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

Expressão, Purificação e Caracterização Físico-Química da rhBMP-2 (recombinante humana BMP-2)

KLEICY CAVALCANTE AMARAL

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

Orientador:
Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo
2019

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

Expressão, Purificação e Caracterização Físico-Química da rhBMP-2 (recombinante humana BMP-2)

Versão Original

KLEICY CAVALCANTE AMARAL

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

Orientador:
Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo
2019

Fonte de Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPQ)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

CAVALCANTE AMARAL, K. ***Expressão, Purificação e Caracterização Físico Química da rhBMP-2 (recombinante humana BMP-2)***. 2019. 88 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cavalcante Amaral, Kleicy Expressão, Purificação e Caracterização Físico Química da rhBMP-2 (recombinante humana BMP-2) / Kleicy Cavalcante Amaral; orientador Prof. Dr Daniel Perez Vieira. -- São Paulo, 2019.
87 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. rhBMP-2. 2. Escherichia coli. 3. proteína recombinante.
4. recombinant protein. I. Perez Vieira, Prof. Dr Daniel, orient. II. Título.

Dedico este trabalho a Deus, que nos deu as ferramentas para fazer o que hoje chamamos de ciência...

Dedico também a minha família, sem vocês nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Daniel Perez Vieira, pela compreensão e colaboração durante toda a trajetória percorrida até aqui, com certeza a sua orientação me ensinou os caminhos da ciência e foi fundamental em muitos momentos. O meu mais sincero obrigada!

Aos meus pais, começar esse sonho e concretizá-lo teria sido impossível sem vocês, só tenho a agradecer por todos os incentivos, conselhos e apoio! Eu amo vocês!

Aos alunos do grupo de radiobiologia: à Ivette Zegarra que me ensinou os primeiros passos dentro de uma cultura celular; à Leticia Bonfim, por todas as alegrias e tristezas que passamos juntas, sua amizade e parceria no grupo é de valor inestimável; à Luma Ramirez, por toda a compreensão paciência, e sempre tentando "elevar nossos picos", vocês são inesquecíveis! A Ana Cristina, Ana Ligia, Priscila Passos, Fúlvio Corazza, Mayelli, Karina Oliveira, Juliana e Rachel, que tornaram esse grupo simplesmente incrível! Foi um privilégio ter andado com vocês!

Agradeço também a todos os alunos do Centro de Biotecnologia, que me ajudaram em diversas situações, o meu muito obrigado! Também agradeço aos funcionários do CEBIO, como Sandra, Cida e Tania, que tornaram meus cafés da manhã mais divertidos!

Agradeço ao Dr. Paolo Bartolini, por permitir minha entrada nesse projeto de pesquisa, ao Dr. João Ezequiel pela paciência e dedicação em orientar e ensinar, a Dra. Miriam Suzuki pela disposição em ensinar e aconselhar!

A minha instituição de origem FATEC-PG, e aos meus professores do curso de Processos Químicos, sem vocês não teria chego até aqui!

Aos meus amigos que mesmo com dificuldade de entender o que trabalhei durante essa dissertação, sempre me incentivaram a persistir!

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao CNPq, pela concessão de recursos financeiros.

"...O que existe por trás do universo se assemelha mais a uma mente que a qualquer outra coisa conhecida. É algo consciente e dotado de objetivos e preferências..."

C.S Lewis

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FíSICO-QUíMICA DA rhBMP-2

Kleicy Cavalcante Amaral

RESUMO

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são um grupo proteico pertencente à superfamília dos fatores transformadores de crescimento beta (TGF-β). Dentre estas, a BMP-2 humana recombinante (rhBMP-2) tem sido amplamente estudada, devido suas propriedades osteoindutoras. Já existe a comercialização desta proteína produzida por tecnologia de DNA recombinante em células de ovário de hamster chinês (CHO) e para fins de pesquisa, a expressa no citoplasma de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*). A rhBMP-2 na sua forma homodimérica possui alta atividade biológica, induzindo a mineralização óssea em ossos endocondrais e a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e osteoclastos. O objetivo desse trabalho consistiu em obter a rhBMP-2 através da produção em bactérias *E. coli*, altamente purificada através de técnicas cromatográficas e com atividade biológica. As cepas utilizadas para produção foram a W3110 e a BL21(DE), transformadas com plasmídeos contendo o cDNA da hBMP-2 cultivadas em três temperaturas de expressão: 25 °C, 37 °C e 42 °C. Para purificação dessa proteína foram utilizadas duas técnicas cromatográficas: afinidade a heparina e exclusão molecular por cromatografia líquida de alto desempenho (HPSEC). As coletas destas etapas de purificação levaram a separação de oito produtos que foram caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western Blotting (WB). A atividade biológica foi averiguada por produção de fosfatase alcalina em células mioblásticas de camundongo (C2C12). A avaliação dos produtos comerciais também foi feita através dessas técnicas. Os resultados indicaram que dois dos oito produtos purificados, um obtido a partir da produção na cepa BL21(DE) à 25 ºC e outro da produção na cepa W3110 à 42 ºC, apresentaram relevante grau de pureza e atividade biológica.

Palavras chaves: rhBMP-2; *Escherichia coli*; proteína recombinante

EXPRESSION, PURIFICATION AND PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF rhBMP-2

Kleicy Cavalcante Amaral

ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMP) belongs to the Transforming Grown Factor -β superfamily (TGF- β). Among this group, the recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) has been widely investigated, because of its osteoinductive activity. There is already a commercial product based on recombinant DNA technology from Chinese hamster ovary (CHO) cells and also for research use, one expressed in the cytoplasm of *Escherichia coli (E. coli*). The rhBMP-2 in its homodimer form has high biological activity, lead to a bone mineralization in endochondral bones, and differentiate mesenchymal cells into osteoblasts and osteoclasts. The aim of this study consisted in obtaining the rhBMP-2 by producing in *E. coli*, highly purified through chromatographic techniques and with biological activity. The bacteria strains used for production were W3110 and BL21(DE), cultivated in three different expression temperatures 25 °C, 37 °C e 42 °C. Two chromatographic techniques were used for the purification of this protein from periplasmic fluid: heparin affinity and High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC). The fractions collected from these purification steps led to separation of eight products characterized by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting (WB). The biological activity analysis was checked by the induction at alkaline phosphatase production in mouse myoblast C2C12 cells. The analysis of the commercial products was also made with these techniques. The results showed that two among the eight purified products, obtained from BL21 in 25°C one and W3110 42°C one, exhibit high purity and biological activity.

Keywords: rhBMP-2; *Escherichia coli*; recombinant protein

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Tipos de células ósseas (Tormena, 2009).....21

FIGURA 2: Etapas de reparo (Carano & Filvaroff, 2003).....23

FIGURA 3: Relações entre BMPs e os seus receptores (Yanagita, 2009).....26

FIGURA 4: Esquema simplificado em *E. coli* (Miyamoto, 2013).....34

FIGURA 5: Infuse bone grafts kits (McKay, 2007).....37

FIGURA 6: SDS-PAGE (A) e WB (B) de hBMP-2 de *E. coli* (Genscript) e CHO (Infuse).....45

FIGURA 7: Análise em RP-HPLC da hBMP-2 padrão.....46

FIGURA 8: Análise em HPSEC da rhBMP-2.....47

FIGURA 9: Análise em HPSEC da rhBMP-2 produzida em células CHO (Infuse).....48

FIGURA 10: Produção de fosfatase alcalina em células C2C12 incubadas com rhBMP-2.....49

FIGURA 11: Análise mediante MALDI- TOF-MS do padrão Genscript.....50

FIGURA 12: Análise mediante MALDI-TOF-MS do padrão Infuse.....51

FIGURA 13: Comparação meios de cultura a) SDS PAGE e b) WB.....53

FIGURA 14: Purificação da rhBMP-2 por cromatografia de afinidade à heparina (Hitrap Heparin HP).....55

FIGURA 15 SDS-PAGE 15% em condição não reduzida da amostra W3110-λPL-Rep/42°C.....58

FIGURA 16 SDS-PAGE 15% em condição não reduzida da amostra W3110-λPL-Rep/37°C.....59

FIGURA 17 SDS-PAGE 15% em condição não reduzida da amostra BL21-pET/25 °C 60

FIGURA 18 SDS-PAGE 15% em condição não reduzida das amostras coletadas da purificação da rhBMP-2 por cromatografia de afinidade à heparina.....61

FIGURA 19A HPSEC preparativa e analítica da rhBMP-2 coletada da heparina.....63

FIGURA 19 B Análise em HPSEC da rhBMP-2 purificada.....65

FIGURA 20 SDS–PAGE 15% em condição não reduzida das amostras coletadas da segunda purificação de BMP-2 em HPSEC.....67

FIGURA 21 Western Blot das proteínas separadas em SDS-PAGE…….....68
FIGURA 22 Análise em RP-HPLC da rhBMP-2.....69
FIGURA 23 MALDI-TOF-MS do produto purificado obtido pela estratégia BL21-pET/25 °C.....72
FIGURA 24 MALDI-TOF-MS do produto purificado obtido pela estratégia W3110-λP_L/37 °C.....73
FIGURA 25 MALDI-TOF-MS do produto purificado obtido pela estratégia W3110-λPL-Rep/42°C, em posição A.....74
FIGURA 26 MALDI-TOF-MS do produto purificado obtido pela estratégia W3110-λPL-Rep/42°C em posição B.....75
FIGURA 27 Avaliação da atividade biológica em células C2C12.....76
FIGURA 28 Fermentação em biorreator no volume de 5 L.....78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Fatores de crescimento (adaptado Juan, 2008).....…….25

TABELA 2: Condições de cultivo e expressão.....39

TABELA 3 Expressão específica e volumétrica de vários cultivos realizados……...54

TABELA 4 Análise quantitativa da purificação por afinidade à heparina e HPSEC…..71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	Esponja de colágeno absorvível (absorbable collagen sponge)
BMP	Proteína morfogenética óssea *(*bone morphogenetic protein)
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CHO	Ovário de hamster chinês (Chinese Hamster Ovary)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
E. coli	*Escherichia coli*
FDA	Agência de Alimentos e Drogas (Food and Drug Administration)
GH	Hormônio do crescimento (Growth Hormone)
HPSEC	Cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular (High Pressure Size Exclusion Chomatography)
IB	Corpúsculos de inclusão (Inclusion bodies)
IPTG	Isopropil β-d-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de vôo (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of flight)
MM	Massa molecular
mRNA	RNA mensageiro
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	ε-caprolactona
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetra metil etileno diamina (N,N,N´,N´-tetramethylethylenediamine)
TGF β	Fator de transformação de crescimento (Transforming Grown Factors)
rhBMP-2	Proteína morfogenética óssea 2 humana recombinante
RP-HPLC	Cromatografia liquida de alto desempenho (High Performace Liquid Chromatography)
RNA	Ácido ribonucleico
OI	Osteogênese imperfeita
UV	Ultravioleta
WB	Western blotting

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1 OBJETIVOS GERAIS 18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Tecido ósseo 19
2.2 Células ósseas 20
2.3 Cicatrização óssea 23
2.4 O papel da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF-β) na cicatrização da fratura 24
2.5 Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) 25
2.6 Início BMP 29
2.7 rhBMP-2 30
2.8 Produção em *E. coli* 33
2.9 Carreador adequado 35
3. MATERIAIS E MÉTODOS 38
3.1 Cepas de *E.coli* produtoras de hBMP-2 38
3.2 Cultivo das cepas W3110 e BL21(DE) 38
3.3 Padronização da fermentação da cepa de *E. coli* já definitivamente escolhida para produção, em biorreator tipo piloto 39
3.4 Caracterização da rhBMP-2 mediante técnicas físico-químicas, imunológicas e biológicas, para a determinação exata dos rendimentos da expressão 40
3.5 Purificação por afinidade a heparina e HPSEC 41
3.5.1 Heparina 41
3.5.2 *High Pressure Size Exclusion Chromatography* - HPSEC 41
3.6 SDS PAGE e Western blotting 41
3.6.1 SDS PAGE 41
3.6.2 WB 42
3.7 Ensaio biológico com células C2C12 *in vitro* 42
3.8 Análise da massa molecular por MALDI-TOF-MS 43
3.9 Análises dos dados obtidos no ensaio com células C2C12 e na fermentação 43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
4.1 Padrões Genscript e Infuse 44
4.1.1 Análises por SDS-PAGE e Western Blotting (WB) 44

4.1.2. Análises em RP-HPLC e HPSEC 45
4.2 Ensaio biológico “in vitro” em células mioblásticas murina C2C12 48
4.3 Determinação da massa molecular (MM) exata dos padrões de hBMP-2 por MALDI-TOF-MS 50
4.4 Cultivo em erlenmeyer e cálculo dos rendimentos de expressão em hBMP-2 52
4.5 Rendimento da expressão conforme o meio 53
4.8 Análise em HPLC – fase reversa 68
4.9 Análise de rendimentos da purificação em Heparina e HPSEC 70
Fonte: autora da dissertação. 71
4.10 Análise mediante MALDI-TOF-MS dos produtos obtidos e comparação com os padrões Genscript e Infuse 71
4.11. Avaliação da atividade biológica em células C2C12 dos produtos obtidos. 75
4.12. Fermentação em biorreator MBR tipo piloto (20 L) com controle de temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido e adição de glicose mediante sistema “fed-batch” ... 76
4.12.1. Primeira fermentação “teste” simulando antiga fermentação realizada para produção de hGH na mesma cepa. 76
Considerações Finais 78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

1. INTRODUÇÃO

As BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*, Proteínas Morfogenéticas do Osso), compõem uma superfamília dos fatores de transformação de crescimento (*Transforming Growth Factors, TGF*) que são um grupo de proteínas que podem exercer efeito inibitório ou estimulatório sobre diversas populações celulares do organismo (SANTOS et al., 2006), como também no desenvolvimento de diversos órgãos e tecidos e no arcabouço físico básico do corpo dos embriões, ou seja; são capazes de induzir a formação e o crescimento de ossos e cartilagens (VALLEJO et al.; 2002). A BMP-2 foi descoberta e nomeada em 1965 por Urist (KIRK-HEAD, 2000), e com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, foi possível a clonagem do gene e deste modo a síntese da BMP humana recombinante (rhBMP), viabilizando assim a sua produção e purificação (LEE, 2010). São encontradas também em vários grupos do reino animal como em vertebrados, artrópodes e nematóides (BUBNOFF, 2001).

Testes clínicos revelaram que BMPs obtidas por tecnologias de DNA recombinante (transferência de genes a outros organismos), possibilitam sua produção em escala, sendo alternativas efetivas e seguras para enxertos ósseos autólogos (transplante do osso de um local para outro) (VALLEJO et al.; 2002). Atualmente as BMPs têm sido utilizadas em várias especialidades médicas e odontológicas, e suas aplicações incluem osteointegração de implantes metálicos, tendões e ligamentos reunidos com osso, reparo da cartilagem e até mesmo doenças não esqueléticas (Kirker-Head, 2000). Até o momento, aproximadamente 15 diferentes BMPs foram identificadas, com graus variáveis de indução de crescimento ósseo e cartilaginoso (LONG et al, 2006).

Dentre as BMPs, a BMP-2 tem sido amplamente estudada na última década, devido ao seu uso na medicina regenerativa. A BMP-2, consiste em uma glicoproteína homodimérica de 48 kDa, com 228 aminoácidos. Cada monômero contém ~~6~~ 7 cisteínas que formam três pontes de dissulfeto intramoleculares e uma ponte intermolecular (KIRKER-

HEAD, 2000). O peso molecular téorico da forma dimérica da rhBMP-2 é de 25,8 kDa para o dimero, ligado por uma ponte dissulfeto (KIRSCH, 2000).

A rhBMP-7 e rhBMP-2 estão comercialmente disponíveis, mas a rhBMP-2 é a mais investigada (Kuroiwa, 2018) como alternativa para diversas aplicações clínicas, incluindo fusões de vértebras espinhais, fixação interna de fraturas, tratamento de defeitos ósseos, e reconstrução de condições maxilofaciais (Long et al, 2005), sendo atualmente aplicada na área de ortopédicos e por dentistas (LEE, 2010).

A rhBMP-2 é uma molécula que induz poderosamente a regeneração óssea *in vivo*. No entanto, no local de reparação óssea, a rhBMP-2 requer um carreador adequado, sendo usualmente um suporte (*scaffold*) de colágeno bovino tipo I, obtido do tendão flexor profundo (Aquiles), formando um produto denominado comercialmente de esponja de colágeno absorvível (*Absorbable Collagen Sponge - ACS*) (MEDTRONIC, 2011). Em 2011, SILVA desenvolveu e caracterizou, dispositivos implantáveis biocompatíveis no polímero poli(e-caprolactona) PCL. O processo resultou em matrizes puras de PCL, com biofuncionalidade adequada à aplicação como biomaterial, na engenharia de tecido ósseo. É uma alternativa para o ACS, sendo um produto nacional que está sob patente (BR 10 2014 017703 5).

A expressão recombinante se justifica, pois as BMPs endógenas são difíceis de se extrair em quantidades suficientes para uso clínico que são normalmente encontradas no corpo humano a uma concentração inferior a 2 mg/kg em osso cortical e, portanto, de ação altamente restrita aos locais de expressão (CAVALCA, 2011).

Em 1987, a purificação da BMP-2 humana foi realizada por Reddi e colaboradores (Sampath et al, 1987), sendo sua primeira síntese em células de ovário de hamster chinês (CHO) realizada pelo Genetics Institute (Cambridge, MA, USA) (WOZNEY et al, 1988; ISRAEL et al, 1992). A expressão da rhBMP-2 é comumente feita em células de mamíferos (como as CHO) (LEE, 2010). Porém, há algumas desvantagens nesse tipo de expressão: baixos rendimentos (abaixo de 1 ng/mL) (VALLEJO et al., 2002), 0,2 mg de rhBMP-2 aproximadamente por grama de célula (LONG et al., 2006) e o custo alto dessa produção, por ser um sistema eucarioto (LEE et al., 2010). Problemas similares ocorrem durante a produção de rhBMP-2 em células infectadas por vírus (ISHIDA et al., 1994). Uma alternativa é a produção *in vitro* de formas biologicamente ativas de rhBMP-2 em corpos de inclusão, produzidos pela *Escherichia coli* (VALLEJO et al., 2001). A técnica permite que

a proteína, mesmo não glicosilada pelo hospedeiro (*E. coli*), tenha o mesmo nível de bioatividade que um sistema eucarioto (QUASS, 2018). Através de purificação e o *refolding* das proteínas expressas, a maioria dos estudos demonstram uma bioatividade da rhBMP-2 inferior nesse sistema, mas que pode ser compensada por uma produção em larga escala e baixo custo (Lee et al, 2010).

A empresa Medtronic (Minneapolis, MN, USA) é a que mais estudou e que está comercializando este a rhBMP-2 obtida em células CHO–sob o nome de Infuse®, que representa um faturamento anual de US$700 milhões. A empresa Cellumed Co. (Seul, Coreia) também comercializa rhBMP-2 recombinante obtida em células CHO. Outras empresas comercializam rhBMP-2, porém derivada de *E. coli*, Daewoong Pharmaceutical - Seul, Coreia do Sul e Osteopharma Inc. - Osaka, Japão. Além destas, existem empresas que fornecem rhBMP-2 para pesquisa e uso *in vitro*, entre as quais a GenScript, Affymetrix, Sigma-Aldrich, US-Biological e R&D Systems, essas comercializam por um preço entre 1200-1600 US$/mg.

Diante de todas essas pesquisas, a rhBMP-2 é uma possível alternativa a doenças como a osteogênese imperfeita (OI), que até o momento não possui cura e há poucas opções de tratamentos paliativos. Além disso, torna-se importante o vislumbre de alternativas que, ao reduzirem a quantidade de BMP empregada no tratamento (por associação a arcabouços bioabsorvíveis), também reduzam o custo total do tratamento, que é atualmente restritivo.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo principal do presente trabalho é a obtenção da proteína morfogenética óssea tipo 2 humana em sua forma recombinante (rhBMP-2), biologicamente ativa e com alto grau de pureza. A rhBMP-2 é um produto de altíssimo valor agregado, disponibilizado comercialmente somente por poucas empresas e cujos preços variam em patamares muito altos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Expressão da rhBMP-2 em sistema bacteriano (*E. coli*).

2. Purificação do produto recombinante mediante cromatografia por afinidade à heparina, introduzindo outras etapas cromatográficas até obtenção de pureza compatível com testes biológicos *in vitro.*

3. Avaliação do produto purificado por eletroforese em gel de poliacrilamida e reconhecimento por anticorpo (SDS-PAGE e Western blotting).

4. Teste *in vitro* com mioblastos murinos C2C12 para verificar produção de fosfatase alcalina na presença de rhBMP-2.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecido ósseo

Para entender como funciona a aplicação da BMP-2 na cicatrização de faturas é preciso entender o básico de como funciona a matriz óssea.

A matriz óssea pertence ao tecido conjuntivo (responsável pela união de tecidos para conexão, sustentação e preenchimento), o tecido conjuntivo no geral atua na coagulação sanguínea, cicatrização e transporte de gases, nutrientes e catabólitos, armazena gordura para as funções metabólicas, e íons (MONTANARI, 2016). O tecido ósseo está relacionado a sustentação e proteção dos órgãos vitais, é onde se localiza a medula óssea. Os ossos também em junção com o músculo, possibilitam a movimentação do corpo, que está sobre o controle de fatores sistêmicos, como os hormônios, e ações locais como os fatores de crescimento e citocinas; devido a isso o sistema imune se encontra relacionado ao esquelético (ANDIA, 2006).

Podemos dividir a constituição da matriz óssea em duas partes, orgânicos (35% - relacionada a flexibilidade do osso) e inorgânicos (65% representa a rigidez e resistência do osso) (MONTANARI, 2016), a matriz óssea está diretamente relacionada a homeostase dos níveis sanguíneos. A parte orgânica se refere às células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), fibras colágenas (colágeno tipo 1), proteoglicanos e glicoproteínas de adesão (osteonectina, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea); e também glicosaminoglicanos (ácido hialurônico). A parte inorgânica se refere aos íons (fosfato, cálcio, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato) importantes em geral para as funções metabólicas.

Dentre os íons da parte orgânica, o principal é o fosfato de cálcio que corresponde por cerca de dois terços do peso ósseo. Em interação com o hidróxido de cálcio, forma o constituinte natural do osso (os cristais de hidroxiapatita) onde ocorre o depósito de 99% do cálcio corporal e 80% do fósforo total (MONTANARI, 2016), esses cristais possuem uma capa de hidratação ao seu redor, em que os íons hidratados se aderem, como o: carbonato de

cálcio, sódio, magnésio e fluoreto, responsáveis pela dureza e rigidez (CONSTANTINESCU, 2002). O Ca^{2+} é muito importante não apenas nas formações dos cristais, mas também para vários processos biológicos, como permeabilidade da membrana, adesão celular, coagulação sanguínea, transmissão do impulso nervoso e contração muscular. (MONTANARI, 2016).

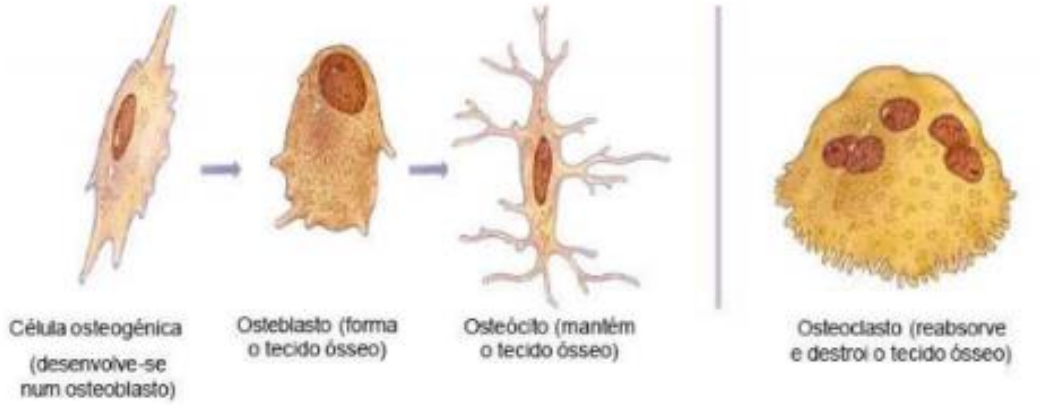
A medula está localizada na parte mais periférica dos ossos, denominada cortical, esponjoso ou trabecular, em uma rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes. O revestimento da superfície óssea interna e externa são através do endósteo e o periósteo. O periósteo constitui membrana de grande importância para a integridade dos ossos (ANDIA, 2006).

O crescimento ósseo inicia no desenvolvimento embrionário e persiste em adultos na regeneração e remodelação óssea em um nível histológico, a formação de osso durante o reparo do trauma formado ocorre em resposta aos ferimentos. Células mesenquimais que em torno do tecido invadem o local do ferimento, onde elas se proliferam, condensam e se diferenciam em cartilagem ou osso. Em resposta a lesão, atuam os fatores de transformação de crescimento, associados com o desenvolvimento esquelético fetal e com a formação e indução da formação ectópica do osso, incluem-se os membros da BMP, outros fatores de crescimento também, como fibroblastos, plaquetas derivadas dos fatores de crescimento e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) ou chamada de somatomedina C (papel importante no desenvolvimento da musculatura), age em resposta ao hormônio de crescimento (GH) entre outras funções principais, como aumento da glicose no sangue e diminuição da gordura corporal (LEE et al., 2001).

2.2 Células ósseas

As células do tecido ósseo constituem-se por: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e os osteoclastos (Figura 2). As células osteoprogenitoras, os osteoblastos e os osteócitos são variações do mesmo tipo celular.

Figura 1 – Tipos de células ósseas



Fonte: TORMENA, 2009

As células osteoprogenitoras são derivadas das células mesenquimais e dão origem aos osteoblastos. Elas se situam na superfície da matriz óssea. As células mesenquimais diferenciam-se em células osteoprogenitoras expressando o fator de ligação central ∞-1 (Cbfa1). Esse fator de transcrição promove a expressão de genes característicos do fenótipo do osteoblasto. As células osteoprogenitoras sofrem divisão mitótica e, sob a influência da família de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e do fator de crescimento de transformação-β (TGF-β), diferenciam-se em osteoblastos, mas, em situações de pouca oxigenação, podem originar condroblastos (MONTANARI, 2016).

Osteoblastos são células secretoras de matriz óssea extracelular, sintetizam o osteoide, que consiste em fibras colágenas (como colágeno tipo I), e proteínas não colágenas, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas, que produzem substâncias que constituem o osso não mineralizado (estes componentes interagem entre si e organizam-se, fornecendo um arcabouço que permite a deposição de sais minerais, atuando na mineralização do osso) (ANDIA, 2006).

Os osteoblastos realizam a exocitose (liberação para o meio extracelular) de vesículas ricas nos íons cálcio e fosfato (MONTANARI, 2016), essas vesículas desprendem-se dos osteoblastos para a matriz óssea, contêm glicoproteínas e fosfatos obtidos através da fosfatase alcalina (família de enzimas que hidrolisam os íons fosfatos) (ANDIA 2006). As vesículas da matriz também apresentam bombas de Ca^{2+}, concentrando esse íon. Os cristais de hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)6(OH)_2$ formados rompem a membrana e são depositados entre as fibrilas colágenas, atuando como ninhos de cristalização e promovendo a calcificação da

matriz ao redor (MONTANARI, 2016); esse processo é característico dos locais onde está ocorrendo pela primeira vez a formação e mineralização do tecido ósseo. As vesículas da matriz também são liberadas pelos condrócitos (ANDIA, 2006). Os osteoclastos remodelam o osso conforme as tensões mecânicas locais. As células osteoprogenitoras e os osteoblastos dispostos na superfície da matriz óssea compõem o *endósteo*, importante para a manutenção e o reparo do tecido.

Os osteócitos são células ósseas maduras (advindas dos osteoblastos maduros, aqueles que permanecem aprisionados na matriz) (MONTANARI, 2016) de maior população, com formato de aranha, são encontradas em pequenas cavidades das junções lamelares chamadas de lacunas. Somente um osteócito é encontrado por lacuna e essas células não podem se dividir. Numerosos processos alongam-se de cada osteócito para dentro dos canalículos, passando rapidamente pela matriz de mineralização e se conectando a uma lacuna adjacente. Então, há uma rede de comunicação entre o canalículo e a lacuna, fazendo com que o processo ocorra em todo o osso mineralizado. O canalículo é importante porque é dele que provém a rota pela qual o processo de um osteócito pode se contactar aos outros adjacentes. Portanto, todos os osteócitos são capazes de se comunicar entre si, carregando informações e nutrientes. Os osteócitos podem sintetizar ou absorver a matriz óssea e, caso sejam destruídos, a reabsorção da matriz óssea ocorre devido à atividade do osteoclasto, que é sucedida pela reparação ou remodelação através da atividade osteoblástica (ANDIA, 2006).

Os osteoclastos são células multinucleadas grandes, envolvidas na reabsorção do osso e, portanto, estão presentes em áreas onde o osso está sendo removido. Estão localizadas na camada celular do periósteo, no endósteo e na linha vascular de passagem da matriz medular. São dessas células que se originam os osteoblastos e, portanto, são importantes para a reparação das fraturas (ANDIA et al., 2006; AKERS e DENBOW, 2008).

É importante que a atividade entre osteoblastos, células de formação óssea, osteoclastos, e células de reabsorção óssea, esteja equilibrada. Se há alguma disfunção e esta relação inclinar-se mais aos osteoclastos irá ocorrer reabsorções patológicas, como nas periodontites, artrites reumatóides e doenças osteoporóticas 2. O equilíbrio garante a homeostase do sistema esquelético, quem regula esse sistema é o sistema imune (ANDIA, 2006).

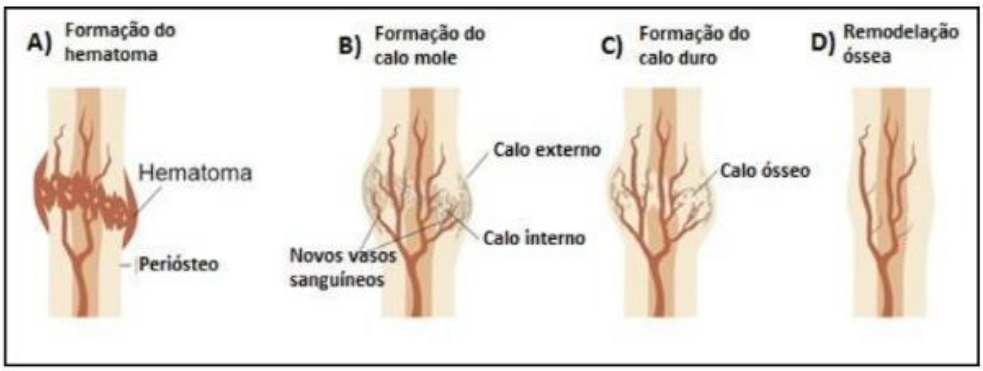
2.3 Cicatrização óssea

É possível dividir as formas de reparação em um tecido, envolvendo a reparação em que o tecido é lesionado, sobre uma restauração sem aumentar o volume ósseo; o segundo é a regeneração, neste caso ocorre a diferenciação celular de novas células, e um novo tecido ósseo, consequentemente aumento no seu volume. E o terceiro, envolvendo procedimentos cirúrgicos diversos. (AL-AQL et al., 2008).

Após a lesão do tecido (o trauma), o primeiro evento que ocorre é a formação do hematoma, que nada mais é, do que as células do sangue (seja periférico ou da medula óssea). Consequentemente ocorre uma resposta inflamatória, que leva a coagulação do hematoma entorno das extremidades do local fraturado. Ocorre o recrutamento de células-tronco mesenquimais e a diferenciação em condrócitos que produzem cartilagens e osteoblastos, que formam o osso como já mencionado. A resposta inflamatória aguda atinge seu pico nas primeiras 24 horas e se completa após sete dias, embora as moléculas pró-inflamatórias mais tarde continuem desempenhando um papel importante no final da regeneração (CHO et al., 2002).

Após os primeiros dias é produzida uma matriz cartilaginosa, que mineraliza, e ocorre uma transição para osso, com iniciativa da reabsorção da cartilagem mineralizada. A formação do osso primário é seguida por remodelação, em que o calo ósseo (Figura 3) inicial é modificado por formação e reabsorção óssea secundária para restaurar a estrutura anatômica que suporta cargas mecânicas (GERSTENFELD et al., 2003).

Figura 2 – Etapas de reparo



Fonte: CARANO et al, 2003

2.4 O papel da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF-β) na cicatrização da fratura

A superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF-β) consiste em um grande número de diferentes fatores de crescimento e diferenciação que incluem as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), fator de crescimento transformador beta (TGF-β), fator de crescimento e diferenciação (GDFs), ativinas, inibinas e a substância inibidora Mulleriana (CHO et al., 2002).

Os fatores de crescimento com potenciais aplicações clínicas (utilizados em formação e reparo ósseo, e outros tecidos conectivos), são agrupados quanto as suas atividades biológicas, incluindo as proteínas da superfamília "transforming growth factor-β(TGF-β)", os fatores de crescimento semelhantes à insulina ("insulin-like growth factors", IGFs), fator de crescimento derivado de plaquetas ("platelet-derived growth factor", PDGF), fatores de crescimento fibroblásticos ("fibroblast growth factors", FGFs) e o fator de crescimento epidermal ("epidermal growth factor", EGF) (Long, 2001; Lieberman, Daluiski et al., 2002). A origem e as principais funções destas proteínas estão detalhadas nos membros específicos desta família, como as BMPs (2-8), GDF (1, 5, 8 e 10) e TGF-β1-3 promovem vários estágios de ossificação endocondral e intramembranosa durante a cicatrização da fratura (CHO et al., 2002).

Após uma lesão, estimulados pelo fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), produzido pelos macrófagos, os fibroblastos se proliferam, e secretam a matriz extracelular contribuindo para a cicatrização. Sob a influência do fator de crescimento de transformação-β1 (TGF-β1), os fibroblastos diferenciam-se nos miofibroblastos, expressando ∞-actina do músculo liso (∞-SMA). Assim, além da síntese de colágeno, por possuírem filamentos de actina associados à miosina, são capazes de se contrair, retraindo o tecido cicatricial (MONTONARI, 2016).

Todas as três isoformas (TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3) deste grupo de proteínas estão envolvidas no reparo da fratura. Elas são produzidas por degranulação plaquetária após a lesão inicial, o que sugere o seu envolvimento com o início da formação de calos (BOLANDER, 1992; BOSTROM, 1998). Certas proteínas também são produzidas pelos osteoblastos e condrócitos em fases posteriores, o que aumenta a proliferação destas células, bem como a de células mesenquimais e pré-osteoblastos (LIEBERMAN et al., 2002).

Acredita-se que o TGF-β exerça uma papel importante na condrogênese e formação endocondral (BARNES et al, 1999). Ele também induz a expressão de proteínas da matriz extracelular (SANDBERG et al., 1993). O TGF-β2 e TGF-β3 desempenham um papel importante durante o processo de cicatrização da fratura, uma vez que o pico de expressão ocorre durante a fase crítica da condrogênese (CHO et al., 2002). A Tabela 1 mostra de forma simplificada as ações dos membros pertencentes aos fatores de crescimento.

Tabela 1 – Fatores de crescimento

Fator	**Origem**	**Função principal**
TGFβ	Matriz extracelular de cartilagem e osso; plaquetas	Inicia diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais. Produz proliferação de condro e osteoblastos; regula síntese de colágeno e proteoglicanas.
BMPs	Matriz extracelular de osso; osteoblastos; osteoprogenitores.	Inicia formação óssea pela diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais em condro e osteoblastos; inicia diferenciação de osteoprogenitores em osteoblastos; influencia diversos aspectos durante "*patterning*" no esqueleto e desenvolvimento.
IGFs	Condrócitos, osteoblastos, matriz extracelular óssea.	Induzem proliferação e diferenciação de osteoprogenitores.
PDGF	Plaquetas, células endoteliais, monócitos.	Estimula a proliferação de osteoblastos e condrócitos: atua como mitógeno em osteoblastos e células mesenquimais; é um fator quimiotático para macrófagos.
FGFs	Osteoblastos, condrócitos, macrófagos, células mesenquimais.	Estimulam crescimento de osteoblastos, condrócitos e células mesenquimais; estimulam diferenciação de células pluripotentes; participam em angiogênese.
EGF	Células epiteliais fibroblastos.	Induz o desenvolvimento de células endoteliais; estimula angiogênese.

Fonte: adaptado do VALENZUELA, 2008.

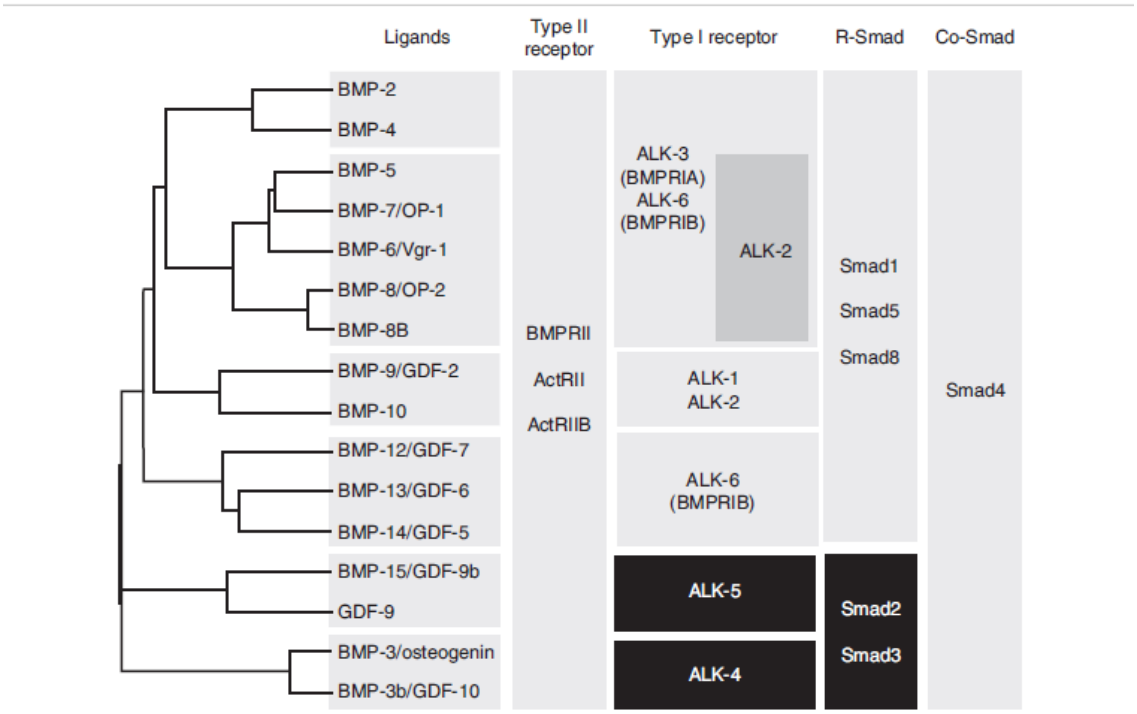
2.5 Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs)

As BMPS são moléculas diméricas com duas cadeias polipeptídicas, que com a associação de dois monômeros formam uma ponte dissulfeto (REIDI, 2001; ANJA, 2009). Cada BMP madura e ativa tem uma ponte de dissulfeto homodimérica dos mesmos membros ou uma ponte de dissulfeto heterodimérica de dois diferentes membros (SAKOU, 1998). Cada cadeia monomérica é biosintetizada como uma cadeia polipeptídica com mais de 400 amino ácidos como precursor, incluindo a pro região e a BMP madura (REIDI et al, 2001).

Proteases estão envolvidas nas pro-BMPs (REIDI, 2001), onde nas regiões do carboxi terminais produzem proteínas maduras de aproximadamente de 120 a 140 amino ácidos com *7* resíduos de cisteinas (SAKOU, 1998). O ligamento das sequencias de amino ácidos das BMPs indica uma identidade entre elas na região do *carboxy terminal* da proteína, assim como outros membros da superfamília dos TGF-β (SAKOU, 1998).

As BMPs maduras iniciam a sinalização de transdução pela ligação heterodimérica complexa de duas transmembranas de serina-treonina receptores kinase (YANAGITA, 2009), o BMP receptor (BMPR) tipo I e tipo II. A ativação dos receptores kinases, desencadeiam a fosforilação dos fatores de transcrição Smad 1, 5 e 8 (Figura 4). As Smads fosforiladas formam o heterodímero complexo com Smad 4 no núcleo e ativa o alvo da expressão dos genes com outros ativadores (CHENG, 2003).

Figura 3 – Relações entre BMPs e os seus receptores



Fonte: YANAGITA, 2009.

A BMP-1, não é de fato pertencente à família das BMPs (Reidi, 2001) porque não induz a formação óssea (CHENG, 2003), é conhecida como metaloproteinase e está envolvida no controle de desenvolvimento da matriz extracelular e na ativação dos fatores de crescimento (DELOLME, 2015), atua como uma enzima proteolítica no pró-colágeno

(CHO, 2002), que desenvolve o seu papel na modulação das ações da BMP pela proteólise de alguns antagonistas das BMPs e dos TGF, tais como *noggin, chordin, e gremlin.* (REIDI et al, 2001).

Ao longo do reparo da fratura, as BMPs se ligam a superfície celular (células mesenquimais). Sinais são ativados e enviados aos núcleos dessas células, que expressam genes provocando a síntese de macromoléculas que envolvem a formação de cartilagem e osso, as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos ou osteoblastos (REIDI et al, 2001).

O reparo ósseo envolve três fatores: resposta inflamatória, condrogênica e a fase osteogênica. Em teste com murinos, foi observado que durante todo o processo de fechamento da fratura (aproximadamente 21 dias), ocorreu a osteogênese, exemplificado por altos níveis de colágeno tipo I, que iniciou 24 h após a lesão. No entanto, a máxima diferenciação osteogênica ocorreu entre os dias 14 e 21. A BMP-2 foi a primeira a induzir a osteogênese, as BMP-4, BMP-7, BMP-8 e BMP-3 expressaram apenas no período entre os dias 14 e 21, quando a reabsorção da cartilagem calcificada e o recrutamento osteoblástico são ativados, e ocorre a formação óssea (CHO et al., 2002), em outros estudos revelou que o mensageiro RNA (mRNA) da expressão da BMP-4 está relacionado aos estágios iniciais de cura da fratura, a ossificação endocondral e a membranosa (YOSHIMURA, 2001). BMP-5 e BMP -6 e outros membros da superfamília do TGF-β são expressos de 3 a 21 dias durante a fratura em camundongos, sugerindo que eles têm um efeito regulador em ambas as ossificações intramembranosa e endocondral (CHO et al., 2002).

É possível que algumas moléculas das BMPs atuem prevenindo os excessos de calo gerado no local da fratura através dos seus antagonistas (YOSHIMURA, 2001), sendo moduladas não somente através do gene expressão e o processamento da proteína, mas também pela interação com os seus antagonistas como Noggin e Chordin (BRUNET, 1998). Os antagonistas das BMPs tem um papel importante no desenvolvimento embrionário. Testes *in vitro* revelaram que o antagonista noggin pode ser um importante regulador na formação dos calos durante o reparo da fratura (YOSHIMURA et al., 2001).

O noggin é expresso na cartilagem condensada e em condrócitos imaturos, como são expressas as muitas BMPs, ele inicia após a condrogenese ter iniciado (BRUNET, 1998). Em um estudo com camundongos descobriu-se que a ausência do noggin, fez com que o potencial de indução óssea da BMP ocorresse de forma livre, isso revelou que o nogin-BMP tem um importante papel na condrogenese, em controlar o excesso de osso e a formação de

cartilagem formada durante o desenvolvimento, ele atua bloqueando a BMP-2, BMP-4 e BMP-7 (YOSHIMURA et al, 2001), a aplicação excessiva por exemplo de BMP-2 no desenvolvimento embrionário de *pintos* antes da condensação das células mesenquimais e o início da condrogenese, induziu apoptose, e consequentemente a perda de elementos no esqueleto no desenvolvimento (BRUNET, 1998). O equilíbrio entre noggin e BMP-4, por exemplo, é importante durante a formação de calos e a cicatrização da fratura. Alguns resultados indicam que a BMP-2, 4 e 6 e o fator de crescimento β 1 (TGF- β1) induzem a expressão de noggin em células osteoblásticas (YOSHIMURA et al., 2001).

Outro antagonista de alta relevância é o Chordin, foi o primeiro antagonista identificado da BMP. É secretado em um grande homodímero de 120 kDa, que contém 4 cisteínas ricas (cysteine-rich – CR) ligadas a BMP. O ligamento do Chordin a BMP-2, BMP-4 e BMP-7. Sua regulação acontece através da metaloprotease BMP-1, o Chordin-BMP é clivado pela BMP-1, e a inativação da sua atividade libera BMP (YANAGITA, 2009).

O tempo de fechamento da fratura e a formação do novo osso podem variar conforme o local da lesão e o tipo de lesão. Outro estudo com murinos, demonstrou que em 11 dias foi possível ver o novo osso formado. A ativação iniciou com o ligamento da fibronectina (família de glicoproteínas) a receptores da matriz desmineralizada, facilitando a adesão de células mesenquimais e a proliferação no primeiro dia; no quinto dia ocorreu a diferenciação em condroblastos; no sétimo e oitavo dia ocorreu a máxima condrogenesis, no nono dia foi possível observar a hipertrofia de cartilagem com mineralização da matriz da cartilagem. No décimo e décimo primeiro dia, ocorreu a angiogênese e invasão vascular, que é um pré-requisito para a diferenciação de osteoblastos. Então o recém osso endocronal foi remodelado no local da hematopoese (REIDI et al, 2001).

As BMP-2, BMP-6 e BMP-9 induzem a diferenciação de células mesenquimais para osteoblastos de forma mais eficiente, e também a indução da fosfatase alcalina, sendo a BMP-2 e BMP-6 as mais potentes nesse aspecto, enquanto as BMPs restantes promovem a maturação dos osteoblastos comprometidos (CHENG et al., 2003).

A ação das BMPs nas células estimuladas funcionam independentemente ou em colaboração umas com as outras, não é bem definido ainda as funções individuais ou em grupo das BMPs por completo (CHENG, 2003), mesmo que revelem diferentes níveis de expressão nos estágios da consolidação da fratura ou na embriogênese, assim como outros membros da superfamília TGF-β (REIDI et al, 2001). As BMP-2, BMP-4 e BMP-7 tem demonstrado que individualmente estimulam a expressão fenótipa condrogênica e a

osteoblástica, em células precursoras mesenquimais, nas diferentes linhagens celulares (EDGAR, 2007). É possível dizer que a ação das BMPs envolve cinco fatores básicos: proliferação e diferenciação de células mesenquimais, quimiotaxia, angiogênese e síntese da matriz extracelular. Essa sequência pode estar associada tanto ao desenvolvimento embrionário como a reparo de fraturas em adultos (REIDI et al, 2001).

2.6 Início BMP

Em 1889, Seen em um estudo sobre osteomielite, observou a indução óssea em reparos de fraturas, utilizando resíduo descalcificado com iodofórmio, a descalcificação do osso era uma forma de carreador para o iodofórmio. O seu primeiro objetivo era usar o iodofórmio como antisséptico para tratar a osteomielite. Assim, descobriu que não somente a infecção havia sido controlada, mas um novo osso havia sido formado. Em 1930, Lavander notou que um extrato alcoólico de osso cru em tecido muscular, induzia uma nova formação óssea. Em 1961 Sharrard e Collins, usaram um extrato de osso descalcificado em etilenodiaminotetracético (RENGACHARY, 2002).

Em 1965, Urist implantou em locais intramusculares de roedores e coelhos, extratos de ossos desmineralizados. As células mesenquimais migraram para o local de implantação por quimiotaxia, desenvolvendo-se em condroblastos, osteoblastos e osteoclastos, logo foi possível observar a formação de um esqueleto cartilaginoso, e a vascularização na matriz extracelular por células hematopoiéticas e endoteliais; a cartilagem então foi reabsorvida e substituída pelo osso novo. Em 21 dias ocorreu a formação de um ossículo de osso (KIRKER, 2000). Urist constatou que esse grupo de proteínas podia induzir a formação do osso em sítios ectópicos quando implantados em ratos, ele nomeou esse grupo de proteínas de proteína morfogenética óssea ou proteína osteogênica (URIST, 1965). Por não ser possível um ensaio reprodutível na época, não foi confirmado que esse grupo de proteínas havia realmente sido responsável pela indução óssea em locais ectópicos (RENGACHARY, 2002).

Em 1983, Reddi e Sampath, desenvolveram um ensaio reprodutível de formação óssea ectópica, baseado na atividade da fosfatase alcalina e a quantidade de cálcio obtido no novo osso formado. O grupo também conseguiu comprovar, experimentalmente, que não era a matriz óssea responsável pela indução de formação ectópica, mas sim a proteína dentro dela. Em 1988, Johnson e seu grupo de pesquisa estudaram a proteína purificada humana

BMP. Foi uma intensa competição entre dois grupos para descobrir o sequenciamento de genes da BMP, o *Creative BioMolecule* e o *Genetics Institute*, sendo que simultaneamente descobriram a sequência de várias BMPs, que resultou em uma patente disputada. Com a tecnologia do DNA recombinante foi possível sua reprodução em larga escala.

Em 1998, Wang et al, relatou o isolamento de osso bovino de três polipeptídios de 16, 18 e 30 kDa. Esses foram sequencialmente nomeados BMPs 1, 2 e 3. Wozney et al, usou esses três polipeptídios para ajudar a identificar correspondente RNAs humanas e, consequentemente, os cDNAs. Para melhorar a expressão, a codificação de genes humanos foram transferidos para células de ovários de hamster chinês (CHO) e por fim para a *Escherichia coli* com a intenção de produzir grandes quantidades de BMPs. Estudos adicionais revelaram outras BMPs, reorganizando o grupo atual em rhBMPs de 1 a 15 (KIRKER, 2000).

Em 2002, a Agência de Drogas e Alimentos (FDA) dos Estados Unidos, aprovou o uso da rhBMP-7 para tratamento em defeitos de osso longos, e a rhBMP-2 sobre o nome comercial de INFUSE® (Medtronic Spinal and Biologics, Memphis, TN) para aplicações em fusões lombares, ambos aplicados com um carreador adequado de esponja de colágeno bovino tipo I absorvível (ACS) também conhecido como INFUSE Bone Graft. Em 2004, após um estudo com 279 pacientes comprovando o uso da rhBMP-2 no reparo de fraturas, passou a ser usado para tratar fraturas abertas da tíbia (GLASSMAN, 2007), e em 2007, o FDA, aprovou o INFUSE® para procedimentos de enxertos ósseos em aplicações buco maxilo faciais (MCKAY, 2007). A rhBMP-2 produzida é livre do risco de infecções e reações alérgicas (RENGACHARY, 2002). Depois de três aprovações do FDA, a rhBMP-2 se tornou a BMP mais estudada (MCKAY, 2007).

2.7 rhBMP-2

O peso molecular téorico da forma dimérica da rhBMP-2 é de 25,8 kDa para o dímero ligado por dissulfureto (QUAAS,2018). A capacidade da rhBMP-2 para induzir formação óssea tem sido explorada por aplicações terapêuticas. O sinal de transdução envolve o dímero da rhBMP-2 em associação com o tipo I e o tipo II de receptor. Dois modos de ligação têm sido reportados para a BMP-2, que indica diferentes caminhos de sinais. Para o modo sequencial de ligação, duas moléculas receptoras tipo I são ligadas ao dímero. Sequencialmente, duas moléculas receptores tipo II são recrutadas pelo receptor complexo

de ligação tipo I. Essa associação inicia o caminho da p38-MAPK, que leva a indução da fosfatase alcalina. O segundo modo de ligação é caracterizado pela ligação do receptor complexo pré-formado *(PFC – pre formed receptor)*, que consiste em dois tipos de receptor I e II. Pelo vínculo com as ligações de PFCs, o sinal do Smad é ativado e a BMP-2 traduzida (ANJA, 2009). As BMPs, especialmente a BMP-2, sintetizam a fosfatase alcalina, promovendo a calcificação da cartilagem (MONTINARI, 2016).

A ligação direta entre os receptores complexos TGF-β e a ativação da p38 já foi confirmada. Alguns estudos se restringem, na compreensão da ligação de ativação da p38 com as BMP-s. O que se tem por entendimento até o momento é o fato das células não responderem à BMP se não houver p38 ativada. E que a BMP ativa as MAPK como a p38 e esta ativa a estabilização de filamentos de actina, o que leva a proliferação e a migração. Esse sinal da BMP-2 é requerido para as células pluripotentes que geram estruturas craniofaciais e do sistema nervoso entérico. Além do mais, um número de estudos indica que a BMP guia o crescimento dos axônios e dentritos durante o desenvolvimento neuronal. Em testes *in vitro*, a BMP-2 induziu a migração de células progenitoras mesenquimais da medula, osteoblastos e células endoteliais (GAMELL, 2010).

Tratamento de células C2C12 com BMP-2 aumentaram os níveis ativos endógenos da p38 depois de 20 min da adição. A incubação de células de BMP-2 junto com noggin (que sequestra bmp-2 de seus receptores), não induziu a ativação da p38, as células C2C12 foram tratadas com BMP-2 e noggin por 30 min, em um tempo médio de 45 min. Esses dados sugerem que a p38 necessita da BMP-2 para sinalizar os receptores complexos. Para confirmar o papel da p38 na migração das células C2C12 em resposta a BMP-2, um estudo avaliou a cicatrização em monocamadas de células raspadas e expostas a BMP-2 e o inibidor da p38 (SB203580). Sem a p38, somente na presença da BMP-2 e do inibidor da p38, a ferida se manteve; onde o inibidor da p38 (SB203580) foi abolido, houve um efeito positivo da BMP-2 na cicatrização. E uma reorganização no filamento das actinas, envolvendo diretamente a migração celular. O pré-tramento com o inibidor da p38 aboliu completamente a indução da BMP-2 na reorganização da actina, sugerindo que um sinal intacto da p38 é essencial para a indução da BMP-2 em um sistema de filamentos de actina (GAMELL, 2010).

Outros estudos demonstraram que a falta de expressão da BMP-2, não determina os padrões esqueléticos formados na condrogênese que ocorre antes do nascimento, ou seja,

não é necessária para a formação embriológica dos ossos. Em testes com murinos recém-nascidos a deficiência na expressão da BMP-2 não alterou a formação esquelética, o que sugere que as outras BMPs compensam a deficiência. No entanto, com uma semana de idade, observou-se um atraso significativo na ossificação secundária em cada um dos ossos endocondrais dos membros. Foi observado também um decaimento na produção de colágeno rico tipo II na matriz extracelular na superfície da articulação da cartilagem dentro do menisco. Esses resultados sugerem que após o nascimento, com a ausência de BMP-2 desencadeia uma deficiência funcional, e como consequência, animais pequenos e relativamente inativos. Quando esses animais crescem e ganham peso, eles têm problemas sérios na manutenção das suas funções ósseas devido à ausência de BMP-2. Com 23 semanas, todos os camundongos tiveram fraturas em locais em que havia falta de densidade mineral óssea, demonstrando uma resposta dose-dependente das quantidades de BMP-2 com a densidade mineral óssea, ou seja, contribui geneticamente com a manutenção da massa óssea normal.

Em fraturas realizadas no fêmur sem a expressão da BMP-2, o processo de reparo envolvendo a condogenese não iniciou, embora células progenitoras mesenquimais fossem capazes de reparar o processo no local, revelando a potencialidade osteogênica das outras moléculas BMPs, como a BMP-4 e a BMP-7 que não mudaram os seus níveis de expressão sem e com a BMP-2. Mas, comprovou que com a falta de BMP-2 ocorre baixa regulação dessas BMPs, criando um ambiente de redução dos sinais de BMP nos estágios iniciais de reparo. Quando os níveis de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 estão elevados, essas expressam mais delas mesmas, para que haja a diferenciação das células mesenquimais em osso e cartilagem (situação que ocorre em uma fratura normal óssea), níveis máximos da expressão de mRNA de BMP-2 dentro de 24 horas após a lesão, sugerindo que este desempenha seu papel no início do reparo. No entanto, com a falta de BMP-2, a sustentação dessa produção de BMP-4 e BMP-7 não acontece, e devido a isso poucas células se diferenciam em osteoblastos e condrócitos, as células mesenquimais aumentam no local da fratura os níveis de receptores BMP, suprindo a ausência dos sinais das BMPs, outros membros da família BMP compensam essa falta durante a condrogenese e a remodelação do osso, que pode conduzir a uma falha no processo de reparo. Esses dados identificam que a BMP-2 é uma molécula de capacidade regenerativa do osso e está relacionada ao início de reparo ósseo (TSUJI, 2006), mostram também que a BMP-2 controla a expressão de vários outras BMPs e quando

sua atividade é bloqueada, os estromas de células troncos da medula não conseguem se diferenciar em osteoblastos (EDGAR et al., 2007).

No processo, ocorre também o aumento da interleucina-1b (IL-1b) e o ativador receptante NFkappaB ligante (RANKL), mediadores da resposta inflamatória e osteoclástica que ocorre no início do reparo (Tsuji, 2006)

Há uma série de estudos recentes que buscam verificar a bioatividade da rhBMP-2 obtida de *E. coli* em comparação a rhBMP-2 expressa em CHO (KUROWAI, 2018).

Em algumas análises laboratoriais, foi possível comprovar que o fechamento total de uma lesão óssea pode ocorrer entre 2 a 8 semanas, com aplicações variáveis da rhBMP-2 expressa por *E. coli*, aplicada nos locais da lesão com ACS, nas quantidades de 2,5 µg, 5 µg e 10 µg. Em duas semanas de tratamento já é possível identificar a formação de osteócitos, e a junção de condrócitos associados com o novo osso formado, indicando uma ossificação endocondral. E em 8 semanas a fratura óssea é completamente fechada comparada aos controles não tratados com BMP. Em 10 a 20% dos casos, dependendo da anatomia e o local da fratura, é possível o fechamento em até duas semanas, comprovando que a adição de rhBMP-2 de *E. coli* pode obter resultados semelhantes ao expresso em CHO, porém com quantidades maiores de aplicação, devido a sua atividade ser de 5 a 10 vezes menor, do que uma proteína não glicosilada (LEE et al, 2010). Outros estudos comprovam uma eficiência de 40 a 90% após 12 e 24 semanas da aplicação da rhBMP-2 em fraturas de fêmur, comparada a 0% de rendimento do grupo controle em que foi utilizado apenas um fixador externo (KUROIWA, 2018). É possível transformar os monômeros da rhBMP-2 em dímero, que é a forma mais ativa da proteína, outra observação é que por não possuir açúcar (não-glicosilada) é mais fácil manter a qualidade da produção (KUROIWA, 2018).

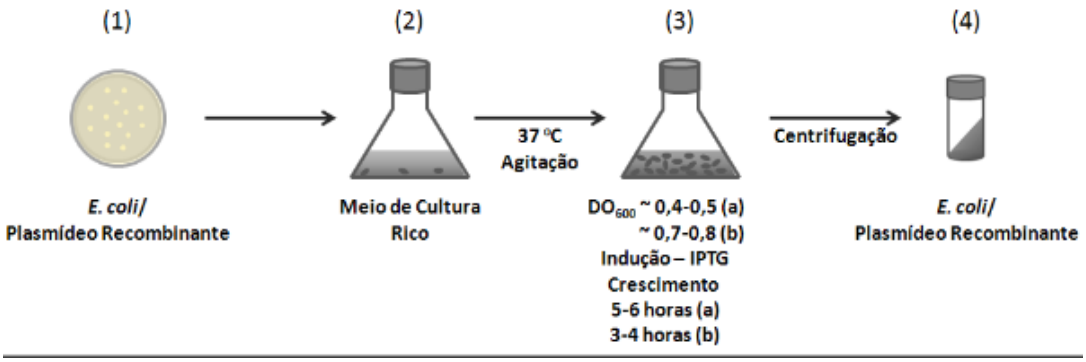
2.8 Produção em *E. coli*

Um dos grandes avanços em questão de expressão de proteínas foi o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, que tornou possível a produção em grande quantidade de proteínas heterólogas. É necessário compreender que a produção dessas proteínas dependem de três processos principais: replicação, transcrição e tradução (MIYAMOTO, 2013).

A *E. coli* é uma bactéria que tem sido amplamente usada para expressar proteínas recombinantes, devido sua flexibilidade em termos de manipulação genética, rápido crescimento e baixo custo. Isto é exemplificado pelo alto número de ferramentas genéticas para o contínuo desenvolvimento desse hospedeiro. Observa-se esse fato ao analisar, o Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank – PDB), em que mais de 90% das estruturas reportadas, utilizaram a *E-coli* para a produção (VICENTELLI, 2013).

O cDNA específico de genes do DNA humano é inserido em plasmídeos utilizando enzimas de restrição. O **plasmídeo** é então inserido numa célula animal, bacteriana ou de levedura, num processo chamado transformação. Os plasmídeos obtidos são introduzidos em células de cepas da *E.coli* modificadas geneticamente para que as mesmas produzam a proteína de interesse. Estas bactérias geneticamente modificadas com os plasmídeos são plaqueadas em meio de cultura semi-sólido. Na segunda etapa são inoculados em meio líquido e o crescimento (geralmente a 30 °C ou 37 °C), sob agitação por 3 a 4 horas, em alguns casos *overnight* (a noite toda - período de 6 horas). O terceiro passo é a indução com IPTG (Isopropil β-d-tiogalactosídeo) ou lactose quando atinge uma DO_{600} ideal – fase logarítmica (DO – densidade ótica medida na absorbância de 600 nm, que está diretamente relacionada ao crescimento bacteriano). O quarto e último passo envolve a coleta das bactérias por centrifugação, esse esquema pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Esquema simplificado da produção em *E. coli*



Fonte: Miyamoto, 2013.

As células bacterianas são coletadas por centrifugação, e o nível de expressão proteico é verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de uma pequena amostra de bactérias induzidas (MIYAMOTO, 2013). Em um nível teórico, para se obter uma proteína recombinante, é preciso obter o gene de interesse, clonar em um vetor de expressão, transformar um hospedeiro de escolha, como a *E. coli*, induzir a expressão, e

então a proteína está pronta para purificação e caracterização. Alguma das dificuldades que podem ser encontradas para a expressão de proteínas heterólogas são: baixo crescimento do hospedeiro, formação de corpúsculos de inclusão (IB), inatividade da proteína, ou não expressão da proteína (ROSARIO, 2013).

A produção da recombinante humana BMP-2 (rhBMP-2) em *E. coli* leva a formação de corpúsculos de inclusão que tendem a se formar devido as ligações de dissulfeto. A bioatividade da rhBMP-2, é recuperada pelo *refolding* através da solubilização dos IBs. Muitas técnicas de renaturação são usadas, como diálise, diluição, e colunas de afinidade, como a cromatografia de afinidade a heparina, que purifica a rhBMP-2. É a forma mais simples de se ter rhBMP-2 bioativa através da *E. coli*, tornando esse processo o mais utilizado atualmente (QUAAS, 2018).

Nas produções em *E. coli*, genes de resistência a antibióticos são habitualmente usados para deter o crescimento de células sem plasmídeos. A degradação do antibiótico acontece em algumas horas e a ampicilina se torna escassa. Com essa situação, células que não carregam o plasmídeo alterado crescem durante o cultivo. Outros antibióticos também possuem esse problema, como cloranfenicol e a canamicina, apenas a tetraciclina tem se mostrado estável durante o cultivo. O custo dos antibióticos é um dos gargalos para produção de culturas em larga escala (ROSARIO, 2013).

2.9 Carreador adequado

A BMP é uma proteína que solubiliza relativamente em água, com baixo peso molecular, difunde facilmente nos fluidos corpóreos. Em uma administração cirúrgica, como a fusão espinhal, ela incorpora rapidamente no local da fratura, podendo ser perdida durante sucção de drenagem, ou simplesmente não permanecer no local aplicado, por isso é tão necessário conter a BMP em um carreador adequado (RENGACHARY, 2002).

Desde que a BMP foi inicialmente identificada e purificada, a necessidade de um carreador surgiu. Vários tipos de carreadores foram investigados experimentalmente e clinicamente. Os carreadores das hBMPs poderiam ser amplamente classificados dentro da categoria química de sais orgânicos, levando a substâncias poliméricas, como polímeros sintéticos e naturais. Algumas características básicas devem conter nesse tipo de carreador: não induzir uma resposta inflamatória ou imune, e a sua degradação não deve liberar resíduos tóxicos, precisa ser absorvível conforme a formação do novo osso, não deixar resíduo, deve ser poroso, sendo esta porosidade semelhante ao do osso esponjoso.

O colágeno bovino tipo I é o carreador mais utilizado em pesquisas e o único comercialmente, porque pode ser obtido do osso, tendões e ligamentos, e se encaixa dentro das descrições acima, outros tipos de carreadores foram colocados em estudo, alguns advindos de fosfato de cálcio que se assemelham a hidroxiapatita como os grânulos de TCP já usado em laboratórios químicos, porém devido a questões de porosidade e maleabilidade não adentrou nos aspectos necessários para o uso com a rhBMP-2. Embora, o colágeno bovino se dissolva facilmente, e esteja dentro das descrições acima, a alguns riscos relatados em artigos, como a facilidade da rhBMP sair do ACS com baixa pressão e cargas axiais. Por isso, o seu uso ainda é restrito e não foi aprovado para outros tratamentos pela FDA dos EUA (RENGACHARY, 2002).

A matriz óssea desmineralizada também poderia ser utilizada como carreador, mas não foi aprovada, pelos aspectos de imunogenicidade e transmissão de doenças. Outros polímeros têm sido estudados como fibrina, quitosana, alginato, e outros de origem animal ou polissacarídeos derivados de plantas.

Polímeros sintéticos apresentam a vantagem de fornecimento ilimitado, baixa ou antigenicidade, previsível, não contém risco de transmissão de doenças, embora alguns derivados de ácido poliglicólico e ácido polilático têm sido explorados, alguns produtos da sua degradação podem produzir reação celular, e a afinidade da BMP com os polímeros sintéticos não é igual ao colágeno. Há uma expectativa de que com o estudo e o desenvolvimento, os polímeros possam substituir futuramente o uso do ACS (RENGACHARY, 2002).

Silva 2011 desenvolveu um carreador baseado no polímero poli ε-caprolactona (PCL), o único polímero que a FDA considera biocompatível para a engenharia de tecidos. O polímero PCL foi sintetizado pelo processo normal de polimerização do monômero ε-caprolactona induzida pelo iodo, que resultou em uma matriz pura de PCL biocompatível, sem toxicidade nas avaliações *in vitro* e *in vivo*, matriz macro porosa, utilizando também como matrizes do compósito com hidroxiapatita (PCL/HA) e com o antibiótico vancomicina (PCL/HA/VC).

A análise pré-clínica foi feita por implantes em tíbias de coelho, e os resultados histológicos demonstraram que o compósito PCL/HA contribuiu para a osteocondução a partir de 30 dias do implante, proporcionando estrutura para a deposição do tecido ósseo neo-formado, mantendo a consolidação durante os períodos de 60-90 dias pós-implante. Assim sendo, indicando o potencial do polímero como biomaterial para a obtenção de

dispositivos implantáveis, capazes de melhorar a osteointegração. Esse carreagor está sob patente (BR 10 2014 017703 5).

O INFUSE com o ACS é aplicado com volumes variáveis de acordo com o tamanho do dispositivo de colágeno com uma solução na concentração de 1,5 mg/cc (MCKAY,2007). Na Figura 1, estão os kits atualmente disponíveis no mercado.

Figura 5 - Quatro tipos de kits do Infuse Bone Graft: pequeno, médio, grande e grande II

TOTAL GRAFT VOLUME	2.8 cc	5.6 cc	8.0 cc	8.0 cc
ORDER NUMBER	7510200 SMALL KIT	7510400 MEDIUM KIT	7510600 LARGE KIT	7510800 LARGE KIT II
INFUSE® Bone Graft Kits				
Sterile Absorbable Collagen Sponge (ACS)	(2) ACS 1" x 2" (2.54 cm x 5.08 cm)	(4) ACS 1" x 2" (2.54 cm x 5.08 cm)	(6) ACS 1" x 2" (2.54 cm x 5.08 cm)	(1) ACS 3" x 4" (7.62 cm x 10.16 cm)
mg rhBMP-2	4.2 mg	8.4 mg	12.0 mg	12.0 mg
Concentration rhBMP-2	1.5 mg/cc	1.5 mg/cc	1.5 mg/cc	1.5 mg/cc

Fonte: Mckay, 2007

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas de *E.coli* produtoras de hBMP-2

As cepas utilizadas foram a *E.coli* W3110 e a *E.coli* BL21(DE), com vetores de expressão com o cDNA da hBMP-2. Também utilizou-se o plasmídeo com repressor (pRK248 clts). A presença do repressor é útil para evitar a expressão do gene de interesse durante o crescimento bacteriano. Na temperatura de 42 °C, o repressor (termosensível) é desativado, permitindo a expressão desejada da proteína de interesse (Soares et al., 2006).

A construção dos vetores de expressão para *E.coli* foi realizada de acordo com as técnicas clássicas de biologia molecular, utilizando reações com enzimas de restrição para corte do vetor, com DNA ligase, para união do fragmento codificante da hBMP-2 ao vetor, que está sob propriedade intelectual do LABORATÓRIO BIOSINTESIS P&D LTDA. O crescimento da bactéria W3110 com o vetor ocorre a 30 °C sem represssor e a mesma temperatura com o plasmídeo repressor pRK248 clts (ambos *overnight*), e a cepa BL21(DE) cresce a 37 °C (durante 6 horas). A temperatura de expressão respectivamente para a cepa W3110 ocorre a 37 °C (sem repressor) e a 42 °C (com repressor). Já para a cepa BL21(DE) a 25 °C após a adição de 1 mM isopropyl-1-thio-bD-galactopyranoside (IPTG) (EINEM, 2010). A utilização do IPTG é necessária porque na cepa BL21 o gene está sob o controle do operador lac, como o IPTG é um imitador molecular da alolactose, através dele é possível desencadear a transcrição através do operador lac, e consequentemente a expressão (HANSEN, 1998).

A expressão do plasmídeo com repressor é ativada em culturas com temperaturas abaixo de 42 °C, enquanto a transcrição da polimerase do RNA hospedeiro resulta em uma inativação do repressor mutante pelo aumento da temperatura, acima de 42 °C (VALDEZ-CRUZ, 2010).

3.2 Cultivo das cepas W3110 e BL21(DE)

O cultivo das cepas de *E. coli* transformadas com o vetor de expressão e o choque osmótico foi realizado de acordo com técnicas já padronizadas e utilizadas em trabalhos anteriores do grupo (OLIVEIRA et al., 1999; SOARES et al., 2000; RIBELA et al., 2003).

O meio de cultura Luria-Bertani (LB) foi preparado contendo 0,1 mg/mL de ampicilina na produção de rhBMP a partir da cepa W3110 sem repressor. Na cultura com repressor (pRK248 clts) foi acrescentado o antibiótico tetraciclina (12,5 mg/mL). Para a produção da cepa BL21(DE), 0,03 mg/mL de canamicina (**Tabela 2**). O volume de meio LB foi de 10 a 25% do volume do erlenmeyer.

Tabela 2. Condições de cultivo e expressão.

(A) Cepa W3110 Com repressor	(B) Cepa W3110 Sem repressor	(C) Cepa BL21(DE) Sem repressor
Cultivo 30 °C Ativação 42 °C	Cultivo 30 °C Ativação 37 °C	Cultivo 37 °C Ativação 25 C
Ampicilina 100 µg/ml Tetraciclina 50 µg/ml	Ampicilina 100 µg/ml	Canamicina 30 µg/ml
Sem IPTG	Sem IPTG	0,1 mM IPTG

Fonte: autora da dissertação.

A determinação do rendimento de expressão de rhBMP-2 foi feita após o choque osmótico por análise em RP-HPLC e HPSEC, como descrito para diferentes proteínas (DALMORA, 1997; SOARES, 2002; SUZUKI, 2012). Como padrão foram utilizados a met-hBMP-2 obitida em *E.coli* (GenScript, Piscataway, NJ, USA) e a rhBMP-2 obtida em células CHO (Infuse® Bone Graft - Medtronic, Minneapolis, USA)**.**

3.3 Padronização da fermentação da cepa de *E. coli* já definitivamente escolhida para produção, em biorreator tipo piloto

As condições de produção no biorreator foram determinadas com base nos seguintes parâmetros que atuam na biomassa a ser obtida: (i) temperatura de cultivo e de ativação; (ii) agitação em rpm; (iii) porcentagem de oxigênio dissolvido; (v) composição do meio de cultura e adição de glicose. Como trabalho base foi utilizado as condições de produção piloto de prolactina humana, um hormônio também obtido no espaço periplásmico de *E. coli* (SOARES et al., 2008).

A fermentação foi realizada no Biorreator de 20 L ("20-Liter Laboratory Bioreactor") (New MBR, Zurich, Suíça) disponível no Centro de Biotecnologia do IPEN, onde se almejava resultados semelhantes aos já descritos no trabalho mencionado, com biomassas da ordem de 30-60 mg A600 e produção volumétrica de 30-90 mg/ml da proteína de interesse.

O meio utilizado na dorna do fermentador foi o Jensen 2x e 4x concentrado (4,5 L), com controle de O_2 à 40%, e pH em torno de 7,2.

Mediu-se a cada hora a A_{600}, % O_2, pH e fluxo de ar. Após a densidade óptica de crescimento atingir 5 A_{600}, onde teoricamente atinge o platô (crescimento constante), foi iniciada a ativação, mudou-se a temperatura de 30 °C para 42 °C ou 37°C. Durante as seis horas seguintes foram coletas amostras, de T0 (hora da ativação) até o T6 (hora final) para a realização do choque osmótico de cada uma, onde foi analisado a expressão que ocorreu durante os intervalos. Também foi feito choque da quantidade total produzida. A temperatura de 42ºC foi escolhida, pelo desempenho da produção da rhBMP-2 avaliados nos outros ensaios que serão posteriormente discutidos.

3.4 Caracterização da rhBMP-2 mediante técnicas físico-químicas, imunológicas e biológicas, para a determinação exata dos rendimentos da expressão

A determinação quantitativa e qualitativa da proteína de interesse no meio heterogêneo das proteínas periplásmicas, é baseada em RP-HPLC em fase reserva. No caso da rhBMP-2 foi usada uma coluna C4 Grace-Vydac e C4 Phenomenex.

A corrida cromatográfica foi realizada com a coluna mantida a 30 °C, a detecção por absorbância em luz UV com comprimento de onda de 220 nm e a quantificação da amostra foi obtida através da determinação da área sob o pico, comparada à área do padrão de rhBMP-2 da Genscript. Foi utilizada uma fase móvel A (solução de 0,1% de TFA em água) e uma fase móvel B, diluindo 10% da fase móvel A com 90% de acetonitrila. A eluição foi realizada com gradiente linear de 30 a 60% de fase móvel B, por 40 min a um fluxo de 1 mL/min.

3.5 Purificação por afinidade a heparina e HPSEC

3.5.1 Heparina

A purificação da rhBMP-2 foi feita em coluna de heparina (Hitrap Heparin) de alta eficiência (HP – 5 ml), baseada na alta afinidade que o elemento "ligante" desta coluna (um glicosaminoglicano sulfato, extraído da mucosa intestinal suína possui para uma variedade de fatores de crescimento como a hBMP-2) (QUAAS, 2018). Outros trabalhos que foram usados como referência para esse estudo que utilizaram a heparina foram Vallejo et al. (2002); Long et al. (2006); Quaas et al. (2018).

A amostra, depois de dialisada com Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, foi colocada na coluna, que foi equilibrada anteriormente com Tris-HCl 10 mM, e gradientes de NaCl (0 – 0,3 M) em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.

3.5.2 *High Pressure Size Exclusion Chromatography* - HPSEC

A segunda etapa de purificação foi feita com o *pool* das amostras de interesse da rhBMP-2 produzida e purificada na heparina em HPSEC (cromatrográfia de exclusão molecular), coluna TosoHass TSK 2000.

A corrida foi realizada com coluna mantida a 25 °C, a detecção por absorvância em luz UV com comprimento de onda de 220 nm e a quantificação da amostra foi obtida através da determinação da área sob o pico, comparada à área do padrão Genscript. Foi utilizada como fase móvel o tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 com adição de 0,15 M NaCl para análise e coleta.

3.6 SDS PAGE e Western blotting

3.6.1 SDS PAGE

O SDS recobre as proteínas, fornecendo a elas carga negativa proporcional ao seu comprimento. Quando a amostra proteica corre em um gel de poliacrilamida, as proteínas são separadas por massa molecular (BLANCHER, 1990). A separação das proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em tampão tris-glicina. A separação ocorreu por aproximadamente uma hora a 35 mA. Após a corrida eletroforética o gel foi fixado por uma hora, corado com *Coomassie Brillant Blue* G por 30 minutos e descorado overnight (SOARES et al., 2003).

3.6.2 WB

O objetivo do Western Blotting, ou mais corretamente immunoblotting, é identificar com um anticorpo específico de um particular antígeno dentro de uma mistura de proteínas complexa depois de separada em um gel de policrilamida e imobilizado em uma membrana. *"Immunoblotting"* pode ser usado para determinar um número de importantes características das proteínas, como a: presença, quantificação e o relativa massa molecular da cadeia polipeptídica e a eficiência de extração (BLANCHER, 1990)

Após separação por massa molecular, o gel com as proteínas separadas é transferido para uma membrana de nitrocelulose pré-umedecida com tampão de transferência, pH 8,3, bloqueado durante 1 hora com PBS (tampão fosfato salino) pH 7,4 + 3% de albumina de soro bovino (BSA), incubado *overnight* em agitação com anticorpo policlonal primário produzido em coelho anti-hBMP2 (Biovision Califórnia, EUA), diluição 1:1000, depois foi lavado com PBS+3% BSA, e incubado durante uma hora com o secundário (policlonal produzido em cabra anti-IgG de coelho conjugado a HRP), diluição 1:5000 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Depois é lavado novamente com PBS+3% BSA, 3 vezes por 5 minutos, e somente PBS, 2 vezes por 5 minutos. A membrana foi exposta ao luminol (Luminata^{TM} Forte Western HSP Substrate, Millipore Co., Billerica, MA, EUA) e revelada em filme CL-X Posure Film (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

3.7 Ensaio biológico com células C2C12 *in vitro*

O ensaio biológico é baseado na capacidade de indução, por parte da hBMP-2, de produção de fosfatase alcalina em células mioblásticas de camundongo C2C12. O ensaio confirma a atividade da hBMP-2 e possibilita o cálculo quantitativo da amostra advinda da expressão bacteriana, através da luz emitida pelo p-nitrofenil fosfato, quantificada em leitor de placas no comprimento de onda de 405 nm.

As células C2C12 foram cultivadas em garrafas de 25 cm², incubadas a 37°C, 5% de CO_2, em meio completo para cultivo DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) com 10% de soro fetal bovino. Após exposição em diferentes concentrações de rhBMP-2 por 72 horas, foi adicionado p-nitrofenil fosfato.

A fosfatase alcalina do meio de cultura, em pH alcalino, hidrolisa o p-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldric) liberando o p-nitrofenol e fosfato inorgânico, segundo a reação seguinte:

p-nitrofenil fosfato + H_2O + fosfatase alcalina -> p-nitrofenol + fosfato

A quantidade produzida de p-nitrofenol que possui coloração amarelada é avaliada na absorbância em 405 nm. Essa leitura é diretamente proporcional à atividade enzimática da fosfatase alcalina na amostra (GEORGE N, 1981).

3.8 Análise da massa molecular por MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF é uma análise de biomoléculas através da ionização por dessorção a laser assistida por matriz, seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de vôo, sigla TOF. Esta técnica permite identificação por meio de massa molecular e uma avaliação *semi-quantitativa* da proteína de interesse depois de purificada.

3.9 Análises dos dados obtidos no ensaio com células C2C12 e na fermentação

Os dados obtidos nos experimentos de quantificação de fosfatase alcalina por células C2C12 foram utilizados para o cálculo da concentração efetiva 50% (EC_{50}). Valores de concentração de rhBMP-2 (Infuse e Genscript) foram transformados para seus logaritmos em base 10 e os valores foram ajustados à função (I), e plotados contra os valores de absorvância (405 nm) observados.

A_{600}nm = Bottom + (Top-Bottom)/(1+e((LogDL50-X)*HillSlope)

Para comparação do efeito entre os padrões comerciais das proteínas obtidas com as diferentes construções de vetor, condições de cultura e disponibilidade nutricional dos diferentes meios de cultura utilizados, os valores de absorvância referentes à presença de fosfatase alcalina produzida por C2C12 foram transformados em porcentagens em relação aos controles não-tratados e plotados contra as concentrações de proteínas recombinantes utilizadas em escala log.

Para comparação entre metodologias de fermentação, o crescimento bacteriano foi determinado periodicamente por espectrofotometria (A_{600}nm) e os dados obtidos foram representados contra um eixo de escala temporal em horas referente aos tempos de fermentação utilizados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

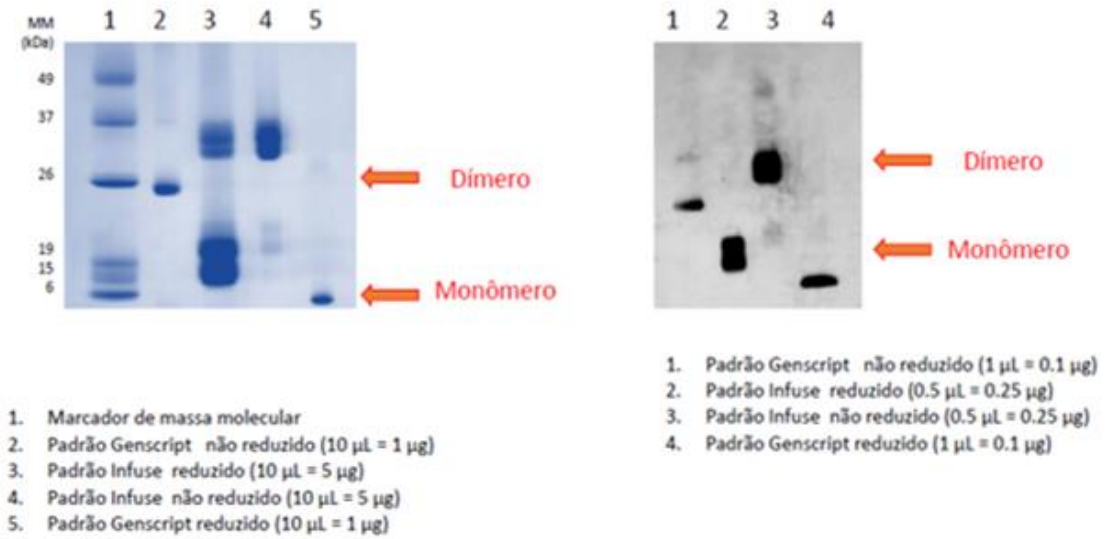
4.1 Padrões Genscript e Infuse

4.1.1 Análises por SDS-PAGE e Western Blotting (WB)

É possível observar as proteínas puras rhBMP-2, de origem bacteriana (padrão comercial Genscript) e de células de mamíferos (padrão comercial Infuse), analisados por SDS-PAGE e Western blotting (WB), apresentados na **Figura 6**, a posição claramente dimérica (~25.000 Da) do Genscript não reduzido, e também do Infuse, cuja massa molecular é maior devida à presença do N-glicanos (MCKAY, 2017). No produto reduzido, onde a ponte dissulfeto é clivada, a massa molecular está, justamente, próxima de 13.000 Da (Genscript), enquanto o Infuse reduzido apresenta duas bandas de aproximadamente 18.000 a 20.000 Da, provavelmente devido a diferentes glicosilações.

Figura 6 - SDS-PAGE (A) e WB (B) de hBMP-2 de *Escherichia coli* (Genscript) e CHO (Infuse). As amostras foram reduzidas ou não com 50 mM DTT, aquecidas a 95 °C por 5 min e aplicadas no gel de poliacrilamida 15%.

A) B)



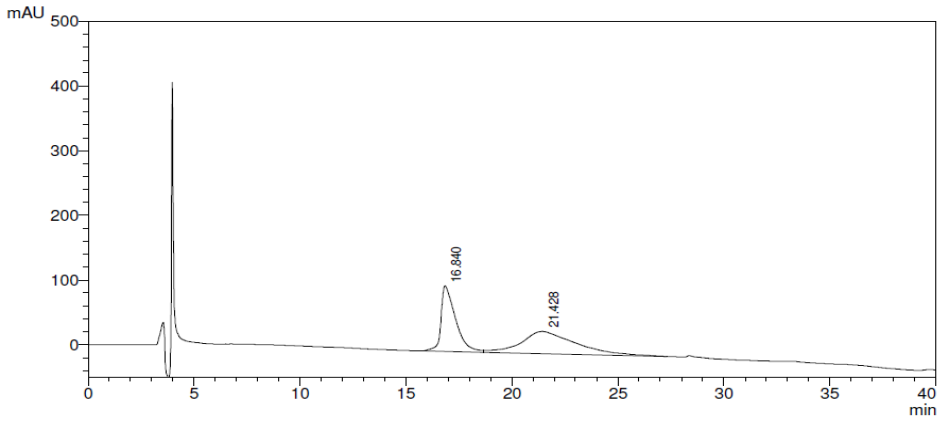
Fonte: autora da dissertação.

4.1.2. Análises em RP-HPLC e HPSEC

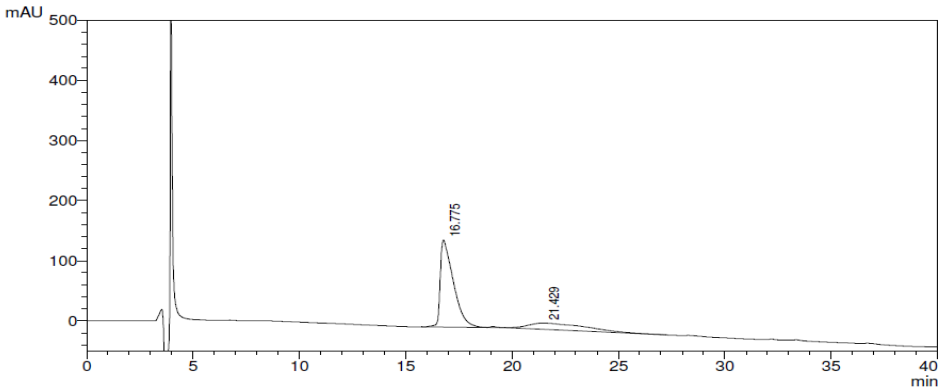
Os dois produtos de referência da rhBMP-2 foram também analisados mediante RP-HPLC (**Figura 7**) e HPSEC (**Figura 8**). No caso do produto Genscript, analisou-se o padrão recentemente adquirido em 2018, e comparou-se com o estocado desde 2017 a -20° C. No caso do Infuse é evidente um pico com MM (massa molecular) diferente, provavelmente indicativo de uma glicosilação. Observa-se a constância dos tempos de retenção dos picos principais: 16,8 min e 16,3 min na RP-HPLC e 20,4min e 20,5 min no caso da HPSEC, respectivamente para o Genscript e o Infuse. Não foi ainda possível revelar a natureza dos produtos de possível "degradação" do Genscript ao longo do tempo (mesmo estocado a -20 °C), detectados seja pela RP-HPLC que pela HPSEC.

Figura 7 - Análise em RP-HPLC da hBMP-2: (A) produzida em *Escherichia coli* (Genscript) 10 µg, após 2 anos estocada a -20 °C; (B) mesmo produto recém adquirido logo após a reconstituição; (C) produzida em CHO (Infuse) 10 µg, logo após a reconstituição.

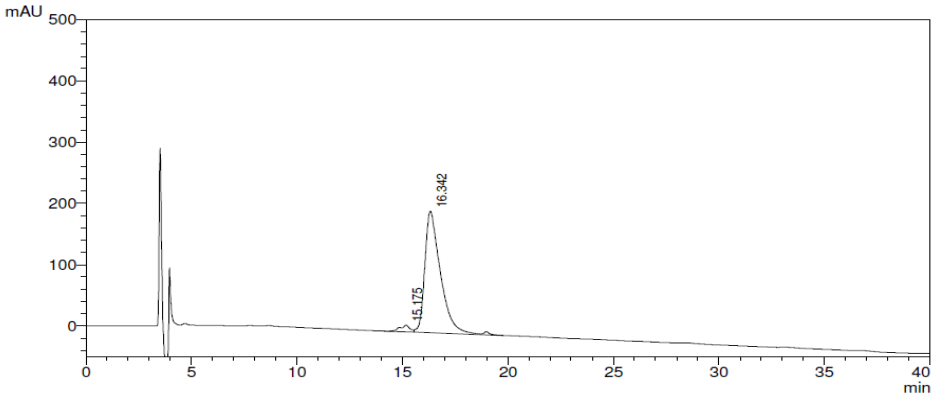
A)



B)



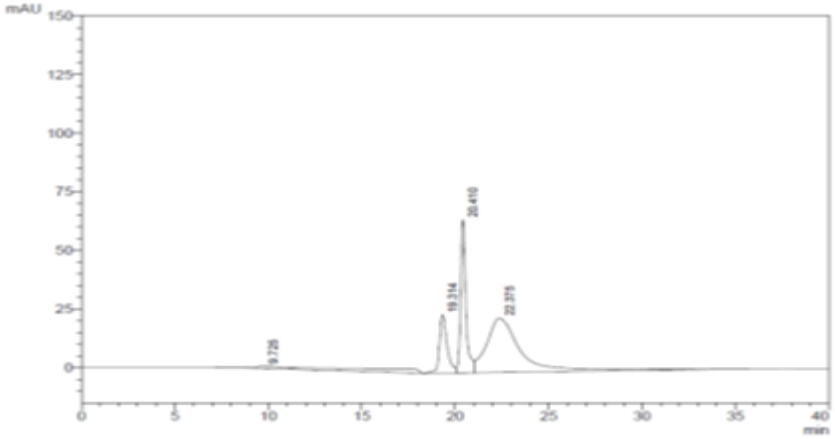
C)



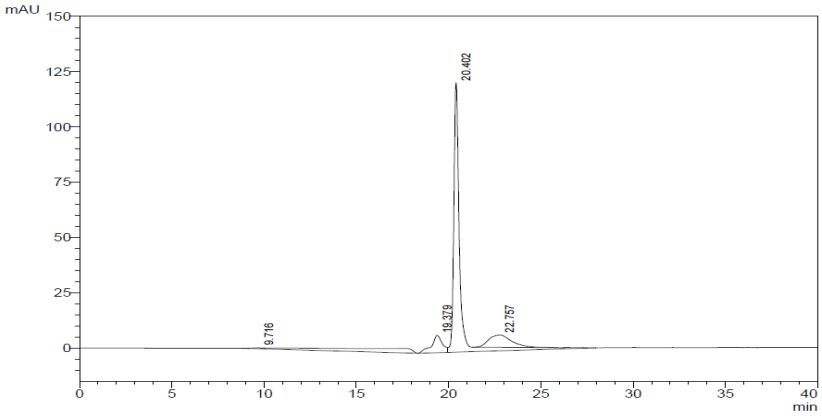
Fonte: autora da dissertação.

Figura 8 - Análise em HPSEC da hBMP-2: (A) produzida em *Escherichia coli* (Genscript) 10 µg, após 2 anos estocada a -20 °C; (B) mesmo produto recém adquirido logo após a reconstituição; (C) produzida em CHO (Infuse) 10 µg, logo após a reconstituição.

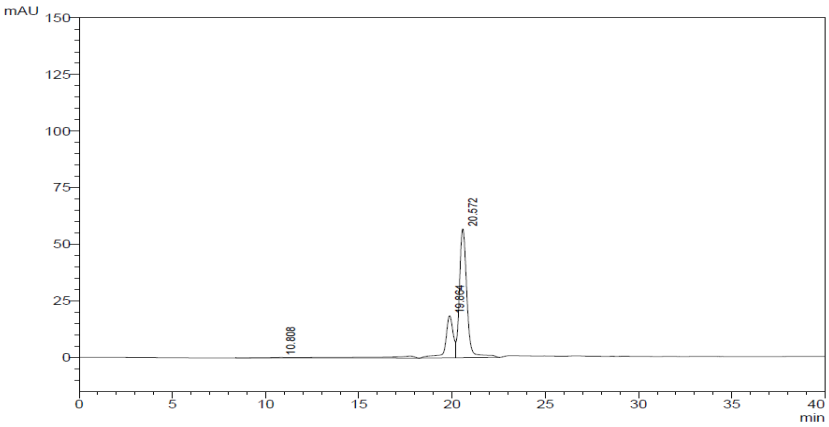
A)



B)



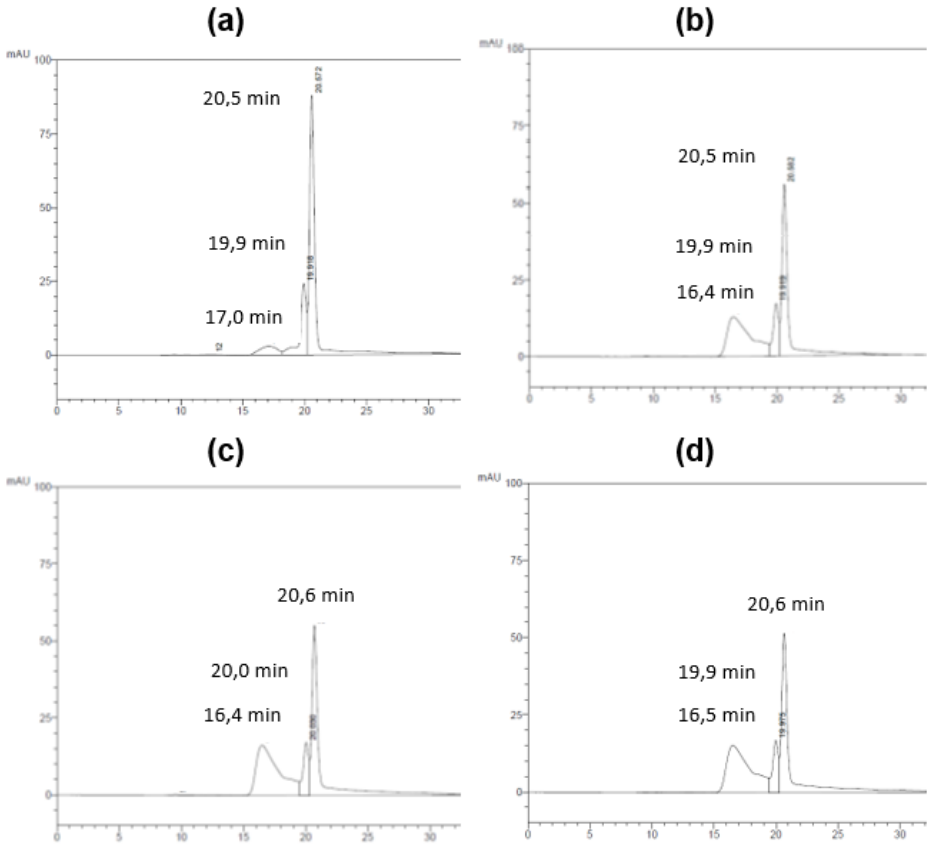
C)



Fonte: autora da dissertação.

Em um estudo com o padrão INFUSE (**Figura 9**) foi possível observar que também houve aumento de massa molecular no tempo de retenção de 16,5 min ao decorrer dos dias após reconstituição, sendo que esta foi feita conforme as normas do produto, em água ultrapura recebida no kit juntamente com a rhBMP-2.

Figura 9 - Análise em HPSEC da rec-hBMP-2 produzida em células CHO (Infuse): **(a)** logo após a reconstituição (30/1/2019); **(b)** um dia após a reconstituição (31/1/19), **(c)** 15 dias após a reconstituição (14/2/19), **(d)** 16 dias após a reconstituição (15/2/19). As alíquotas foram mantidas congeladas a -20 °C. Observar aumento do pico de 16,5 min com o aumento do tempo de armazenamento.



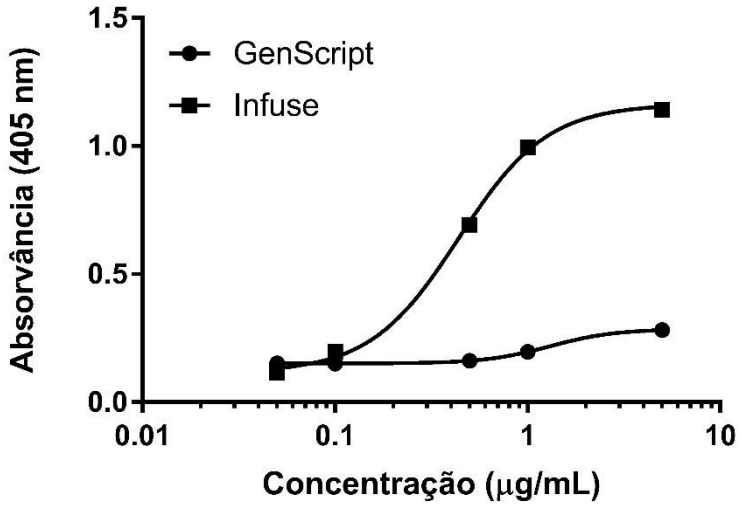
Fonte: autora da dissertação.

4.2 Ensaio biológico "in vitro" em células mioblásticas murina C2C12

A partir de ensaios de quantificação de fosfatase alcalina, culturas de células C2C12 foram expostas a concentrações crescentes dos padrões de rhBMP-2 Genscript e Infuse

(0,05; 0,1;0,5; 1; 3 e 5 µg/mL). **A Figura 10** mostra os resultados das absorvâncias (405 nm) obtidos neste ensaio, contra eixo que contém os valores das concentrações. Desta forma, a curva sigmoidal dose-resposta pode ser calculada, e os valores de EC_{50} (concentração efetiva para estímulo de crescimento 50% maior que o controle) puderam ser determinados. Infuse tem potência estimulatória cerca de três vezes maior que Genscript (EC_{50} Infuse: 0,438 ± 0,03 µg/mL; EC_{50} Genscript: 1,304 ± 0,087 µg/mL; Média ± Erro Padrão da Média).

Figura 10. Valores das quantidades de fosfatase alcalina, representados em unidades de absorvância a 405 nm, em células C2C12 tratadas com concentrações crescentes de rhBMP-2 da Genscript e da Infuse.



Fonte: autora da dissertação.

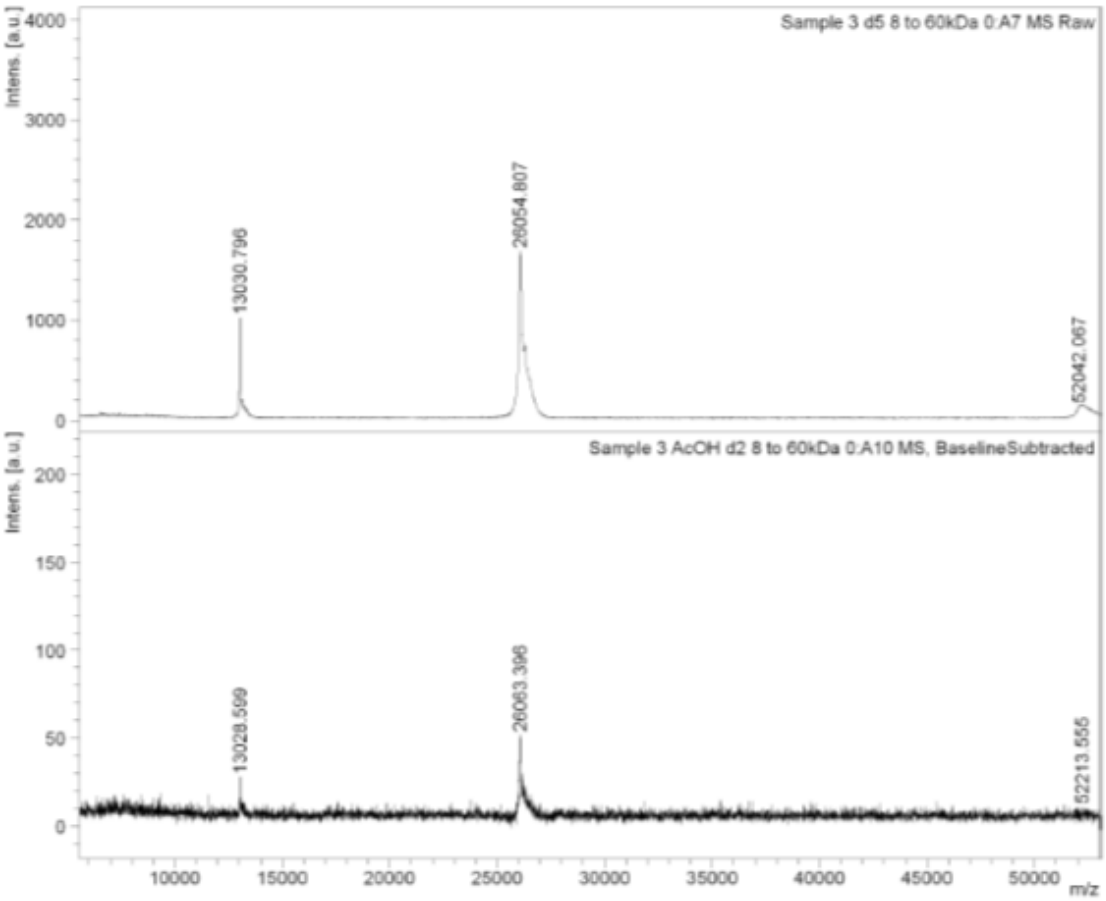
Os valores de EC_{50} obtidos foram comparados utilizando-se o teste F de comparação de soma dos quadrados, e são diferentes entre si (P = 0,0087). Os dois conjuntos de dados puderam ser ajustados de maneira bastante satisfatória ao modelo (r^2 Genscript: 0,9975; r^2 Infuse: 0,9965), de forma a corroborar a confiabilidade do cálculo dos valores de EC_{50} obtidos.

4.3 Determinação da massa molecular (MM) exata dos padrões de hBMP-2 por MALDI-TOF-MS

Na **Figura 11** podemos observar a determinação exata da MM do produto Genscript. Sendo que a mesma empresa Genscript recomenda dissolver o produto em ácido acético 20 mM, foi estudada também esta condição.

Nesta figura também observamos que a maioria do produto é dímero (forma biologicamente ativa), com a presença de ~10% de monômero. A MM determinada é exatamente a esperada de ~ 26.000 Da, diferindo da MM teórica de somente 0,04-0,06%. A presença de ácido acético (**Figura 12**) diminui a sensibilidade da análise, mas não altera o resultado. É interessante observar também uma certa presença (~15%) do tetrâmero (MM = 52042 Da).

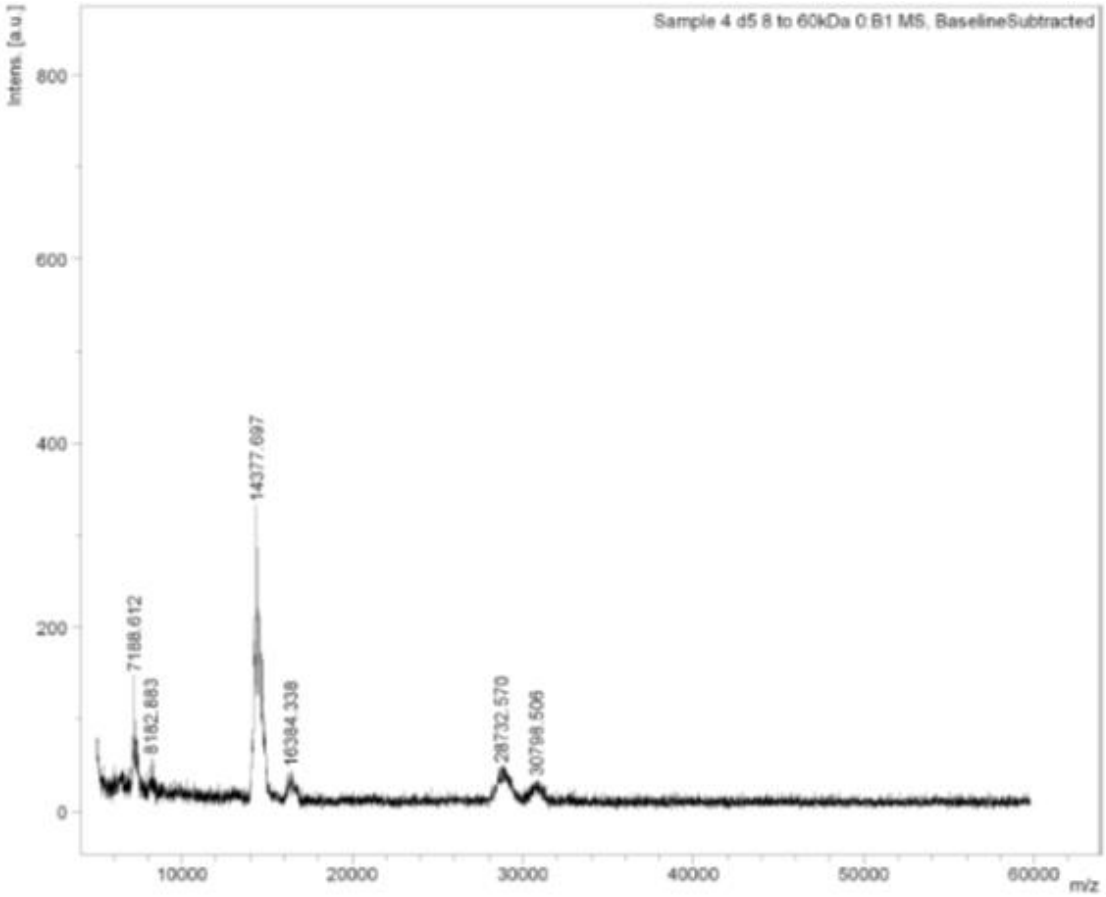
Figura 11. Análise mediante MALDI-TOF-MS do padrão Genscrip(MM teórica=13.036): (A) produto recebido diretamente da Genscript, (B) produto tratado com 20 mM de ácido acético.



Fonte: autora da dissertação.

Na **Figura 12** é representada a análise do padrão Infuse, dissolvido pelo grupo de pesquisa e liofilizado antes da análise. É evidente a presença em maior quantidade de uma forma monomérica (MM = 14377 Da) e de sua correspondente forma dimérica (MM = 28732 Da), ~30% do total. Outra forma, provavelmente derivada de diferente glicosilação, é presente em menor quantidade, com aproximadamente a mesma abundância de monômero e dímero (MM = 16.384 Da e 30.798 Da). Relativamente à massa proteica, as duas formas glicosiladas devem possuir 10,2% e 21,2% de carboidratos, provavelmente devido a diferentes estruturas e massas do único N-glicano presente na molécula.

Figura 12 - Análise mediante MALDI-TOF-MS do padrão Infuse.



Fonte: autora da dissertação.

4.4 Cultivo em erlenmeyer e cálculo dos rendimentos de expressão em hBMP-2

Três diferentes estratégias de expressão foram utilizadas, de acordo com a experiência do grupo.

A primeira **(A)** é baseada na utilização do vetor de expressão juntamente com outro plasmídeo, pRK248 cIts (pRep), também introduzido na mesma cepa (W3110). Uma vez que a biomassa bacteriana desejada é alcançada, a ativação a 42 °C desativa o repressor, permitindo assim a expressão da proteína de interesse, sem maiores dispêndios energéticos para obtenção de biomassa. Esta estratégia foi denominada: **W3110 - 42°C**.

A segunda estratégia **(B)**, utiliza o mesmo vetor de expressão porém sem a presença do repressor. O crescimento das bactérias é realizado também a 30 °C com expressão constitutiva (não regulada) da hBMP-2, cuja intensidade é incrementada aumentando a temperatura de cultivo para 37 °C; estratégia: **W3110 - 37°C.**

A terceira estratégia **(C)** é baseada completamente em outro vetor e outra cepa de *E. coli* BL21(DE), sistema que possui a vantagem de expressar frequentemente com bons rendimentos em baixas temperaturas (neste caso 25 °C) com ativação mediante isopropil tioglicolato (IPTG), sempre após um crescimento bacteriano inicial a 30°C; estratégia: **BL21 - 25°C.**

A quarta estratégia (**D**) utiliza o mesmo vetor de expressão, também sem a presença do repressor como o (B). O crescimento das bactérias é realizado a 30 °C com expressão constitutiva (não regulada) da hBMP-2, a temperatura de cultivo é abaixada para 25 °C; estratégia: W3110 - 25°C. Essa estratégia foi realizada posteriormente, algumas etapas não foram realizadas devido ao conhecimento adquirido das três estratégias anteriores. A expresão específica foi de 0,12 µg/mL/A600 e uma concentração de hBMP-2 no meio de 0,40 mg/L aproximadamente .

Os primeiros resultados obtidos com as 4 estratégias (**Tabela 3**). O sistema BL21 25°C foi aparentemente o melhor, mas é infelizmente baseado na utilização de IPTG que apresenta um custo razoável em comparação com a produção em *e.coli* e certa toxicidade para células eucarióticas que, porém, não parece afetar a *E. Coli*, já que após a purificação essa toxicidade dimiu o seu efeito. A utilização do W3110 37°C não apresentou aquela vantagem esperada na utilização de um sistema de expressão constitutivo, em temperatura moderada. O sistema clássico que utiliza o repressor e ativação a W3110 42°C, também foi

aquém das expectativas. Apresentou uma baixa expressão específica (média de 0,16 µg/mL/A_{600}), mas a maior biomassa (média de 4,24 A_{600}). As amostras que poderiam ser aplicadas em biorretor mediante os dados apresentados, são a BL21 25°C e W3110 42°C, porém como o interesse é que a cepa a W3110 obtenha um desempenho satisfatório, então está foi escolhida, para produção em escala piloto industrial, a expectativa é que em biorreator, em condições controladas de agitação, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e adição de glicose, este parâmetro possa melhorar consideravelmente, e assim também a expressão volumétrica (de maior interesse industrial), atualmente de somente 0,70 mg/L.

Tabela 3. Expressão específica e volumétrica de vários cultivos realizados com diferentes cepas e vetores de expressão para hBMP-2 (quantificado por HPLC)

Cepa e temperatura de ativação	Expressão específica (µg/mL/A600)	Expressão específica média ± DP (µg/mL/A600)	A600 final (biomassa)	Concentração de hBMP-2 no meio (mg/L)	Concentração de hBMP-2 no meio média ± DP (mg/L)
(A) W3110 - 42 °C	0,20	0,16 ± 0,05	4,46	0,89	0,70 ± 0,37
	0,16		2,68	0,42	
	0,19		6,08	1,14	
	0,10		3,76	0,37	
(B) W3110 - 37 °C	0,10	0,13 ± 0,03	3,44	0,33	0,51 ± 0,21
	0,17		4,77	0,81	
	0,15		2,94	0,45	
	0,12		3,72	0,45	
(D) BL21 - 25 °C	0,44	0,41 ± 0,18	3,01	1,33	1,16 ± 0,39
	0,42		2,94	1,23	
	0,59		2,53	1,49	
	0,16		3,74	0,6	

Fonte: autora da dissertação.

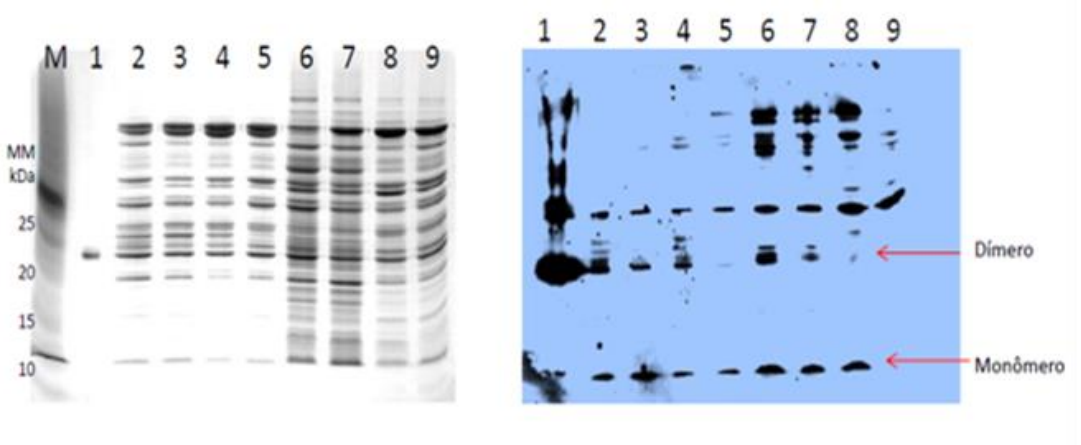
4.5 Rendimento da expressão conforme o meio

Com objetivo de obter uma produção mais eficiente de rhBMP-2 foram testadas duas concentrações do meio utilizado para a produção de choque osmótico, e outros dois meios para cultivo. Luria Bertani (1x) e Luria Bertani (2x), com ativação da produção 37°C (W3110 sem repressor) e 42°C (W3110 com repressor), e os mesmos parâmetros foram aplicados ao meios Zamani e Jensen (37° sem repressor e 42°C com repressor), a temperatura

a 37°C foi escolhida, devido a frequência de sua utilização com cepas *e.coli*. Através das medidas de D.O em uma absorbância de 600 u.a e da produção do choque osmótico, foi possível obter dados comparativos entre todos esses parâmetros. Na **Figura 13**, as análises em SDS-PAGE e WB, observa-se os fluidos periplásmicos produzidos, o meio LB 1 x sem repressor (número 2 na figura 13.a e o mesmo na figura 13.b), possui bandas de baixo peso molecular, em comparação com o padrão Genscript, já que a banda de interesse da proteína é o dímero na direção do padrão. Tanto no SDS-PAGE e WB, observa-se uma banda na direção do padrão com poucas bandas acima do dímero, demonstrando um índice menor de impureza e a hBMP-2 produzida pela *E-coli*.

Figura 13 - a) SDS-PAGE e b) WB, comparação de meios de cultura para expressão de BMP-2 na cepa w3110, com repressor (42°C) e sem repressor (37°C). M – Marker, 1. BMP-2 padrão Genscript (2017), 2. Fluido sem repressor meio LB, 3. Fluido sem repressor meio LB2x, 4. Fluido sem repressor meio Jensen, 5. Fluido sem repressor meio Zamani, 6. Fluido com repressor meio LB,7. Fluido com repressor meio LB2x, 8. Fluido com repressor meio Jensen, 9. Fluido com repressor meio Zamani.

a) **b)**



Fonte: autora da dissertação.

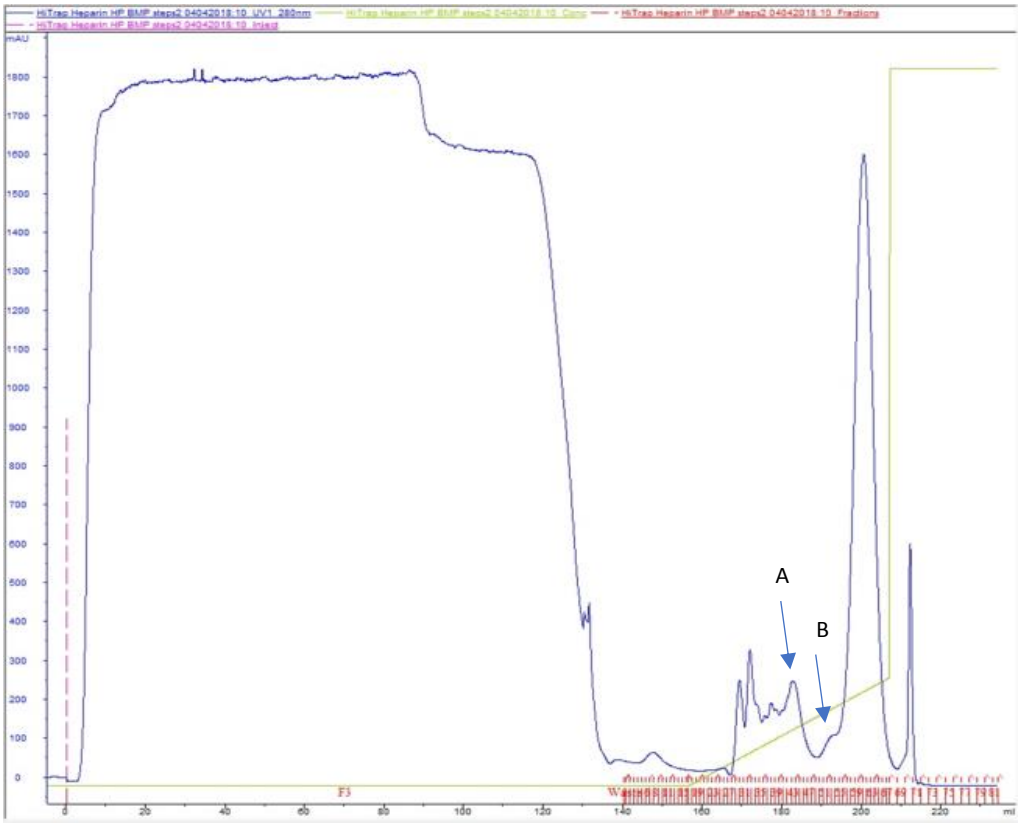
4.6.Primeira etapa de purificação em coluna de afinidade HiTrap Heparin-Sepharose HP

Na **Figura 14** apresentamos os cromatogramas obtidos na primeira etapa de purificação da rhBMP-2 em coluna de afinidade a heparina a partir do fluido dialisado. É possível observar os picos de interesse, que continham rhBMP-2, que foram selecionados após análise por SDS-PAGE. As frações proteicas separadas pela técnica de cromatografia também foram analisadas em HPSEC e selecionadas aquelas que eluíram no mesmo tempo de retenção do padrão de rhBMP-2 (Genscript). Aquelas que apareceram na posição

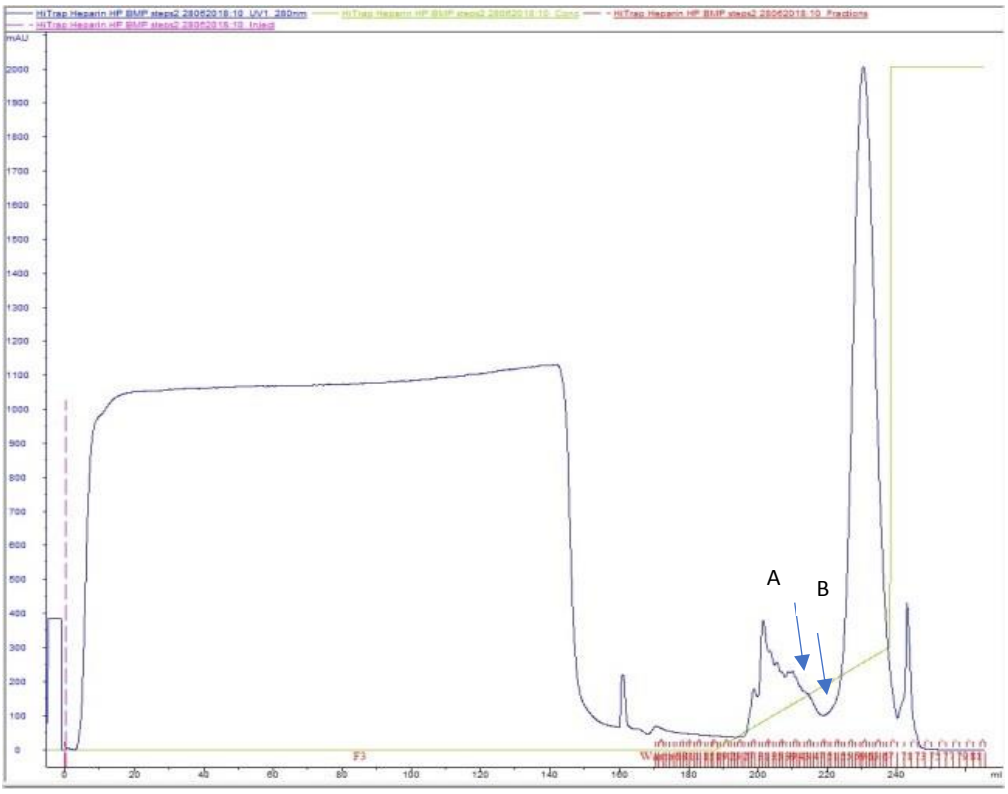
dimérica (~25kDa) relativo ao padrão de rhBMP-2 (Genscript) no SDS- PAGE, passaram pela segunda purificação em HPSEC.

Figura 14 - Purificação da hBMP-2 por cromatografia de afinidade à heparina (Hitrap Heparin HP). Fluido dialisado com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 foi aplicado na coluna. O mesmo tampão foi utilizado para o gradiente de NaCl de 0 a 0,3 M: (A) BL21 - 25 °C, (B) W3110 - 25 °C; (C)W3110 - 37 °C e (D) W3110 - 42°C . As setas indicam a eluição da hBMP-2 com 0,15 M NaCl correspondendo às frações de #42 e #52. Leitura feita em 280 nm e fluxo de 3 mL/min. Foram coletadas frações de 1 mL cada.

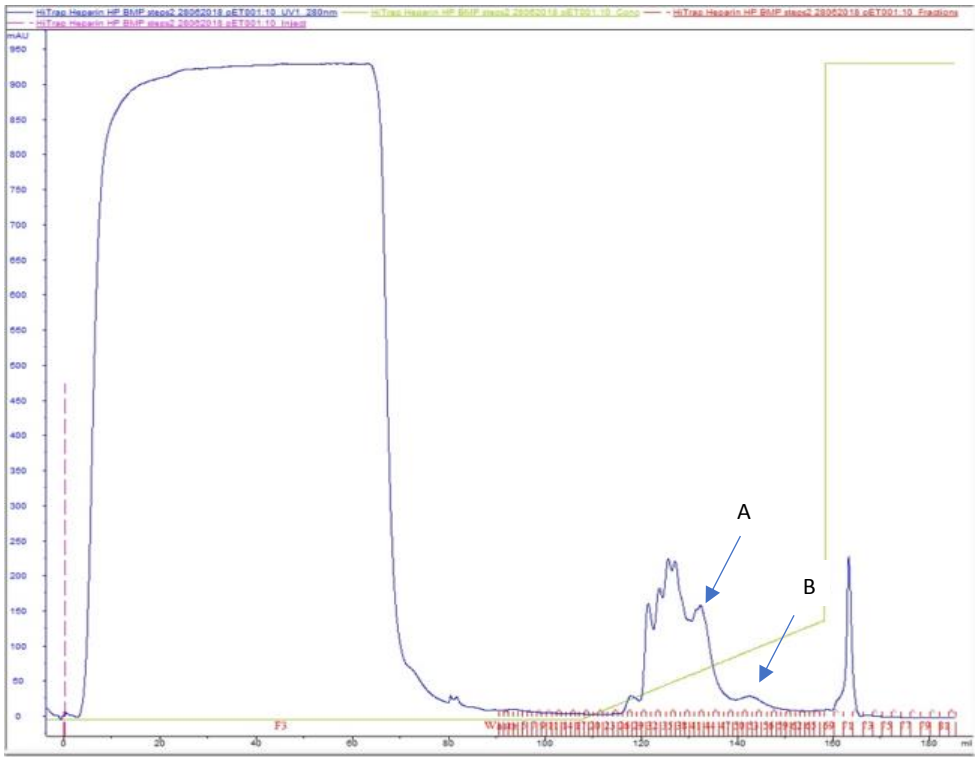
A) W3110 – 42 °C



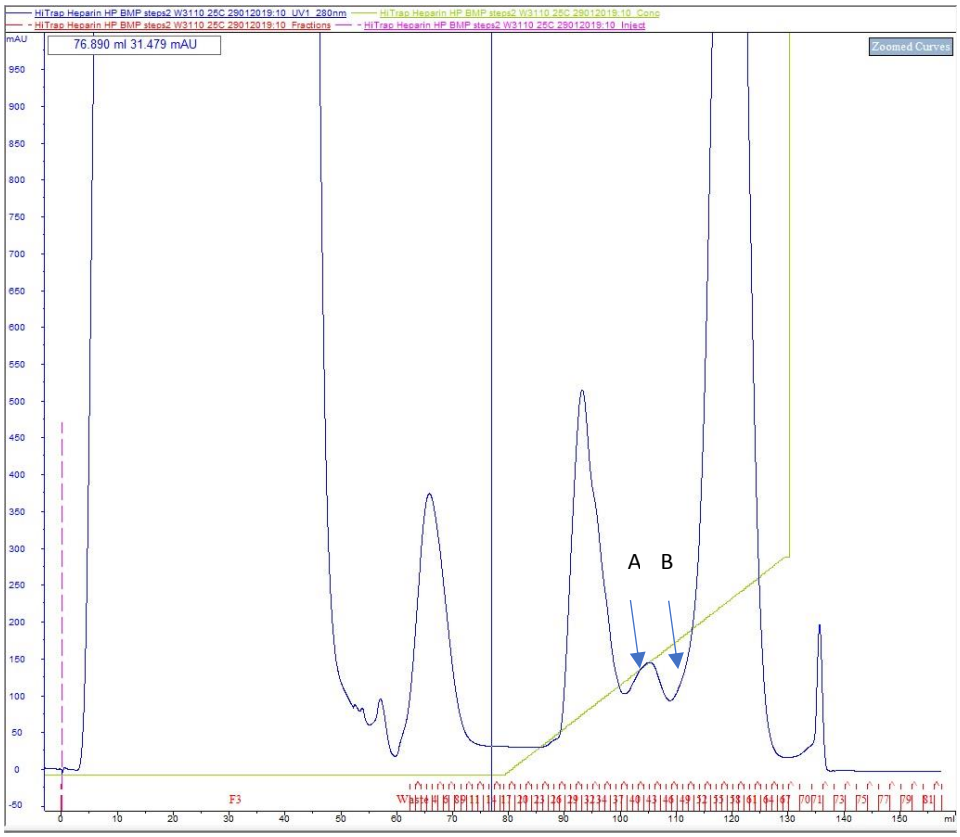
B) W3110 - 37 °C


mAU
2000
1900
1800
1700
1600
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
F3
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
ml
A
B

C) BL21 - 25 °C



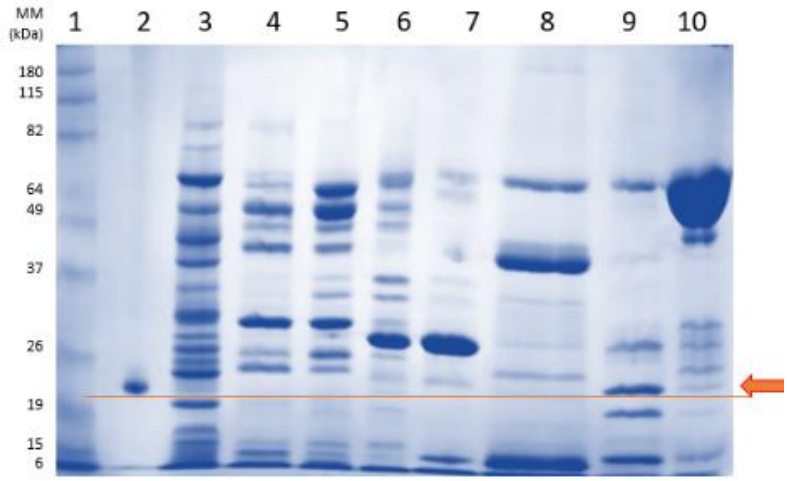
D) W3110 – 25 °C



Fonte: autora da dissertação.

Na **Figura 15** apresentamos um SDS-PAGE em condição não reduzida da estrátegia **W3110 - 42°C.** Podemos observar que as frações #43 e #53 apresentaram bandas na mesma posição dimérica do padrão de rhBMP-2 (Genscript), bandas na posição de ~30 kDa e de baixa massa molecular de cerca de 13 kDa que pode ser a forma monomérica. Também apareceram possíveis agregados acima de 50 kDa.

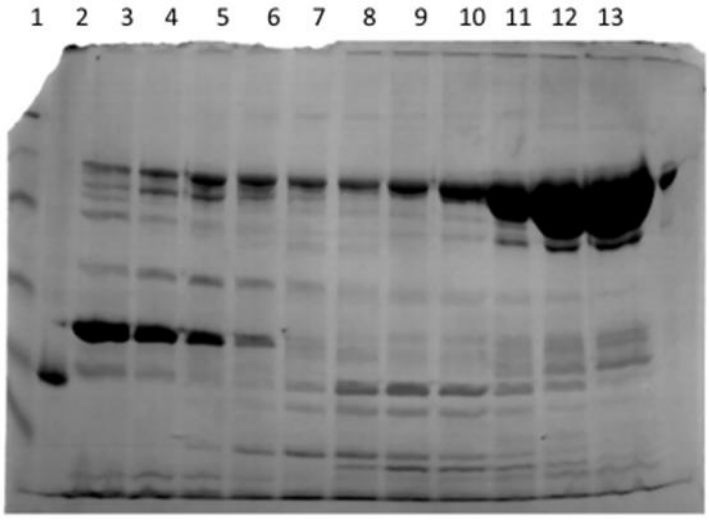
Figura 15 - SDS–PAGE 15% em condição não reduzida da amostra W3110 - 42 °C coletada da purificação de BMP-2 por cromatografia de afinidade à heparina (Hitrap Heparin HP) – gradiente de NaCl (0 – 0,3 M) em Tris-HCl 10 mM pH 7,5. 1. Marker, 2. Genscript (2018), 3. Choque pós dialise W3110-λP_L/42 °C; 4. Fração #29; 5. Fração #32; 6. Fração #37; 7. Fração #43; 8. Fração #70; 9. Fração #53; 10. Fração #60.



Fonte: autora da dissertação.

Na **Figura 16** apresentamos o SDS-PAGE com as frações coletadas da purificação com o fluido periplásmico da estratégia **W3110 - 37 °C.** As frações #40, #42, #50, #52, #54, #56 e # 58 apresentaram bandas na posição dimérica igual ao padrão de rhBMP-2 (Genscript) e uma possível forma monomérica. Também possuem bandas de massa molecular próximo a 30 kDa e de alta massa molecular superior a 50 kDa.

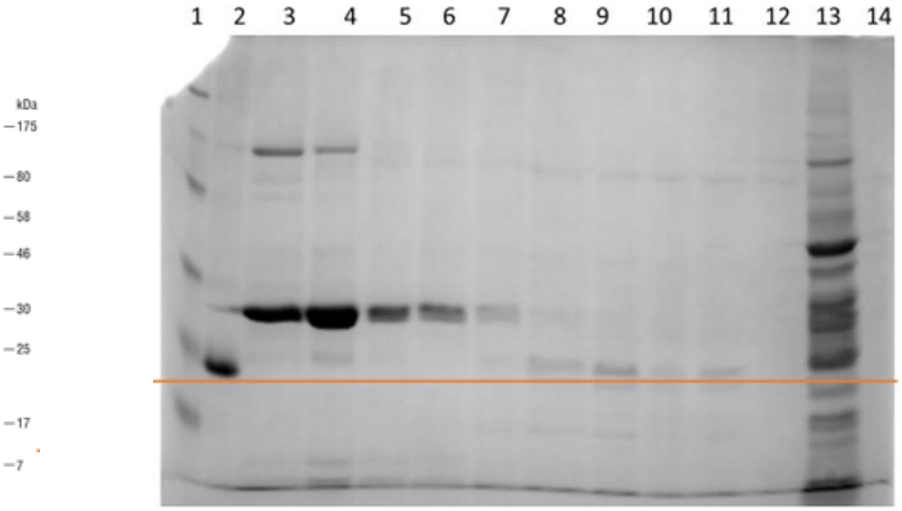
Figura 16. SDS–PAGE 15% em condição não reduzida da amostra BL21 - 25 °C coletada da purificação de BMP-2 por cromatografia de afinidade à heparina (Hitrap Heparin HP) – gradiente de NaCl (0 – 0,3 M) em Tris-HCl 10 mM pH 7,5. 1. Marker, 2. Genscript (2018), 3. Fração #40; 4. Fração #42; 5. Fração #44; 6. Fração #46; 7. Fração #48; 8. Fração #50; 9. Fração #52; 10. Fração #54;11. Fração #56;12. Fração #58; 13. Fração #60.



Fonte: autora da dissertação.

A **Figura 17** apresentamos o SDS-PAGE com as frações coletadas da purificação com o fluido periplásmico da estratégia na estratégia **BL21 - 25 °C. A**s frações #46, #50, #52, #54 mostraram posição dimérica semelhante ao padrão genscript, também exibiu a possível forma monomerica, bandas na posição de ~30 kDa e bandas de alto peso molecular acima de ~ 50 kDa. Devido a esses dados, as eluições foram divididas em A e B para cada estratégia, sendo A as eluições das frações #40 ao #46, aproximadante (a região detectada é a mesma, mas as eluições podem variar dentro dessa região conforme o pico apresentado), e o B sendo as eluições das frações #50 ao 56.

Figura 17. SDS–PAGE 15% em condição não reduzida da amostra BL21 - 25 °C coletada da purificação de BMP-2 por cromatografia de afinidade à heparina (Hitrap Heparin HP) – gradiente de NaCl (0 – 0,3 M) em Tris-HCl 10 mM pH 7,5. 1. Marker, 2. Genscript (2018), 3. Fração #40; 4. Fração #42; 5. Fração #44; 6. Fração #46; 7. Fração #48; 8. Fração #50; 9. Fração #52; 10. Fração #54;11. Fração #56;12. Fração #60; 13. Choque pós dialise BL21-pET/25 °C; 14. Fração #58



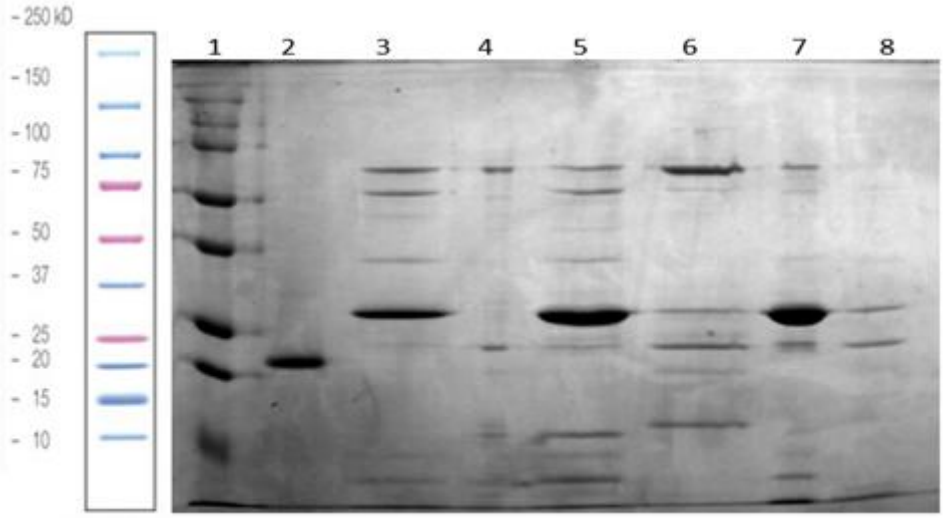
Fonte: autora da dissertação.

A estratégia D **W3110 - 25 °C**, foi posteriormente expressa e purificada, através dos resultados eminentes das três estratégias anteriores testadas, a mesma faixa de eluições da heparina conforme os picos mostrados na **Figura 14** Heparina A, B, C, e D, que indica picos semelhates nas 4 estratégias avaliadas, se diferenciando apenas por picos que possuem formações produzidas pela *E.coli* com alto peso molecular, podendo ser agregados protéicos ou corpos de inclusão (QUASS, 2018), esses agregados diminuem ou aumentam conforme a temperatura de expressão, nas duas faixas de eluições separadas A e B. Na **Figura 18 BL21 - 25 °C,** percebe-se uma produção sem o pico a esquerda que fica na faixa de eluições

noemada B (entre ~#50 ao #56), facilitando a segunda purificação, dentro as estratégia com a cepa W3110, a faixa de eluições B, nas temperaturas a 25°C e 37°C não foi possível observar com precisão, o pico ficou mais evidente e separado a 42°C. Depois de identificadas as frações A e B, estas foram homogenezidas (*feito um pool)*, concentradas em um filtro amicon 0,45 ug, para a realização da segunda purificação em HPSEC.

A **Figura 18** é um SDS-PAGE em que as três estratégias (cepa W3110 a 42°C e 37°C, e o BL21 a 25°C) foram analisadas em seus respectivos A e B conforme as eluições das frações da heparina. Percebe-se que todos os A tem um banda um pouco acima do padrão Genscript, que correspondem ao peso próximo ao dímero, e uma banda em torno dos 30 kDa. Todos os B possuem uma banda um pouco acima do padrão, provavelmente também correspondente ao dímero. Além de todos possuírem formas de alto peso molecular acima dos 50 kDa, como já mencionado baseado nos SDS da Fig. SW. A W3110 a 37°C (correspondente ao 3 e 4 da figura), na sua forma em B, possui uma banda um pouco acima de 10 kDa, indicando um possível monômero da BMP, o w3110 a 42°C (correspondem ao 5 e 6 da figura), os dois apresentaram uma banda um pouco acima dos 10 kDa. E o (BL21 a 25°C correspondente ao 7 e 8), foi o que apresentou a forma mais pura, sem bandas de alto peso molecular e possui também um possível monômero no A (7).

Figura 18. SDS–PAGE 15% em condição não reduzida das amostras coletadas da purificação BMP-2 por cromatografia de afinidade à heparina (Hitrap Heparin HP) – gradiente de NaCl (0 – 0,3 M) em Tris-HCl 10 mM pH 7,5. 1. Marker, 2. Genscript (2018), 3. A fração#42 W3110 - 37 °C, 4. B Fração #52 W3110-λP_L/37 °C, 5. A Fração pool #39-41 W3110-λP_L/42 °C, 6. B Fração pool #49-51 W3110-λP_L/42°C, 7. A Fração #42 BL21-pET/25 °C e 8. B Fração #52 BL21-pET/25 °C.



Fonte: autora da dissertação.

4.7. Segunda etapa da purificação em HPSEC, utilizada com finalidade preparativa e analítica.

Conforme descrito nas eluições da Heparina, foram separados o A e o B de cada estratégia. A estratégia w3110 42°C, o pool A frações #39-44, o pool B frações #48-54 (Fig. 19 A); a estratégia w3110 37°C, o pool A frações #40-46, o pool B frações #49-53 (Fig.19 B); a estratégia BL21-pET/25°C, o pool A frações do #39-45, o pool B Frações do #47-53 (Fig. 19 C) e a estratégia w3110 25°C, o pool A frações #39-45 e pool B frações #47-58 (Fig. 19 D). Podemos observar na **Fig. 19**a que os produtos coletados para fins preparativos foram ao mesmo tempo, analisados, em coluna de exclusão molecular (HPSEC).

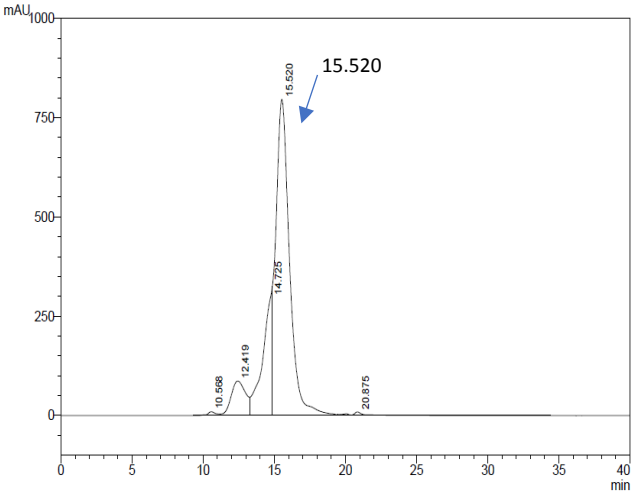
As quatro estratégias que utilizam diferentes cepas e vetores proporcionaram picos com diferentes níveis de pureza: o mais puro sendo o produto expressado em BL21-pET/25°C (com IPTG). A reprodutibilidade dos tempos de retenção (t_R), sempre de 15,6-15,8 min para o pool A e 16,4 a 16,5 para o pool B, o que é um ótimo teste de identidade para a própria hBMP-2 obtida em quatro diferentes sistemas.

Os mesmos produtos foram coletados nos t_R ~ 15 min para pool A e ~ 16 min para pool B, e reanalizados na mesma HPSEC, o que forneceu os cromatogramas apresentados na **Fig.19 b**. É evidente que, a este ponto, os produtos apresentam praticamente a mesma pureza (>95%), continuando com os mesmos t_R=15,7 - 15,8 min para pool A, e para o pool B aumentou de forma insignificante permanecendo em ~16.7 . Além disto, a purificação em Heparina, proporcionou 728 μg de produto liofilizado, com 60,8% de rendimento total. O padrão Genscript, já analisado nos capítulos anteriores introduz, porém, uma fonte de incerteza sendo o t_R do seu dímero aproximadamente ~ 20,4 min. Lembramos assim que este padrão é um dímero de met-hBMP-2, que a mesma Genscript recomenda seja reconstituído com ácido acético 20 mM e que, infelizmente, o ácido acético passado sozinho na mesma coluna, produz um pico com o mesmo t_R = 20 min. Dos 4 produtos purificados, através de duas etapas cromatográficas, **dois apresentaram atividade biológica em células C2C12** satisfatória **(ver capitulo 4.11)**.

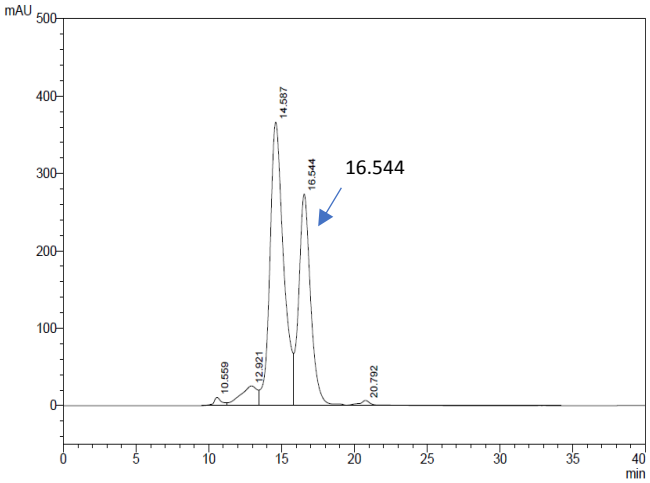
Figura 19a. HPSEC preparativa e analítica da hBMP-2 coletada da heparina: (A) pool coletado das frações #42 e 43, BL21-pET/25 °C (500 µL); (B) pool coletado das frações #42 e 43, W3110-λP_L/37 °C (500 µL); (C) pool coletado das frações #39 e 41, W3110-λPL-Rep/42°C (500 µL)

A) W3110–λP_L-Rep/42°C

Pool A

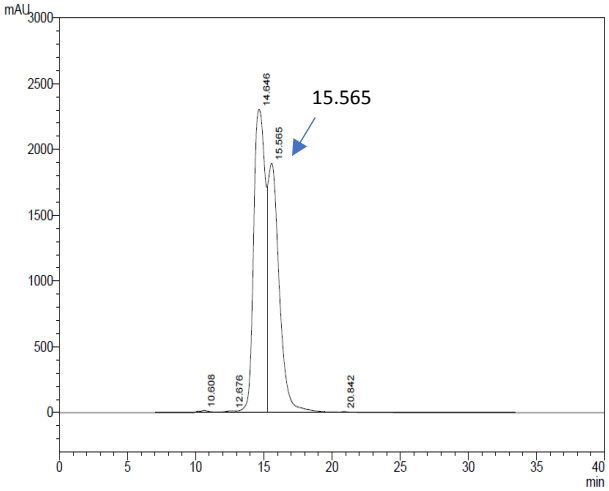


Pool B

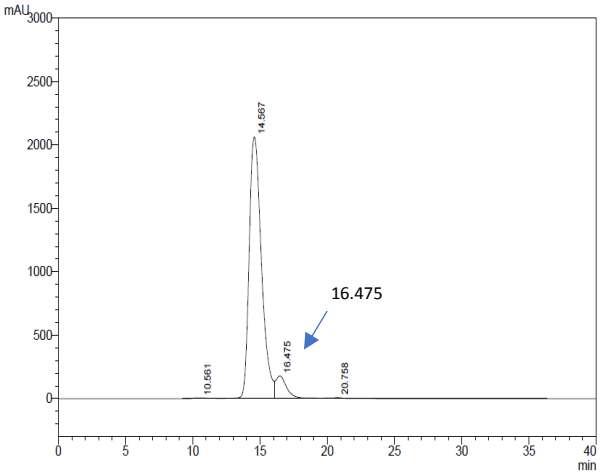


B) W3110–λP_L/37°C

Pool A

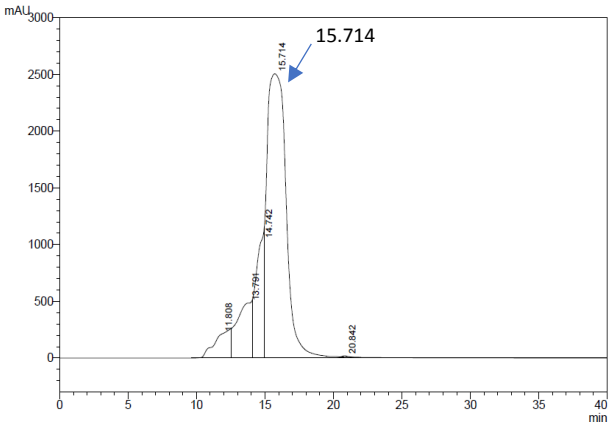


Pool B

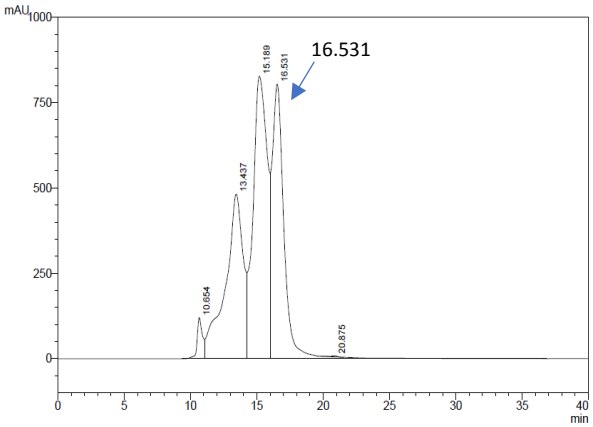


C) BL21-pET/25°C

Pool A

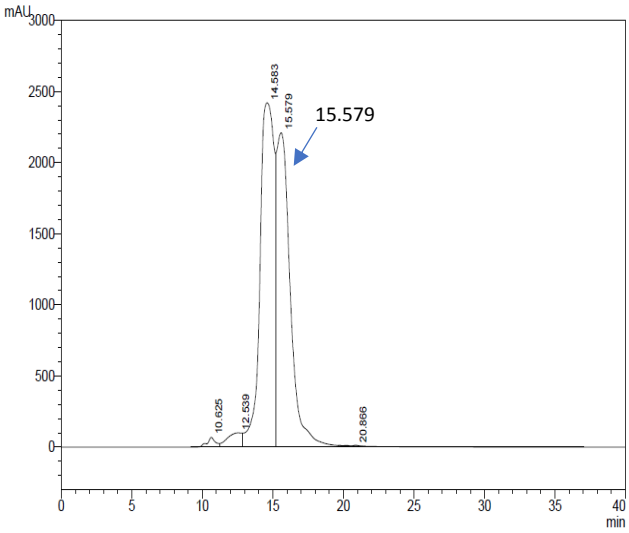


Pool B

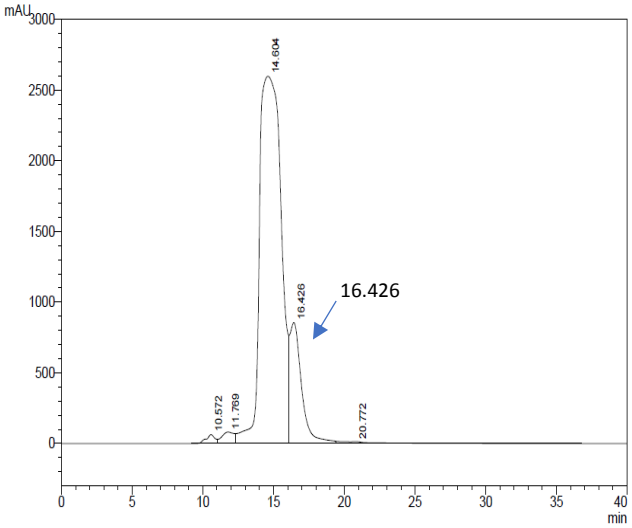


D)W3110–λP_L/25°C

Pool A



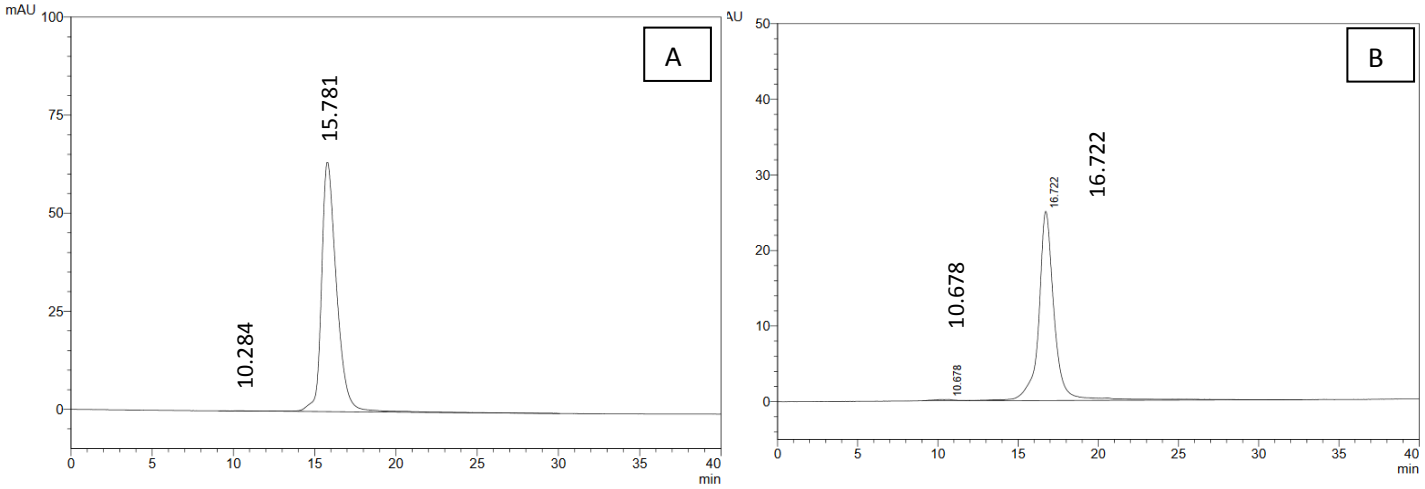
Pool B



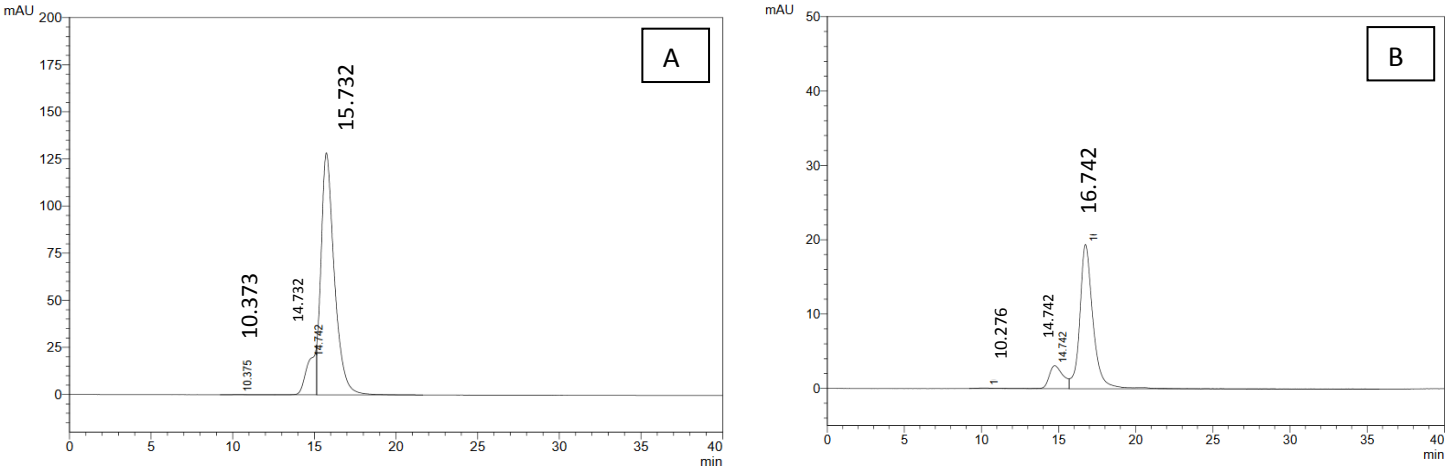
Fonte:autora da dissertação

Figura 19 b. Análise em HPSEC da hBMP-2 purificada: (A) produto purificado da cepa BL21-pET/25°C (100 µL); (B) produto purificado da cepa W3110-λPL/37°C (100 µL); (C) produto purificado da cepa W3110-λPL-Rep/42°C, fração A (100 µL); (D) produto purificado da cepa W3110λPL-Rep/42°C, fração B; (E) Padrão de *E. coli* Genscript (10 µg).

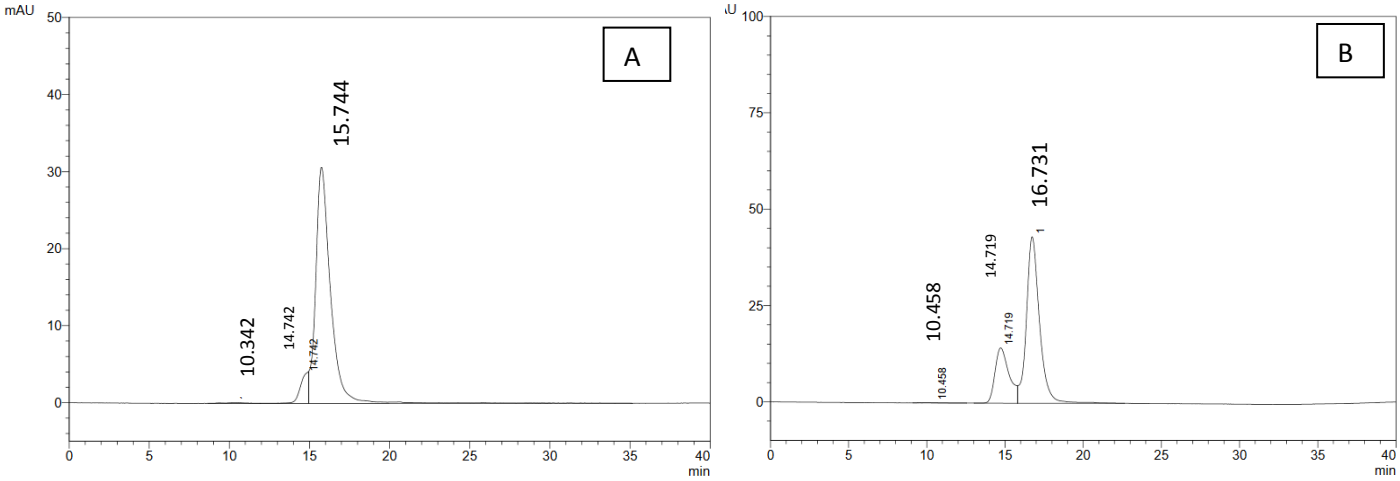
a) BL21-pET/25°C



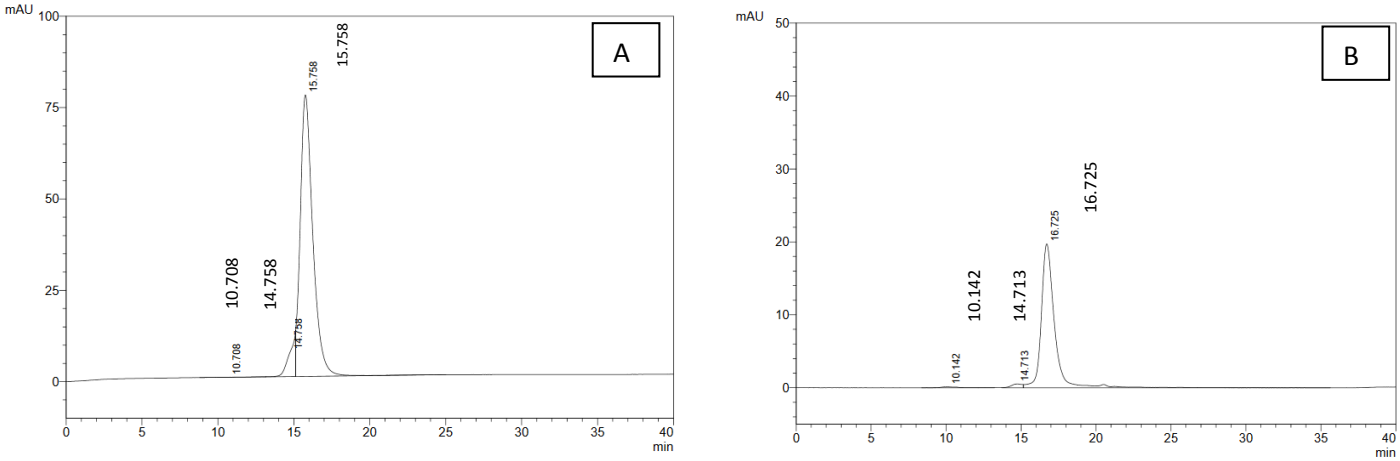
b) W3110–λP_L/25°C



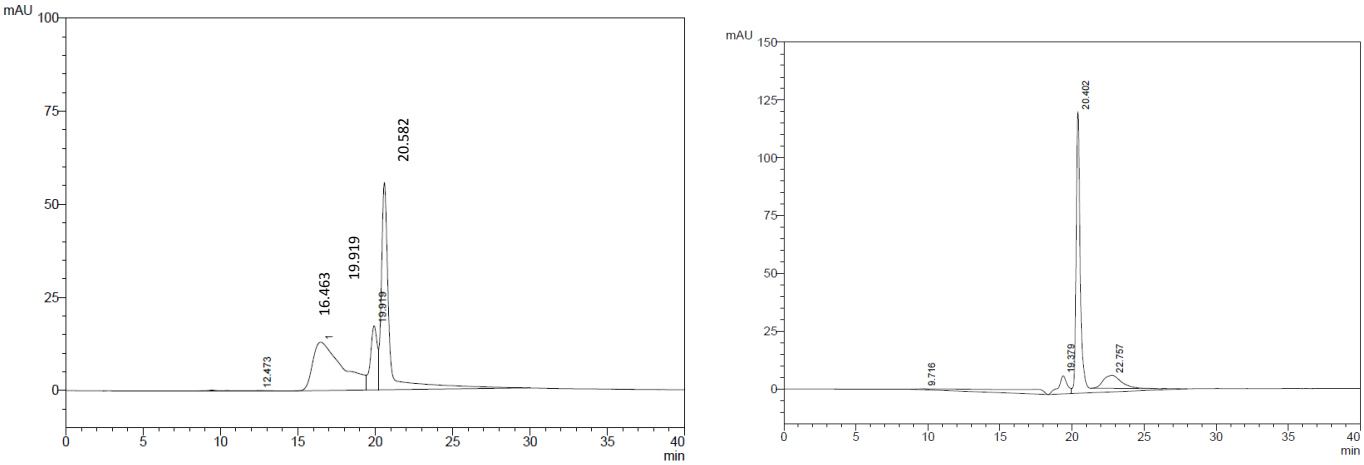
c)W3110–λP$_L$/37°C



d)W 3110- λP$_L$/42°C



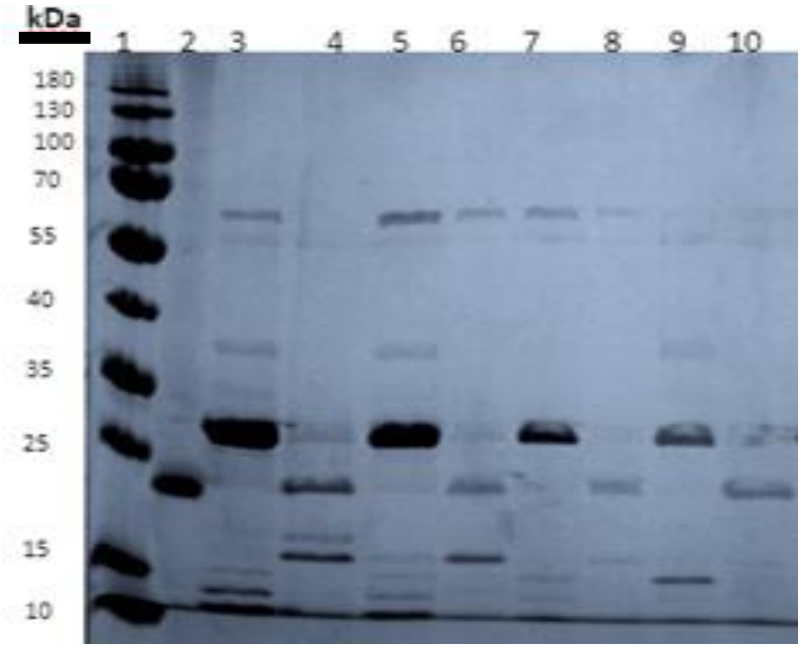
e) Infuse e Genscript



Fonte: Autora da dissetação

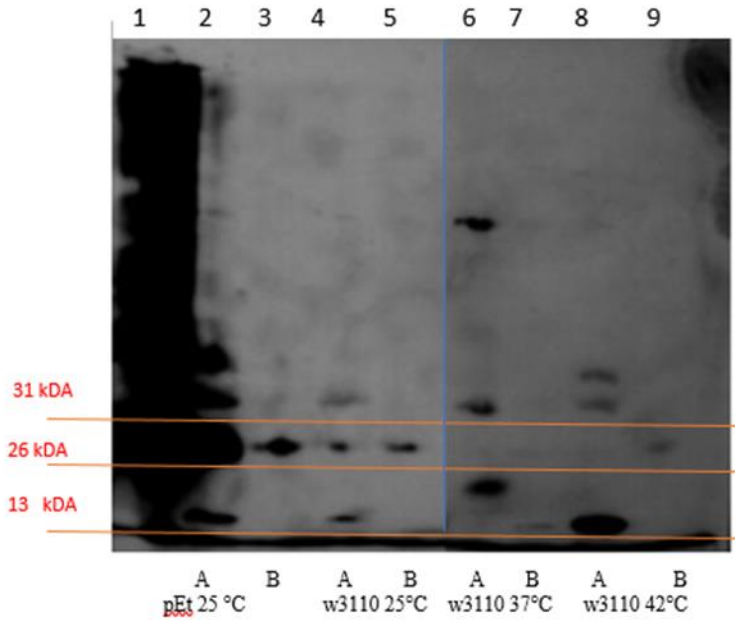
O gel de eletroforese (Fig. 20), exibe que os produtos da segunda purificação em HPSEC nos pools A e B apresentam separação de bandas protéicas semelhantes, revelando assim que nas 4 formas, mas em quantidades variantes, é possivel verificar o dimero em ~24 kDa no pool B das 4 amostras na posição do padrão Genscript, e no pool A bandas na posição de ~30 kDa e possíveis monômeros em ~ 13 kDa. Com o wester bloot (Fig. 21) é possível determinar se algumas dessas bandas separadas em eletroforese, de fato são BMP (BLANCHER, 1990). O pET 25°C, no A havia banda na posição do dímero, o B exibiu banda na posição do dímero e monômero, w3110 25°C A e B possuem bandas nas posições diméricas e A também a monomérica, w3110 37°C o A exibiu formas na posição dimérica, monomérica, e o B apenas monomérica, o w3110 42°C revelou formas na posição dimérica em B, e o A um grande quantidade monomérica. Todos os A das 4 estratégias, apresentaram uma banda ~31 kDA.

Figura 20. SDS–PAGE 15% em condição não reduzida das amostras coletadas da segunda purificação de BMP-2 em HPSEC – gradiente de NaCl (0 – 0,3 M) em Tris-HCl 10 mM pH 7,5. 1. Marker, 2. Genscript (2018), 3. BL21 25 °C (A), 4. BL21 25 °C (B), 5. W3110 25 °C (A), 6. 5. W3110 25 °C (B), 7. W3110 37 °C (A), 8. W3110 37 °C (B), 9. W3110 42°C (A) produção 300119, 10. W3110 42°C (B).



Fonte: autora da dissertação.

Fig.21 WB. 20. Western Bloot das proteínas separadas em SDS- PAGE 1. Padrão Genscript (2018), 2. BL21 25 °C (A), 3. BL21 25 °C (B), 4. W3110 25 °C (A), 5. W3110 25 °C (B), 6. W3110 37 °C (A), 7. W3110 37 °C (B), 8. W3110 42°C (A) produção 300119, 9. W3110 42°C (B).

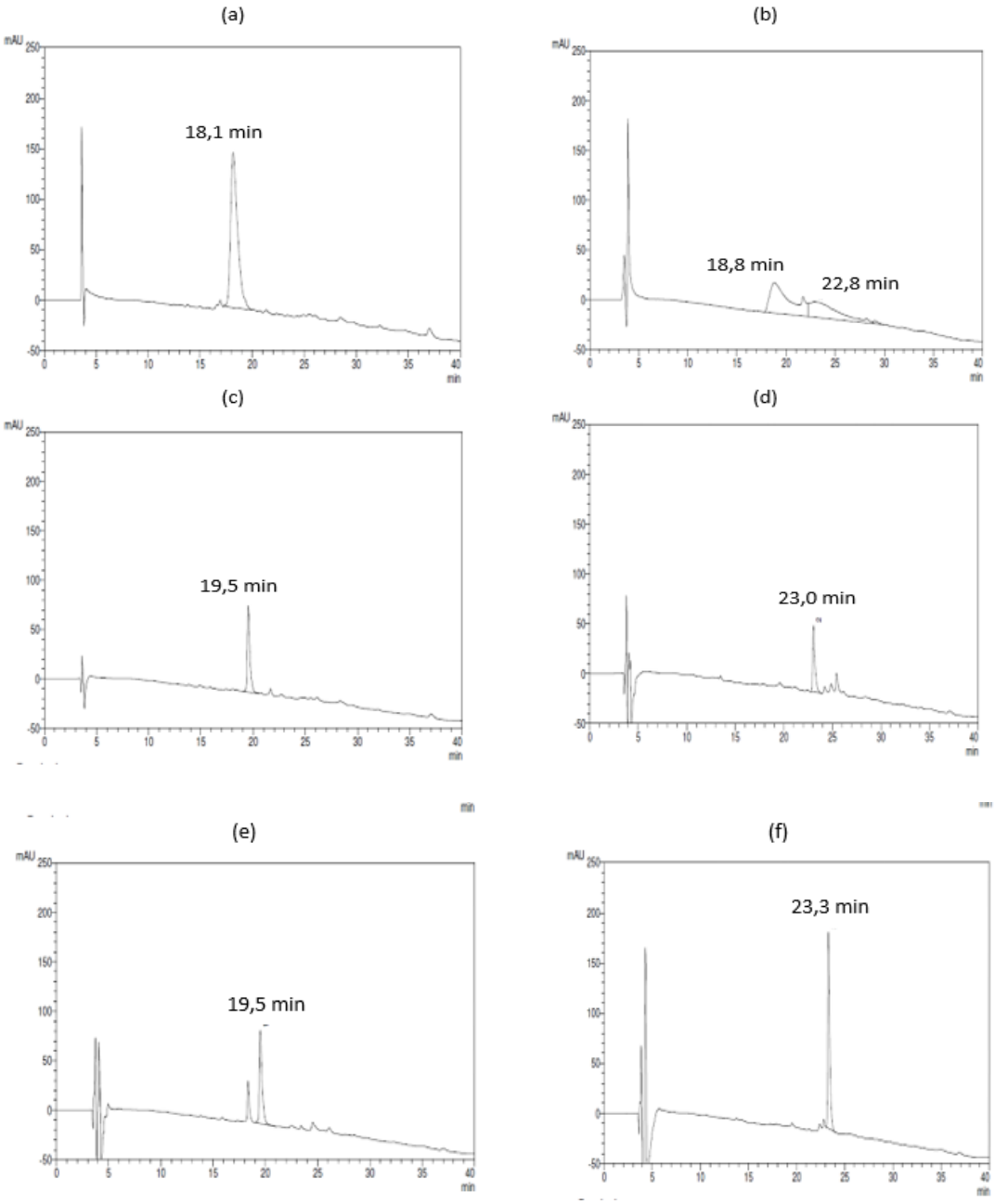


Fonte: autora da dissertação

4.8 Análise em HPLC – fase reversa

Para confirmar a identidade dos produtos, foi utilizada HPLC de fase reversa (RP-HPLC) **Figura 22** na espera dos dados relativos às massas moleculares a serem obtidos mediante MALDI-TOF-MS. Foram escolhidas a estratégia BL21 25°C, pela pureza nas duas purificações e atividade biológica. E das 3 estratégias restantes em w3110, o w3110 42°C foi o que demosntrou maior atividade biológica em células C2C12 (ver depois Capitulo 4.11). As frações em A de ambas as estratégias pEt 25°C e w3110 42°C, respectivamente em (c) e (e), obtiveram tempos de retenção iguais em 19,5 min, próximos ao primeiro pico do infuse (b) INFUSE em 18,8 min, sendo que este mesmo pico se assemelha ao do padrão Genscript em 18,1 min. As formas B das estratégias em (d) e (f) na **Figura 21**, tiveram praticamente o mesmo tempo de retenção (d) 23,0 min e (f) 23,3 min, sendo aproximados ao segundo pico do INFUSE (b) em 22,8 min. Lembrando que a ErhBMP não possui sítios de glicozilação, mas as estratégias aplicadas, os tempos de retençao foram semelhantes aos do INFUSE, provavelmente porque a análise em HPLC é por hidrofobicidade.

Figura 22. Análise em RP-HPLC da rec-hBMP-2: (a) padrão produzido em CHO (Infuse), (b) padrão produzido em *E. coli* (Genscript) após um ano de estocagem, (c) hBMP-2 produzida em cepa BL21 25 °C, fração A, (d) hBMP-2 produzida em cepa BL21 25 °C, fração B, (e) hBMP-2 produzida em cepa W3110 42°C, fração A, (f) hBMP-2 produzida em cepa W3110 42°C, fração B.



Fonte: autora da dissertação.

4.9 Análise de rendimentos da purificação em Heparina e HPSEC

Como podemos observar na Tabela 3**,** as três purificações da fração A possuíram rendimento relativo a massa inicial acima de 50% na purifição em Heparina, e acima de 50% em HPSEC. O rendimento total envolvendo as duas purificações, foram em torno de ~ 35% para as purificações advindas da cepa w3110 e 60,8% para o BL21 25°C, sendo o melhor rendimento adquirido.

A purificação da estratégia w3110 42°C segue-se pelo 42,6 µg/ml encontrados nos 80 ml de choque, por um total de 1600 µg que são derivados dos 3 litros de meio condicionado, com 3,32 A_{600} (ou seja, com uma atividade específica de 0,16 µg/ml/A_{600}). Este material proporcionou 568 µg no pico eluído da Heparina na fração A, com um rendimento para esta etapa de 53,4%. Foram aplicados do eluato da Heparina na segunda purificação em HPSEC 143, 4 µg, a coleta do eluato da HPSEC foi de 574 µg, derivados do valor inicial de 1600 µg, com um rendimento para esta etapa de 67,40%. Estas duas purificações forneceram um rendimento total de 35,3 %.

A purificação da estratégia w3110 37 °C segue-se pelo 79,5 µg/ml encontrados nos 141 mL de choque, por um total de 1692 µg que são derivados dos 3 litros de meio condicionado, com 3,72 A_{600} (ou seja, com uma atividade específica de 1692 µg = 0,15 µg/mL/A600). Este material proporcionou 1012 µg no pico eluído da Heparina na fração A, com um rendimento para esta etapa de 59,8%. Foram aplicados do eluato da Heparina na segunda purificação em HPSEC 150, 8 µg, a coleta do eluato da HPSEC foi de 603 µg, derivados do valor inicial de 1692 µg, com um rendimento para esta etapa de 59,60%. Estas duas purificações forneceram um rendimento total de 35,9 %.

A purificação da estratégia BL21 25°C segue-se pelo 18,83 µg/ml encontrados nos 65 ml de choque, por um total de 1224 µg que são derivados dos 2 litros de meio condicionado, com 3,74 A_{600} (ou seja, com uma atividade específica de 0,16 µg/ml/A_{600}). Este material proporcionou 1024 µg no pico eluído da Heparina na fração A, com um rendimento para esta etapa de 83,7%. Foram aplicados do eluato da Heparina na segunda purificação em HPSEC 186,4 µg, a coleta do eluato da HPSEC foi de 745 µg, derivados do valor inicial de 1224 µg, o rendimento para essa etapa foi de 72,70%. Estas duas purificações forneceram um excelente rendimento total de 60,8%. Se os mesmos parâmetros fossem

mantidos no fermentador de 150 L, ainda calculando 0,16 µg/ml/A_{600} e uma OD = 30 A_{600}, cada fermentação poderia fornecer 720 mg de hBMP-2 ou 603 mg de produto purificado, o que não é certamente desprezível.

Tabela 4. Análise quantitativa Heparina e HPSEC

Estratégia	W3110 42 °C	W3110 37 °C	BL21 25 °C
Meio condicionado	3 litros	3 litros	2 litros
Quantidade	1600 µg = 0,16 µg/mL/A600	1692 µg = 0,15 µg/mL/A600	1224 µg = 0,16 µg/mL/ A600
A600	3,32	3,72	3,74
Choque osmótico	80 mL	141 mL	65 mL
Eluato da Heparina em HPSEC – aplicado 500 ul	142 µg	253 µg	256 µg
Total (fração A em 2 mL)	568 µg	1012 µg	1024 µg
Rendimento heparina pos purificação	53,20%	59,80%	83,70%
Eluato HPSEC aplicado 100 ul	143, 4 µg	150, 8 µg	186,4 µg
Total (fração A em 2 mL)	574 µg	603 µg	745 µg
Rendimento HPSEC	67,40%	59,60%	72,70%

Fonte: autora da dissertação.

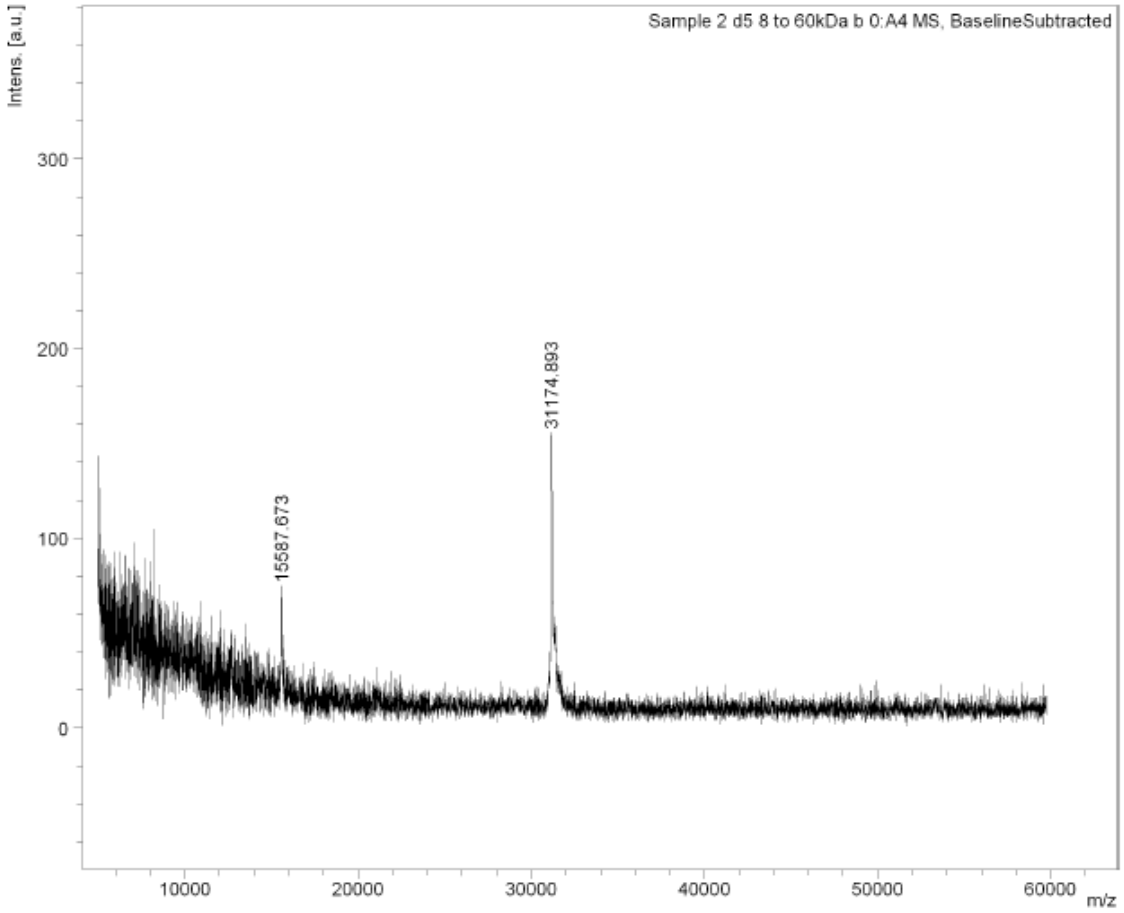
4.10 Análise mediante MALDI-TOF-MS dos produtos obtidos e comparação com os padrões Genscript e Infuse

Dos quatro, três dos diferentes produtos de hBMP-2 obtidos após as duas etapas de purificação (BL21 25°C; W3110 37°C e W3110 42°C) foram também analisados por

MALDI-TOF-MS com os dois padrões, especialmente para poder avaliar, pela técnica mais confiável, suas MMs e suas composições em termos de monómero e dímero.

A avaliação relativa ao BL21 25°C é uma composição especialmente dimérica com uma presença de monómero talvez <10%. Sua MM, porém, é aproximadamente 17,2% superior à MM teórica da proteína autêntica (31 kDa). Este fato, mesmo considerando que o produto possui uma alta atividade biológica em célula C2C12, merece ser investigado, sendo que poderia significar uma clivagem incorreta de seu peptídeo sinalizador.

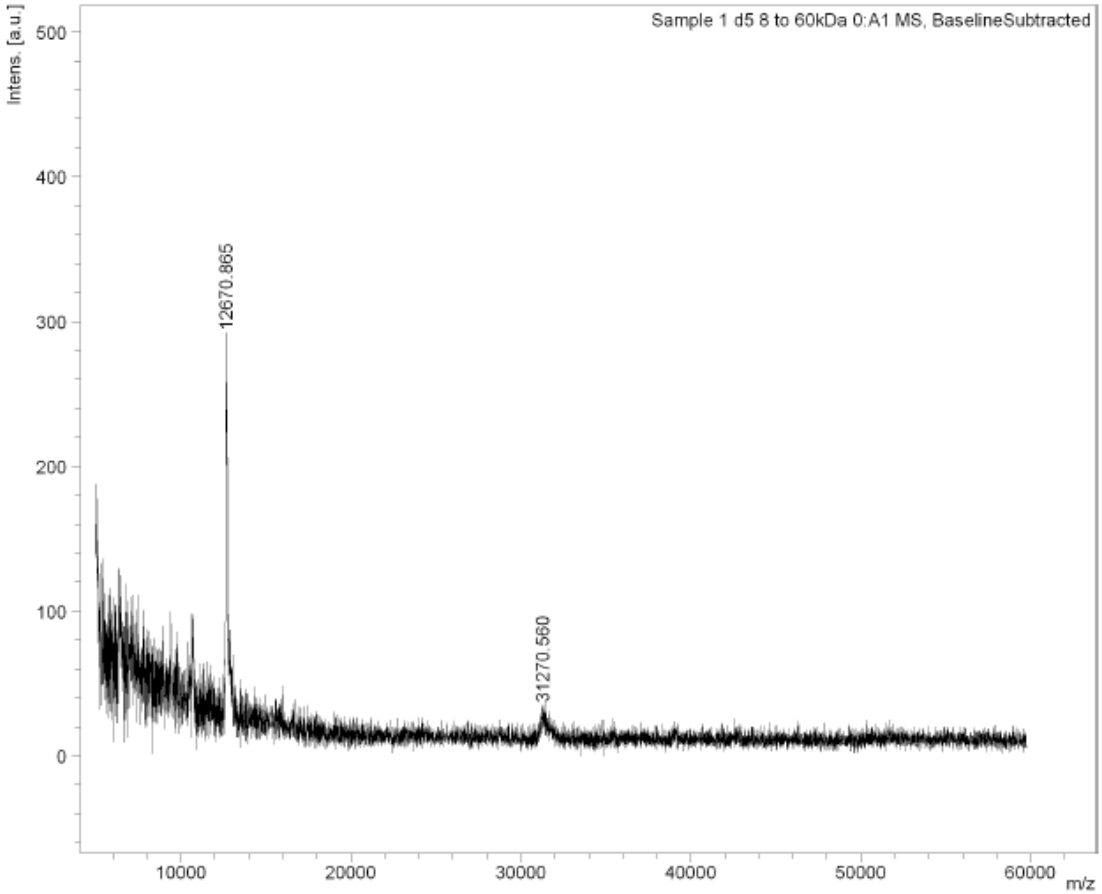
Figura 23. MALDI-TOF-MS do produto purificado obtido pela estratégia BL21 25 °C.



Fonte: autora da dissertação.

O produto W3110 37°C, apresenta predominância de uma forma monomérica, cuja MM é somente 1,8% inferior ao valor esperado de 12.904 Da. E possui outro pico, de 31270 Da não está propriamente na posição do dímero, mas na mesma posição a avaliação relativa do BL21 25°C.

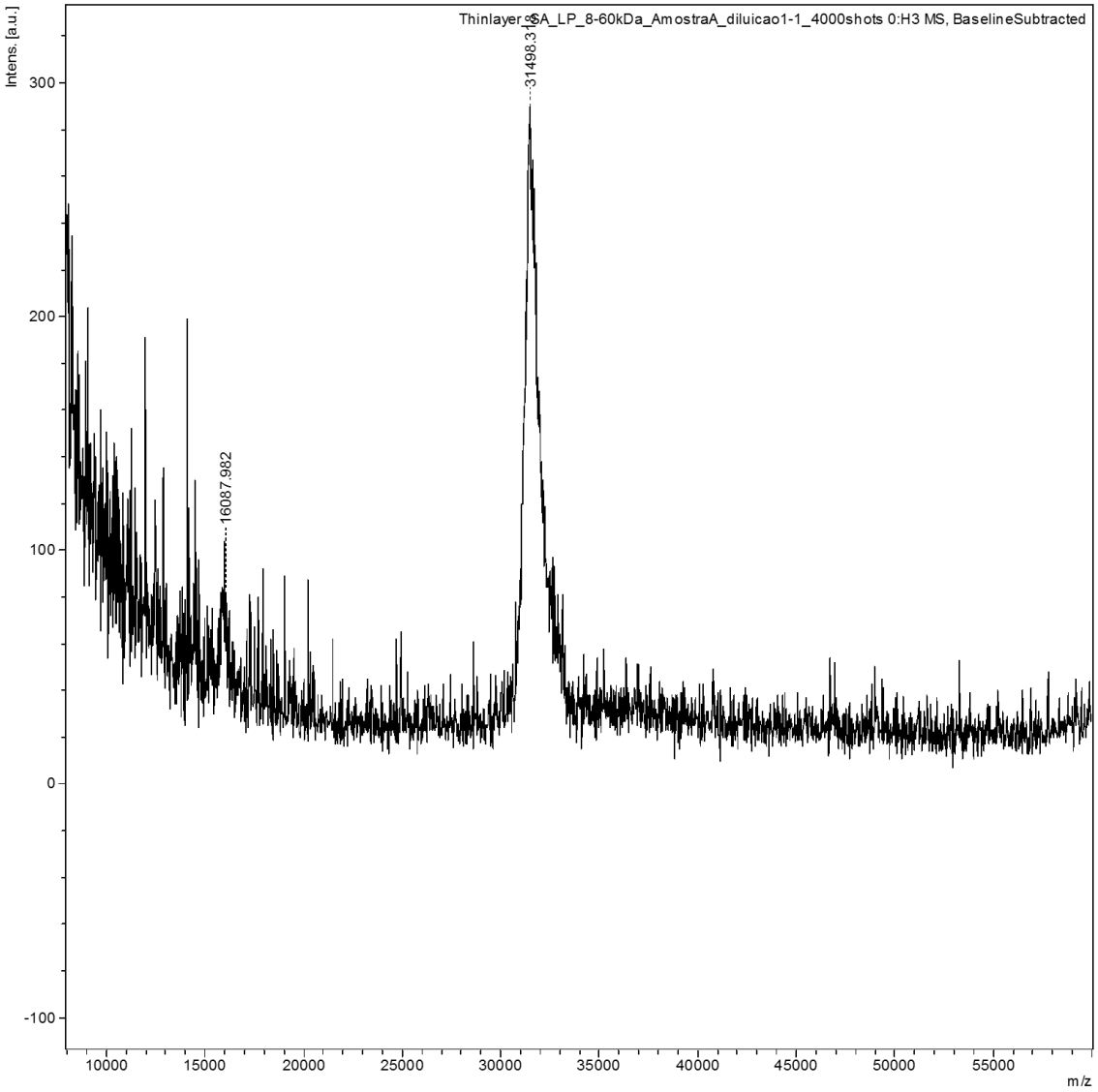
Figura 24. MALDI-TOF-MS do produto purificado obtido pela estratégia W3110 37 °C.



Fonte: autora da dissertação.

O produto W3110 42°C pool A, massa de 31.498 Da diferente somente de 0,7-1,0 % com relação às duas massas determinadas anteriormente. Isto indica com alta probabilidade tratar-se da mesma molécula obtida pelas três diferentes estratégias. De fato, considerando os 3 valores de 31.174 Da, 31.271 Da e 31.498 Da, podemos calcular um valor médio = 31314,3±166,3 (CV=0,53%), o que indica uma alta exatidão na determinação da mesma estrutura molecular.

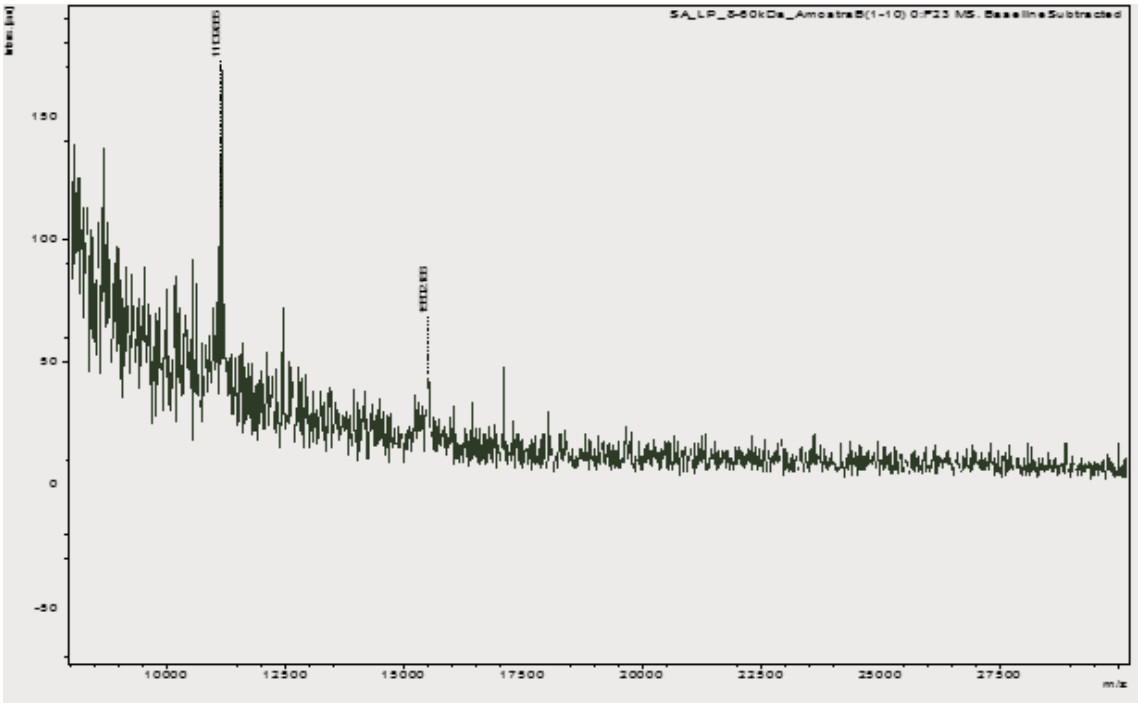
Fig.25. MALDI-TOF-MS do produto purificado obtido pela estratégia W3110 42°C, em posição A



Fonte: autora da dissertação.

O produto W3110 42°C pool B, massas de 11.140 Da e 15.502 Da, posição altamente monomérica. Com porcentagem menor de 1 % em variação comparado ao padrão monomérico da literatura 12.000 Da.

Fig.25. MALDI-TOF-MS do produto purificado obtido pela estratégia W3110-λPL-Rep/42°C em posição B

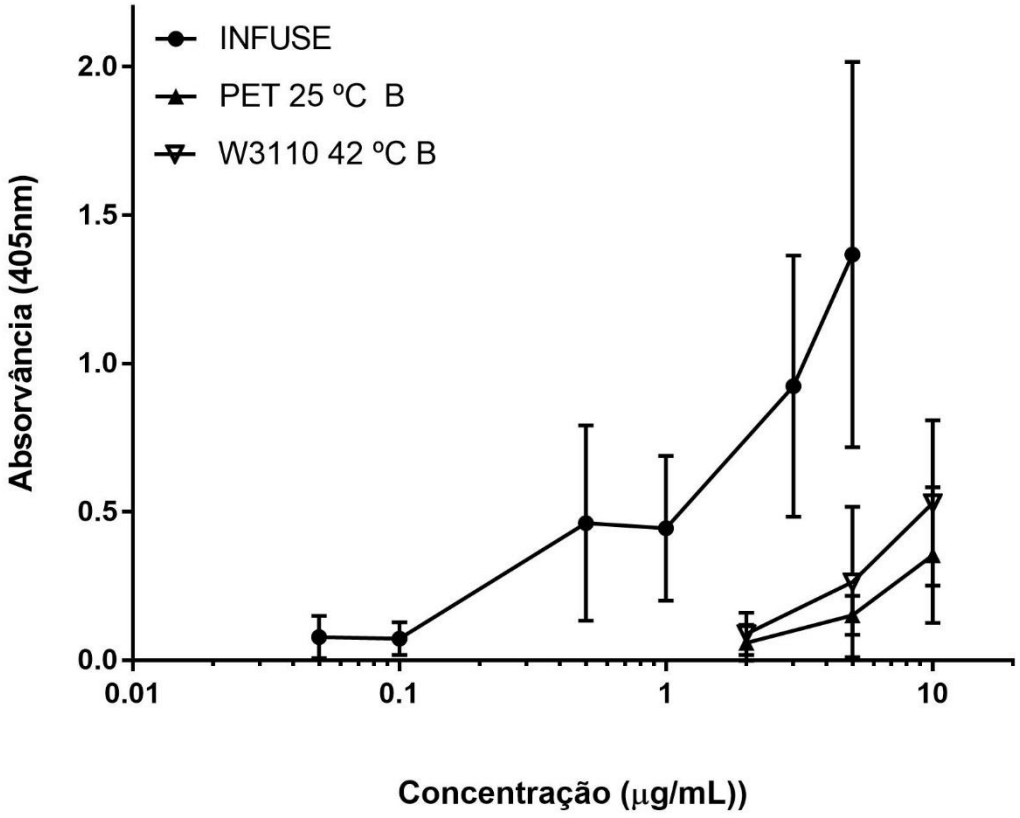


Fonte: autora da dissertação.

4.11. Avaliação da atividade biológica em células C2C12 dos produtos obtidos.

A avaliação da atividade biológica em células C2C12 foi feita com as frações A e B (das três tempetaraturas e vetores abordados neste trabalho) da segunda purificação em HPSEC, coletas dos picos de interesse da A (15 minutos) e B (17 minutos). O cálculo em dose resposta, baseia-se na concentração da porcentagem da atividade celular do controle, em comparação com a atividade das células expostas as amostras e ao mesmo reagente, que induz a produção de fosfatase alcalina na presença de BMP (NAKAMURA, 2011). Conforme os dados (ver **Figura 26**), das oito amostras a w3110 42°C B e o BL21 25°C B obtiveram atividade biológica, cerca de 1/3 menor que o Infuse. Na concentração de 10µg/mL das estratégias, aproximadamente, pode-se dizer que equivale a ativadade do Infuse em 1 µg/mL.

Figura 26. Avaliação da atividade biológica da indução da fosfatase alcalina em células C2C12. Atividade celular da segunda purificação em HPSEC do produto purificado da cepa BL21 25°C, coleta em 17 minutos da fração B; Atividade celular da segunda purificação em HPSEC do produto purificado da cepa W3110 42°C, coleta em 17 minutos da fração B.



Fonte: autora da dissertação.

4.12. Fermentação em biorreator MBR tipo piloto (20 L) com controle de temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido e adição de glicose mediante sistema "fed-batch"

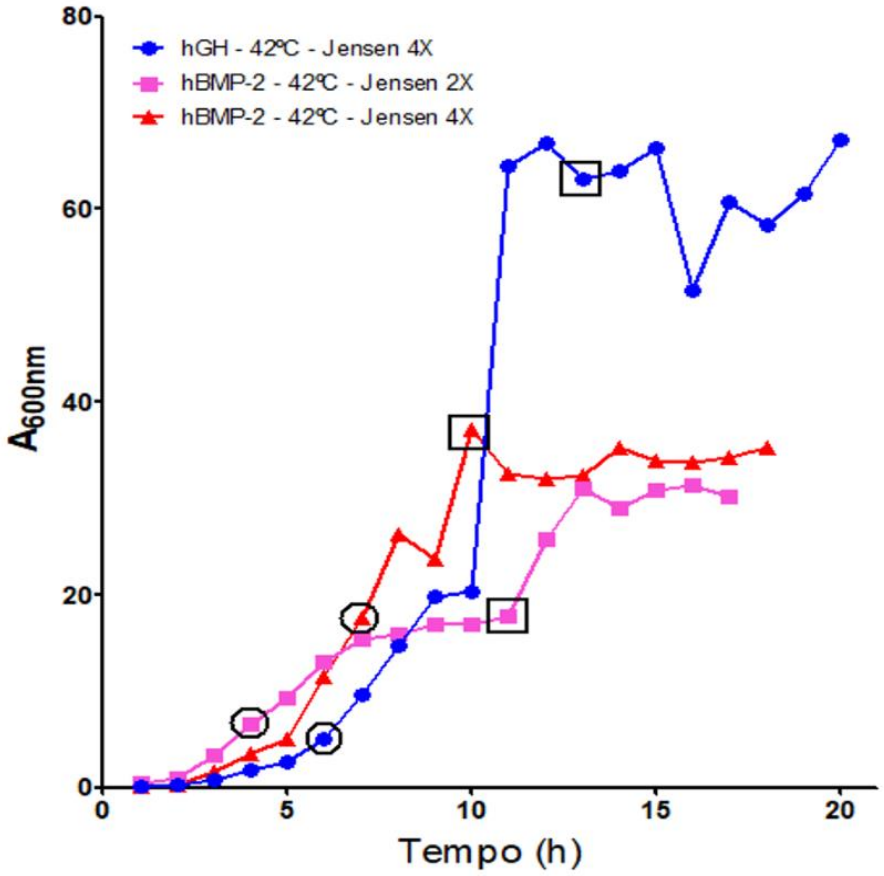
4.12.1. Primeira fermentação "teste" simulando antiga fermentação realizada para produção de hGH na mesma cepa.

A primeira fermentação, podemos observar na **Figura 27,** foi realizada tentando reproduzir um experimento já realizado pelo grupo para produção de hormônio de crescimento (hGH) e, também, com a finalidade de testar o funcionamento do biorreator.

No caso da hBMP-2 foram utilizadas quantidades maiores de glicose (fed-batch), respectivamente 3,6 e 5,4 g/L/h e, em contrapartida, um meio menos rico: Jensen 2X ao

invés de Jensen 4X **(**JENSEN and CARLSEN, 1990). Talvez por estas razões a expressão específica de hBMP-2 foi bem menor (0,12-0,06 µg/ml/A_{600}) e não aumentou progressivamente com o tempo de ativação a 42°C. O rendimento em biomassa, mesmo não atingindo as 60 A_{600} obtidas para o hGH (SOARES, 2009), que foi o trabalho base para esse ensaio, foi aceitável: ~30 A_{600}.

Figura 27. Fermentação em biorreator no volume de 5 L. **(A- em azul)** W3110-λP_L-hGH-Rep/42 °C com meio Jensen 4x, **(B – em rosa)** W3110-hBMP-2-Rep/42 °C com meio Jensen 2x e **(C – em vermelho)** W3110-hBMP-2-Rep/42 °C com meio Jensen 4x. Os círculos indicam a adição de glicose (fed batch) com $A_{600,}$ respectivamente: 2,4 g/l/h, 3,6 g/L/h e 2,4 g/L/h. Os quadrados a elevação da temperatura de 30 °C para 42 °C quando atingido o platô de crescimento.



Fonte: autora da dissertação.

Considerações Finais

A produção da rhBMP-2 proposta neste trabalho, foi atingida com atividade biológica ativa nas estratégias w3110 42°C B e BL21 25°C B. Formas diméricas e monoméricas foram comprovadas com SDS- PAGE, WB e HPLC para as quatro estratégias, porém não obtiveram atividade. O MALDI-TOF-MS é um ótimo parâmetro para confirmar a presença do dímero, porém suas massas não foram equivalentes ao do padrão; no caso do pET39b a massa molecular foi 17,5% maior que a do padrão Genscript, porém essa massa molecular de ~ 31 kDa foram reprodutíveis em todo o processo nas 4 estratégias. O peso molecular teórico da forma dimérica da rhBMP-2 é de 25,8 kDa para o dímero ligado por dissulfureto e 12 kDA para a forma monomérica. Mas, nas análises realizadas por outros grupo de pesquisa, os valores também variaram, como por exemplo 28 kDa (KIRSCH, 2000). Hanamura em 1980, foi um dos primeiros que exibiu que o peso molecular das frações ativas de BMP expressadas em *e-coli*, nos quais variavam em torno de 30 kDa. Kirsch et al., demonstrou que a expressão extracelular do domínio receptor humano tipo IA da BMP-2 (BMPR-IA) também expressa em *Escherichia coli*, exibiu que a forma BMP-2 complexa por ter um excesso de 3 fold, que levou a um pico de 55 kDa, possível forma de um tetrâmero, sendo que na literatura está 53 kDa. Kirsch também obteve BMP-2 na posição dimérica em 16 kDa. Esse aumento no peso molecular não tem uma justificativa exata, possivelmente devido ao excesso de carboidratos, ou erro de clivagem e até mesmo proteínas agregadas pode estar envolvido (ROSANO, 2014).

No padrão da Genscript há uma evidente alteração que se reflete também em sua atividade biológica. O ensaio biológico, demostrou atividade, o que indica que a rBMP-2 produzida foi efetiva, sendo que as estratégias que mais possuíram atividade foi o BL21 25°C B, está não é a mais desejada para a produção, pois é necessário a utilização de IPTG, porém a estratégia W3110-Rep/42°C, fração B, obteve atividade dentre as outras temperaturas de expressão da cepa w3110.

A produção piloto em biorreator MBR tipo piloto (20 L) foi baixa, em comparação com o trabalho base, em que observa-se um incremento na expressão periplásmica de ~30

vezes, elevando as biomassas de ~3 unidades de absorbância (A600) em erlenmeyer, até 35 A_{600} em biorreator (SOARES, 2008). Os resultados mesmo abaixo do esperado foram satisfatórios, pois a produção foi eficiente.

Conforme os dados acerca do padrão Infuse®, é possível observar que a produção da rhBMP-2 em células CHO, além da proteína ser glicolisada, possui atividade biológica superior à da rhBMP-2 em *E.coli*. Neste trabalho, optou-se por permanecer com a produçao em bactéria por ser uma técnica mais simples, a *E.coli* possui crescimento rápido (o seu *doubling time* é de 20 min), meios de comunicação e condições ambientais ótimas, economicamente mais viável, os meios complexos ricos podem ser feitos de componentes prontamente disponíveis e baratos, mesmo em que sua produção perisplámisca, como a realizada nesse trabalho, os números de expressão sejam significantemente menores (ROSANO, 2014). No contexto regulatório os dois sistemas (*E.coli* e *CHO*) apresentaram o mesmo tipo de trabalho em questões práticas.

Foram obtidos no total 8 materiais, que possuem atividade, com purificação reprodutível e rendimentos acima de 50% no total das duas purificações. Em 1998, Kupler constatou a produção de BMP-2 produzida em *E.coli*, purificada (com um rendimento de 98% - apenas uma purificação em heparina), biologicamente ativa, em uma massa de 0,4 ug/mL. Neste trabalho foi desenvolvido um método com duas purificações, que tornou o material com condições excelentes de pureza, e com massas em torno de 0,16 µg/mL, biologicamente ativa. Para um possível ensaio *in vivo* seria necessário produzir uma quantidade de 2,5 para indução óssea, conforme Lee et al 2010, que na quantidade a partir de 2.5 µg/mL induziu a formação óssea. O projeto do presente trabalho já iniciou os teste *in vivo*.

Das 8 as que biologicamente são mais ativas, são a ErhBMP-2 em BL21 25°C fração A, e W3110-hBMP-2-Rep/42 °C fração B. Uma possível junção de todas essas massas levaria a um outro estudo interessante, já que é possível observar picos diferentes dos padrões Genscript e Infuse, em que deveria apenas sair um único pico. O Infuse provavelmente por possuir uma metionina a mais e ser glicosilado, e o Genscript não tem razões totalmente claras, apenas constatado que o tampão utilizado para a diluição, tem de certa forma uma interferência no decorrer do tempo. Então a possível junção das amostras não estaria fora dos parâmetros até o momento, sendo que os próprios padrões comerciais não obtém um pico único como demonstrado hoje na análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERS, R. M.; Denbow, D. M. ***Bones and Skeletal System.*** Anatomy & Physiology of Domestic Animals.Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.131-168.

AL-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A**. *Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction.*** Journal of Dental Research, Washington, v.87, n.2, p.107-118, 2008.

ANDIA, D. C.; CERRI, Paulo Sérgio; SPOLIDORIO, Luis Carlos. **Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos**. Revista de Odontologia da UNESP. 2006; 35(2): 191-98

ANDREW, E. Denker; Andrew R. Haas; Steven B. Nicoll; Rocky S. Tuan. ***Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures.*** Differentiation (1999) 64:67–76

ARICESCU, A.R.; Lu, W.; Jones, E.Y. ***A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells.*** Biological Crystallography, 2006; 10.1107

BOLANDER, M. E.; ***Regulation of fracture repair by growth factors.*** Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine, Malden, v.200, n.2, p.165-170, 1992.

BOSTROM, M. P. ***Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing.*** ClinicalOrthopaedics and Related Research,Philadelphia, v.355, p.S116-123, 1998.

BLANCHER, Christine; Jones, Adam. ***SDS-PAGE and Western Blotting Techniques.*** Methods in Molecular Medicine, vol. 57:Metastasis Research Protocols, Vol. 1: Analysis of Cells and Tissues.Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ páginas 145 – 161. 2001.

BUBNOFF, Andreas von; Cho, Ken W. Y. ***REVIEW Intracellular BMP Signaling Regulation in Vertebrates: Pathway or Network?*** Developmental Biology **239,** 1–14 (2001).

CAVALCA IA. O papel da proteína óssea morfogenética (BMP) na reparação do tecido ósseo. Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba 2011.

CARANO, R. A. D.; FILVAROFF, E. H. ***Angiogenesis and bone repair***. Drug Discovery Today, Kidlington, v.8, n.21, 2003.

COLEMAN, ***Joseph E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase*****.** Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1992. 21:441-{j3

CHO, Jae Hwan; Lee, Jae Hyup; Yeom, Jin Sup; Chang, Bong-Soon; Choon-Ki Lee; Kim, Hyoungmin; Suk, Kyung-Soo; Nam, Woo Dong; MS, Jumi Han. ***Efficacy of Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 in posterolateral lumbar fusion: an open,active-controlled, randomized, multicenter trial***.The Spine Journal 17 (2017) 1866–1874

EDGAR, Cory M.; Chakravarthy, Vinay; Barnes, George; Kakar, Sanjeev; Gerstenfeld, Louis C.; Einhorn ,Thomas A. ***Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells.*** Elsevier, Bone 40 (2007) 1389–1398.

EINEM, S. von; Schwarz, E.; Rudolph, R. ***A novel TWO-STEP renaturation procedure for efficient production of recombinant BMP-2.*** Protein Expression and Purification 73 (2010) 65–69.

GAMELL, Cristina; Susperregui, Antonio G.; Bernard, Ora; Rosa, José Luis; Ventura, Francesc. ***The p38/MK2/Hsp25 Pathway Is Required for BMP-2-Induced Cell Migration.*** Plos one, January 2011, Volume 6, Issue 1, e16477.

GAMELL C; Osses N; Bartrons R; Ruckle T; Camps M, et al***. BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3- kinase and Cdc42 activity***. .2008 J. Cell Sci 121: 3960–3970.

GLASSMAN, Steven D; Carreon, Leah; Djurasovic, Mladen; Campbell, Mitchell J; Puno, Rolando M; Johnson, John R; Dimar, John R. **Posterolateral lumbar spine fusion with INFUSE bone graft**. The Spine Journal 7 (2007) 44–49.

GERSTENFELD, Louis C.; Alkhiary,Yaser M.; Krall, Elizabeth A.; Nicholls, Fred H.,Stapleton, Stephanie N.; Fitch, Jennifer L.; Bauer, Megan; Kayal, Rayyan; Graves, Dana T.; Jepsen, Karl J.; Einhorn, Thomas A. ***Three-dimensional Reconstruction of Fracture Callus Morphogenesis***. Journal of Histochemistry & Cytochemistry.Volume 54(11): 1215–1228, 2006.

GIESELER,Gesa; Pepelanova, Iliyana; Stuckenberg, Lena; Villain, Louis; Nölle, Volker; Odenthal, Uwe; Beutel, Sascha; Rinas, Ursula; Scheper ,Thomas. ***Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography***. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016.

HANSEN, Lars H. ***The Effect of the lacY Gene on the Induction of IPTG Inducible Promoters, Studied in Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens.*** Current microbiology vol. 36 (1998), pp. 341–347

REDDI, BY A.H. ***Bone Morphogenetic Proteins:From Basic Science to Clinical Applications***. The journal of bone & joint surgery, jbjs.org volume 83-a. Supplement 1, part 1 ·2001.

RENGACHARY, Setti S. ***Bone morphogenetic proteins: basic concepts.*** Neurosurg Focus 13 (6):Article 2, 2002.

ISRAEL DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ**.** ***Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells.*** Growth Factors 1992; 7: 139-150.

JENSEN EB, Carlsen S. ***Production of recombinant human growth hormone in Escherichia coli: expression.*** Of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. Biotechnol Bioengineering 1990; 36: 1-11.

KATAGIRI, Takenobu; Watabe, Tetsuro. ***Bone Morphogenetic Proteins***.Cold Spring Harb Perspect Biol 2016;8:a021899.

Kim, Jee Yon; Kim, Yeon-Gu; Lee, Gyun Min. ***CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential***. Appl Microbiol Biotechnol (2012) 93:917–930.

KIRSCH T, Nickel J, Sebald W. ***BMP-2 antagonist emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II***. EMBO J 2000; 13: 3314-332.

KIRKER-HEAD CA. ***Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins***. Adv Drug Deliv Rev 2000; 43: 65-92

KUROIWA, Yu; Niikura, Takahiro; Lee, Sang Yang; Oe, Keisuke; Iwakura, Takashi; Fukui, Tomoaki; Matsumoto, Tomoyuki; Matsushita, Takehiko; Kotaro, Nishida; Kuroda, Ryosuke. ***Escherichia coli-derived BMP-2-absorbed β-TCP granules induce bone regeneration in rabbit critical-sized femoral segmental defects***. International Ortophedics, 2018.

LE, A.X; Miclau, T.; Hu, D.; Helms, J.A. ***Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures.*** Journal of Orthopaedic Research 19 (2001) 78 84.

LEE, Ji-Hyun; Kim, Chang-Sung; Choi, Kyung-Hee; Jung, Ui-Won; Yun, Jeong-Ho; Cho, Seong-Hoi; Cho, Kyoo-Sung.The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in Escherichia coli. Biomaterials 31 (2010) 3512–3519.

LIEBERMAN, J. R.; Daluiski, A.; Einhorn, T. A. ***The role of growth factors in the repair of bone. Biology and Clinical applications***. The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume, Boston, v. 84-A, n.6, p.1032-1044, 2002.

LIND M, Eriksen EF, Bunger C. ***Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells.*** Bone 18: 53–57. 1996.

LONG S, Truong L, Bennet K, Phillips A, Wong-Staal F, MA H**.** ***Expression, purification and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli***. Protein Expres Purif 2006; 46: 374-378

MCKAY, William F.; Peckham, Steven M.; Badura, Jeffrey M. ***A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE® Bone Graft)***.International Orthopaedics (SICOT) (2007) 31:729–734

MEDTRONIC. ***Instruções de uso, enxerto ósseo infuse***. 02/2011.

MIYAMOTO, C. A. ***Produção de proteínas recombinantes em Escherichia coli. Revista conexão eletrônica,*** 2013. p. 220–233.

MONTANARI, Tatiana. ***Histologia – Texto, atlas e roteiro de aulas práticas***. 3ªedição, Edição do autor. Biblioteca Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). pag. 71-78. Porto Alegre, 2016.

NAKAMURA T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Hasegawa-Nakamura K, Fujioka-Kobayashi M, Noguchi K. ***Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarian critical-size defects***. Clin Oral Invest 2017; 21: 2671-2679.

OLIVEIRA JE, SOARES CRJ, PERONI CN, GIMBO E, CAMARGO IMC, MORGANTI L, BELLINI MH, AFFONSO R, ARKATEN RR, BARTOLINI P, RIBELA MTCP. ***High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in Escherichia Coli periplasmic space.*** J Chromatogr A 1999; 852:441-450.

QUAAS, Bastian; Burmeister, Laura; Li, Zhaopeng; Nimtz, Manfred; Hoffmann, Andrea; Rinas, Ursula. ***Properties of dimeric, disulfide-linked rhBMP-2 recovered from E. coli derived inclusion bodies by mild extraction or chaotropic solubilization and subsequent refolding.*** Process Biochemistry.J.procbio.2018.02.001.

REDDI, A. H.; ***Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications.*** The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume. Boston, v.83-A, p.S1-S6, 2001.

RIBELA, MTCP, GOUT PW, BARTOLINI P. ***Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituritary hormones (Review)***. J_Chromatogr B, 2003; 790: 285-316

ROSANO. G. L.; Ceccarelli E.A. ***Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in Microbiology,*** 2014; 10.3389/gmicb.2014.00172

SAKOU, T. ***Bone Morphogenetic Proteins: From Basic Studies to Clinical Approaches.*** Elsevier, Bone Vol. 22, No. 6. June 1998:591–603.

SANTOS APDS, Miranda CDO, Alves MTDSA, Faloppa F. ***O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo***. ACTA ORTOP BRAS 13(4) – 2006

SAMPATH TK, Muthukumaran N, Reddi AH. ***Isolation of osteogenein, an extracellularmatrix associated, bone inductive protein, by heparin affinity chromatography.*** PNAS 1987; 84: 7109-7113

SANDBERG, M. N.; Aro, H. T.; Vuorio, E. I. ***Gene expression during***

bone repair. Clinical Orthopaedics and Related Research, New York, v.289, p.292-312, 199.

SILVA, FM. ***Desenvolvimento, caracterização e estudo pré-clínico de dispositivos implantáveis biocompatíveis no polimero poli(e-caprolactona). 2011. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares*** – IPEN/CNEN-SP, São Paulo. 88 p.

SOARES CRJ, MORGANTI L, MILOUX B, LUPKER JH, FERRARA P, BARTOLINI P. ***High-level synthesis of human prolactin in Chinese hamster ovary cells.*** Biotechnol Appl Biochem 2000;32, 127-135.

SOARES CRJ, GLEZER A, OKAZAKI K, UEDA EKM, HELLER SR, WALKER AM, GOFFIN V, BARTOLINI P. **Physico-chemical and biological characterization of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Protein Expres Purif., 2006**; 48: 182-194.

SOARES CRJ, Ueda EKM, Oliveira TL, Gomide FIC, Heller SR, Bartolini P. ***Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: temperature plays a major role in protein yields***. J Biotechnol 2008; 133: 27-35.

SUO, Guangli; Chen, Bing; Zhang, Jingyu; Gao, Yuan; Wang, Xia; He, Zhengquan; Dai, Jianwu**.** ***Expression of active hBMP2 in transgenic tobacco plants.*** Plant Cell Rep (2006) 25: 1316–1324.

TORMENA, F. V. ***Um modelo de remodelamento ósseo utilizando potenciais termodinâmicos generalizados***. 2009. 183f. Tese (Doutorado em Engenharia-PPGMNE) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TSUJI, Kunikazu; Bandyopadhyay, Amitabha, Brian D Harfe; Cox, Karen; Kakar, Sanjeev; Gerstenfeld, Louis; Einhorn, Thomas; Tabin, Clifford J; Rosen,Vicki**.** ***BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing.***VOLUME 38, NUMBER 12, DECEMBER 2006 ,NATURE GENETICS.

URIST MR. ***Bone formation by autoinduction***. Science 1965; 150: 893-899

URIST MR, STRATES BS. ***Bone morphogenetic protein***. J Dent Res 1971; 50: 1392-1406

VALLEJO LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe, S, Cabrera-Crespo J, Hoffman A, Gross G, Weich HA, Rinas U. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. J Biotechnol 2002; 94: 185-194.

SILVA, FM. ***Desenvolvimento, caracterização e estudo pré-clínico de dispositivos implantáveis biocompatíveis no polimero poli(e-caprolactona). 2011. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares*** – IPEN/CNEN-SP, São Paulo. 88 p.

VALENZUELA, Juan Carlos Bastos. ***Análise dos genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação induzida por proteínas morfogenéticas de osso (BMP2 e***

BMP7) em células c2c12 e super-expressão de rhBMBP-2 e rhBMP7 em células de mamíferos. 2008 Tese (Doutorado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo.

WANG, Elizabeth A.; Rosen, Vicki; Cordes, Paul; Hewick, Rodney M. ***Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors(bone morphogenetic protein/bone formation).***Vol. 85, pp. 9484-9488, December 1988 Biochemistry.

WANG EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, Lapan P, Luxenberg DP, Mcquaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM. ***Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation***. PNAS 1990; 87: 2220-2224

WILKESJÖ UM, Quahash M, Huang YH, Xiropaidis A, Polimeni G, Susin C. ***Bone morphogenetic proteins for periodontal and alveolar indications; biological observations – clinical implications***. Orthod Craniofac Res 2009; 12: 263-270

WOZNEY JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RH, Hewick RM, Wang EA**.** ***Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities***. Science 1988; 242: 1528-1534

XIONG, Dong-Hai; Shen, Hui; Zhao, Lan-Juan; Xiao, Peng; Yang,Tie-Lin; Guo, Yan; Wang, Wei; Guo,Yan-Fang; Liu, Yong-Jun; Recker, Robert R; Deng, Hong-Wen. ***Robust and Comprehensive Analysis of 20 Osteoporosis Candidate Genes by Very High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Screen Among 405 White Nuclear. Families Identified Significant Association and Gene–Gene Interaction***. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH. Volume 21, Number 11, 2006. 10.1359/JBMR.060808.

YANAGITA, Motoko. ***BMP modulators regulate the function of BMP during body patterning and disease progression***. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.Volume 35, Number 2, March/April 2009, Pages 113–119.

YOSHIMURA, Yasuo; Nomura, Shintaro; Kawasaki, Satoshi; Tsutsumimoto, Takahiro; Shimizu, Tominaga; Takaoka, Kunio**.** ***Colocalization of Noggin and Bone Morphogenetic Protein-4 During Fracture Healing***. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH. Páginas 877-881, Volume 16, Number 5, 2001

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.