derivado de células CHO (Thyrogen®), tendo sido sua utilização na detecção e tratamento de câncer de tireóide aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1998 (Szkudlinki MW e col., 2002).

Vários estudos relacionados ao hTSH já foram desenvolvidos em nosso laboratório relativos à síntese em células CHO do hTSH recombinante IPEN (Peroni CN e col., 2002; Ribela MTCP e col., 2003), à sua purificação e caracterização (Oliveira JE e col., 2003; Mendonça F e col., 2005; Ribela MTCP e col., 2006; Oliveira JE e col., 2007; Carvalho CM e col., 2009; Almeida BE e col., 2014; Silva MA e col., 2016) e à influência de condições de cultivo de células CHO produtoras de hTSH na síntese deste hormônio (Oliveira JE e col., 2008; Damiani R e col., 2013). Uma outra forma de hTSH produzida em CHO com configuração de oligossacarídeos mais parecida àquela do produto humano de extração hipofisária (hTSH recombinante humanizado, hlsr-hTSH), foi também sintetizada em nosso laboratório (Damiani R e col., 2009).

Na literatura não há relatos de tireotrofina recombinante expressa em células humanas. Tendo em vista o cenário apresentado anteriormente, a nosso ver é extremamente importante identificar o impacto farmacológico relacionado ao sistema de expressão e trabalhar para obter glicoproteínas recombinantes cada vez mais similares às naturais.

2. OBJETIVO

Sintetizar a tireotrofina humana em células embrionárias de rim humano (HEK293) e compará-la à preparação recombinante derivada de células CHO e à preparação nativa, derivada da hipófise.

2.1. Objetivos específicos

- Clonar os genes das subunidades α e β do hTSH nos vetores de expressão.
- Sequenciar os vetores e confirmar a orientação dos genes.
- Cultivar e transfectar as células HEK293 com os vetores de expressão
- Purificar o hTSH do meio condicionado e caracterizá-lo quanto à massa molecular, composição de carboidratos, atividade biológica e farmacocinética.
- Comparar o hTSH obtido no presente trabalho ao hTSH já produzido em células CHO e ao hTSH pituitário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

- Agarose, Uniscience (São Paulo, SP, Brasil).
- Brometo de etídio, Uniscience (São Paulo, SP, Brasil).
- Enzima Taq polimerase platinum HiFi, Life Techonology (Carlsbald, CA, USA)
- Primers sense e anti-sense das subunidades α e β do hTSH, Exxtend (Campinas, São Paulo, Brasil).
- Primers para o sequenciamento do vetor: CMV forward e pcDNATM3.4 reverse, Life Techonology (Carlsbald, CA, USA).
- Genes da subunidade α e β do hTSH previamente clonados nos vetores pEDdc- α e pEAdc- β (Peroni CN e col., 2002).
- Tris HCl, Sinth (São Paulo, SP, Brasil).
- Acetato de sódio, Sinth (São Paulo, SP, Brasil).
- EDTA, Sinth (São Paulo, SP, Brasil).

3.1.2 Vetor de expressão

- Vetor comercial de expressão pcDNA 3.4 TOPO, Life Techonology (Carlsbald, CA, USA)

3.1.3 Transformação de células competentes

3.1.3.1 Linhagem celular

- *E.coli* DH5 α quimicamente competentes One Shot® TOP10, Life Technologies (Carlsbald, CA, USA)

3.1.3.2. Meio de cultura

- Meio S.O.C, , Life Techonology (Carlsbald, CA, USA)
- LB Agar, Sinth (São Paulo, SP, Brasil)

3.1.3.3. Antibiótico

- Ampicilina, Vitrocell Embriolife (Campinas, SP, Brasil).

3.1.4. Kits de extração e purificação de DNA plasmidial

- NucleoBond® (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha).

3.1.5 Transfecção

3.1.5.1 Reagentes

- Expifectamina. Life Technology (Carlsbad, CA, USA).

3.1.5.2 Linhagem celular

- Células HEK293T que expressa constitutivamente o antígeno T do SV40 (Simian vírus 40).

3.1.6 Preparações hormonais utilizadas

- hTSH de origem hipofisária (hTSH-Pit), produzido e fornecido pelo Dr. Peter A. Torjesen do “Aker University Hospital” (Oslo, Noruega).
- hTSH derivado de células de ovário de Hamster Chinês (hTSH-CHO) (Thyrogen®), produzido por “Genzyme Corporation” (Cambridge, EUA) e fornecido pela *Collect* (São Paulo, SP, Brazil).

3.1.7 Cultivo celular

3.1.7.1 Reagentes utilizados nos procedimentos de cultura celular

- Bicarbonato de sódio P.A., Sinth (São Paulo, Brasil)
- Dimetilssulfóxido (DMSO), MERK (São Paulo, Brasil).
- Meio DMEM, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Soro fetal bovino dialisado (SFBd), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Tripsina, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).

3.1.7.2 Material plástico estéril

- Garrafas de 75 cm², Corning Costar (NY, EUA).
- Pipetas de 2, 5, 10 e 25 mL, Corning Costar (NY, EUA).
- Sistema de filtração de 500 mL, 0,22µm, Corning Costar (NY, EUA).
- Tubos criogênicos de 2 mL, Corning Costar (NY, EUA).
- Tubos para centrifuga de 15 e 50 mL, Corning Costar (NY, EUA).

3.1.8 Purificação e análise do hTSH

3.1.8.1 Colunas cromatográficas

a) Coluna de vidro utilizada em cromatografia clássica

- Coluna XK (20cm X 16mm DI), GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).

b) Colunas cromatográficas utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

- Coluna TSK G 2000 SW (60 cm X 7,5 mm D.I.), acoplada a uma pré-coluna SW (7,5 cm x 7,5 mm DI), Tosohaas (Montgomeryville, PA, EUA), para HPLC de exclusão molecular.
- Coluna C4, 214 TP54 (25 cm X 4,6 mm D.I.), acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5 µm, 1,0cm X 4,6 mm D.I.), Vydac Separations Group (Hesperia, CA, EUA), para HPLC de fase reversa analítica.
- Coluna C4, 214 TP510 (25 cm X 10 mm D.I.), acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5 µm, 1,0cm X 4,6 mm D.I.), Vydac Separations Group (Hesperia, CA, EUA), para HPLC de fase reversa semi-preparativa.

3.1.8.2 Resinas cromatográficas

- Resina cromatográfica SP Sepharose Fast Flow (SPFF), GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra), para cromatografia clássica.
- Sílica gel, grupo funcional Diol, tamanho das partículas 10 µm e poros de 125 Å, Tosohaas (Montgomeryville, PA, EUA), para HPLC de exclusão molecular.
- Sílica com grupos de ligação butil alifático, tamanho das partículas 5 µm e diâmetro dos poros de 300 Å, Vydac Separations Group (Hesperia, CA, EUA) para HPLC de fase reversa.

3.1.8.3 Reagentes químicos

- Acetonitrila grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Acetato de sódio, Merck (São Paulo, Brasil).
- Ácido acético, Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Cloreto de sódio p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio monobásico p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio bibásico p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Metanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).

3.1.9 Imunoensaios

3.1.9.1 Anticorpos

- Anticorpo monoclonal (mAB) anti hTSH (anticorpo de detecção utilizado no radioensaio), fornecido pelo Netria, North East Thames Region Immunoassay Unit (Londres, Inglaterra).
- Anticorpo policlonal anti hTSH acoplado a celulose (anticorpo de captura, fase sólida), fornecido pelo Netria, North East Thames Region Immunoassay Unit (Londres, Inglaterra).

3.1.9.2 Reagentes para marcação do anticorpo de detecção

- Cloramina T P. A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Iodeto de potássio p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Metabissulfito de sódio, Carlo Erba (São Paulo, Brasil).
- NaI¹²⁵ comercial livre de carregadores e oxidantes, com atividade específica de 11100-22200 MBq/mL (300-600 mCi/mL), Nordion Europe S.A. (Fleurus, Bélgica).

3.1.9.3 Outros reagentes

- Soro albumina bovina (BSA) RIA Grade (fração V), Sigma (St. Louis, EUA).
- Tween 20, Sigma (St. Louis, EUA).

3.1.10 Ensaio biológico

- Camundongos machos da linhagem isogênica Balb-C, com peso de 22 - 30g, oriundos do Biotério de Criação e Manutenção de Animais de Laboratório do IPEN/CNEN – SP.

- Sal de sódio de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3), Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Kit de ELISA para dosagem de tiroxina total (T4), Foresight (San Diego, CA, USA).

3.1.11 Proteína total

- Kit micro BCA, Pierce (Rockford, EUA).
- Placas de microtitulação com fundo em “U”, Dynatech (Chantilly, EUA).

3.1.12 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil).
- Agitador rotatório de tubos (“rotator”), fornecido pelo laboratório NETRIA, North East Thames Region Immunoassay Unit (Londres, Inglaterra).
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil).
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL- 10A, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e a um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD, EUA).
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo P100N, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich, Suíça).
- Bomba peristáltica modelo P-1, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Câmera de Neubauer, Boeco (Hamburg, Alemanha).
- Cassete para diálise Slide-A-Lyzer dialysis, 3,5 kDa de “cut off”, Pierce (Illinois, EUA).
- Centrífuga, modelo LS-3 plus, Celm (São Paulo, Brasil).
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super Speed RC – 2B, Sorvall (Newtown, Connecticut, EUA).
- Contador gama Wizard 2470-0010 tipo "poço", com troca automática de amostra, Perkin Elmer (Illinois, EUA).
- Estufa de cultura celular, modelo 3159, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Fluxo Laminar classe II A/B 3, modelo 1140, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Fotodocumentador, modelo Minibis Pro, DNR Image systems, (Jerusalém, Israel).

- Freezer –20°C, modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil).
- Freezer –80°C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Leitor de placas modelo Multiskan Ex (Thermo Electron Corporation, EUA)
- Liofilizador, modelo XL SP-Scientific (Ipswich, Inglaterra).
- Medidor digital de pH, modelo 420A, Orion (Boston, MA, EUA).
- Membranas de filtração de 0,22 µm, Millipore (Bedford, MA, EUA).
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha).
- Mini-centrifuga, modelo 541HP, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).
- *NanodropTM* 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).
- Refrigerador com porta de vidro modelo VE 730, Metalfrio (São Paulo, Brasil).
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA).
- Sistema de purificação AKTA Purifier, GE Healthcare (Uppsala, Suécia).
- Termociclador Verti 96-well Applied Biosystems®, (Foster City, CA, EUA)
- Tubos de poliestireno para imunoenaios (7,5x1,2 cm), EMTEL (São Paulo, Brasil).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção da região codificadora das subunidades α e β do TSH humano

Os genes das subunidades α e β já existentes no nosso laboratório (pEDdc- α e pEAdc- β) e utilizados na síntese do hTSH em células CHO (Peroni CN. e col. 2002; Damiani R. e col. 2009) foram amplificados por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Utilizaram-se os primers sense e anti-sense específicos de cada subunidade na concentração de 10 mM e 1U de Taq DNA polimerase de alta fidelidade. A reação foi realizada no termociclador seguindo as condições abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Condições utilizadas no PCR

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Denaturação inicial	95°C	3'	1
Denaturação	95°C	30''	35
Anelamento	55°C	30''	
Extensão	72°C	1'	
Extensão final	72°C	10'	1

Realizou-se um ciclo de extensão final para garantir a poliadenilação das extremidades 3'.

3.2.2 Purificação do produto de PCR

O material obtido no item 3.2.1 foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2%. A agarose foi dissolvida com leve aquecimento em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA) e acrescida de 1,0 μ L de uma solução de brometo de etídio (1mg/mL) para posterior visualização das bandas. A solução foi despejada em um molde até sua completa polimerização e em seguida posicionada na cuba de eletroforese. As amostras foram aplicadas na seguinte sequência: (1) marcador de peso molecular de 100 pb, (2) reação de amplificação da subunidade α e (3) reação de amplificação da subunidade β . Aplicou-se uma tensão elétrica de 80 volts durante 60 minutos. Após esse período, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e as bandas correspondentes ao inserto amplificado foram recortadas e purificadas com o kit de purificação. Devido ao baixo rendimento do processo, as amostras foram reamplificadas de acordo com as condições anteriormente citadas.

3.2.3 Clonagem das subunidades no vetor de expressão

Foi utilizado o vetor de expressão **pcDNA 3.4 TOPO** que contem alguns elementos que favorecem o aumento da expressão gênica, tais como a presença do promotor CMV humano e do elemento regulador pós-transcricional de Woodchuck (WPRE) (Almo SC & Love JD, 2014). A ligação do inserto é intermediada pela ação da enzima topoisomerase I, que se encontra ligada covalentemente ao vetor. Na sua forma linearizada, o pcDNA 3.4 TOPO apresenta um resíduo de deoxitimina (T) na extremidade 3' (Figura 3).

A topoisomerase I se liga ao DNA dupla fita em sítios específicos e cliva a ligação fosfodiéster depois da sequência 5'-CCCTT em uma das fitas. A energia da quebra da ligação é conservada para a formação de uma ligação covalente entre o grupo fosfato do grupo 3' da fita clivada e o resíduo tirosil (Tyr-274) da topoisomerase I. Na sequência, a ligação fosfotirosil entre o DNA e a enzima é atacada pelo grupo 5' hidroxil da fita que foi clivada, revertendo a ligação e liberando a topoisomerase (Schuman S, 1994).

À 1,0 µL do vetor foi adicionado 100 ng do produto de PCR purificado. A reação foi agitada suavemente e incubada por 5 minutos, a temperatura ambiente. A reação foi conservada em gelo. Em seguida foi realizada a transformação das células competentes.

Figura 3. Esquema geral do vetor pcDNA TOPO 3.4: (1) Promotor CMV [P_{CMV}]: 47 -726; (2) Sítio CMV para ligação do primer sense: 584 – 604; (3) Sítio de clonagem do vetor: 741; (3) WPRE (Woodchuck posttranscriptional regulatory element): 782; (4) pcDNA 3.4 sítio de ligação do primer anti-sense: 822-844; (5) Sinal de poliadenilação TK [TK pA]: 1388-1655; SV40 “early promoter” [P_{SV40}]: 2124-2493; (6) Gene de resistência a neomicina (marcador de seleção): 2529-3323; (7) Sítio de poliadenilação [SV40 pA]: 34499-3629; (8) pUC origin para um alto número de cópias e manutenção do plasmídeo na *E.coli*: 4012-4685; (9) Gene de resistência a ampicilina (marcador de seleção): 4830-5640.

3.2.4 Transformação das células competentes pelo método do choque térmico

Adicionou-se 2,0 µL da reação de clonagem (item 3.2.3) às células *E.coli* DH5α. As células com o plasmídeo foram suavemente agitadas e incubadas no gelo, por 15 minutos. Após o período de incubação, realizou-se o choque térmico em banho maria (42°C, por 30 segundos). A reação foi imediatamente transferida para o gelo, e adicionou-se 250 µL de meio S.O.C (“*super optimal broth*”) a cada tubo.

As amostras foram novamente incubadas (1h, 37°C, 150 rpm). Semeou-se 10 µL de cada reação em meio LB ágar com 0,1 mg/mL de ampicilina. As amostras foram incubadas *overnight*, a 37°C.

3.2.5 Seleção dos clones positivos

Após o período de incubação realizou-se triagem dos clones positivos por PCR. O material obtido foi analisado em eletroforese em gel de agarose, conforme o item 3.2.2. Em seguida, realizou-se uma minipreparação plasmidial dos clones positivos. A quantificação e a pureza (razão 260/280nm) do material foram determinadas através de espectrofotometria, utilizando o equipamento *Nanodrop*TM. Em seguida as amostras foram enviadas para sequenciamento.

3.2.6 Sequenciamento das amostras

A confirmação da orientação do inserto foi realizada por sequenciamento. Foram preparadas alíquotas no volume total de 7,5 µL contendo 775 ng de cDNA da subunidade α e 800 ng de cDNA da subunidade β acrescidos dos *primers* do vetor (5 pmoles/µL). O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies – Applied Biosystems) e analisado pelo software BioEdit.

3.2.7 Transfecção

Células da linhagem HEK293T, que expressa o gene “SV40 large T antigen”, foram transfectadas pelo método da lipofectamina, lipídeo catiônico que facilita a entrada do DNA nas células. Foi utilizado DNA na proporção de 1:5 das subunidades α e β (Peroni CN. e col., 2002). As células (3 x 10⁶ cel/10 mL) foram semeadas em uma placa de 75cm² no dia anterior

à transfecção e mantidas com meio Dulbecco's Modified Medium, suplementado com 10% de soro fetal bovino. No dia da transfecção, o DNA (16 µg) foi diluído em 50 µL de meio DMEM sem soro e sem antibiótico. Separadamente realizou-se a diluição de 16 µL de expifectamina em 50 µL do mesmo diluente. Esta solução foi incubada por 5 minutos, a temperatura ambiente. Após esse período, o DNA diluído foi adicionado à expifectamina diluída perfazendo o total de 100 µL. Esta solução foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após o período de incubação, o meio de cultura das células foi removido e substituído por 5 mL de meio fresco sem soro e sem antibiótico. Em seguida, adicionou-se às células os 100 µL do complexo formado. As células foram incubadas por um período de 5 h a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida adicionou-se 5 mL de DMEM com 20% de soro. Após a transfecção, as células foram mantidas em cultura por um período de 5 dias. O meio de cultura foi coletado e substituído diariamente por 10 mL de DMEM sem soro e armazenado a -20°C para posterior análise.

3.2.8 Processo de Purificação

O processo de purificação empregado neste trabalho seguiu um protocolo previamente padronizado em nosso laboratório (Oliveira JE e col., 2007). O processo consiste de duas etapas cromatográficas, sendo a primeira uma cromatografia clássica de troca iônica, do tipo catiônica, seguida de uma cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.

3.2.9 Cromatografia de troca iônica

Em uma purificação típica, o meio condicionado, após ter seu pH acertado para 5,0, foi aplicado a uma coluna de 2,6 cm de diâmetro x 10 cm de altura, contendo a resina SP Sepharose Fast Flow (SPFF) (resina de troca catiônica), previamente equilibrada em 0,02M de acetato de sódio, pH 5,0 com 0,05M de NaCl. Após lavagens sucessivas (cinco volumes de coluna no mínimo) com este mesmo tampão, as proteínas foram eluídas neste mesmo tampão com um gradiente linear de NaCl (0,05 M a 0,25 M). O fluxo utilizado foi de 200 mL/h e as frações coletadas foram de 5 mL.

3.2.10 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa preparativa (RP-HPLC)

O pool das frações contendo hTSH, detectado por IRMA, resultante da primeira etapa de purificação, foi concentrado para 10 mL em um dispositivo filtrante de centrífuga Amicon Ultra-15 e aplicado a uma coluna C4 semi preparativa de fase reversa. A coluna, conectada a um HPLC, foi mantida a 25°C e foram usados na fase móvel dois tampões A e B (tampão A: fosfato de sódio 0,05M pH 7,0 e tampão B: 50% de A + 50% de acetonitrila). A eluição das proteínas foi realizada com um gradiente linear de 25 a 100% de tampão B, durante 40 minutos. Um fluxo de trabalho de 2,5 mL/min e detecção por luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 220nm foram utilizados. O pool final foi dialisado contra tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,0, contendo 0,15M NaCl. Após a diálise, o hTSH foi liofilizado sob vácuo controlado entre 100-200 mT na fase primária e sob vácuo máximo na fase secundária para retirada da umidade residual.

3.2 11 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica

A análise quantitativa e qualitativa do hTSH presente no meio condicionado e nas diferentes etapas do processo de purificação foi realizada mediante cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e de exclusão molecular (HPSEC), de acordo com as condições experimentais das Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Condições experimentais da RP-HPLC

Coluna	Vydac C4
Fase móvel	Tampão A: Fosfato de sódio 0,05M pH7,0 Tampão B: 50% acetonitrila + 50% tampão A
Tempo de corrida	40 minutos
Fluxo	0,5 mL/minutos
Eluição	Gradiente linear de 25 a 100% B
Detecção	220 nm
Temperatura da coluna	25°C

Tabela 4. Condições experimentais da HPSEC

Coluna	TosoHaas TSK 2000
Fase móvel	Tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,0 + 0,15% NaCl
Tempo de corrida	40 minutos
Fluxo	1,0 mL/minuto
Eluição	Isocrática
Deteção	220 nm
Temperatura da coluna	25°C

A preparação recombinante comercial Thyrogen® foi utilizada como preparação referência nas duas técnicas de análise.

3.2.12 Ensaio imunoradiométrico (IRMA)

Os níveis de hTSH foram determinados por IRMA desenvolvido em nosso laboratório (Ribela MTCP e col., 1996). No ensaio foi realizada uma curva padrão de TSH (Thyrogen®), com níveis de concentração distintos (0,15; 0,3; 0,6; 1,5; 3,0; 7,5; 15; 30; 60; 100 μ UI/mL). Pipetaram-se duplicatas de 100 μ L de cada ponto da curva a um tubo de ensaio contendo 300 μ L de diluente (tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,4, contendo 1% de BSA e 0,5% de tween 20). Pipetaram-se, em duplicata, 100 μ L das amostras provenientes de cada dia de expressão (24h, 48h, 72h, 96h e 120h). Em seguida adicionou-se 50 μ L de I¹²⁵ - mAB anti-hTSH contendo aproximadamente 60000 cpm e 50 μ L de fase sólida (celulose que contem anticorpo anti hTSH ligado à sua superfície). O ensaio foi incubado overnight em um agitador rotatório de tubos. Após a incubação, foram adicionados 2 mL de tampão de lavagem (tampão fosfato 0,05M, pH 7,4 + 0,5% de Tween 20) a cada tudo e a separação da fase sólida foi realizada por centrifugação a 6000g, por 30 minutos, a 4°C. Esse processo foi realizado 2 vezes.

3.2.13 Determinação de proteína total

A concentração de proteína total das amostras resultantes de cada etapa do processo de purificação foi determinada pelo método Micro BCA, que consiste na detecção e quantificação colorimétrica da proteína total diluída em solução após a reação com o ácido bicinonínico (BCA). Foi realizada uma curva padrão de BSA (albumina de soro bovino) com níveis de concentração distintos (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,0 e 0,5 μ g/mL). No caso do meio condicionado, a amostra foi dialisada contra água, em um tubo Amicon Ultra de 4 mL (Millipore) com uma membrana de 3000 kDa, centrifugada a 4000g, por 30 minutos. As centrifugações e a adição

de diluente foram realizadas até que o produto final fosse totalmente incolor. Pipetou-se em duplicata 125 µL das preparações de padrão e amostras em poços de uma placa de ELISA. Em seguida, adicionou-se 125 µL do reagente de trabalho composto por: 50% da solução A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, tartarato de sódio e hidróxido de sódio), 48% da solução B (solução aquosa de ácido bicinconínico 4%) e 2% da solução C (sulfato cúprico penta-hidratado 4%). A placa foi incubada por 1h, a 37°C. A absorbância foi determinada a 540 nm em leitor de placa.

3.2.14 SDS-PAGE

As diferentes etapas de purificação do hTSH-HEK e as preparações de referência hTSH-CHO e hTSH-Pit foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, na presença de 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) sob condições não redutoras. As amostras a serem analisadas foram adicionadas ao tampão de amostra, que consiste de 2 mL de glicerol 20%, 3 mL de SDS 20%, 10 mg de azul de bromofenol (0,1%), 2,5 mL de Tris-HCL pH 6,8 e água Milli-Q, na proporção de 3:1 (tampão:amostra) e aplicadas após serem submetidas a fervura por 15 minutos. Durante a corrida eletroforética, a intensidade da corrente foi de 35 mA. As proteínas presentes no gel foram fixadas mergulhando o gel em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial, por 30 minutos. Após a fixação o gel é submetido a 3 ciclos de lavagem alternando-se água destilada e deionizada com 50% de metanol, sob agitação, durante 5 – 10 minutos para cada lavagem. O gel é em seguida incubado por 15 minutos, sob agitação, em solução de nitrato de prata (nitrato de prata 0,8%, NaOH 0,2 N, NH₄OH 0,2 N) recém preparada. Ao final da incubação, o gel é novamente lavado 2 vezes com água destilada e deionizada e, em seguida, mergulhado em solução reveladora (0,005% ácido cítrico, 0,05% formaldeído) recém preparada. A partir desse momento a agitação passa a ser manual, observando-se cuidadosamente as bandas que devem surgir gradativamente (6-8 minutos). Para cessar a reação o gel é mergulhado na solução fixadora. Após a revelação, o gel é lavado com solução 50% metanol, 10% ácido acético e conservada em solução 40% de metanol, 10% glicerol.

3.2.15 Atividade biológica

A avaliação da atividade biológica das preparações de hTSH-HEK, hTSH-CHO e hTSH-Pit foi realizada por um ensaio *in vivo*, utilizando camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c, com peso variando entre 22-30g. O ensaio baseia-se na capacidade do TSH em estimular a produção de T4. Visando suprimir o TSH endógeno dos animais, foi administrada oralmente, durante 3 dias, triiodotironina (T3), pH 7,5, com uma concentração final de 3µg/mL. Após a supressão do TSH endógeno, as amostras a serem analisadas foram administradas intraperitonealmente (10µg/animal), em um volume de 200µL, após diluição em solução salina. Para cada preparação foram utilizados 10 animais, bem como para o controle (salina). Após 6 horas da administração das amostras foi realizada a coleta de sangue, via plexo retro-orbital, e o nível de T4 circulante foi mensurado por ELISA.

3.2.16 Farmacocinética

A análise da depuração plasmática do hTSH-HEK foi realizada utilizando camundongos da linhagem BALB/c. Foi injetado intraperitonealmente 2µg da preparação em estudo a 5 animais e a coleta de sangue (via plexo retro-orbital) foi realizada em diferentes intervalos de tempo: 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 minutos. A concentração de hTSH após cada intervalo de tempo foi determinada por IRMA.

Todos os ensaios que utilizaram animais foram conduzidos de acordo com as leis nacionais de proteção aos animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética, protocolo 168/16.

3.2.17 Espectrometria de massa (MALDI-TOF)

A massa molecular do hTSH-HEK (aproximadamente 100 µg de amostra) foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry), em um sistema Voyager DE BioSpectrometry Workstation (Applied Biosystem Sciex, Framingham, MA), operado em modo linear do íon positivo, utilizando uma solução saturada de ácido sinapnóico (AS) em 50% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoracético como matriz. O espectro foi obtido pelo acúmulo de 100 disparos e foi calibrado com um padrão externo (ProMix 3; LaserBiolabs). Esta análise foi realizada no laboratório Proteodynamics SARL (Riom, França).

3.2.18 Análise de carboidratos

A análise das estruturas de carboidratos foi realizada no laboratório Proteodynamics SARL (Riom, França). O perfil dos glicanos da amostra de hTSH-HEK foi obtido após a digestão com glicosidase e permetilação dos N-glicanos. A amostra foi denaturada com 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 1% de β -mercaptoetanol (90° C, 10 minutos) e deglicosilada por digestão enzimática, tratando por 15 h a 37°C com 20 unidades de PNGase F da Roche Applied Science (Mannheim, Alemanha), de acordo com Fogli A e col., 2012. A deglicosilação foi monitorada em um gradiente NuPage de 4-12% MES (Invitrogen) por coloração com *Comassie blue*. Os N-glicanos foram purificados utilizando uma coluna de carbono grafitizado, sendo eluídos com 25% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA e posteriormente liofilizados. A permetilação foi realizada com NaOH e dimetilsulfato e os produtos dessa reação purificados em coluna C18 Sep Pak Plus (Waters, Milford, MA). Os N-glicanos eluídos foram solubilizados 50:50 água/metanol, misturados com ácido dihidroxibenzeno (DHB) e analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF-MS.

O espectro de massa dos N-glicanos permetilados ressuspensos em 20 μ L de 50% methanol/água foi adquirido no modo linear do íon positivo (m/z de 1000 – 5000 Da), em um sistema MALDI-TOF DE PRO (Applied Biosystem Sciex, Framingham, MA), com DHB como matriz (10 mg/mL, razão 1:1). O espectro foi obtido pelo acúmulo de 500 disparos e foi calibrado com padrão externo. Os dados do MALDI-TOF-MS foram processados usando o programa DataExplorer 4.0 para gerar os valores de m/z e para comparar as intensidades. A interpretação das estruturas dos glicanos correspondente às massas monoisotópicas foi realizada usando a ferramenta EXPAZY GlycoMod (<http://web.expasy.org/glycanmass/>) e o programa GlycoWorkBench. O perfil de glicanos e a intensidade relativa (%) de cada glicano foram utilizados para calcular a massa média dos N-glicanos presentes na molécula de hTSH-HEK. Por estequiometria, foi calculada também a contribuição de cada monossacarídeo a cada glicano. A ocupação dos sítios de glicosilação foi calculada utilizando a massa média do glicano (AGM), obtida a partir do perfil dos N-glicanos e da massa molecular total da glicoproteína, obtida por MALDI-TOF-MS, de acordo com a seguinte relação:

$$\text{AGM} \times \text{N}^{\circ} \text{ de sítios ocupados} = \text{Massa de carboidratos}$$

A massa de carboidratos é obtida pela relação:

$$\text{Massa de carboidratos} = \text{massa molecular} - \text{backbone hTSH}$$

O backbone do hTSH é 24 330 Da (Cole ES e col., 1993), calculado pela análise da sequência de aminoácidos do hTSH recombinante (Thyrogen[®]) e de suas subunidades.

Conhecendo a ocupância é então possível determinar a razão molar (mol/mol) de cada monossacarídeo.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação dos produtos de PCR

A Figura 4 mostra a análise dos produtos de PCR em gel de agarose, onde ficam evidenciadas as bandas correspondentes às subunidades α (362 pb) e β (428 pb), que foram posteriormente purificadas.

Figura 4. Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. Poço 1: marcador de peso molecular; Poço 2: produto de PCR da subunidade α ; Poço 3: produto de PCR da subunidade β .

4.2 Sequenciamento do vetor

As Figuras 5 e 6 mostram a análise comparativa entre as sequências teórica (●) e experimental (●) das subunidades α e β , confirmando a correta orientação do inserto.

```

460          470          480          490          500
ATCAAAC TCA TTACTAACCG GTAGGGATCG AACCC TTGCC ATGGATTACT
-----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      510      520      530      540      550
ACAGAAAATA TGCAGCTATC TTTCTGGTCA CATTGTCGGT GTTTCTGCAT
ACAGAAAATA TGCAGCTATC TTTCTGGTCA CATTGTCGGT GTTTCTGCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      560      570      580      590      600
GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGCAGGAT TGCCCAAGAAT GCACGCTACA
GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGCAGGAT TGCCCAAGAAT GCACGCTACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      610      620      630      640      650
GGAAAACCCA TTCTTCTCCC AGCCGGGTGC CCCAATACTT CAGTGCATGG
GGAAAACCCA TTCTTCTCCC AGCCGGGTGC CCCAATACTT CAGTGCATGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      660      670      680      690      700
GCTGCTGCTT CTCTAGAGCA TATCCCACTC CACTAAGGTC CAAGAAGACG
GCTGCTGCTT CTCCAGAGCA TATCCCACTC CACTAAGGTC CAAGAAGACG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      710      720      730      740      750
ATGTTGGTCC AAAAGAACGT CACCTCAGAG TCCAATTGCT GTGTAGCTAA
ATGTTGGTCC AAAAGAACGT CACCTCAGAG TCCAATTGCT GTGTAGCTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      760      770      780      790      800
ATCATATAAC AGGGTCACAG TAATGGGGGG TTTCAAAGTG GAGAACCACA
ATCATATAAC AGGGTCACAG TAATGGGGGG TTTCAAAGTG GAGAACCACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      810      820      830      840      850
CGGCGTGCCM CTGCAGTACT TGTTATTATC ACAAMTCTTA AAGGGTTCSA
CGGCGTGCCA CTCGAGTACT TGTTAT-ATC ACAAATCTTA A-----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      860      870      880      890      900
TCCTCTAGAS TCCGGAGGCY GGATCGGTCC CGGTGTCYTC TATGGAGGTC
-----

```

Figura 5. Sequenciamento da subunidade α do hTSH.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      110      120      130      140      150
CTCCGGACTC TAGAGGATCG AACCCCTAGC ATGACTGCTC TCTTTCTGAT
-----
-----
----- ATGACTGCTC TCTTTCTGAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160      170      180      190      200
GTCCATGCTT TTTGGCCTTG CATGTGGGCA AGCGATGTCT TTTTGTATTC
GTCCATGCTT TTTGGCCTTA CATGTGGGCA AGCGATGTCT TTTTGTATTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      210      220      230      240      250
CAACTGAGTA TACAATGCAC ATCGAAAGGA GAGAGTGTGC TTATTGCCTA
CAACTGAGTA TACAATGCAC ATCGAAAGGA GAGAGTGTGC TTATTGCCTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      260      270      280      290      300
ACCATCAACA CCACCATCTG TGCTGGATAT TGTATGACAC GGGATATCAA
ACCATCAACA CCACCATCTG TGCTGGATAT TGTATGACAC GGGATATCAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      310      320      330      340      350
TGGCAAACCTG TTTCTTCCCA AATATGCTCT GTCCCAGGAT GTTTGCACAT
TGGCAAACCTG TTTCTTCCCA AATATGCTCT GTCCCAGGAT GTTTGCACAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      360      370      380      390      400
ATAGAGACTT CATCTACAGG ACTGTAGAAA TACCAGGATG CCCACTCCAT
ATAGAGACTT CATCTACAGG ACTGTAGAAA TACCAGGATG CCCACTCCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      410      420      430      440      450
GTTGCTCCCT ATTTTTCCTA TCCTGTTGCT TTAAGCTGTA AGTGTGGCAA
GTTGCTCCCT ATTTTTCCTA TCCTGTTGCT TTAAGCTGTA AGTGTGGCAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      460      470      480      490      500
GTGCAATACT GACTATAGTG ACTGCATACA TGAAGCCATC AAGACAAACT
GTGCAATACT GACTATAGTG ACTGCATACA TGAAGCCATC AAGACAAACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      510      520      530      540      550
ACTGTACCAA ACCTCAGAAG TCTTATCTGG TAGGATTTTC TGTCTAAAAG
ACTGTACCAA ACCTCAGAAG TCTTATCTGG TAGGATTTTC TGTCTAATAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      560      570      580      590      600
GGTTCGATCC CTACCGGTTA GTAATGAGTT TGATATCTCG ACAATCAACC
TGATATAATT -TGCAATTG GT--TAAATG TGCTTGCTG A-AATAAAGC

```

Figura 6. Sequenciamento da subunidade β do hTSH.

4.3 Crescimento celular e produtividade do hTSH

A concentração de hTSH-HEK, resultante de 4 transfecções independentes, ao longo de um cultivo de 5 dias é mostrada na Figura 7.

Figura 7. Concentração de hTSH ao longo de 5 dias de cultivo.

Observa-se que a concentração média mais alta de hTSH-HEK foi de $1,01 \pm 0,45$ µg/mL, alcançada após 72 horas. Após 5 dias de cultivo, a concentração de hTSH caiu cerca de 40% ($0,61 \pm 0,14$ µg/mL).

O crescimento celular, analisado durante os 5 dias de cultivo, é mostrado na Figura 8, sendo a inclinação da curva de crescimento, que reflete a velocidade média de proliferação celular, de $1,2 \times 10^6$ células/dia.

Figura 8. Número de células viáveis ao longo de 5 dias de cultivo.

Considerando o crescimento celular ao longo de 5 dias de cultivo e a produtividade volumétrica nesse período, foi calculada a produtividade específica ($\mu\text{g}/10^6 \text{ célula}/\text{dia}$) mostrada na Figura 9. A mais alta produtividade específica foi de $2,2 \mu\text{g}/10^6 \text{ célula}/\text{dia}$

Figura 9. Produtividade específica de hTSH ao longo de 5 dias de cultivo.

4.4 Processo de obtenção do hTSH-HEK

Para a separação da proteína de interesse de suas impurezas, o processo de purificação partiu de 3209 mL de meio condicionado, que foi concentrado para 271 mL (concentração de ~12x). Dois tipos de cromatografia (troca iônica e fase reversa) foram utilizadas (Figura 10).

Figura 10. (A) Cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose FF. (B) Cromatografia de fase reversa.

Na cromatografia de troca iônica em SP-Sepharose FF, as frações coletadas foram monitoradas por IRMA sendo identificada atividade imunológica em duas regiões (pico I e II). O pool das frações correspondentes ao pico I foi concentrado para 10 mL, via dispositivo de filtração e submetido a uma cromatografia em RP-HPLC preparativa. O pico II, embora apresentando a proteína de interesse, foi descartado por conter muito mais impurezas.

A amostra resultante da última etapa foi dialisada em tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,0 + 0,15 M NaCl para retirada da acetonitrila.

A tabela 5 mostra os rendimentos das diferentes etapas do processo de purificação, bem como a fração de massa de hTSH.

Tabela 5: Processo de purificação do hTSH derivado de células HEK293.

Etapa	Volume (mL)	hTSH (µg/ mL)	Proteína total (µg/ mL)	Recuperação da etapa (%)	Fração de massa (%)
Meio condicionado	271	11,3 ¹	1616	-	0,70
Cromatografia de troca iônica	10	194,3 ¹	391	63,4	49,7
Cromatografia de fase reversa	13	135,2 ²	145	90,6	93,2
Díálise	14,1	119,9 ²	132,5	96,2	90,5

¹Quantificação por RP-HPLC

²Quantificação por HPSEC

A recuperação total do processo foi de 55,2%. A etapa da cromatografia de troca iônica foi onde ocorreu o maior fator de purificação (71x) e também as maiores perdas (37%).

Uma baixa fração de massa (< 1%) foi determinada no meio condicionado. De fato, observando-se o perfil cromatográfico desta etapa, em HPSEC e RP-HPLC, fica evidenciada a presença de uma grande quantidade de impurezas, juntamente com o hTSH (Figura 11). Na Fig 11A observa-se picos de atividade imunológica tanto no tempo de retenção correspondente ao hTSH (17,5 minutos) quanto em tempos de retenção correspondentes a proteínas de alto peso molecular (12 – 15 minutos), possivelmente formas alteradas (agregado e dímero) de hTSH. Na Fig 11B observa-se que apenas o pico com tempo de retenção de 36,4 min apresenta atividade imunológica.

Figura 11. Perfil cromatográfico em HPSEC (A) e em RP-HPLC (B) do meio condicionado derivado do cultivo de células HEK293 transfectadas com as subunidades α e β do hTSH. —A₂₂₀ x---x IRMA (cpm).

A pureza do produto final foi avaliada por SDS-PAGE (Figura 12) onde é possível observar a progressiva eliminação dos contaminantes nas diferentes etapas de purificação, sendo o produto final tão puro quanto o padrão de referência.

Figura 12. SDS-PAGE, em condições não redutoras, das diferentes etapas de purificação do hTSH. Colunas 1 e 6, marcadores de massa molecular; coluna 5, meio condicionado; coluna 4, eluato da troca catiônica; coluna 3, eluato da RP-HPLC; coluna 2, Thyrogen®, utilizado como padrão de referência.

As diferentes etapas do processo de purificação foram analisadas também em HPSEC, que se baseia em diferenças de peso molecular (Figura 13). Enquanto no meio condicionado (Figura 13A) a presença do hTSH só foi possível de ser identificada por IRMA, no eluato da cromatografia de troca iônica já foi possível identifica-lo a partir da HPSEC, mesmo em presença de outras formas de maior peso molecular (Figura 13B). Após a etapa de cromatografia de fase reversa o produto já se encontra puro. O pico à direita do hTSH (Figura 13C) corresponde à acetonitrila, solvente orgânico utilizado nesta etapa de purificação, sendo este eliminado após a etapa de diálise (Figura 13D).

As diferentes etapas do processo de purificação também foram analisadas em RP-HPLC, que se baseia em diferenças de hidrofobicidade (Figura 14). Observa-se que o hTSH-HEK é bem mais hidrofóbico que as demais impurezas, o que permite a sua identificação já na primeira etapa do processo (Figura 14A). Após a segunda etapa (Figura 14B), a maior parte das impurezas já foram eliminadas.

Figura 13. Perfil cromatográfico em HPSEC: (A) Meio condicionado; (B) Após cromatografia de troca catiônica; (C) Após cromatografia de fase reversa; (D) Produto dialisado.

Figura 14. Perfil cromatográfico em RP-HPLC: (A) Meio condicionado; (B) Após cromatografia de troca catiônica; (C) Após cromatografia de fase reversa; (D) Produto dialisado.

4.5 Caracterização do Produto Purificado e Sua Comparação com Preparações de Diferentes Origens

4.5.1 Massa Molecular

A massa molecular relativa (M_r) da preparação hTSH-HEK foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF. O espectro obtido permitiu a detecção simultânea dos monômeros das subunidades α e β e do heterodímero (Figura 15). A massa molecular média destas formas, determinadas em três ensaios, foi de $13833,0 \pm 8,17$ para a subunidade α , $15469,1 \pm 4,14$ para a subunidade β e $29531,8 \pm 121,5$ para o heterodímero. Salienta-se que as somas das duas subunidades (29302,1 Da) está de acordo com o valor encontrado para o heterodímero ($\alpha + \beta / \text{het} = 0,992$), uma diferença $< 1\%$. No espectro obtido para o hTSH-HEK observou-se também a formação de homodímero da subunidade α ($\alpha\text{-}\alpha = 27480,2 \pm 339,6$) e a presença de íons de carga dupla da subunidade α ($\alpha/2 = 6992,7 \pm 198,2$). Nestes casos, a razão entre o valor calculado e o determinado experimentalmente foram respectivamente 1,007 e 0,989. Comparando-se a massa molecular do hTSH-HEK (29302) com a do hTSH-Pit (28524) e hTSH-CHO (29921), previamente determinadas em trabalhos do nosso grupo (Ribela MTCP e col., 2016), verificou-se que a massa do hTSH-HEK é 2,7% maior do que a massa do hTSH-Pit e 2,1% menor que a massa do hTSH-CHO. Nesta comparação utilizamos o valor de $\alpha + \beta$, por apresentarem melhor resolução que o heterodímero.

Figura 15. Espectro obtido por espectrometria de massa MALDI-TOF para o hTSH-HEK.

4.5.2 Carboidratos

A Tabela 6 mostra a comparação das estruturas de carboidratos do hTSH-HEK determinadas no presente trabalho e das estruturas do hTSH derivado de células CHO e de origem hipofisária, determinadas em trabalho anterior do nosso grupo (Ribela MTCP e col., 2016).

No hTSH expresso em células HEK293 foram identificadas um total de 24 diferentes estruturas de carboidratos, todas elas complexas. Destas, apenas 2 estruturas tem uma intensidade relativa superior a 7,4%. As duas estruturas mais relevantes são triantenárias com 1 resíduo terminal de galactose. Das estruturas do hTSH-HEK, apenas 3 delas são comuns ao hTSH-CHO e 12 comuns ao hTSH-Pit. No caso das preparações de hTSH-Pit e hTSH-CHO o número de estruturas de carboidratos são respectivamente 38 e 15 e além de estruturas complexas estas preparações tem uma pequena quantidade de estruturas híbridas, 9,8% e 1,2% respectivamente.

A Figura 16 mostra esquematicamente as duas estruturas mais relevantes das preparações de hTSH de diferentes origens com frequências de 45,3% no caso do hTSH-HEK, 28,1% no caso do hTSH-Pit e 68% no caso do hTSH-CHO.

Figura 16. Estruturas mais relevantes do hTSH de diferentes origens e intensidades relativas

Tabela 6. Estruturas de carboidratos de hTSH de diferentes origens e intensidades relativas.

	Massa do Glicano – H ₂ O	Estrutura do N-glicano	Intensidade Relativa (%)		
			hTSH-HEK	hTSH-Pit	hTSH-CHO
1	1298,96	(GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,3	0,0	0,0
2	1378,43	(GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₁ (Sulf) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	5,1	0,0
3	1444,53	(GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,6	0,3	0,0
4	1460,53	(Gal) ₁ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2,5	0,4	0,4
5	1501,56	(GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3,5	0,0	0,0
6	1524,49	(GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₁ (Sulf) ₁ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	1,5	0,0
7	1540,49	(GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₁ (Sulf) ₁ + (Man) ₄ (GlcNAc) ₂	0,0	5,2	0,0
8	1548,54	(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	1,8	0,0
9	1581,51	(GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Sulf) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	6,7	0,0
10	1606,59	(Gal) ₁ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	7,4	0,0	5,0
11	1622,58	(Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3,2	1,0	0,0
12	1647,61	(GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1,9	1,8	0,0
13	1663,61	(Gal) ₁ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	15,4	0,0	0,0
14	1686,54	(GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₁ (Sulf) ₁ (Fuc) ₁ + (Man) ₄ (GlcNAc) ₂	0,0	0,7	0,0
15	1694,60	(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₁ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	1,1	0,0
16	1702,54	(GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₁ (Sulf) ₁ + (Man) ₅ (GlcNAc) ₂	0,0	2,5	0,0
17	1710,60	(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₁ + (Man) ₄ (GlcNAc) ₂	0,0	0,0	1,2
18	1743,56	(Gal) ₁ (GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Sulf) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	3,6	0,0
19	1751,62	(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	1,3	0,5
20	1768,64	(Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3,5	0,6	0,0
21	1809,67	(Gal) ₁ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	29,9	0,8	0,0
22	1825,66	(Gal) ₂ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	6,7	0,0	0,0
23	1850,69	(GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3,0	0,0	0,0
24	1864,55	(GalNAc) ₂ (GlcNAc) ₂ (Sulf) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	3,4	0,0
25	1889,62	(GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Sulf) ₁ (Fuc) ₁ + (Man) ₄ (GlcNAc) ₂	0,0	1,4	0,0
26	1889,62	(Gal) ₁ (GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Sulf) ₁ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	4,6	0,0
27	1897,68	(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	1,0	0,0
28	1913,68	(NeuAc) ₁ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,9	0,9	36,1
29	1930,65	(GalNAc) ₂ (GlcNAc) ₂ (Sulf) ₁ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	1,6	0,0
30	1954,70	(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1,9	0,7	0,0
31	1955,72	(Gal) ₁ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	6,2	0,8	0,0
32	1971,72	(Gal) ₂ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3,9	0,0	0,0
33	1996,75	(GlcNAc) ₄ (Fuc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2,5	0,0	0,0
34	2010,60	(GalNAc) ₂ (GlcNAc) ₂ (Sulf) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	4,4	0,0
35	2012,75	(Gal) ₁ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,6	0,0	0,0
36	2028,74	(Gal) ₂ (GlcNAc) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1,0	1,3	0,0
37	2034,66	(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Sulf) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	14,0	0,0
38	2059,73	(NeuAc) ₁ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0,0	3,4
39	2100,76	(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1,2	4,2	0,0
40	2116,76	(NeuAc) ₁ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,7	0,0	0,0
41	2117,78	(Gal) ₂ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0,0	0,5
42	2174,80	(Gal) ₂ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1,7	1,4	0,0
43	2180,72	(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GalNAc) ₁ (GlcNAc) ₂ (Sulf) ₁ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	3,5	0,0
44	2190,79	(Gal) ₃ (GlcNAc) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,9	0,0	0,0
45	2204,77	(NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	14,1	31,9
46	2245,80	(NeuAc) ₂ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	2,3	0,0
47	2278,81	(NeuAc) ₁ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0,0	2,7
48	2350,83	(NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	2,1	5,3
49	2424,87	(NeuAc) ₁ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0	0,5
50	2553,91	(NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0,5	0,0
51	2569,90	(NeuAc) ₂ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0,0	6,9
52	2684,97	(NeuAc) ₁ (Gal) ₃ (GalNAc) ₂ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0,8	0,0
53	2715,96	(NeuAc) ₂ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0,0	1,5
54	2743,01	(Gal) ₃ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,6	0,0	0,0
55	2831,03	(NeuAc) ₁ (Gal) ₃ (GalNAc) ₂ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	1,0	0,0
56	2861,00	(NeuAc) ₃ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0,6	3,5
57	3007,06	(NeuAc) ₃ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0,0	0,9	0,7
Massa média (Da)			1860,8	1959,7	2202,3

Todas as estruturas do hTSH-CHO são galactosiladas, com predominância de estruturas com duas galactoses. Um menor número de glicanos com resíduos de Gal (1-3) são encontrados nas duas preparações de origem humana, com predominância de estruturas com uma galactose (Tabela 7).

Na preparação hTSH-HEK estruturas fucosiladas são bastante frequentes, enquanto nas preparações derivadas de células CHO e pituitária a fucose ocorre em menor incidência (Tabela 7).

Uma grande diferença encontrada entre as preparações de diferentes origens foi na frequência de estruturas sialiladas. Muito poucas estruturas são sialiladas na preparação hTSH-HEK, sendo a preparação hTSH-CHO a mais sialilada (Tabela 7).

Tabela 7. Frequência de diferentes monossacarídeos (%) em preparações de TSH de diferentes origens

Monossacarídeo	hTSH-HEK (%)	hTSH-Pit (%)	hTSH-CHO (%)
Galactose	88,2	65,3	100
Fucose	63	34,2	16,9
Ácido siálico	4,7	50,8	94,2

A análise do perfil de N-glicanos do hTSH-HEK mostrou que esta preparação contém glicanos complexos bi, tri e tetrantenários, com predominância dos triantenários, sendo as estruturas monoantenárias ausentes (Tabela 8). Diferentemente, as preparações derivadas de células CHO e pituitária tem as estruturas biantenárias predominantes. Estruturas tetra-antenárias só não foram encontradas no hTSH-CHO.

Tabela 8. Intensidade relativa (%) de GlcNAc em preparações de TSH de diferentes origens

Antenaridade	hTSH-HEK (%)	hTSH-Pit (%)	hTSH-CHO (%)
(GlcNAc) ₁	—	17,9	1,2
(GlcNAc) ₂	18,4	64,9	82,6
(GlcNAc) ₃	71,3	14,4	16,3
(GlcNAc) ₄	10,3	2,7	—

A preparação hTSH-HEK apresentou 2,3% mais carboidratos que a preparação hTSH-Pit e 1,7% menos carboidratos que a preparação hTSH-CHO (Tabela 9). Dos três sítios de N-

glicosilação disponíveis, a preparação CHO apresentou o maior número de sítios ocupados, seguido do hTSH-HEK e hTSH-Pit (Tabela 9).

Tabela 9. Massa média dos glicanos, composição de carboidratos e ocupância, calculados a partir do perfil dos N-glicanos

Preparação de hTSH	Massa dos carboidratos MALDI-TOF* (Da)	Massa média dos glicanos (Da)	Composição de carboidratos (%)	Sítios ocupados (Nº)	Ocupância (%)
hTSH-HEK	4972	1860,8	17,0	2,67	89,1
hTSH-Pit	4194	1959,7	14,7	2,14	71,3
hTSH-CHO	5590	2202,3	18,7	2,79	93,1

*Calculada considerando a massa do backbone do hTSH de 24330 Da

O cálculo dos monossacarídeos Fuc, GalNac, GlcNac, Gal, Man, SA e do Sulfato foi feito levando-se em conta a contribuição em massa de cada um deles nas diferentes estruturas das preparações de hTSH (Tabela 10). A preparação hTSH-HEK foi a que apresentou a maior quantidade de fucose, aproximadamente 5x mais que a preparação hTSH-CHO e praticamente 3x mais que a preparação hTSH-Pit. Com relação a GalNac e Sulfato, apenas a preparação hTSH-Pit apresentou estas espécies. Quanto a GlcNac, a preparação hTSH-HEK foi a que apresentou maior quantidade deste monossacarídeo, 22,5% a mais que o hTSH-CHO e 38,3 % a mais que o hTSH-Pit. A Gal no hTSH-HEK é 42,4% maior do que na preparação hTSH-Pit e 64,8% menor que na preparação hTSH-CHO. Em relação à Man do hTSH-HEK, o hTSH-CHO apresenta praticamente a mesma quantidade e o hTSH-Pit apresenta 28,7% menos. O SA encontrado no hTSH-HEK foi 11,8 x menor do que no hTSH-Pit e 35,8x menor do que no hTSH-CHO.

Tabela 10. Razão molar de monossacarídeos ou sulfato por molécula de hTSH (mol/mol), determinada baseada na análise dos N-glicanos

Preparação de hTSH	Monossacarídeo (mol/mol hTSH)						
	Fuc	GalNac	GlcNac	Gal	Man	AS	Sulfato
hTSH-HEK	2,20	0	14,22	3,21	8,72	0,12	0
hTSH-Pit	0,76	1,63	8,78	1,85	6,22	1,41	1,57
hTSH-CHO	0,47	0	11,02	5,29	8,48	4,29	0

4.5.3 Análise em HPLC

Quando as preparações de diferentes origens foram analisadas em HPSEC e RP-HPLC, o hTSH-HEK apresentou tempo de retenção maior que o hTSH-CHO e que o hTSH-Pit, na seguinte ordem: $t_{RCHO} < t_{RPit} < t_{RHEK}$ (Tabela 11 e 12).

Tabela 11. Tempo de retenção de preparações de hTSH de diferentes origens em HPSEC

Preparação	Tempo de retenção(t_R) (min)	Diferença relativa hTSH-HEK (%)	Significância
hTSH-HEK	17,50 ± 0,21	-	-
hTSH-Pit	17,08 ± 0,08	-2,4	NS
hTSH-CHO	16,31 ± 0,03	-6,8	P > 0,05

Tabela 12. Tempo de retenção de preparações de hTSH de diferentes origens em RP-HPLC

Preparação	Tempo de retenção(t_R) (min)	Diferença relativa hTSH-HEK (%)	Significância
hTSH-HEK	35,74 ± 0,67	-	-
hTSH-Pit	34,82 ± 0,62	-2,6	NS
hTSH-CHO	34,47 ± 0,66	-3,6	NS

No caso da HPSEC, a diferença do tempo de retenção entre as 2 preparações de origem humana não foi significativa. Entretanto, foi significativa a diferença entre o tempo de retenção do hTSH-CHO e hTSH-HEK.

Relativa à análise em RP-HPLC, há diferença de ~ 1 minuto na eluição do hTSH-HEK e das outras duas preparações, mas estas diferenças não foram significativas.

O perfil cromatográfico em HPSEC destas preparações é mostrado na Figura 17. Observa-se que as 3 preparações apresentam o mesmo grau de pureza de 97%.

O perfil cromatográfico em RP-HPLC destas preparações é mostrado na Figura 18. Observa-se que o hTSH-HEK é a preparação mais hidrofóbica.

Figura 17. Perfil cromatográfico em HPSEC de preparações de hTSH de diferentes origens.

Figura 18. Perfil cromatográfico em RP-HPLC de preparações de hTSH de diferentes origens.

4.5.4 Análise em SDS-PAGE

Quando analisadas em SDS-PAGE, as 3 preparações de hTSH migram como 2 bandas (subunidades α e β), observando-se uma pequena diferença de migração entre elas. As subunidades do hTSH-CHO migram menos que as subunidades das 2 outras preparações (Figura 19). Na literatura há relato semelhante relativo ao hTSH de origem hipofisária e derivado de células CHO (Carvalho CM e col., 2009). É possível observar também nessa análise que a pureza do produto obtida no presente trabalho é equivalente à das duas outras preparações.

Figura 19. SDS-PAGE de hTSH de diferentes origens. (1) e (5) Marcador de peso molecular; (2) hTSH-CHO; (3) hTSH pituitário; (4) hTSH-HEK.

4.5.5 Farmacocinética

Um exemplo de curva de concentração de hTSH-HEK no soro de camundongos em função do tempo é mostrada na Figura 20. A concentração plasmática máxima de hTSH-HEK foi atingida aos 60 minutos. Após 5 horas, apenas 14% de TSH ainda permanece na circulação.

Figura 20. Concentração plasmática do hTSH-HEK em 5 horas.

Analisando o comportamento cinético das 3 preparações de origens diferentes observa-se que a meia-vida do hTSH-HEK é cerca de 1,5 vezes menor que a meia-vida do hTSH-CHO e 1,2 vezes menor do que o hTSH-Pit (Tabela 13). Enquanto o hTSH-CHO teve o máximo de absorção aos 90 minutos, ambos os hTSH de origem humana tiveram o máximo de absorção aos 60 minutos, gerando uma menor exposição do organismo ao hormônio.

Tabela 13. Comportamento farmacocinético de preparações de hTSH de diferentes origens em 2 ensaios

Preparação	Tempo de máxima absorção (min)	T _{1/2} (min)	AUC (µg.min/mL)
hTSH-HEK ¹	60	74,3 ± 18,03	12194 ± 2033,2
hTSH-Pit ²	60	89,7 ± 0,42	14269 ± 2146,7
hTSH-CHO ³	90	115,1 ± 3,12	16155 ± 1398,1

¹ Dados obtidos no presente trabalho² Dados de Ribela MTCP e col., 2016³ Dados Damiani R e col., 2013

4.5.6 Atividade biológica

A atividade biológica de preparações de hTSH de diferentes origens foi avaliada por bioensaio *in vivo*, baseado no estímulo de liberação de T₄ pela administração de hTSH, após prévia inibição do TSH endógeno dos camundongos Balb/C.

As respostas do T₄ de camundongos (n=10) para as diferentes preparações administradas são mostradas na Tabela 14. Pode-se observar que a preparação de hTSH-HEK é biologicamente ativa, sendo 39% menos ativa que a preparação hTSH-CHO e 16% menos ativa que a preparação hTSH-Pit. Observa-se que a outra preparação de origem humana (hTSH-Pit) é também menos ativa que a derivada de CHO, cerca de 27%.

Tabela 14. Nível de T₄ (µg/dL), em preparações de hTSH de diferentes origens, determinado por bioensaio *in vivo*.

Preparação	T ₄ (µg/dL) ¹
hTSH-HEK	2,98 ± 0,33
hTSH-Pit	3,55 ± 0,52
hTSH-CHO	4,86 ± 0,77

¹Média ± desvio padrão (n=10)

5.0 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi obtida a tireotrofina humana recombinante expressa em células embrionárias de rim humano (HEK 293). Pelo que é do nosso conhecimento não há nenhum estudo na literatura sobre produção de hTSH recombinante em células humanas. Até o presente momento, todo o hTSH descrito na literatura, tanto pelo nosso grupo (Peroni CN e col., 2002) quanto por Cole ES e col. (1993) é derivado de células de ovário de hamster chinês (CHO), inclusive o único produto comercial disponível.

Um sistema eficiente de expressão transiente, utilizando o vetor comercial TOPO pcDNA 3.4 contendo os genes das subunidades α e β do hTSH na mesma proporção empregada por Peroni e col. (2002), foi utilizado para a obtenção do hTSH-HEK.

Nas condições de transfecção estabelecidas neste trabalho obteve-se uma produtividade específica de $2,1 \mu\text{g}/10^6 \text{ cel./dia}$ e uma concentração de hTSH-HEK no meio condicionado de $0,95 \mu\text{g/mL}$. Estes valores são comparáveis em termos de produtividade específica aos reportados por Damiani R e col. (2009) para o hTSH derivado de células CHO modificadas para uma sialilação mais próxima da humana, isto é com configurações $\alpha_{2,3}$ e $\alpha_{2,6}$. Entretanto, estes valores são menores que aqueles reportados por Cole ES e col. (1993) ($4,5 \mu\text{g}/10^6 \text{ cel./dia}$) e por Peroni CN. e col. (2002) ($7,2 \mu\text{g}/10^6 \text{ cel./dia}$) para o hTSH derivado de células CHO não modificadas. De qualquer forma estes níveis de hTSH foram adequados para a obtenção de material para ser purificado e caracterizado.

O processo de purificação partiu de 438 mg de material cru impuro e diluído em 3,2 L de meio de cultura (fração de massa de hTSH = 0,70%). Após a primeira etapa do processo (concentração-purificação), foi obtido um enriquecimento de 71 vezes, gerando aproximadamente 4 mg de proteína (fração de massa de hTSH = 49,6%). Seguindo para a segunda etapa do processo (cromatografia de fase reversa), aproximadamente 1,8 mg de hTSH com pureza de reagente químico (> 93%) foi obtido.

No presente trabalho foi utilizado o mesmo processo de purificação descrito por Oliveira JE e col. (2007) para a purificação de hTSH derivado de células CHO. Neste caso, o material de partida era 1,6 vezes mais concentrado ($0,95$ versus $0,60 \mu\text{g/mL}$) e 2 vezes mais puro (fração de massa 0,70 versus 0,35%) que o trabalho reportado na literatura. Em ambos os casos obteve-

se um produto com pureza adequada, porém a recuperação final do processo do presente trabalho foi menor que a obtida na literatura (55% versus 70%), embora ainda bastante útil.

A espectrometria de massa MALDI-TOF tem se mostrado uma ferramenta bastante importante para avaliar a identidade ou diferenças chave entre preparações derivadas de hospedeiros diferentes. A massa do hTSH-HEK (29302), determinada por MALDI-TOF, é menor do que a massa do hTSH-CHO. Tal fato ficou também evidenciado na análise destas 2 preparações por HPLC de Exclusão molecular (HPSEC), onde uma diferença de tempo de retenção de ~7% entre estas duas preparações foi observada, com o hTSH-CHO eluindo primeiro, refletindo portanto ter massa maior. Da mesma forma, a corrida eletroforética destas 2 preparações mostrou uma menor migração da preparação hTSH-CHO, caracterizando a sua massa maior. Com relação à massa do hTSH-Pit (28524), determinada por MALDI-TOF, a massa do hTSH-HEK foi 2,7% maior. Na comparação destas 2 preparações por HPSEC, o hTSH-Pit eluiu primeiro, mas a diferença entre os tempos de retenção destas preparações não foi significativo.

A análise das tres preparações de diferentes origens em RP-HPLC (Tabela 12) revelou uma maior interação com a coluna de fase reversa da preparação hTSH-HEK, refletindo a maior hidrofobicidade relativa desta preparação. Esta preparação exibiu um tempo de retenção 3,6% maior que o hTSH-CHO e 2,6% maior que o hTSH-Pit, embora estas diferenças não tenham sido significativas. O hTSH-CHO apresentou um tempo de retenção 1% menor que o hTSH-Pit. Este fato já tinha também sido observado anteriormente na literatura. Oliveira JE e col.(2003) e Damiani R e col. (2009) obtiveram em seus estudos diferenças de -1,22% e -1,14%, respectivamente entre preparações derivadas de células CHO e hipofisária, o que pode ser explicado por diferenças de carboidratos nestes preparações.

Relativo ao perfil de N-glicanos obtido para o hTSH-HEK, foi verificado que o número (24) e quase todos os tipos de glicoe estruturas desta preparação não foram comparáveis aos obtidos para a preparação hTSH-CHO, que é aquela usualmente utilizada na prática clínica. Apenas poucos (14,2%) N-glicanos do hTSH-Pit foram comuns aos do hTSH-HEK, sendo que os glicanos predominantes nesta última (triantenários monogalactosilados com ou sem fucose), não foram identificados na preparação nativa.

A preparação de hTSH derivada de células HEK 293 teve um grau de sialilação bem menor do que as outras duas preparações analisadas.

Já foi descrito na literatura que a sialilação é altamente específica do tipo de célula hospedeira (Zhang P e col.,2010).

Böhn E e col. (2015) obtiveram um grau de ácido siálico 5,5x menor na preparação recombinante humana de fator de coagulação VII derivada de células HEK293 (0,57 ac siálico/molécula) do que na preparação derivada de células CHO (3,14 ac siálico/molécula).

Zhang P e col. (2010) mostraram por focalização isoeétrica (IEF) diferenças de sialilação na eritropoetina produzida em células CHO e células HEK293, estas últimas apresentando um menor grau de sialilação.

Crosset A. e col. (2012) analisaram em IEF 12 proteínas de peso molecular entre 10000 e 53000 Da expressas em células CHO e HEK293 e detectaram que as proteínas expressas em células CHO tem isoformas mais ácidas comparadas às proteínas derivadas de células HEK, indicando a menor quantidade de ácido siálico das preparações derivadas de células HEK.

A quantidade de ácido siálico de uma glicoproteína é afetada por dois processos opostos: a adição intracelular do ácido siálico por sialiltransferases e a remoção extracelular de ácido siálico por clivagem enzimática via sialidase. A adição intracelular do ácido siálico é a última etapa do processo de glicosilação que ocorre no trans-Golgi. Isto envolve a transferência enzimática do ácido siálico do nucleotídeo precursor (CMP-ácido siálico) para galactose disponível na estrutura do glicano emergente, que é ligado à nova proteína sintetizada. Fatores que podem influenciar o nível de sialilação incluem disponibilidade de CMP-ácido siálico, a atividade de enzimas sialiltransferase e galactosiltransferase e a disponibilidade de galactose na estrutura do glicano emergente (Jing Y e col., 2010).

A diminuição do ácido siálico no hTSH-Pit pode ser associada com a menor disponibilidade de galactose. De fato, observa-se que a razão molar AS/Gal nesta preparação (0,76) e no hTSH-CHO (0,81) são da mesma ordem. Isto, entretanto, não ocorre no hTSH-HEK onde esta razão é ~ 20 vezes menor (0,037), sugerindo que a diminuição do ácido siálico possa ter ocorrido também por ação de sialidasas.

Outra diferença bastante significativa observada nas preparações analisadas foi a maior quantidade de fucose presente na preparação derivada de células HEK293. Tal fato foi também observado por Böhn E. e col. (2015) que reportaram 5x mais fucose na preparação recombinante de fator de coagulação VII derivada de células HEK do que na preparação derivada de células CHO.

Relativa à antenaridade das estruturas das 3 preparações de hTSH em análise, enquanto no hTSH-CHO e no hTSH-Pit a predominância foi de estruturas biantenárias, no hTSH-HEK a predominância foi de estruturas triantenárias, uma diferença de frequência destas estruturas nas 2 outras preparações de 56,9% e 55% respectivamente.

Não foram encontradas no hTSH-HEK estruturas contendo N-acetil galactosamina (GalNac) ao contrário do esperado, por se tratar de um célula de origem humana, analogamente ao que ocorre na preparação nativa.

Os 3 sítios de glicosilação do hTSH não estão sempre totalmente ocupados. Com relação à ocupância do hTSH-HEK, foi observada uma pequena diferença (4%) com relação ao hTSH-CHO e ~ 18% de diferença na ocupância relativa ao hTSH-Pit. A ocupância das glicoproteínas pode ser clinicamente relevante, uma vez que pode estar associada a doenças que afetam a síntese, transferência ou processamento dos glicanos. Por exemplo a CDG tipo 1 (Congenital Disorders of Glycosylation) é uma síndrome que provoca defeitos nas etapas iniciais do processo de glicosilação gerando sítios não ocupados (Tian Y & Zhang H, 2010).

Relativo ao tempo de permanência da proteína na circulação, observou-se que o $t_{1/2}$ do hTSH-HEK foi o menor das 3 preparações analisadas. Isto possivelmente está ligado ao nível de sialilação destas preparações, uma vez que o ácido siálico ligado à proteína impossibilita o seu reconhecimento pelos receptores asialo-glicoproteicos existentes no fígado e que são responsáveis diretos pela depuração metabólica da proteína, sendo a taxa de depuração inversamente proporcional ao grau de sialilação. Desta forma, a preparação hTSH-HEK, que tem o menor grau de ácido siálico, foi a que foi depurada mais rapidamente da circulação. (Thotakura NR, 1992; Szkudlinski MW, 1993; Thotakura NR, 1995; Takamatsu S, 2003 ;). Nossos resultados de $t_{1/2}$ das diferentes preparações de hTSH mostraram uma alta e significativa correlação com a quantidade de ácido siálico (mol/mol): $r = 0,9971$ $p < 0,001$.

A atividade biológica do hTSH-HEK mostrou-se menor que a do hTSH-CHO e hTSH-Pit. Este resultado está coerente com aquele obtido no estudo de farmacocinética em que a menor exposição do hTSH ao organismo foi do hTSH-HEK ($AUC = 12194 \mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$). Também o hTSH-Pit mostrou-se menos ativo que o hTSH-CHO, o que está de acordo com

relatos da literatura (Thotakura NR e col., 1991; Szkudlinski MW e col., 1993; Mendonça F e col., 2005; Oliveira JE e col., 2007; Damiani R e col., 2013). Nossos resultados mostraram uma alta e significativa correlação da atividade biológica com a meia vida circulatória ($r = 0,9965$ $p < 0,001$) e com a quantidade de ácido siálico ($r = 0,9999$ $p < 0,001$). Preparações com baixo teor de ácido siálico permanecem um tempo menor na circulação comparadas àquelas com maior teor de ácido siálico e menor é a sua atividade biológica *in vivo*.

Vale ressaltar a precisão do ensaio biológico realizado neste estudo, com coeficiente de variação $< 16 \%$, uma variabilidade considerada pequena, tratando-se de ensaio biológico *in vivo* com animais.

Em conclusão, os resultados alcançados no presente trabalho mostram que a utilização das células HEK293T como hospedeiras é uma alternativa viável para a expressão de tireotrofina humana recombinante. O produto gerado satisfaz critérios de identidade, pureza e potência necessários para suportar seu uso como reagente químico, seja para uso *in vitro* (como reagente de imunoensaios), assim como para bioensaios, estudos de biodistribuição ou ainda em estudos de estrutura-função. A principal vantagem desta expressão é ser de origem humana, aproximando-se da proteína nativa. Também a maior rapidez e praticidade em sua obtenção por transfecção transiente é de interesse para a evolução de estudos sobre este hormônio.

6. CONCLUSÕES

- Foi obtida pela primeira vez a tireotrofina humana recombinante derivada de células embrionárias de rim humano (HEK293T), biologicamente ativa e de alta qualidade.
- Não foram observadas diferenças significativas com relação à massa molecular entre o hTSH-HEK, o hTSH derivado de células CHO e a preparação nativa.
- Foram encontradas diferenças substanciais nas estruturas dos N-glicanos da tireotrofina humana recombinante derivada de células HEK293T, derivada de células CHO e da preparação nativa, especialmente no que se refere à sialilação, fucosilação e antenaridade das mesmas.
- O hTSH-HEK foi depurado mais rapidamente que o hTSH-CHO e que o hTSH-Pit.
- O hTSH-HEK mostrou-se 1,6 vezes menos potente que o hTSH-CHO e 1,2 vezes menos potente que o hTSH-Pit
- A expressão transiente de hTSH em células HEK 293T é uma alternativa potencialmente viável para se obter, de maneira rápida, um produto com atributos adequados de identidade, pureza e potência para o uso em estudos deste hormônio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adam E, Sarrazin S, Landolfi C, Motte V, Lortat-Jacob H, Lassalle P, Delehedde, M. Efficient long-term and high-yielded production of a recombinant proteoglycan in eukaryotic HEK293 cells using a membrane-based bioreactor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 369, p. 297-302, 2008.
2. Almeida B E, Damiani R, Oliveira J E, Dalmora S L, Torjesen P A. Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination. *Anal.Meth.*, v. 6, p. 6688-6694, 2014.
3. Almo SC, Love JD. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.26, p.39-43, 2014.
4. Bandaranayake AD, Almo SC. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters*, v.588, p. 253-260, 2014.
5. Beckliwal G, Hildinger M, Hasija V, Wurm FM. High-Density Transfection with HEK-293 cells allows doubling of transient titers and removes need for a priori DNA complex formation with PEI. *Biotechnol. Bioeng.*, v.99, p.721-727, 2008
6. Belin V, Rousselle P. Production of recombinant expressed laminin fragment by HEK-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis bioreactor. *Prot. Express. Purif.*, v.48, p.43-48, 2006.
7. Böhn E, Seyfried BK, Dockal M, Graninger M, Hasslacher M, Neurath M, Konetschny C, Matthiessen P, Mitterer A, Scheiflinger F. Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells. *BMC Biotechnol.*, v. 15, p. 87-101, 2015.
8. Carvalho CM, Oliveira JE, Almeida BE, Ueda EKM, Torjesen, PA, Bartolini P, Ribela, MTCP. Efficient isolation of the subunits of recombinant and pituitary glycoprotein hormones. *J. Chromatogr. A*, v. 1216, p. 1431-1438, 2009.
9. Casademunt E, Martinelle K, Jernberg M, Winge S, Tiemeyer M, Biesert L, Knaub S, Walter O, Schröder. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *Eur. J. Haematol*, v. 89, p. 165-176, 2012.
10. Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Berrow NS, Segura MM, Gòdia F. Extended gene expression by medium exchange and repeated transient transfection for recombinant protein production enhancement. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 112, p. 934-946, 2015 a.

11. Cervera L, Fuenmayor J, González-Dominguez I, Gutiérrez-Granados S, Segura MM, Gódia F. Selection and optimization of transfection enhancer additives for increases virus-particles production in HEK293 suspension cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 99, p. 9935-9949, 2015 b.
12. Cole ES, Lee K, Lauziere K, Kelton C, Chappel S, Weintraub B, Ferrara D, Peterson P.; Bernasconi R, Edmunds T, Richards S, Dickrell L, Kleeman.; MC Phersin JM, Pratt B. Recombinant human thyroid stimulating hormone: development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma, *Bio-Technol.*, v.11, p.1014-1023,1993.
13. Croset A, Delafosse L, Gaudry JP, Arod C, Glez L, Losberger C, Begue D, Krstanovic A, Robert F, Vilbois F, Chevalet L, Antonsson B. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J. Biotechnol*, v. 161, p. 336-348, 2012.
14. Damiani R, Oliveira JE, Vorauer-Uhl K, Peroni CN, Vianna EG, Bartolini P, Ribela MTCP. Stable expression of a human-like sialylated recombinant thyrotropin in a Chinese hamster ovary cell line expressing alpha 2,6-sialyltransferase. *Protein Express. Purif.*, v. 67, p. 7-14, 2009.
15. Damiani R. Almeida B E, Oliveira J E, Bartolini P, Ribela M T C P. Enhancement of human thyrotropin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v. 171, p. 1658-1672, 2013.
16. Datta P, Linhardt, RJ, Sharfstein ST. An omics approach towards CHO cell engineering. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 110, p 1255-1262, 2013.
17. Dumont JA, Liu T, Low SC, Zhang X, Kamphaus G., Sakorafas P, Fraley C, Drager D, Reidy T, McCue J, Franck HWG, Merricks EP, Nichols TC, Bitonti AJ, Pierce GF, Jiang H. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. *Blood*, v.119,p. 1-34, 2002.
18. Durocher Y, Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 20, p. 700-707, 2009.
19. Fischer S, Charara N, Gerber A, Wolfel J, Shiedner G, Voedisch B, Geisse S. Transient recombinant protein expression in a human amniocyte cell line: CAP-T1 cell system. *Biotechnol. Bioeng.*,v. 109, p.2250-2261, 2012
20. Fliedl L, Grillari J, Grillari-Voglauer R. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. *New Biotechnol.*, v.32, p. 673-679, 2015.

21. Fogli, A.; Merle, C.; Roussel, V.; Schiffmann, R.; Ughetto, S.; Theisen, M.; Boespflug-Tanguy, O. CSF N-glycan profiles to investigate biomarkers in brain developmental disorders: application to leukodystrophies related to eIF2B mutations. *PLoS ONE*, v.7, e42688, 2012.
22. Gawlitzek M, Estacio M, Fürch T, Kiss R. Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 103, p. 1164-1175, 2009.
23. Geisse S. Reflections on more than 10 years of TGE approaches. *Protein Express. Purif.*, v. 64, p. 99-107, 2009.
24. Green ED, Baenziger JU. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. I. Structural elucidation of the sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 25-35, 1988.
25. Jing Y, Quian Y, Li ZJ Sialylation enhancement of CTLA4-Ig fusion in Chinese hamster ovary cells by dexamethasone. *Biotechnol. Bioeng.*, v.107, p.488-496,2010.
26. Lin C-Y, Huang Z, Wen W, Wu A, Wang C, Niu L. Enhancing protein expression in HEK-293 cells by lowering culture temperature. *PloS ONE*, v.10 e0123562, 2015.
27. Loignon M, Perret S, Kelly J, Boulais D, Cass B, Bisson L, Alfkhamizarreh F, Durocher Y. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.*, v. 8, p. 1-16, 2008.
28. Mendonça F, Oliveira JE, Bartolini P, Ribela MTCP. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotrophin and its immunological, biological, physico-chemical and mass spectral characterization. *J. Chromatogr. A*, v.1062, p.103-112, 2005.
29. Oliveira JE, Mendonça F, Peroni CN, Bartolini P, Ribela MTCP. Determination of chinese ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 787, p. 345-355, 2003.
30. Oliveira JE, Damiani R, Bartolini P, Ribela MTCP, Practical reversed-phase high performance liquid chromatography method for laboratory scale purification of recombinant human thyrotropin. *J. Chromatogr. A*, v.1164, p. 206-211, 2007.
31. Oliveira JE, Damiani R, Bartolini P, Ribela MTCP, Influence of a reduced CO $_2$ environment on the secretion yield, potency and N-glycan structures of recombinant thyrotropin from CHO cells. *Mol. Biotechnol.*, v. 39, p. 159-166, 2008.

32. Peroni CN, Soares CRJ, Gimbo E, Morganti L, Ribela MTCP, Bartolini P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 35, p. 19-26, 2002.
33. Pharm PL, Perret S, Cass B, Carpentier E, St-Laurent G, Bisson L, Kamen A, Durocher Y. Transient gene expression in HEK293 cells: Peptone addition post transfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 90, p. 333-334, 2005.
34. Picanço-Castro V, Biaggio R T, Cova D T, Swiech K. Production of recombinant therapeutic protein in humans cells: current achievements and future perspectives. *Protein Pept. Lett.*, v. 20, p. 1373-1381, 2013.
35. Ribela MTCP, Bianco AC, Bartolini P. The use of recombinant human thyrotropin produced by chinese hamster ovary cells for the preparation of immunoassay reagents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 81, p. 249-256, 1996.
36. Ribela MTCP, Gout PW, Bartolini P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. (Review) *J. Chromatogr. B*, v. 790, p. 285-316, 2003.
37. Ribela MTCP, Gout PW, Oliveira JE, Bartolini P. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications (Review). *Curr. Pharm. Anal.*, v. 2, p. 103-126, 2006.
38. Ribela MTCP, Damiani R, Silva FD, Lima ER, Oliveira JE, Peroni CN, Torjesen PA, Soares CR, Bartoloni P. N-glycoprofiling analysis for carbohydrate composition and site-occupancy determination in a poly-glycosylated protein: human thyrotropin of different origins. *Submetido à Int. J. Mol. Sci.*, 2016.
39. Schuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 32678-32684, 1994.
40. Silva MA, Valgode FGS, Gonzalez JÁ, Yoriyaz H, Guimarães MICC, Ribela MTCP, Buchjeiguel CA, Bartolini P, Okazaki K. Cytogenetic and dosimetric effects of I^{131} in patient with differentiated thyroid carcinoma: comparison between stimulation with rhTSH and thyroid hormone withdrawal treatments. *Radiat. Environ. Biophys.*, v. 55, p. 317-328, 2016.
41. Simpson DZ, Hitchen PG, Elmhirst EL, Taylor ME. Multiple interactions between pituitary hormones and the mannose receptor. *Biochem. J*, v. 343, p. 403-411, 1999.

42. Sun X, Goth PE, Wong KTK, Mori T, Yap MGS. Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. *Biotechnol. Lett.*, v. 28, p. 843-848, 2006.
43. Szkudlinki MW, Thotakura NR, Bucci I, Joshi LR, Tsai A, East-Palmer J, Shiloach J, Weintraub BD. Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by Chinese-hamster ovary cells – the role of sialylation and sulfatation in TSH bioactivity. *Endocrinology*, v.133, p. 1490-1500, 1993.
44. Szkudlinki MW, Thotakura NR, Tropea JE, Grossmann M, Weintraub BD. Asparagine-linked oligosaccharide structures determine clearance and oligodistribution of pituitary and recombinant thyrotropin. *Endocrinology*, v. 136, p. 3325-3330, 1995.
45. Szkudlinki MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.*, v. 82, p. 473-502, 2002.
46. Swiech K, Picanço-Castro V, Covas DT. Human cells: New Platform for recombinant therapeutic production. *Protein Express. Purif.*, v.84, p. 147-153, 2012.
47. Takamatsu S, Fukuta K, Asanagi M, Abe R, Yokomatsu T, Fujibayashi Y, Makino T. Monitoring biodistribution of glycoproteins with modified sugar chains. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1622, p. 179-191, 2003.
48. Thotakura NR, Desai RK, Bales LG, Cole ES, Pratt BM, Weintraub BD. Biological activity and metabolic clearance of a recombinant thyrotropin produced in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*, v. 128, p. 341-348, 1991.
49. Thotakura NR, Desai RK, Szkudlinki MW, Weintraub BD. The role of the oligosaccharide chains of the thyrotropin alpha-subunit and beta-subunit in hormone action. *Endocrinology*, v. 131, p. 82-88, 1992.
50. Thotakura NR & Blithe DL. Glycoprotein hormones: glycobiology of gonadotropins, thyrotropin and free α subunit. *Glycobiology*, v. 5, p. 3-10, 1995.
51. Tian Y & Zhang H. Glycoproteomics and clinical applications. *Proteomics Clin. Appl.*, v. 4, p. 124-132, 2010.
52. Zhang P, Tan DL, Heng D, Wang T, Yang MY, Song Z. A functional analysis of N-glycosylation-related genes on sialylation of recombinant erythropoietin in six commonly used mammalian cell lines. *Metab. Eng.*, v. 12, p.526-536, 2010.
53. Wajih N, Owen J, Wallin R. Enhanced Functional Recombinant Factor VII Production by HEK 293 Cells stably transfected with VKORC1 where the gamma-carboxylase

inhibitor calumenin is stably suppressed by shRNA transfection. *Thromb. Res.*, v.122, p. 405-410, 2008.