INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**INFLUÊNCIA DO BUTIRATO DE SÓDIO, DA CICLOHEXIMIDA E DO
CLORETO DE MANGANÊS NA PRODUTIVIDADE, GLICOSILAÇÃO E
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA TIREOTROFINA HUMANA
DERIVADA DE CHO**

Renata Damiani

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto
Ribela**

São Paulo

2013

Dedico este trabalho

A meus pais Antonio Estevam Damiani e Helena Maria Damiani, meus grandes exemplos de força, coragem e determinação, por todo amor, carinho, compreensão e por estarem sempre, incondicionalmente, ao meu lado, sempre me incentivando e me encorajando.

Sem vocês, nada seria possível!

Aos meus irmãos Marcelo Estevam Damiani e Karina Damiani pelo amor de toda uma vida, às vezes torto, às vezes errado, mas sempre verdadeiro!

A toda minha família, minha base, meu porto seguro, por me darem coragem para seguir em frente! Sem vocês meus sonhos seriam apenas sonhos!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por sempre guiar meus passos e por ter colocado cada uma dessas pessoas em minha vida!

À minha “mãe” científica Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, pela orientação, apoio e incentivo, pela paciência e pelos ensinamentos transmitidos. Por ter me ajudado a crescer e amadurecer na minha vida profissional e acadêmica. À você meu eterno respeito e gratidão!

Ao Dr. Paolo Bartolini, a quem devo muito respeito e gratidão, pela confiança, apoio e incentivo e por sempre ter acreditado em mim e no meu trabalho.

À Dra. Cibele Nunes Peroni, quem primeiro me acolheu neste laboratório e muito me ajudou nos meus primeiros passos no caminho da pesquisa.

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares e Dra. Kayo Okazaki por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho e por todo conhecimento transmitido.

Às amigas Cláudia, Eliza, Fernanda, Flávia e Thais por toda cumplicidade, pelos desabafos, pela amizade, pelos bons momentos que compartilhamos, pelas risadas e até pelas lágrimas! Levarei vocês sempre comigo!

Ao amigo Johnny, sempre por perto e pronto a ajudar, pelo apoio, incentivo, paciência e preciosa colaboração!

Às amigas Bia e Miriam, que estiveram sempre dispostas a ajudar a qualquer hora do dia e a qualquer momento.

Aos amigos Junqueira, Zé Maria, Perez e Rosângela, sempre presentes e prontos a ajudar!

Aos amigos Arlete, Bruno, Ed, Flávio, Eliana, Hugo, Ivette, Karen, Laura, Márcia, Marcos, Mayara, Mosca, Neide, Patrícia, Regina, Roberto, Rosa, Rute, Taís, Tamara e Vincent por todos os almoços divertidos e por ter me proporcionado bons momentos de descontração ao longo de todos estes anos!

Aos amigos Bárbara, Camila, Caicy, Cecília, Danielle, Maurício, Natália, Nélío, Karina Corleto, Karina Oliveira, Keli, Larissa, Leandro, Luciene, Marcão, Otávio, Suellen, Susana, Taís Bunioto, Talita, Tatiana, Tatiane, Tita, Vanessa Fábio, Vanessa Kummer e Yuri por terem tornado meus dias em São Paulo mais felizes e mais leves!

Às amigas Edna, Néia, Sandra, Marisa, Gi e Elisângela, por todas as “fofocas” do meio do dia!

Aos amigos Cléber, Daniele, Sandra e Thamara por toda torcida e pelo apoio de sempre! Por estarem sempre presentes em minha vida, mesmo distantes! Por me lembrarem, sempre, do valor da amizade verdadeira!

À todos os colegas do Centro de Biotecnologia do IPEN que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho...

À FAPESP e CNEN pelo apoio financeiro.

A todos vocês, expresso minha gratidão!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão
uma gota de água no oceano. Mas o oceano seria
menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

Influência do butirato de sódio, da cicloheximida e do cloreto de manganês na produtividade, glicosilação e propriedades biológicas da tireotrofina humana derivada de CHO

Renata Damiani

Resumo

A influência do butirato de sódio (NaBu), do cloreto de manganês (MnCl_2), combinados ou isolados, e da cicloheximida (CHX) na síntese de tireotrofina humana recombinante (r-hTSH) derivada de células CHO foi investigada pela primeira vez. Com exceção da CHX, que gerou uma redução de 1,5 vezes na produtividade volumétrica, todos os reagentes geraram um aumento (1,4 vezes para o MnCl_2 e 3 vezes para o NaBu e NaBu+ MnCl_2) na produtividade volumétrica. Também foi observada uma diminuição no número de células viáveis com a utilização de todos os reagentes. A adição destes reagentes ao meio de cultura de células CHO produtoras de hTSH gerou também alterações na glicosilação do r-hTSH. As alterações geradas pela presença de CHX foram todas negativas, resultando em uma diminuição de 5,5% no conteúdo de ácido siálico, 10% na ocupação dos sítios de glicosilação, além de uma diminuição no conteúdo de todos os monossacarídeos neutros. Os demais reagentes, por outro lado, resultaram em alterações positivas. A presença de NaBu no meio de cultura acarretou um aumento de 12% no conteúdo de ácido siálico e de 3% na ocupação dos sítios de glicosilação. Com relação às estruturas de carboidratos presentes no hTSH, foi observado um aumento de 14% nas estruturas bi-antenárias, aumento no conteúdo de manose e fucose e uma diminuição no conteúdo de galactose e N-acetilglucosamina. A presença de MnCl_2 no meio de cultura resultou em um aumento de 1,7% no conteúdo de ácido siálico e de 1,3% na ocupação dos sítios de glicosilação. Houve ainda um aumento no conteúdo de manose e N-acetilglucosamina e uma diminuição no conteúdo de fucose e galactose. Um aumento de 7% na frequência de estruturas bi-antenárias foi também observado quando MnCl_2 foi utilizado. O uso simultâneo de NaBu e MnCl_2 proporcionou um aumento de 14% no conteúdo de ácido siálico e de 3% na ocupação dos sítios de glicosilação, bem

como um aumento no conteúdo de todos os monossacarídeos neutros. Não houve, entretanto, alterações na frequência das estruturas de carboidratos. Apesar de todas as alterações causadas pelos diferentes reagentes, não foram observadas diferenças na atividade biológica ou no comportamento farmacocinético das diferentes preparações de hTSH estudadas. Este estudo é extremamente relevante, tanto do ponto de vista do desenvolvimento de novos biofármacos, quanto do ponto de vista do controle de qualidade das glicoproteínas hormonais já utilizadas na clínica médica.

Influence of sodium butyrate, cycloheximide and manganese chloride on productivity, glycosylation and biological properties of human thyrotropin CHO-derived

Renata Damiani

Abstract

The influence of sodium butyrate (NaBu), manganese chloride (MnCl_2), combined or isolated, and cycloheximide (CHX) on the synthesis of human thyrotropin CHO-derived (r-hTSH) was investigated for the first time. Exception made for CHX, which caused 1.5-fold reduction on volumetric productivity, all other reagents caused an increase in the volumetric productivity of 1.4-fold with MnCl_2 and 3-fold with NaBu and NaBu+ MnCl_2 . The number of viable cells decreased in presence of all these reagents. They also caused alterations in the glycosylation of r-hTSH. When CHX was utilized, a decrease in the content of sialic acid (5.5%), in the site occupancy (10%) and in the content of neutral monosaccharides was observed. In contrast, the addition of NaBu to culture medium caused an increase of about 12% in the sialic acid content and of 3% in the site occupancy. Concerning to carbohydrate structures, an increase of 14% of bi-antennary structures was achieved. In addition, an increased content of mannose and fucose and a decrease in the content of galactose and N-acetyl glucosamine was also observed. When MnCl_2 was utilized, an increase of 1.7% in the sialic acid content and of 1.3% in site occupancy occurred. An increased content of mannose and N-acetyl glucosamine was also observed, while the content of fucose and galactose decreased. Concerning to carbohydrate structures, an increase of 7% on bi-antennary structures was achieved. When NaBu and MnCl_2 were utilized simultaneously, we observed an increase of about 14% in the sialic acid content, of 3% in the site occupancy, as well as an increase in the content of all neutral monosaccharides. The frequency of carbohydrates structures, however, was not altered. Despite all the changes caused by these different reagents, *in vivo* biological activity and pharmacokinetic behavior were found not significant different in all the hTSH preparations studied in the present work.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 MATERIAL.....	27
3.1.1 Preparações hormonais utilizadas.....	27
3.1.2 Cultivo celular.....	27
3.1.2.1 Reagentes utilizados nos procedimentos de cultivo celular.....	27
3.1.2.2 Material plástico estéril.....	28
3.1.3 Purificação e análise do r-hTSH.....	28
3.1.3.1 Colunas cromatográficas.....	28
3.1.3.2 Resinas cromatográficas.....	29
3.1.3.3 Reagentes químicos.....	29
3.1.4 Imunoensaios.....	29
3.1.4.1 Anticorpos.....	29
3.1.4.2 Reagentes para marcação do anticorpo de detecção.....	30
3.1.4.3 Outros reagentes.....	30
3.1.5 Ensaio biológico.....	30
3.1.6 Proteína total.....	31
3.1.7 Equipamentos e acessórios principais.....	31
3.2 MÉTODOS.....	33
3.2.1 Cultivo celular.....	33
3.2.2 Viabilidade celular.....	33
3.2.3 Purificação.....	34
3.2.3.1 Cromatografia de troca iônica.....	34
3.2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)..	34
3.2.4 Avaliação da proteína de interesse.....	35
3.2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	35
3.2.4.2 Ensaio imunorradiométrico (IRMA).....	35
3.2.4.3 Determinação da proteína total.....	36
3.2.4.4 SDS-PAGE.....	36
3.2.4.5 Atividade biológica.....	37
3.2.4.6 Farmacocinética.....	37

3.2.4.7 Espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	38
3.2.5 Análise de carboidratos.....	38
3.2.5.1 Análise estrutural.....	38
3.2.5.2 Análise composicional.....	39
3.2.5.2.1 Determinação de ácido siálico	39
3.2.5.2.2 Cálculos utilizados para análise de carboidratos.....	40
3.2.5.2.2.1 Contribuição em massa dos glicanos de hTSH via estrutura.....	40
3.2.5.2.2.2 Determinação da ocupação dos sítios de glicosilação.....	40
3.2.5.2.2.3 Determinação de monossacarídeos neutros.....	41
3.2.5.2.2.4 Determinação do nível de galactosilação e sialilação.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Tireotrofina recombinante obtida na presença de cicloheximida.....	42
4.1.1 Crescimento celular e produtividade de hTSH.....	42
4.1.2 Análise composicional.....	46
4.1.2.1 Determinação de ácido siálico.....	46
4.1.2.2 Determinação de monossacarídeos neutros.....	46
4.1.3 Efeitos biológicos.....	47
4.1.3.1 Atividade biológica.....	47
4.1.3.2 Farmacocinética.....	48
4.2 Tireotrofina recombinante obtida na presença de butirato de sódio.....	50
4.2.1 Crescimento celular e produtividade de hTSH.....	50
4.2.2 Espectrometria de massa.....	55
4.2.3 Análise estrutural dos carboidratos.....	58
4.2.4 Ocupação dos sítios de glicosilação.....	62
4.2.5 Análise composicional.....	64
4.2.5.1 Determinação de ácido siálico.....	64
4.2.5.2 Determinação de monossacarídeos neutros.....	65
4.2.6 Efeitos biológicos.....	67
4.2.6.1 Atividade biológica.....	67
4.2.6.2 Farmacocinética.....	67
4.3 Tireotrofina recombinante obtida na presença de cloreto de manganês....	70
4.3.1 Crescimento celular e produtividade de hTSH.....	70
4.3.2 Determinação de ácido siálico.....	72

4.3.3 Espectrometria de massa.....	75
4.3.4 Análise estrutural dos carboidratos.....	77
4.3.5 Ocupação dos sítios de glicosilação.....	81
4.3.6 Análise composicional.....	83
4.3.6.1 Determinação de ácido siálico.....	83
4.3.6.2 Determinação de monossacarídeos neutros.....	85
4.3.7 Efeitos biológicos.....	86
4.3.7.1 Atividade biológica.....	86
4.3.7.2 Farmacocinética.....	86
4.4 Tireotrofina recombinante obtida na presença de butirato de NaBu+MnCl ₂	88
4.4.1 Crescimento celular e produtividade de hTSH.....	88
4.4.2 Purificação do r-hTSH.....	90
4.4.3 Espectrometria de massa.....	94
4.4.4 Análise estrutural dos carboidratos.....	96
4.4.5 Ocupação dos sítios de glicosilação.....	100
4.4.6 Análise composicional.....	102
4.4.6.1 Determinação de ácido siálico.....	102
4.4.6.2 Determinação de monossacarídeos neutros.....	103
4.4.7 Efeitos biológicos.....	105
4.4.7.1 Atividade biológica.....	105
4.4.7.2 Farmacocinética.....	105
5. DISCUSSÃO.....	107
6. CONCLUSÕES.....	114
7. Referências bibliográficas.....	115

1 – INTRODUÇÃO

A tireotrofina humana (hTSH), glicoproteína objeto do presente estudo, é um hormônio pertencente à família dos hormônios glicoproteicos da qual fazem parte também a foliculotrofina (FSH), luteotrofina (LH) e a gonadotrofina coriônica (CG). São hormônios heterodiméricos, consistindo de duas subunidades ligadas não covalentemente, sendo a subunidade α comum a todos os glicohormônios e a subunidade β única, que confere a especificidade biológica de cada hormônio (LATIF; GRAVES; DAVIES, 2001). A subunidade α é composta de 92 aminoácidos, incluindo 10 resíduos de cisteína ligadas por pontes dissulfeto. Esta subunidade é codificada por um único gene, localizado no cromossomo 6 em humanos, apresentando 4 exons e 3 introns, sendo sua sequência de aminoácidos comum aos quatro glico-hormônios (FIDDES; GOODMAN, 1981; GROSSMAN et. al, 1997; SZKUDLINSKI et. al, 2002). Já os oligossacarídeos de ligação N das cadeias α dos quatro hormônios apresentam diferenças (AMORESANO et. al, 1996). O gene da subunidade β de diferentes glicohormônios difere no tamanho, organização estrutural e localização cromossomal. No caso do TSH, o gene da subunidade β está localizado no cromossomo 1 (DRACOPOLI et. al, 1986). Muito embora exista 80% de analogia entre as subunidades β dos hormônios glicoproteicos, ela é distinta o suficiente para ter uma alta especificidade ao seu respectivo receptor (PIERCE; PARSONS, 1981).

O TSH é proteína chave para o controle das funções da tireóide, que acontece após sua interação com a proteína G acoplada ao seu receptor (TSHR). É um hormônio sintetizado pelas células basófilas (tireotropos) da hipófise anterior, sendo sua síntese estimulada pelo hormônio liberador da tireotrofina (TRH) e inibida pelos hormônios da tireóide (T_3 e T_4), em um clássico mecanismo de “feedback” negativo. Além do controle das funções tireoideanas, o TSH está também envolvido na diferenciação morfológica das células da tireóide, na produção e liberação de iodotironinas, na promoção do crescimento da glândula, além de atuar protegendo as células tireoideanas da apoptose e ocupar um papel fundamental na ontogenia (SZKUDLINSKI et. al, 2000; SZKUDLINSKI et. al, 2002). Este hormônio tem grande interesse clínico,

sendo amplamente utilizado tanto em aplicações diagnósticas como terapêuticas, que incluem, entre outras, o câncer de tireóide (CHEN; DODDAMANE; CHENG, 2010; BONNEMA; HEGEDÜS, 2012). Tem sido amplamente utilizado para a avaliação clínica da função tireoideana, para melhorar a qualidade e interpretação de testes para a tireóide realizados em medicina nuclear, no tratamento de bócio multinodular e de outras patologias (HAUGEN et. al, 1999; Luster, 2006).

No campo diagnóstico *in vitro*, o advento de imunoenaios ultrasensíveis possibilitou o uso destes em testes primários da função tireoideana, sendo a determinação de TSH de fundamental importância na rotina de análises clínicas neonatais (HAY et. al, 1991; RIBELA; BIANCO. BARTOLINI, 1996; PERONI; RIBELA; BARTOLINI, 1997). Estas e outras importantes aplicações do hTSH recombinante são apresentadas na Tabela 1 (SZKUDLINSKI et. al, 2002; EMERSON; TORRES, 2003).

Tabela 1- Aplicações do rec-hTSH

-
- Avaliação clínica da função tireoideana
 - Diagnóstico de hipotireoidismo
 - Diagnóstico diferencial de hipotireoidismo primário e secundário
 - Diagnóstico da diminuição da reserva tireoideana
 - Seguimento de câncer de tireóide (uso indicado e aprovado pelo FDA*)
 - Estímulo para teste de tireoglobulina e mapeamento de corpo inteiro
 - Tratamento de câncer da tireóide
 - Estímulo para ablação com radioiodo
 - Avaliação da estrutura-função da tireóide
 - Função do receptor do TSH
 - Estudo das proteínas da tireóide e iodotironinas
 - Mapeamento da tireóide
 - Melhoramento da qualidade do mapeamento da tireóide e de sua interpretação
 - Tratamento com radioiodo
 - Tratamento de tireotoxicoses e de bócio
 - Preparação de reagentes de imunoenaios (padrões e traçadores)
 - Testes laboratoriais de bioatividade de TSH
-

*FDA – Food and Drug Administration

A massa molecular do hTSH varia em torno de 28-30 kDa (MENDONÇA et. al, 2005). Diferenças na massa molecular de hTSH podem acontecer devido à heterogeneidade nas cadeias de carboidratos. As porções de carboidratos, no caso do hTSH, correspondem a cerca de 15 a 25% do seu peso. A subunidade α do hTSH apresenta duas cadeias oligossacarídicas ligadas à asparagina e a subunidade β possui apenas uma.

Em proteínas heterólogas, as porções de carboidratos aderidas pós-traducionalmente, frequentemente diferem das porções de carboidratos encontradas em proteínas expressas em suas células hospedeiras naturais. Por exemplo, os oligossacarídeos do TSH de origem hipofisária apresentam, ligados ao resíduo de N-acetilgalactosamina (GalNAc), um resíduo de sulfato (BAEZINGER, 1994). Já no TSH recombinante derivado de células CHO não existem cadeias oligossacarídicas terminadas em sulfato, uma vez que estas células não possuem N-acetilgalactosamina transferase e sulfatotransferases, responsáveis pela ligação de GalNAc e pela sulfatação da GalNAc, respectivamente (SZKDLINSKI; THOTAKURA; WEINTRAUB, 1995).

Na Figura 1 é mostrado um esquema das terminações das cadeias oligossacarídicas de TSH de diferentes origens. Os carboidratos do TSH bovino (bTSH) apresentam, ocupando a posição terminal, resíduos de N-acetilgalactosamina-sulfato, enquanto que os do TSH humano de origem hipofisária (pit-hTSH) terminam em N-acetilgalactosamina-sulfato e galactose-ácido siálico. No caso do hTSH recombinante derivado de células CHO (rec-hTSH), os carboidratos terminam em galactose ácido siálico, enquanto os do rec-hTSH derivados de células de inseto terminam em manose.

Figura 1 Diferentes estruturas de carboidratos de TSH de diferentes origens (SZKUDLINSKI et. al, 2002).

A glicosilação e heterogeneidade de glicoformas são aspectos muito importantes na produção de glicoproteínas com potencial uso terapêutico. As cadeias de carboidratos na proteína podem afetar a sua solubilidade, susceptibilidade às proteases, estabilidade térmica, “folding” estrutural. Além disso, a glicosilação também afeta, através do reconhecimento específico proteína-carboidrato, diversas funções biológicas, tais como imunoantigenicidade, atividade biológica e especialmente a depuração *in vivo* que modula os níveis circulatórios da glicoproteína (BERTOZZI; KIESSLING, 2001; ELLGAARD; HELENIUS, 2003; BYRNE; DONOHOE; O’KENNEDY, 2007).

A glicosilação é uma modificação pós-traducional, sendo um processo que envolve múltiplas etapas e centenas de enzimas e é considerada a mais abundante modificação da proteína. Estima-se que aproximadamente 50% de todas as proteínas são glicosiladas (TIAN; ZHANG, 2010). Os oligossacarídeos podem ser ligados covalentemente a um resíduo de asparagina (Asn), dando

origem à glicosilação N ou a um resíduo de serina (Ser) ou treonina (Thr), dando origem à glicosilação O (GU; TANIGUCHI, 2004; WONG, 2005). Os N-glicanos apresentam um núcleo pentassacarídico invariável, que consiste de dois resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e três resíduos de manose (Man), ligado a um resíduo de asparagina de uma sequência de aminoácidos (“sequon=Asn-x-Ser/Thr”), onde x pode ser qualquer aminoácido com exceção da prolina (Figura 2).

Figura 2 Núcleo pentassacarídico de um N-glicano (BUTLER, 2006)

Os N-glicanos estão classificados em três categorias diferentes, como está mostrado na Figura 3. Os oligossacarídeos do tipo alta manose apresentam de dois a seis resíduos de manose adicionais ligados ao núcleo pentassacarídeo. Os oligossacarídeos do tipo complexo são aqueles que apresentam ligados ao núcleo pentassacarídico resíduos adicionais de N-acetilglucosamina. Alongando as ramificações destas estruturas, são encontrados resíduos de galactose seguidos de resíduos de ácido siálico. E por fim, os do tipo híbridos, apresentam características dos outros dois tipos de oligossacarídeos (KORNFELD; KORNFELD, 1985). Em alguns casos estas estruturas, independente da categoria em que se enquadram, podem apresentar resíduos de fucose, comumente ligados ao núcleo pentassacarídico.

Figura 3 Diferentes tipos de N-glicanos (BUTLER, 2006)

Devido à complexa estrutura das glicoproteínas, sua síntese só pode ser obtida em sistemas de células eucariotas. Entre os sistemas eucariontes, leveduras e plantas são incapazes de realizar glicosilação complexa como a dos mamíferos. Em eucariontes inferiores como leveduras (*pichia pastoris* ou *sacharomyces*, por exemplo), estruturas do tipo alta manose são liberadas como produto final da glicosilação. Nestes sistemas, estruturas híbridas também podem ser encontradas. No caso de células de insetos, existe a produção de oligossacarídeos truncados e estruturas terminadas em manose. Já em células de mamíferos, estruturas do tipo alta manose são produzidas como uma etapa intermediária da formação de estruturas complexas (RIBELA; GOUT; BARTOLINI, 2003; BETENBAUHG, 2005; BUTLER, 2006; MOLINARI, 2007). Portanto, o perfil de glicosilação das glicoproteínas depende das células hospedeiras (RAJU et. al, 2000; BUTLER, 2006). As células mais utilizadas para a produção de glicoproteínas terapêuticas são as células de mamíferos. Dentre as células de mamíferos, as células de ovário de hamster chinês (CHO) são as mais comumente utilizadas principalmente por seus glicanos serem relativamente similares aos de glicoproteínas humanas, tanto na estrutura quanto na composição (JENKINS; CURLING, 1994; JONES; KRAG; BETENBAUGH, 2005; JEONG et. al, 2008). Isso se explica, provavelmente, pelo fato de que 99% das enzimas de glicosilação são codificadas por genes homólogos aos genes humanos. Ainda que cerca de 140 desses genes não sejam expressos pelas células em condições normais de crescimento, a glicosilação final é muito similar à glicosilação humana, o que minimiza possíveis respostas imunológicas (BUTLER; MENESES-ACOSTA, 2012). Além

disso, as células CHO apresentam como vantagem o fácil cultivo e a expressão em alto nível do transgene.

No processo de N-glicosilação, um oligossacarídeo composto de 14 monossacarídeos $(\text{GlcNac})_2 - (\text{Man})_9 - (\text{Glc})_3$ é primeiramente ligado a um lipídeo de cadeia longa (dolicol fosfato) e então transferido a um resíduo específico de asparagina na cadeia polipeptídica nascente, sendo esta transferência catalisada pela oligossacariltransferase, enzima que necessita de íons divalentes para sua máxima atividade (CROWELL et. al, 2007). Este processo ocorre no retículo endoplasmático. A síntese desta estrutura se inicia com a transferência de um resíduo de N-acetilglucosamina para o dolicol fosfato. Posteriormente ocorre a transferência do segundo resíduo de N-acetilglucosamina e de cinco resíduos de manose na face citoplasmática do retículo endoplasmático, onde os açúcares nucleotídeos UDP-GlcNac e GDP-Man servem como açúcares doadores. Posteriormente, o dolicol fosfato se vira na membrana plasmática do retículo endoplasmático, em resposta à ação da enzima flipase, carreando esta estrutura pré-formada para o lúmen do retículo. Após esta translocação, quatro resíduos de manose e três de glicose são adicionados de acordo com a atividade das glicosiltransferases específicas, formando assim a estrutura precursora dos N-glicanos. Esta estrutura é então eficientemente transferida à proteína nascente (KORNFELD; KORNFELD, 1985; ROTH et. al, 2010; MRÁZEK et. al, 2013). Na Figura 4 estão esquematizados estes processos.

Figura 4 Esquema do início do processo de glicosilação no retículo endoplasmático (KARP, 2005)

Os processamentos dos glicanos começam ainda no retículo endoplasmático, porém nesta etapa são geradas estruturas com diversidade limitada, pois as modificações que ocorrem nesta organela são compartilhadas entre todas as glicoproteínas (HELENIUS; MARKUS, 2001). Imediatamente após se ligar à cadeia polipeptídica um dos terminais glicose é removido pela ação da enzima $\alpha 1,2$ glucosidase (Gluc I). Posteriormente outro resíduo de glicose é removido pela glucosidase II (Gluc II). A presença deste último resíduo de glicose nesta estrutura está relacionada ao controle de qualidade das proteínas que estão sendo sintetizadas (ROTH et. al, 2010). A Figura 5 esquematiza como a glicose regula a liberação das proteínas para os passos seguintes da glicosilação. Glicoproteínas apresentando apenas um resíduo de glicose são reconhecidas pelas proteínas chaperonas calnexina e/ou calreticulina (reação 2). O último resíduo de glicose é, finalmente, clivado da estrutura (reação 3) fazendo com que a proteína perca sua afinidade com a chaperona e se desprenda dela. Quando uma proteína está dobrada de forma incorreta, a enzima glicosiltransferase adiciona um novo resíduo de glicose para que a proteína possa corrigir seu dobramento (reação 4). Este processo é repetido até que a proteína atinja seu correto dobramento. Quando a proteína corretamente dobrada se solta das chaperonas, está pronta para passar pelos

estágios seguintes da glicosilação (reação 6). Caso a proteína não consiga atingir seu correto dobramento ela será transportada para o citoplasma onde será degradada por proteases (reação 7) (ALBERTS et. al, 2010; ZHANG et. al, 2011). Após a remoção do último resíduo de glicose, três resíduos de manose são clivados pela ação de α manosidases e a proteína é transportada para o complexo de Golgi, onde continua a ser processada. A ação de diversas glicosiltransferases e glicosidases permite a adição de uma variedade de outros açúcares, tais como galactose, N-acetilglucosamina, fucose e ácido siálico, levando assim às estruturas complexas e definitivas dos carboidratos (KORNFELD; KORNFELD, 1985; HELLENIUS; MARKUS, 2001; ELLGAARD; HELLENIUS, 2003; MRÁZEK et. al, 2013).

Figura 5 Esquema do controle de qualidade mediado por chaperonas e glicose no retículo endoplasmático (KARP, 2005)

Estas reações das transferases no complexo de Golgi, nem sempre ocorrem de forma completa, o que acarreta a heterogeneidade das estruturas finais. Tal heterogeneidade fica evidente ao observarmos o nível de antenaridade, que pode variar de dois a quatro, nas estruturas oligossacarídicas (BUTLER, 2006; HOSSLER; KHATTAK; LI, 2009).

Da mesma forma, as reações iniciais da glicosilação também podem ocorrer de forma incompleta, permitindo a secreção de uma mistura de produtos com diferentes níveis de glicosilação. Esta heterogeneidade na reação inicial da via de glicosilação é normalmente referida como variação na ocupação dos sítios de glicosilação (NYBERG et. al, 1998; ANDERSEN et. al, 2000). Mecanismos potencialmente diferentes podem ser responsáveis por variações na ocupação dos sítios de glicosilação de uma glicoproteína tais como, disponibilidade do dolicol-fosfato e de nucleotídeos (CMP); atividade de glicosiltransferase; acessibilidade variável ao sítio de glicosilação em virtude de competição com o “folding” da proteína, uma vez que após o “folding” os sítios de glicosilação não estão mais acessíveis às oligossacariltransferases (KORNFELD; KORNFELD, 1985; GAWLITZEK et. al, 2009). Estas variações têm um papel crítico na eficácia e farmacocinética das glicoproteínas terapêuticas (CHOI, et. al 2012).

O conteúdo de ácido N-acetilneuramínico ou ácido siálico é outro fator que pode afetar a qualidade terapêutica de uma glicoproteína. O processo de sialilação envolve a adição do substrato doador, citidina mono-fosfato (CMP-ácido siálico) a um carboidrato aceptor (Gal-GlcNAc-Man-R), via uma reação enzimática, realizada no complexo de Golgi e catalisada por uma sialiltransferase (BORK; HORSTKORT; WEIDEMANN, 2009). Os resíduos de ácido siálico que estão presentes em uma glicoproteína cujas cadeias de carboidratos estão ligadas à asparagina (N-ligadas), são ligados na posição 3 ou 6 da galactose. O ácido siálico com ligação $\alpha 2,3$ à galactose da cadeia Gal-GlcNAc-Man-R é encontrado em glicoproteínas sintetizadas em células CHO e em células humanas, enquanto o ácido siálico ligado em $\alpha 2,6$ é encontrado apenas em glicoproteínas derivadas de células humanas ou de células CHO modificadas com o gene da $\alpha 2,6$ sialiltransferase (BRAGONZI et. al, 2000; DAMIANI et. al, 2009). A sialilação, em geral, determina a meia vida circulatória da glicoproteína, uma vez que o ácido siálico pode impedir o reconhecimento da glicoproteína pelos receptores assialoglicoproteícos presentes principalmente no fígado (TAKAMATSU et. al, 2003). A quantidade de ácido siálico de uma glicoproteína é afetada por dois processos opostos: a adição intracelular do ácido siálico por sialiltransferases e a remoção extracelular de

ácido siálico por clivagem enzimática via sialidase (JING; QIAN; LI, 2010). A adição intracelular do ácido siálico é a última etapa do processo de glicosilação que ocorre no trans-Golgi. Isto envolve a transferência enzimática do ácido siálico do nucleotídeo precursor (CMP-ácido siálico) para galactose disponível na estrutura do glicano emergente, que é ligado à nova proteína sintetizada. Fatores que podem influenciar o nível de sialilação incluem disponibilidade de CMP-ácido siálico, a atividade de enzimas sialiltransferase e galactosiltransferase e a disponibilidade de galactose na estrutura do glicano emergente. A perda do ácido siálico por degradação extracelular decorrente das sialidases presentes no sobrenadante da cultura de células CHO deve ser evitada. A atividade das sialidases pode potencialmente ser inibida por muitos métodos incluindo cátions divalentes e inibidores químicos. A perda de ácido siálico pode também potencialmente ser evitada aumentando a viabilidade celular, uma vez que têm sido observados níveis crescentes de sialidases no sobrenadante de cultura de células CHO conforme o tempo de cultivo aumenta e a viabilidade celular decresce (JING; QIAN; LI, 2010).

Uma estratégia frequentemente utilizada no processo de produção de uma proteína recombinante visando aumentar a sua produtividade é controlar a proliferação celular, o que acaba gerando um atraso no ciclo celular, aumentando a durabilidade do processo de cultivo celular e consequentemente aumentando a expressão da proteína de interesse (KUMAR; GAMMEL; CLYNES, 2007). A produção da proteína recombinante é dependente da fase do ciclo celular em que a célula hospedeira se encontra (FUSSENEGGER; BAILEY, 1998). Segundo CARVALHAL et. al (2003), células “presas” na fase G1 do ciclo celular são metabolicamente mais ativas e maiores do que as células que não têm este atraso no ciclo celular. Por estas razões, a fase G1 do ciclo celular é considerada a fase em que há maior produção da proteína recombinante (KUMAR; GAMMEL; CLYNES, 2007). Várias substâncias químicas como, por exemplo, o ácido pentanóico, o dimetil sulfóxido, a quinidina e timidina e o butirato de sódio provocam um retardo das células na fase G1 (KUMAR; GAMMEL; CLYNES, 2007). Muitos autores têm explorado estas características do butirato de sódio para aumentar a expressão de diferentes proteínas recombinantes (CHOTIGEAT et. al, 1994; LAMOTE et. al, 1999; CHUNG et. al, 2001; MIMURA et. al, 2001; TABUCHI et. al, 2002;

OGAWA et. al, 2003; SUNG et. al, 2004; BAIK et. al, 2008; CROWELL et. al, 2008).

O butirato de sódio é um sal de ácido graxo de cadeia curta, identificado como produto da fermentação anaeróbica de bactérias. Seu uso em cultura celular resulta em aumento dos níveis de mRNA, levando a um aumento de transcrição do gene de interesse e a uma diminuição da estabilidade do mRNA; decréscimo da fosforilação de histonas, que interfere na progressão do ciclo celular; aumento na hiperacetilação de histona, gerando perda de estrutura da cromatina com conseqüente dano ao citoesqueleto e menor acesso à RNA polimerase para a síntese de mRNA; aumento da produção, no retículo endoplasmático, de proteínas “chaperones-like” (GRP78 e 94) (LIU; CHU; HWANG, 2001; OGAWA et. al, 2003; KUMAR; GAMMEL; CLYNES, 2007; BAIK et. al, 2008; CROWELL et. al, 2008). Também foi mostrado que o butirato causa alterações nas células CHO, relacionadas à longevidade da cultura e à produtividade específica (JENKINS et. al, 2009).

Tem sido demonstrado também que o butirato de sódio tem a capacidade de modificar a estrutura dos oligossacarídeos, sendo estas alterações altamente dependentes do sistema de expressão, bem como da proteína a ser expressa (CROWELL et. al, 2008). Tendo em vista que o ácido siálico desempenha um papel importante na atividade biológica das glicoproteínas, muitos estudos têm sido realizados visando aumentar a glicosilação e a sialilação destas glicoproteínas recombinantes, através do uso no meio de cultura deste agente estimulador.

A oligossacariltransferase é uma proteína multimérica ligada à membrana, responsável por catalizar a glicosilação N-ligada, atuando na proteína durante sua tradução (BERGAMAN; KUEHL, 1978; KELLEHER; KREIBICH; GILMORE, 1992). A relação tempo x espaço entre a tradução, glicosilação e “folding” da proteína tem sido investigada por muitos grupos (PLESS; LENNARZ, 1977; GAVEL; VON HEIJINE, 1990; BULLEID et. al, 1992; SHELIKOFF; SINSKEY; STEPHANOPOULOS, 1994). Esta relação entre glicosilação e “folding” foi observada primeiramente por PLESS et. al (1977) que observaram que o potencial sítio de glicosilação da ovoalbumina, uma proteína normalmente não glicosilada, se tornava apto à glicosilação somente

após sua denaturação. Outra evidência de que a glicosilação é afetada pela velocidade da tradução se refere aos potenciais sítios de glicosilação próximos à região N-terminal, que por ficarem mais tempos expostos à atividade da oligossacariltransferase, podem apresentar uma maior glicosilação do que a região C-terminal da proteína (GAVEL; VON HEIJNE, 1990).

Com base nestas evidências, muitos autores têm usado diferentes alternativas visando diminuir a velocidade de tradução das proteínas, aumentando seu trânsito e tempo de permanência no retículo endoplasmático, o que pode facilitar a obtenção de estruturas mais glicosiladas (HOSSLER; KHATTAK, 2009). BULLEID et. al (1992), em células CHO produtoras de t-PA, utilizaram como estratégia a diminuição da temperatura para diminuir a velocidade de tradução. Já SHELIKOFF et. al (1994) adotaram como estratégia a adição de cicloheximida ao meio de cultura de células C127 produtoras de prolactina. A cicloheximida é um conhecido inibidor da síntese protéica. Foi descrita na literatura uma melhora da ocupação do único sítio de glicosilação da prolactina recombinante produzida em células C127 (SHELIKOFF; SINSKEY; STEPHANOPOULOS, 1994) e, especificamente pelo nosso grupo de pesquisa, um considerável aumento da porcentagem de prolactina glicosilada na produção de prolactina recombinante em células CHO, quando em presença de cicloheximida (HELLER et. al, 2010).

Outra enzima muito importante no processo de glicosilação é a β 1,4 galactosiltransferase, uma enzima presente no Golgi que participa da reação que transfere um resíduo de galactose, a partir do nucleotídeo doador UDP-galactose, aos aceptores da glicoproteína (ROTH; BERGER, 1982; WITSELL; CASEY; NEVILLE, 1990). Esta enzima requer íons divalentes para que possa atingir seu potencial máximo. A ativação da galactosiltransferase mediante íons metálicos envolve dois sítios de ligação presentes na enzima. O primeiro sítio se liga fortemente ao manganês e pode desenvolver um papel estrutural na enzima, enquanto o segundo sítio apresenta uma afinidade relativamente mais fraca com o manganês e pode estar especificamente envolvido com a doação de UDP-galactose (POWELL; BREW, 1976). Além disso, o manganês pode atuar na membrana da vesícula onde a entrada do UDP-galactose é controlada (WITSELL; CASEY; NEVILLE, 1990). Tendo em vista que o ácido siálico se liga

obrigatoriamente a um resíduo de galactose, alguns autores têm apostado na adição de manganês ao meio de cultura visando aumentar o conteúdo de galactose nas glicoproteínas sintetizadas, aumentando por consequência o conteúdo de ácido siálico. Outra vantagem da adição de manganês ao meio de cultura se refere ao aumento da ocupação dos sítios de glicosilação, uma vez que a oligossacariltransferase também requer íons divalentes para atingir seu máximo potencial (GAWLITZEK et. al, 2009). De fato, Gawlitzek et. al (2009) observaram um aumento na ocupação dos sítios de glicosilação do t-PA quando manganês foi adicionado ao meio de cultura de células CHO. Da mesma forma, CROWELL et. al (2007) além do aumento na ocupação dos sítios de glicosilação da EPO, obtiveram também um aumento na porcentagem de estruturas sialiladas com a adição de manganês no cultivo celular.

Qualquer um dos mecanismos comentados podem, portanto, ser influenciados por alterações no ambiente do cultivo celular que podem acarretar perturbações no metabolismo e nas funções celulares (NYBERG et. al, 1998). Sendo assim, o conhecimento de aspectos do cultivo celular que potencialmente podem impactar a produtividade e a qualidade do produto se torna de extrema importância para a obtenção de produtos recombinantes com bioatividade e propriedades farmacológicas definidas.

Neste contexto, será estudado no presente trabalho a influência do butirato de sódio, do cloreto de manganês e de cicloheximida na produção da tireotrofina recombinante. Considerando que as alterações causadas por estes agentes são processo e proteína-específicos e que, pelo que é de nosso conhecimento, não há estudos relativos ao hTSH, é muito importante, para realizar um controle eficiente da qualidade do produto final, realizar o estudo de sua influência na produtividade e na glicosilação do r-hTSH. Ressaltamos que este tipo de estudo é extremamente relevante, tanto do ponto de vista do desenvolvimento de novos biofármacos, quanto do ponto de vista do controle de qualidade das glicoproteínas hormonais já utilizadas na clínica médica.

2- OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é estudar a influência de condições do cultivo celular na produtividade, glicosilação e propriedades biológicas da tireotrofina derivada de células CHO

2.2 – Objetivos Específicos

1. Obtenção de diferentes glicoformas de hTSH recombinante farmacologicamente ativas, derivadas do cultivo de células CHO produtoras desta glicoproteína ao qual foram adicionados diferentes compostos: butirato de sódio, cicloheximida e cloreto de manganês
2. Caracterização dos novos produtos com relação à produtividade
3. Caracterização dos novos produtos com relação à porcentagem de ocupação dos sítios de glicosilação, estrutura de carboidratos e sialilação
4. Caracterização dos novos produtos com relação à atividade biológica e depuração plasmática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Preparações hormonais utilizadas

- hTSH de origem hipofisária (p-hTSH NIDDK) produzido e fornecido pelo “National Hormone and Pituitary Program” (Torrance, CA, EUA).
- hTSH derivado de células de ovário de hamster chinês (CHO) (Thyrogen®), produzido pela “Genzyme Corporation” (Cambridge, EUA) e fornecido pela Collect (São Paulo, SP, Brazil), sendo o único TSH recombinante comercialmente disponível.
- hTSH derivado de células CHO, produzido no laboratório de Hormônios do Centro de Biotecnologia do IPEN-CNEN/SP (r-hTSH IPEN), a partir de células CHO deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR), linhagem mutante DXB-11, co-transfectadas com vetores dicistrônicos (pEDdc- α e pEAdc- β -hTSH) e submetidas à amplificação gênica com metotrexato (MTX) (PERONI et. al, 2002)

3.1.2 Material utilizado no cultivo celular

3.1.2.1 Reagentes utilizados nos procedimentos de cultura celular

- Anfotericina B, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Bicarbonato de sódio p.a., Sinth (São Paulo, Brasil)
- Butirato de sódio, Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Cicloheximida, Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Cloreto de manganês, Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Dimetilssulfóxido (DMSO), MERK (São Paulo, Brasil).
- Gentamicina, Schering-Plougt (Rio de Janeiro, Brasil).
- Meio CHO-S-SFM II, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Meio mínimo essencial sem a presença de nucleosídeos (α -MEM), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Metotrexato (MTX), Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Penicilina-Estreptomicina, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Soro fetal bovino dialisado (SFBd), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).

- Tripsina, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).

3.1.2.2 Material plástico estéril

- Garrafas de 75 e 162 cm², Corning Costar (NY, EUA).
- Pipetas de 2, 5, 10 e 25 mL, Corning Costar (NY, EUA).
- Placas de petri de 20 cm², Corning Costar (NY, EUA).
- Sistema de filtração de 500 mL, 0,22µm, Corning Costar (NY, EUA).
- Tubos criogênicos de 2 mL, Corning Costar (NY, EUA).
- Tubos para centrifuga de 15 e 50 mL, Corning Costar (NY, EUA).

3.1.3 Material utilizado no processo de purificação e análise do r-hTSH

3.1.3.1 Colunas cromatográficas

- a) Coluna de vidro utilizada em cromatografia clássica
 - Coluna XK (20cm X 16mm DI), GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra) para cromatografia de troca iônica.
- b) Colunas de aço inoxidável utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
 - Coluna TSK G 2000 SW (60 cm X 7,5 mm D.I.), acoplada a uma pré-coluna SW (7,5 cm x 7,5 mm DI), Tosohaas (Montgomeryville, PA, EUA), para HPLC de exclusão molecular.
 - Coluna C₄, 214 TP54 (25 cm X 4,6 mm D.I.), acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5 µm, 1,0cm X 4,6 mm D.I.), Vydac Separations Group (Hesperia, CA, EUA), para HPLC de fase reversa analítica.
 - Coluna C₄, 214 TP510 (25 cm X 10 mm D.I.), acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5 µm, 1,0cm X 4,6 mm D.I.), Vydac Separations Group (Hesperia, CA, EUA), para HPLC de fase reversa semi-preparativa.
 - Coluna Supelco LCC18 Sigma (St. Louis, MO, EUA), para HPLC de fase reversa, para determinação de ácido siálico.

3.1.3.2 Resinas cromatográficas

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

3.1.3.3 Reagentes químicos

- Acetonitrila grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Acetato de sódio, Merck (São Paulo, Brasil).
- Ácido acético, Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Ácido fosfórico p.a. Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Bissulfato de sódio, Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Butilamina, Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Cloreto de sódio p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio monobásico p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio bibásico p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Metanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Tetrahidrofurano, Sigma (St. Louis, MO, EUA).

3.1.4 Material utilizado nos imunoensaios

3.1.4.1 Anticorpos

- Anticorpo monoclonal (mAB) anti hTSH (anticorpo de detecção utilizado no radioensaio), fornecido pelo Scipac LTDA (Sittingborne, UK).
- Anticorpo policlonal anti hTSH acoplado a celulose (anticorpo de captura, fase sólida), fornecido pelo Scipac LTDA (Sittingborne, UK).

3.1.4.2 Reagentes para marcação do anticorpo de detecção

- Cloramina T p. a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Iodeto de potássio p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Metabissulfito de sódio, Carlo Erba (São Paulo, Brasil).
- Na¹²⁵I comercial livre de carregadores e oxidantes, com atividade específica de 11100-22200 MBq/mL (300-600 mCi/mL), Nordion Europe S.A. (Fleurus, Bélgica).

3.1.4.3 Outros reagentes

- Azida sódica, Sigma (St. Louis, EUA).
- Controles de qualidade para imunoensaios baseados em sangue humano, Lyphochek Immunoassay Plus control (1, 2, 3), Bio Rad (Invinu, CA, EUA).
- Fosfato de sódio monobásico p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio bibásico p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Soro albumina bovina (BSA) RIA Grade (fração V), Sigma (St. Louis, EUA).
- Tween 20, Sigma (St. Louis, EUA).

3.1.5 Material utilizado no ensaio biológico

- Camundongos machos da linhagem isogênica *Balb-C*, com peso de 22 - 30g, oriundos do Biotério de Criação e Manutenção de Animais de Laboratório do IPEN/CNEN – SP.
- Microtubos de homo-polímero, de 1,5mL, Axygen (Union City, CA, EUA).
- Pipeta Pasteur de vidro, Corning (New York, EUA).
- Sal de sódio de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T₃), Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Sistema de radioimunoensaio para dosagem de tiroxina total (T₄), *RIA Coat-A-Count® Total T₄*, Diagnostic Products Corporation (DPC) (Los Angeles, CA, EUA).

3.1.6 Material utilizado no ensaio de dosagem de proteína total

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

3.1.7 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil).
- Agitador rotatório de tubos (“rotator”), fornecido pelo laboratório NETRIA, North East Thames Region Immunoassay Unit (Londres, Inglaterra).
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil).
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10A, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e a um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD, EUA).
- Aparelho para dosagem de glicose Accu-Check Active, Roche (Boehringer, Mannheim, Alemanha).
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo P100N, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich, Suíça).
- Bomba peristáltica modelo P-1, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Câmera de Neubauer, Boeco (Hamburg, Alemanha).
- Centrífuga, modelo LS-3 plus, Celm (São Paulo, Brasil).
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super Speed RC – 2B, Sorvall (Newtown, Connecticut, EUA).
- Coletor de frações, modelo Frac-200, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Contador gama tipo “poço”, com troca automática de amostra, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para ^{125}I de 80%, Packard Instrument Company (Illinois, EUA).
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).

- Estufa de cultura celular, modelo 3159, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Fluxo Laminar classe II A/B 3, modelo 1140, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Freezer –20°C, modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil).
- Freezer –40°C, modelo AB 240, Metafrio (São Paulo, Brasil).
- Freezer –80°C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Leitor de placas de microtitulação modelo MR400 (Dynatech, Bethesda, EUA).
- Liofilizador, modelo Dura Stop – TDS – 3 DURA DRY, FTS Systems (Stone Ridge, EUA).
- Medidor digital de pH, modelo 420A, Orion (Boston, MA, EUA).
- Membrana para diálise modelo SnakeSkin, 3.500 MWCO, Pierce (Rockford, IL, EUA).
- Membranas de filtração de 0,22 µm, Millipore (Bedford, MA, EUA).
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha).
- Refrigerador duplex, modelo 320 clear, Brastemp (São Paulo, Brasil).
- Refrigerador com porta de vidro modelo VE 730, Metafrio (São Paulo, Brasil).
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA).
- Sistema de focalização isoelétrica Multiphor II, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Tubos de poliestireno para imunoensaios (7,5x1,2 cm), EMTEL (São Paulo, Brasil).
- Sistema de transferência semi-seco Hoefer TE 70, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação da concentração ideal de trabalho de cada reagente e viabilidade celular

Em placas de 60 cm² foram semeadas aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células que após atingirem aproximadamente 80% de confluência foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações dos reagentes estudados, durante 6 dias. Diariamente as células foram contadas, após tripsinização, e as células viáveis foram distinguidas das células mortas usando o método de exclusão com “trypan blue dye”.

Um cultivo celular sem a adição dos reagentes também foi realizado como controle.

A escolha da concentração ideal de cada reagente foi baseada em um balanço apropriado entre a produtividade volumétrica de hTSH e o número de células viáveis em cada um dos casos.

3.2.2 Cultivo Celular

O processo de cultivo celular se deu em frascos T de 75 cm², com um inóculo inicial de $1,5 \times 10^6$ células/frasco (OLIVEIRA et. al, 2008). Durante a fase de crescimento celular, as células foram mantidas em 10 mL de meio α -MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino dialisado suplementado com 100nM de MTX. Quando as células atingiram cerca de 80% de confluência, o que aconteceu em aproximadamente 2 dias, o meio foi substituído pelo meio de produção CHO-S-SFM II suplementado com 100nM de MTX, 50 μ g/mL de penicilina/estreptomicina, 40 μ g/mL de gentamicina, 0,25 μ g/mL de anfotericina B e com as concentrações apropriadas de cada reagente estudado. O meio foi então coletado e trocado diariamente, centrifugado a 1000 x g por 5 minutos, para a remoção das células e o sobrenadante armazenado a -20°C. Durante todo o processo de cultivo, o r-hTSH foi quantificado mediante ensaio imunorradiométrico (IRMA).

3.2.3 Purificação

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

3.2.3.1 Cromatografia de troca iônica

Em uma purificação típica, o meio condicionado (meio contendo hTSH), após ser concentrado de 3 a 5 vezes (em um sistema de filtração tangencial com uma membrana de 5 kDa de “cut off”) e ter seu pH ajustado para 5,0, foi aplicado a uma coluna de 2,6 cm de diâmetro X 10 cm de altura, contendo a resina SP Sepharose Fast Flow (SPFF) (resina de troca catiônica), previamente equilibrada em 0,02M de acetato de sódio, pH 5,0 com 0,05M de NaCl. Após lavagens sucessivas (cinco volumes de coluna no mínimo) com este mesmo tampão, as proteínas foram eluídas neste mesmo tampão com um gradiente linear de NaCl de 0,05M a 0,25M. O fluxo utilizado foi de 200 mL/h e as frações coletadas foram de 5 mL.

3.2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC)

O pool das frações contendo r-hTSH, detectado por IRMA, resultante da primeira etapa de purificação, foi concentrado 16-30 vezes em um dispositivo filtrante de centrífuga Amicon Ultra-15, chegando a um pool de aproximadamente 8 mL. Estes “pools” foram aplicados a uma coluna C₄ semi-preparativa de fase reversa (25 cm X 10 mm D.I). Nesta etapa, a proteína de interesse foi identificada através do tempo de retenção em comparação com um padrão interno de referência (preparação comercial Thyrogen[®]).

A coluna, conectada a um HPLC, foi mantida a 25°C e foram usadas na fase móvel duas soluções A e B (solução A: fosfato de sódio 0,05M pH 7,0 e solução B: 50% de A + 50% de acetonitrila). Para a eluição do hTSH foi aplicado um gradiente linear de 25 a 100% de solução B, durante 40 minutos

(Oliveira, 2003). Um fluxo de trabalho de 2,5 mL/min e detecção por luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 220nm foram utilizados. O pool final foi dialisado contra tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,0, contendo 0,15M NaCl. Após a diálise, o hTSH foi liofilizado sob vácuo controlado entre 100-200mT na fase primária e sob vácuo máximo na fase secundária para retirada da umidade residual.

3.2.4 Avaliação da proteína de interesse

3.2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A análise quantitativa e qualitativa do hTSH presente no meio condicionado e nas diferentes etapas do processo de purificação foi realizada mediante cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e de exclusão molecular (HPSEC). Nos dois casos, a detecção foi realizada com luz ultravioleta, no comprimento de onda de 220nm.

Para a RP-HPLC, a coluna foi mantida a 25°C e para compor a fase móvel, foram utilizadas duas soluções, sendo a solução A fosfato de sódio 0,05M, pH 7,0 e a solução B 50% de A mais 50% de acetonitrila. Para a eluição da proteína de interesse foi utilizado um gradiente linear de 25 a 100 de solução B, durante 40 minutos, com um fluxo de trabalho de 0,5mL/min (OLIVEIRA et. al, 2003).

Já para a HPSEC, a técnica de eluição foi isocrática, sendo a fase móvel utilizada o tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,0, em presença de 0,15M de cloreto de sódio. O fluxo de trabalho utilizado foi de 1,0mL/min. e a coluna foi mantida a temperatura ambiente.

Nas duas técnicas de análise foi utilizada como preparação referência a preparação recombinante comercial Thyrogen (Genzyme).

3.2.4.2 Ensaio imunorradiométrico (IRMA)

Os níveis de expressão do r-hTSH foram determinados por ensaio imunorradiométrico (IRMA) desenvolvido em nosso laboratório (RIBELA; BIANCO; BARTOLINI, 1996).

Para a realização do IRMA, os seguintes reagentes são adicionados simultaneamente: 100 μL de preparação padrão (cuja concentração varia de 0,15 a 100 $\mu\text{UI/mL}$) ou da amostra desconhecida, 50 μL de ^{125}I -mAB anti-hTSH (~60000 contagem por minuto), 300 μL de tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4, contendo 1% de BSA e 0,5% de Tween 20 e 50 μL de fase sólida (anticorpo anti hTSH acoplado à celulose). Todas as amostras foram incubadas em duplicata e mantidas em um agitador rotatório de tubos por aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente.

Após a incubação, foram adicionados 2 mL de tampão de lavagem (fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4 + 0,1% de azida sódica + 0,5% de Tween 20) e a separação foi realizada por centrifugação a 5000 g, por 30 minutos, a 4°C. O processo de lavagem foi repetido 2 vezes.

Em todos os ensaios foram utilizados paralelamente preparações comerciais de controle de qualidade em níveis de concentração baixo, médio e alto.

3.2.4.3 Determinação de proteína total

A concentração de proteína total foi estimada usando o método Micro BCA, que consiste na detecção colorimétrica e quantificação da proteína total em solução diluída após reação com ácido bicinconínico (BCA). A cada ensaio é determinada uma curva padrão de calibração que relaciona diferentes concentrações de soro albumina bovina (BSA) pura (0,5 - 200 $\mu\text{g/mL}$) com a absorvância correspondente, no comprimento de onda de 540 nm. Os seguintes reagentes são adicionados simultaneamente em cada poço de placas de 96 poços: 125 μL de amostra; 125 μL de reagente de trabalho. O reagente de trabalho é constituído por: 50% solução A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, tartarato de sódio e hidróxido de sódio); 48% solução B (solução aquosa de ácido bicinconínico 4%) e 2% solução C (sulfato cúprico penta-hidratado 4%).

3.2.4.4 SDS-PAGE

As preparações obtidas após duas etapas de purificação foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, na presença de 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) sob condições não redutoras.

As amostras a serem analisadas foram adicionadas ao tampão de amostra, que consiste de 2 mL de glicerol 20%, 3 mL de SDS 20%, 10 mg de azul de bromofenol (0,1%), 2,5 mL de tris-HCL pH 6,8 e água Milli-Q, na proporção de 3:1 (tampão:amostra) e aplicadas após serem submetidas a fervura por 15 minutos. Durante a corrida eletroforética, a intensidade da corrente foi de 35 mA. As proteínas presentes no gel foram fixadas mergulhando o gel em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial por 30 minutos. O gel foi então imerso em solução corante composta por 0,25% de Coomassie Brilliant Blue G 250, 45% de metanol e 10% de ácido acético glacial, em agitação contínua por aproximadamente 30 minutos. O gel foi descorado utilizando 10% de ácido acético em água Milli-Q até ser obtida a transparência desejada.

3.2.4.5 Atividade Biológica

A determinação da atividade biológica das diferentes preparações de hTSH foi realizada por um ensaio *in vivo*, utilizando camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c, com peso variando entre 22-30g. O ensaio baseia-se na capacidade que o TSH tem de estimular a produção de T_4 . Visando suprimir o TSH endógeno dos animais, foi administrada oralmente triiodotironina (T_3), em uma concentração final de 3µg/mL (pH 7,5), por 4-5 dias. Após a supressão do TSH endógeno, as amostras a serem analisadas foram administradas intraperitonealmente, em um volume final de 200 µL, após diluição em solução salina. Foram utilizados 10 animais para cada preparação de hTSH testada, para o padrão de referência (Thyrogeon®) e para o controle negativo (solução salina), sendo administrados 10 µg hTSH/animal.

Após 6 horas da administração das amostras, foi realizada a coleta de sangue, via plexo retro-orbital e o nível de T_4 circulante foi mensurado por radioimunoensaio (RIA), utilizando o kit *RIA Coat-A-Count® Total T_4* .

3.2.4.6 Farmacocinética

A análise da depuração plasmática de diferentes preparações de hTSH foi realizada utilizando camundongos da linhagem BALB/c. Foram injetados, intraperitonealmente 2 µg das preparações analisadas e a coleta de sangue (via plexo retro-orbital) foi realizada em diferentes intervalos de tempo: 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 minutos.

A concentração de hTSH presente no plasma dos animais, em cada intervalo de tempo, foi determinada por IRMA.

3.2.4.7 Espectrometria de massa (MALDI-TOF)

As massas moleculares das preparações estudadas (aproximadamente 345 pmoles de amostra) foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry), em um sistema Voyager DE BioSpectrometry Workstation (Applied Biosystem), operado no modo linear do íon positivo, utilizando uma solução saturada de ácido sinapínico (AS) em 50% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoracético como matriz. Esta análise foi realizada no laboratório AIBioTech (Richmond, EUA).

3.2.5 Análise dos carboidratos

3.2.5.1 Análise estrutural dos carboidratos

A análise das estruturas de glicanos encontradas nas diferentes preparações de hTSH foi realizada no laboratório Proteodynamics (Saint Beaulieu/Chevilly, França).

Os perfis dos glicanos de amostras de hTSH foram obtidos após digestão com glicosidase e permetilação dos N-glicanos. As amostras foram denaturadas com 0,5% SDS e 1% β mercaptoetanol, a 90°C, por 10 minutos e deglicosiladas com 20 unidades da enzima PNGase F, a 37°C, por 15 horas. Os N-glicanos foram purificados utilizando uma coluna de carbono grafitizado, sendo eluídos com 25% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA e posteriormente liofilizados. A permetilização é então realizada com hidróxido

de sódio e dimetil sulfato e os produtos desta reação são purificados em uma coluna C₁₈. Os glicanos purificados permetilados foram solubilizados com 50:50 água/metanol, misturados com uma solução matriz (10 mg/mL) de ácido dihidroxibenzeno (DHB) e analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF.

3.2.5.2 Análise Composicional

3.2.5.2.1 Determinação do ácido siálico

A determinação de ácido siálico das diferentes amostras de hTSH obtidas no presente estudo foi feita mediante HPLC de fase reversa, com coluna C₁₈. O ácido siálico de diferentes preparações de hTSH (5 µg de proteína), foi clivado por um processo de hidrólise ácida com bissulfato de sódio 0,5M, por 20 minutos, a 80°C, e derivatizado com OPD, a 80°C, por 40 minutos. Os derivados foram então separados por HPLC de fase reversa, em uma coluna C18, seguindo as condições descritas por ANUMULA (1995), com detecção por fluorescência ($\lambda_{ex}=230\text{nm}$, $\lambda_{em}=425\text{nm}$). Utilizou-se como fase móvel uma solução composta de 0,15% de 1-butilamina, 0,5% de ácido fosfórico e 1% de tetrahidrofurano, e uma solução B composta de 50% de solução A e 50% de acetonitrila. Um gradiente de “steps” foi realizado: 5% de tampão B, em 10 minutos; 13% de tampão B, em 20 minutos e 100% de tampão B, em 10 minutos.

Esta metodologia foi desenvolvida em nosso laboratório e a validação do método foi realizada quanto à linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade. Uma curva dose resposta foi estabelecida relacionando área do pico de interesse com quantidades conhecidas de ácido siálico (0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 µg): $y_{u.a.}=18392x \text{ µg} + 325,32$. O coeficiente de correlação ($r=0,9892$ $n=12$), altamente significativo ($p<0,001$), demonstrou a linearidade de resposta no intervalo analisado. Como controle positivo foi utilizada a fetuina bovina, uma glicoproteína bastante utilizada na literatura que apresenta um conteúdo de ácido siálico de 7,6 mol de ácido siálico/mol de proteína. Como controle negativo foi utilizada a ovoalbumina, uma glicoproteína desprovida de ácido siálico. Foram obtidos os valores de $7,3\pm0,42$ e $0,17\pm0,036$ mol de ácido

siálico/mol de proteína (n=9), para a fetuina e ovoalbumina, respectivamente. Devido à alta sensibilidade do ensaio, são suficientes apenas 5 µg de amostra para a determinação de ácido siálico.

3.2.5.2.2 Cálculos utilizados para análise de carboidratos

3.2.5.2.2.1 Contribuição em massa dos glicanos de hTSH determinado pelas estruturas

Para determinar a massa dos carboidratos em cada uma das diferentes preparações de hTSH estudadas neste trabalho, o seguinte cálculo foi utilizado:

$$\frac{\text{Massa do glicano} \times \text{frequência do glicano na molécula de hTSH}}{100}$$

A somatória da massa de todos os glicanos presentes na glicoproteína resulta na massa total dos glicanos

3.2.5.2.2.2 Determinação da ocupação dos sítios de glicosilação

Para determinar a ocupação dos sítios de glicosilação das diferentes preparações de hTSH aqui estudadas, foi primeiramente obtida a contribuição em massa dos glicanos a partir do MALDI-TOF:

Massa molecular relativa do heterodímero por MALDI-TOF – 24330 = massa dos glicanos

onde 24330 é o valor em massa do esqueleto de aminoácidos do hTSH, que é, portanto, invariável.

Uma vez obtido o valor da contribuição em massa dos glicanos para cada uma das preparações o seguinte cálculo é utilizado:

massa dos glicanos (MALDI-TOF) x n° de sítios ocupados = massa dos glicanos (estrutura)

Uma vez obtido o número de sítios ocupados/mol de proteína é possível calcular a porcentagem de ocupação, sabendo-se que o hTSH possui 3 sítios de glicosilação.

3.2.5.2.2.3 Determinação de monossacarídeos neutros

Para determinar o conteúdo de monossacarídeos neutros em mol de monossacarídeos/mol hTSH, foi aplicada o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{massa do glicano (estrutura)} \times \text{n}^{\circ} \text{ de sítios ocupados} \times \text{fração de massa média do monossacarídeo}}{\text{Massa molecular do monossacarídeo}}$$

Para determinar a fração de massa média do monossacarídeo, o cálculo utilizado é o seguinte:

Massa do monossacarídeo neutro x n° do monossacarídeo presente no glicano x % do glicano

A somatória das frações de massa em cada glicano resulta na fração de massa média do monossacarídeo

3.2.5.2.2.4 Determinação do nível de galactosilação e sialilação

Para determinar o nível de sialilação e de glicosilação, foi utilizada a seguinte fórmula, descrita por Gramer e colaboradores (2011):

$$\frac{E1+2(E2)+3(E3)+4(E4)}{2(E1+E2)+3(E1+E2+E3)+4(E1+E2+E3+E4)}$$

onde E, no numerador, representa a porcentagem das estruturas sialiladas ou galactosiladas, e 1, 2, 3 e 4, os número de ácido siálico ou galactose presentes em cada estrutura e no denominador as estruturas sialiladas ou galactosiladas são multiplicadas pelo número de antenas que a estrutura apresenta.

4 – Resultados

4.1 – Tireotrofina humana recombinante obtida na presença de cicloheximida (CHX).

4.1.1 – Crescimento celular e produtividade de hTSH

Utilizando diferentes concentrações de CHX (0,06; 0,15; 0,2 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$) no cultivo de células CHO produtoras de hTSH observou-se, com o aumento da concentração de CHX, uma diminuição na produtividade volumétrica de hTSH com relação ao cultivo na ausência deste agente (Figura 6). Já na concentração de 0,06 $\mu\text{g/mL}$ foi observada uma diminuição de aproximadamente 30% da produtividade volumétrica. Essa diminuição chegou a ser de até 95% quando 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de CHX foi adicionada ao meio de cultura.

No que diz respeito ao número de células, observou-se uma drástica redução das células viáveis em presença de CHX (Figura 7). Já com uma concentração baixa de CHX (0,06 $\mu\text{g/mL}$) observa-se uma redução da concentração máxima de células viáveis de aproximadamente 65% comparada ao produto obtido sem a adição de CHX. Em concentrações maiores de CHX, o número máximo de células viáveis sofreu uma redução de até 94%. Isto inviabiliza a produção da proteína em concentrações de CHX maiores do que 0,06 $\mu\text{g/mL}$, mesmo considerando que a produtividade volumétrica é ainda aceitável nestas condições. Os estudos subsequentes foram então realizados com preparações de hTSH obtidas com 0,06 $\mu\text{g/mL}$ CHX. Foi observado um decréscimo na produtividade volumétrica destas preparações com relação às preparações controle de $31,5\% \pm 4,9$ ($n=2$) e com o decréscimo do número de células viáveis, houve uma diminuição de 46% na produtividade específica ($\mu\text{g}/10^6$ células/dia) (Figura 8).

Figura 6 Produtividade volumétrica de hTSH na ausência e na presença de diferentes concentrações de cicloheximida

Figura 7 Número de células viáveis ao longo de sete dias de cultivo na ausência e na presença de diferentes concentrações de cicloheximida

Figura 8 Produtividade específica de hTSH na ausência e na presença de diferentes concentrações de cicloheximida

Para a obtenção do material necessário para todas as análises realizadas, os meios de cultura coletados ao longo de 15 dias de cultivo, tanto da cultura controle como da cultura submetida ao tratamento com 0,06 µg/mL de CHX, foram reunidos em “pools” e submetidos à purificação. Os produtos obtidos após duas etapas de purificação, analisados em HPLC de exclusão molecular (HPSEC) e de fase reversa (RP-HPLC) apresentaram os perfis cromatográficos mostrados na Figura 9, sendo a pureza das amostras de aproximadamente 93% em ambos os casos.

Figura 9 Perfis cromatográficos em HPSEC e RP-HPLC das amostras purificadas r-hTSH IPEN Controle (B e D) e r-hTSH IPEN+CHX (A e C). O t_r da preparação de referência em corrida paralela foi de 17,80 min. em HPSEC e de 33,79 min. em RP-HPL

4.1.2 – Análise composicional

4.1.2.1 – Determinação de ácido siálico

O conteúdo de ácido siálico presente nas preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+CHX é mostrada na Tabela 2. Observa-se uma tendência de diminuição do conteúdo de ácido siálico (5,5%) em presença de CHX, embora a diferença entre o conteúdo de ácido siálico presente na amostra tratada e não tratada não seja significativa ($p>0,20$).

Tabela 2 Conteúdo de ácido siálico do r-hTSH IPEN Controle e do r-hTSH IPEN+CHX

Preparação	Conteúdo de ácido siálico mol. ac. sial./mol proteína	Diferença com relação ao controle (%)
r-hTSH IPEN Controle	$6,71 \pm 0,36$	-----
r-hTSH IPEN+CHX	$6,34 \pm 0,53$	-5,5

4.1.2.2 – Determinação de monossacarídeos neutros

O conteúdo de monossacarídeos neutros presentes nas preparações de hTSH obtidas na presença ou ausência de CHX é mostrado na Tabela 3. Houve uma redução no conteúdo de todos os monossacarídeos neutros (fucose, galactose, glucosamina e manose) na preparação de r-hTSH IPEN+CHX. Esta diminuição variou de 11 a 24%. Não foi observada em nenhuma das preparações a presença do monossacarídeo N-acetilgalactosamina, por serem preparações recombinantes.

O conteúdo de manose diminuiu da ordem de 15%, o que refletiu em uma diminuição na ocupação dos sítios de glicosilação de 10% (Tabela 4). Foi observada ainda, uma diminuição de 3,2% na porcentagem de carboidratos presentes na proteína obtida na presença de CHX.

Tabela 3 Quantificação do conteúdo de monossacarídeos neutros das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+CHX

Monossacarídeos	r-hTSH Controle mol/mol hTSH	r-hTSH+CHX mol/mol hTSH	Diferença com relação ao controle (%)
Fucose	0,74	0,56	-24
Galactose	10,05	8,84	-12
Glucosamina	11,16	9,86	-11,6
Manose	6,07	5,18	-14,7
Galactosamina	ND	ND	---

ND: Não detectado

Tabela 4 Total de carboidratos e porcentagem de sítios ocupados das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+CHX

Preparação	Total de Carboidratos (%)	Número de sítios ocupados por molécula	Ocupação (%)
r-hTSH IPEN Controle	21,0	2,02	67,3
r-hTSH IPEN+CHX	17,8	1,73	57,7

4.1.3 – Efeitos biológicos

4.1.3.1 – Atividade biológica

As respostas de T₄ obtidas para as preparações de r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+CHX são mostradas na Tabela 5. Observa-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre elas. Da mesma forma, observa-se que não há diferença significativa entre as preparações recombinantes obtidas neste trabalho com relação à preparação recombinante de referência, Thyrogen®.

Tabela 5 Nível de T₄ de diferentes preparações de hTSH, determinadas por bioensaio *in vivo*

Preparação	T ₄ (µg/dL)
Thyrogen®	2,40 ± 0,34
r-hTSH IPEN Controle	2,67 ± 0,38
r-hTSH IPEN+CHX	2,44 ± 0,58

4.1.3.2 – Farmacocinética

O tempo de meia vida circulatória das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+CHX foi avaliado.

Na Figura 10 é mostrada a curva de concentração de hTSH no soro em função do tempo correspondente às duas preparações de hTSH administradas aos camundongos. A concentração máxima de hTSH no soro ocorre em 90 minutos após a sua administração. Os resultados de tempo de meia vida circulatória ($t_{1/2}$) e da área sob a curva de concentração de hTSH X tempo (AUC) para as diferentes preparações são mostrados na Tabela 6. É possível observar que as amostras tratada e não tratada não apresentaram diferença significativa da meia vida circulatória do hTSH ($t_{1/2}$) e nem de sua exposição (AUC) ($p>0,10$).

Figura 10 Concentração plasmática de hTSH de diferentes preparações, em 5 horas

Tabela 6 Parâmetros farmacocinéticos após a administração de r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+CHX

Preparação	$t_{1/2}$ (minutos)	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$)
r-hTSH IPEN Controle	$105,5 \pm 18,14$	$15555 \pm 1197,8$
r-hTSH IPEN+CHX	$94,8 \pm 11,74$	$15348 \pm 1229,1$

Um segundo estudo foi realizado aumentando para $0,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ a concentração de CHX adicionada ao meio de cultura. Observou-se uma diminuição de cerca de 75% na produtividade volumétrica de hTSH, tornando inviável a obtenção de quantidades úteis para os estudos propostos. Apenas o conteúdo de ácido siálico foi determinado, sendo observada uma redução de 51% com relação ao conteúdo de ácido siálico encontrado para a preparação controle. Desta forma, concluímos que a CHX não apresenta vantagem para a expressão do hTSH, independente da concentração utilizada.

4.2 – Tireotrofina humana recombinante obtida na presença de butirato de sódio (NaBu)

4.2.1 Crescimento celular e produtividade de hTSH

O crescimento das células CHO produtoras de hTSH, na ausência e na presença de diferentes concentrações (0,5; 1; 1,5 e 2 mM) de butirato de sódio foi avaliado. Nestas condições, o número de células viáveis ao longo de sete dias de cultivo é mostrado na Figura 11. Podemos observar que o número de células viáveis diminui com relação ao controle com o aumento da concentração de NaBu. Imediatamente após 24h à adição de butirato de sódio, na maior concentração analisada (2 mM), o número de células viáveis já é diminuída em cerca de 70% e no final do cultivo celular esta queda chega a ser de aproximadamente 85%. Enquanto o número de células na cultura controle cai a partir do quinto dia de cultivo, com a tendência de continuar caindo ao longo dos dias, na cultura tratada com butirato (exceto na concentração de 0,5mM) o número de células mantém-se mais estável durante este período, mostrando a capacidade do butirato de aumentar a longevidade da cultura.

A produtividade volumétrica de hTSH aumentou com a utilização de NaBu, sendo que o maior aumento foi alcançado na concentração de 1mM de NaBu (Figura 12).

Com a diminuição no número de células viáveis e com o aumento na produtividade volumétrica, houve um conseqüente aumento na produtividade específica de hTSH, chegando este aumento a aproximadamente 10 vezes na concentração de 2mM de NaBu (Figura 13).

Apesar do maior aumento na produtividade específica ter sido encontrado na concentração de 2mM de NaBu, para realizar o presente estudo foi escolhida a concentração de 1 mM de NaBu, considerando o balanço apropriado entre o crescimento celular e a produtividade volumétrica de hTSH. Quando 1mM de butirato foi adicionado, a proliferação celular nos cinco primeiros dias foi aproximadamente 3 vezes mais lenta que na cultura controle, sendo as inclinações das curvas de crescimento celular na presença ou não de butirato de sódio de 1,08 e 3,14 células/dia, respectivamente.

Apesar do crescimento celular sofrer uma diminuição na presença de butirato de sódio, a produtividade volumétrica de hTSH aumentou cerca de

$3,3 \pm 0,53$ vezes ($n=3$ ensaios independentes) com relação àquela da cultura controle, o que resultou em uma produtividade específica ($\mu\text{g}/10^6\text{células}/\text{dia}$) aproximadamente 5,2 vezes maior na presença de butirato (Figura 14).

Figura 11 Número de células viáveis ao longo de sete dias de cultivo, na ausência e na presença de diferentes concentrações de butirato de sódio

Figura 12 Produtividade volumétrica de hTSH na ausência e na presença de diferentes concentrações de butirato de sódio

Figura 13 Produtividade específica de hTSH na ausência ou na presença de diferentes concentrações de NaBu

Figura 14 Análise em cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC) de meios condicionados derivados de cultivos com (B) e sem (A) adição de butirato ao meio de cultura.

Para a obtenção do material necessário para todas as análises realizadas, os meios de cultura coletados ao longo de 15 dias de cultivo, tanto da cultura controle como da cultura submetida ao tratamento com 1 mM de NaBu, foram reunidos em “pools” e submetidos à purificação. Os materiais obtidos após duas etapas de purificação quando analisados em HPLC de exclusão molecular (HPSEC) e de fase reversa (RP-HPLC) mostraram os perfis cromatográficos da Figura 15, sendo a pureza das preparações de aproximadamente 98%.

Figura 15 Perfil cromatográfico em HPSEC e RP-HPLC do hTSH purificado originado de cultivos com (A e C) e sem (B e D) adição de NaBu ao meio de cultura. A preparação interna de referência (Thyrogen®) apresentou, em corrida paralela, $t_r=17,29$ min. em HPSEC e de 34,05 min. em RP-HPLC.

4.2.2 – Espectrometria de Massa

A massa molecular relativa (M_r) das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF. O perfil encontrado para cada uma das amostras é mostrado na Figura 16.

Os resultados referentes a esta análise encontram-se na Tabela 7, juntamente com os dados da preparação Thyrogen® e da preparação hipofisária, que já haviam sido determinadas em trabalhos anteriores do nosso grupo (MENDONÇA et. al, 2005; CARVALHO et. al, 2009). Para as isoformas heterodiméricas das amostras obtidas na ausência e na presença de NaBu foram encontradas massas experimentais de 29390,11 e 29459,48, respectivamente e valores variando de 13436 a 14316 e de 14570 a 15485 para as distintas isoformas das subunidades α e β . É possível observar que o valor encontrado pela determinação direta do heterodímero está de acordo com a somatória dos valores encontrados para suas respectivas subunidades. Observa-se ainda que os valores encontrados para as preparações recombinantes são maiores que o valor encontrado para a preparação hipofisária.

Um pequeno aumento de massa (aproximadamente 0,24%) foi observado para o r-hTSH IPEN+NaBu em relação à preparação r-hTSH IPEN Controle.

Figura 16 Espectrometria de massa de preparações r-hTSH IPEN Controle (A) r-hTSH IPEN+NaBu (B). Os quadros em destaque correspondem às regiões das subunidades α e β .

Tabela 7 Massa molecular relativa (M_r) de várias preparações de hTSH determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF

Preparação	Heterodímero (Experimental) (Mr)	Subunidade α (Mr)	Subunidade β (Mr)	($\alpha+\beta$)	($\alpha+\beta$) / Exp.
r-hTSH IPEN Controle	29390,11	14026,64	14947,50	28974,14	0,99
r-hTSH IPEN+NaBu	29459,48	13985,83	15191,86	29177,69	0,99
Thyrogen®	29612	13860	15581	29441	0,99
p-hTSH	27829	13019	14476	27495	0,99

4.2.3 – Análise estrutural dos carboidratos

Foram identificadas 17 estruturas complexas para a preparação de r-hTSH IPEN Controle e 12 para a preparação r-hTSH IPEN+NaBu, com diferentes níveis de sialilação, apresentando ou não resíduos de fucose e uma estrutura híbrida nas duas preparações (Figura 17). Em ambas as preparações as estruturas predominantes foram as mesmas (estruturas bi-antenárias bi-sialiladas, bi-antenárias mono-sialiladas e estruturas bi-antenárias bi-sialiladas fucosiladas), sendo quantitativamente 17,7% mais freqüentes para a preparação r-hTSH IPEN+NaBu. A intensidade relativa de cada estrutura encontrada nas preparações estudadas de acordo com sua massa teórica é mostrada na Figura 18.

A Tabela 8 apresenta a distribuição dos N-glicanos de acordo com sua antenaridade e sialilação. As estruturas bi-antenárias, independente do nível de sialilação foram sempre maior (90,3%) para a preparação obtida na presença de NaBu do que na preparação controle (76,2%), representando um aumento de 14,1% nestas estruturas quando o NaBu foi utilizado. Por outro lado, estruturas tri-antenárias representam 9,5% das estruturas encontradas no r-hTSH IPEN+NaBu, enquanto na preparação controle a frequência destas estruturas foi de 22,2%, o que representa uma diminuição de 12,7%. Estruturas tetra-antenárias, presentes em baixa frequência, foram encontradas somente na preparação r-hTSH IPEN Controle.

Considerando apenas a porcentagem das estruturas sialiladas, independentemente da antenaridade, observa-se que as estruturas bi-sialiladas da preparação r-hTSH IPEN+NaBu aumentam 8,9% com relação ao controle enquanto as estruturas não sialiladas, mono-sialiladas, tri-sialiladas e tetra-sialiladas diminuem 2,3%, 1,8%, 4,4% e 0,6%, respectivamente.

Com base nas estruturas encontradas em ambas as preparações, o nível de sialilação e galactosilação foi calculado. A adição de NaBu ao meio de cultura possibilitou a obtenção de um r-hTSH com um nível de galactosilação 2,2% maior e um nível de sialilação 5,2% maior, quando comparado ao controle (Tabela 9).

Figura 17 Estruturas de N-glicanos de preparações de hTSH obtidas com e sem adição de NaBu ao meio de cultura

Figura 18 Intensidade relativa das estruturas encontradas nas preparações de hTSH IPEN Controle e hTSH IPEN+NaBu

Tabela 8 Distribuição dos N-glicanos de preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu, de acordo com a antenaridade e o nível de sialilação.

Nível de Sialilação	% bi-Antenárias		% tri-Antenárias		% tetra-antenárias		% total por nível de sialilação	
	-NaBu	+NaBu	-NaBu	+NaBu	-Na Bu	+NaBu	-NaBu	+NaBu
0	4,8	1,2	1,6	2,9		ND	6,4	4,1
1	32,1	34,4	4,6	0,5		ND	36,7	34,9
2	39,3	54,7	8,5	2,6	0,6	ND	48,4	57,3
3		ND	7,5	3,5	0,4	ND	7,9	3,5
4		ND		ND	0,6	ND	0,6	ND
Total por antena	76,2	90,3	22,2	9,5	1,6	ND		

ND: Não Detectado

Tabela 9 Nível de galactosilação e sialilação das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu

	r-hTSH IPEN Controle	r-hTSH IPEN+NaBu	Diferença com relação ao controle (%)
Nível de galactosilação (%)	97,2	99,4	+2,2
Nível de sialilação (%)	75,6	80,8	+5,2

4.2.4 – Ocupação dos sítios de glicosilação

Para determinar a ocupação dos sítios de glicosilação das preparações de hTSH obtidas na presença ou ausência de NaBu, a razão entre a massa média dos glicanos obtidos a partir da determinação das estruturas (Tabela 10) e a massa relativa dos glicanos determinada por MALDI-TOF (Tabela 7), foi calculada, sendo possível calcular o número de sítios ocupados por molécula, bem como a ocupação (%), considerando os 3 possíveis sítios de glicosilação presentes no hTSH (Tabela 11).

É possível observar que a adição de NaBu ao meio de cultura possibilitou um aumento de 3% na ocupação dos sítios de glicosilação quando comparado à preparação controle.

Tabela 10 Contribuição em massa dos glicanos nas preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu

Estrutura	Massa do glicano	% relativa		Contribuição em massa do glicano	
		Controle	NaBu	Controle	NaBu
(Gal) ₁ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1478,54	0,9	0,0	13,31	00,00
(Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1640,59	3,9	1,2	63,98	19,69
(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₁ + (Man) ₄ (GlcNAc) ₂	1728,61	1,5	2,7	25,93	46,67
(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1769,64	2,7	0,9	47,78	15,93
(NeuAc) ₁ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1931,69	22,0	26,5	424,97	511,90
(NeuAc) ₁ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2077,74	5,9	4,3	122,59	89,34
(Gal) ₂ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2135,79	1,6	2,9	34,17	61,94
(NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2222,78	30,6	42,2	680,17	938,01
(NeuAc) ₁ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2296,82	3,4	0,5	78,09	11,48
(NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2368,84	8,7	12,5	206,09	296,10
(NeuAc) ₁ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2442,88	1,2	0,0	29,31	00,00
(NeuAc) ₂ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2587,91	7,0	2,1	181,15	54,35
(NeuAc) ₂ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2733,97	1,5	0,5	41,01	13,67
(NeuAc) ₃ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2878,01	5,5	2,0	158,29	57,56
(NeuAc) ₃ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3025,07	2,0	1,5	60,50	45,38
(NeuAc) ₂ (Gal) ₄ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3099,10	0,6	0,0	18,59	00,00
(NeuAc) ₃ (Gal) ₄ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3390,20	0,4	0,0	13,56	00,00
(NeuAc) ₄ (Gal) ₄ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3681,30	0,6	0,0	22,09	00,00
Massa dos glicanos (Da)				2221,58	2162,02

Tabela 11 Ocupação dos sítios de glicosilação das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu

Preparação	Massa de carboidratos (MALDI-TOF) (Da)	Massa de carboidratos (estrutura) (Da)	Sítios ocupados por molécula	Ocupação (%)
r-hTSH IPEN Controle	5060,11	2221,58	2,28	76
r-hTSH IPEN+NaBu	5129,48	2162,02	2,37	79

4.2.5 – Análise composicional

4.2.5.1 – Determinação de ácido siálico

A Tabela 12 mostra o conteúdo de ácido siálico das amostras de r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu, além da preparação Thyrogen® e de uma preparação de hTSH de origem hipofisária.

A preparação de r-hTSH IPEN+NaBu apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) de aproximadamente 12% no conteúdo de ácido siálico quando comparado à preparação controle. Comparando o conteúdo de ácido siálico da preparação controle com a preparação de hTSH comercial Thyrogen®, observa-se uma pequena diminuição no conteúdo de ácido siálico desta última preparação, esta diferença, porém, não é estatisticamente significativa.

Observou-se ainda que o conteúdo de ácido siálico da preparação pituitária é cerca de 3-4 vezes menor do que o conteúdo de todas as preparações recombinantes analisadas.

Tabela 12 Conteúdo de ácido siálico de preparações de hTSH IPEN obtidas a partir de cultivos na presença e na ausência de butirato de sódio e dos produtos comerciais recombinante (Thyrogen[®]) e hipofisário

Preparação	Conteúdo de ácido siálico mol. ac. sial./mol proteína	Diferença com relação ao controle (%)
r-hTSH IPEN Controle	6,71 ± 0,36	-----
r-hTSH IPEN+NaBu	7,52 ± 0,091	+12
Thyrogen [®]	6,25 ± 0,54	-7
p-hTSH	1,88 ± 0,14	-72

4.2.5.2 Determinação dos monossacarídeos neutros

O conteúdo de monossacarídeos neutros nas preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN NaBu foi determinado considerando a contribuição em massa de cada um deles ao total de carboidratos (Tabela 13).

O monossacarídeo mais abundante em ambas as preparações é o N-acetilglucosamina, isso por que ele faz parte da composição do núcleo pentassacarídeo, além de compor as antenas das estruturas dos carboidratos. Não se observou a presença de N-acetilgalactosamina em nenhuma das preparações, o que já era esperado por se tratarem de preparações recombinantes.

É possível observar que houve uma diminuição de aproximadamente 3% no conteúdo de galactose e de 1,2% no conteúdo de N-acetilglucosamina, por outro lado, os monossacarídeos manose e fucose mostraram um aumento de 2,6 e 7,7%, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13 Quantificação do conteúdo de monossacarídeos neutros das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu

Monossacarídeo*	Fração de massa do monossacarídeo		Contribuição em massa do monossacarídeo no total de carboidratos (Da)		Conteúdo do monossacarídeo (mol/mol)	
	Controle	NaBu	Controle	NaBu	Controle	NaBu
Manose	0,224	0,227	1134,61	1163,15	7,00	7,18
Galactose	0,159	0,152	805,37	778,85	4,97	4,81
Glucosamina	0,392	0,383	1985,56	1962,49	9,78	9,66
Fucose	0,015	0,016	75,99	81,98	0,52	0,56

* Massa molecular dos monossacarídeos: Manose e galactose – 162,05 Da
N-acetilglucosamina – 203,08 Da
Fucose – 146,06 Da

4.2.6 – Efeitos biológicos

4.2.6.1 – Atividade biológica

Na Tabela 14 são apresentadas as respostas de T_4 encontradas para as preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu, e para as preparações de referência recombinante (Thyrogen[®]) e hipofisária (p-hTSH). Foi observada uma diferença altamente significativa ($p>0,001$) entre as preparações recombinantes e a preparação hipofisária, sendo o nível de T_4 , no caso das preparações recombinantes, aproximadamente 3-4 vezes maior do que os níveis de T_4 da preparação nativa. Os níveis de T_4 obtidos para as duas preparações recombinantes em estudo não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$). Da mesma forma, não é observada diferença significativa entre os níveis de T_4 das preparações recombinantes IPEN e a preparação de referência recombinante Thyrogen[®].

Tabela 14 Nível de T_4 de diferentes preparações de hTSH, determinados por bioensaio *in vivo*

Preparação	T_4 ($\mu\text{g/dL}$)
Thyrogen [®]	$2,40 \pm 0,34$
r-hTSH IPEN Controle	$2,67 \pm 0,38$
r-hTSH IPEN+NaBu	$2,70 \pm 0,71$
p-hTSH	$0,75 \pm 0,18$

4.2.6.2 – Farmacocinética

O tempo de meia vida circulatória das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu foi avaliado, juntamente com o de duas preparações referência, uma de origem hipofisária e uma recombinante comercial (Thyrogen[®]).

A Figura 19 mostra, para as diferentes preparações de hTSH administradas aos camundongos, as curvas de concentração de hTSH no soro em função do tempo. Para todas as preparações recombinantes a concentração máxima de hTSH no soro ocorre em 90 minutos após a administração, enquanto para a preparação hipofisária o máximo foi atingido mais precocemente, aos 60 minutos. Os resultados de tempo de meia vida circulatória ($t_{1/2}$) e da área sob a curva de concentração de hTSH X tempo (AUC) para as diferentes preparações são mostrados na Tabela 15. É possível observar que, com relação aos parâmetros analisados, não houve diferença significativa entre as amostras tratada e não tratada, bem como não houve diferença significativa entre estas amostras e a preparação comercial recombinante. Já a preparação hipofisária apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros estudados com relação às preparações recombinantes, sendo a meia vida das preparações recombinantes cerca de 2 vezes maior que a hipofisária e a exposição (AUC) cerca de 30% maior.

Figura 19 Concentração plasmática de hTSH de diferentes preparações em 5 horas

Tabela 15 Parâmetros farmacocinéticos após a administração de diferentes preparações de hTSH

Preparação	$t_{1/2}$ (minutos)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)
r-hTSH IPEN Controle	$105,5 \pm 18,14$	$15555 \pm 1197,8$
r-hTSH IPEN+NaBu	$98,6 \pm 20,54$	$15298 \pm 2484,7$
Thyrogen [®]	$115,1 \pm 3,12$	$16155 \pm 1398,1$
p-hTSH	$56,5 \pm 15,7$	$11463 \pm 682,1$

Salientamos que os resultados apresentados neste item foram publicados em Applied Biochemistry and Biotechnology, volume 7, páginas: 1658-1672, 2013.

4.3 – Tireotrofina humana recombinante obtida na presença de cloreto de manganês (MnCl_2)

4.3.1 – Crescimento celular e produtividade do hTSH

A produtividade volumétrica de hTSH na ausência ou presença de diferentes concentrações de cloreto de manganês (4, 10, 20 e 40 μM) foi avaliada (Figura 20). Observa-se um aumento na produtividade volumétrica com relação ao controle de aproximadamente 1,4 vezes utilizando 10 μM de MnCl_2 e, em concentrações maiores, ocorre uma diminuição da produtividade de hTSH, chegando até a uma diminuição de 1,5 vezes, na dose de 40 μM .

O crescimento celular analisado em presença destas mesmas concentrações de MnCl_2 é mostrado na Figura 21. Observa-se que a concentração máxima de células viáveis sofre um decréscimo quando MnCl_2 foi adicionado, atingindo uma queda de aproximadamente 20% no número de células viáveis quando 40 μM de MnCl_2 foi adicionado ao meio de cultura. A dose de 10 μM de MnCl_2 provocou uma queda intermediária, com redução de aproximadamente 9% do número de células viáveis.

A produtividade específica de hTSH na presença de diferentes concentrações de MnCl_2 apresentou um comportamento semelhante ao da produtividade volumétrica. Observa-se um aumento de até aproximadamente 1,3 vezes com relação ao controle na presença de 10 μM de MnCl_2 e, em concentrações superiores, a produtividade específica começa a diminuir, chegando aos valores iniciais (Figura 22).

Figura 20 Produtividade volumétrica de hTSH na ausência e na presença de diferentes concentrações de MnCl_2

Figura 21 Número de células viáveis ao longo de cinco dias de cultivo, na presença ou ausência de diferentes concentrações de MnCl_2 .

Figura 22 Produtividade específica de r-hTSH obtido na presença ou ausência de MnCl_2

4.3.2 – Determinação de ácido siálico

Uma vez que a alteração na produtividade e na proliferação celular causada pela presença de MnCl_2 foi pequena e somado ao fato de que é descrito na literatura que sua presença no meio de cultura não altera a proliferação celular, tampouco a produtividade das células, e que sua maior ação seria na sialilação, o conteúdo de ácido siálico de cada preparação foi analisado para determinar qual destas concentrações seria a mais efetiva no aumento da sialilação. A maior diferença no conteúdo de ácido siálico entre a preparação controle e a preparação produzida com MnCl_2 foi observada quando foi adicionado à cultura $10\mu\text{M}$ de MnCl_2 (Figura 23). Quando concentrações maiores de MnCl_2 são utilizadas observa-se uma diminuição no conteúdo de ácido siálico com relação ao controle, diminuição esta que chega a ser de aproximadamente 8% na concentração de $40\mu\text{M}$. Optamos por seguir os estudos utilizando $10\mu\text{M}$ de MnCl_2 a fim de verificar se tal concentração

seria capaz de causar alterações nas estruturas de carboidratos presentes no hTSH.

Figura 23 Diferença relativa ao controle do conteúdo de ácido siálico nas diferentes concentrações de MnCl_2

Para a obtenção do material necessário para todas as análises realizadas, os meios de cultura coletados ao longo de 15 dias de cultivo, tanto da cultura controle como da cultura submetida ao tratamento com $10\mu\text{M}$ de MnCl_2 , foram reunidos em “pools” e submetidos à purificação. Os materiais obtidos após duas etapas de purificação quando analisados em HPLC de exclusão molecular (HPSEC) e de fase reversa (RP-HPLC) mostraram os perfis cromatográficos da Figura 24, sendo a pureza de ambas as preparações de aproximadamente 95%.

Figura 24 Perfil cromatográfico em RP-HPLC e HPSEC do hTSH purificado originado de cultivos com (B e D) e sem (A e C) adição de cloreto de manganês ao meio de cultura, respectivamente. A preparação interna de referência (Thyrogen®) apresentou, em corridas paralelas, $t_r=34,87$ min. em RP-HPLC e de 19,04 min. em HPSEC.

4.3.3 – Espectrometria de Massa

A massa molecular relativa (M_r) das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+ $MnCl_2$ foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF. O perfil encontrado para cada uma das amostras é mostrado na Figura 25.

Os resultados referentes à esta análise encontram-se na Tabela 16. Para as isoformas heterodiméricas das amostras obtidas na ausência e na presença de $MnCl_2$ foram encontradas massas experimentais de 29771,41 e 29758,4, respectivamente. Para as subunidades α das duas preparações foram encontrados valores de 14098,02 e de 14085,26 para o r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+ $MnCl_2$, respectivamente. Para a subunidade β foram encontrados valores de 15286,32 e de 15314,62 para a o r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+ $MnCl_2$, respectivamente. É possível observar que o valor encontrado pela determinação direta do heterodímero está de acordo com a somatória dos valores encontrados para suas respectivas subunidades. Observa-se ainda que não há diferença (0,044%) entre as massas moleculares encontradas para as diferentes preparações recombinantes estudadas neste capítulo.

Tabela 16 Massa molecular relativa (M_r) das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+ $MnCl_2$ determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF

Preparação	Heterodímero (Experimental) (Mr)	Subunidade α (Mr)	Subunidade β (Mr)	($\alpha+\beta$)	($\alpha+\beta$) / Exp.
r-hTSH IPEN Controle	29771,51	14098,02	15286,32	29384,34	0.99
r-hTSH IPEN+ $MnCl_2$	29758,41	14085,26	15314,62	29399,88	0.99

Figura 25 Espectro de massa MALDI-TOF de preparações de hTSH IPEN produzidas na ausência (A) e na presença (B) de MnCl_2

4.3.4 – Análise estrutural dos carboidratos

A intensidade relativa de cada estrutura encontrada nas preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂ é mostrada na Figura 26. Estruturas bi-antenárias bi-sialiladas (2792 Da) e bi-antenárias mono-sialiladas (2431 Da) foram as estruturas mais abundantes em ambas as preparações, sendo quantitativamente 7,2% mais freqüentes na preparação r-hTSH IPEN+MnCl₂. Em ambas as preparações foram identificadas quatorze estruturas, sendo treze estruturas do tipo complexa e uma estrutura do tipo híbrida (Figura 27). Os glicanos do tipo complexo apresentam estruturas di, tri e tetra-antenárias. Nas estruturas identificadas foram observados diferentes níveis de sialilação e estas estruturas podem ou não apresentar resíduos de fucose. A distribuição dos N-glicanos de acordo com sua antenaridade e sialilação encontra-se descrita na Tabela 17. A frequência das estruturas bi-antenárias na preparação obtida na presença de MnCl₂ (79,2%) é maior do que na preparação controle (72,1%), representando um aumento de 7,1% nestas estruturas quando o MnCl₂ foi utilizado. Com relação às estruturas tri-antenárias, observa-se uma maior freqüência destas estruturas na preparação controle (26,4%) do que na preparação obtida em presença de MnCl₂ (19,3%), representando uma diminuição de 7,1% nestas estruturas quando o MnCl₂ foi utilizado. Estruturas híbridas e tetra-antenárias foram observadas em baixa freqüência em ambas as preparações.

Com relação ao nível de sialilação das estruturas identificadas, independentemente da antenaridade, as estruturas bi-sialiladas e tetra-sialiladas da preparação r-hTSH IPEN+MnCl₂ sofreram um aumento de 4,8% e 0,3%, respectivamente com relação às da preparação controle, enquanto as não sialiladas, mono-sialiladas e tri-sialiladas diminuíram em 0,4%, 0,5% e 4,1%, respectivamente com relação ao controle.

Com base nas estruturas encontradas em ambas as preparações, o nível de sialilação e galactosilação foi calculado. A adição de MnCl₂ ao meio de cultura possibilitou a obtenção de um r-hTSH com um nível de sialilação 5,9% maior, porém não houve praticamente alteração no nível de galactosilação (Tabela 18).

Figura 26 Intensidade relativa das estruturas encontradas nas preparações de r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂

Figura 27 Estruturas de N-glicanos de preparações de hTSH obtidas com e sem adição de MnCl₂ ao meio de cultura

Tabela 17 Distribuição dos N-glicanos de preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂, de acordo com a antenaridade e o nível de sialilação.

Nível de Sialilação	% bi-Antenárias		% tri-Antenárias		% tetra-antenárias		% total por nível de sialilação	
	Controle	+MnCl ₂	Controle	+MnCl ₂	Controle	+MnCl ₂	Controle	+MnCl ₂
0	1,0	0,9	1,1	0,8	ND		2,1	1,7
1	22,6	22,7	1,4	0,8	ND		24,0	23,5
2	48,5	55,6	8,5	6,2	ND		57,0	61,8
3		ND	15,4	11,5	0,8	0,6	16,2	12,1
4		ND		ND	0,7	1,0	0,7	1,0
Total por antena	72,1	79,2	26,4	19,3	1,5	1,6		

Tabela 18 Nível de galactosilação e sialilação das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂

	r-hTSH IPEN Controle	r-hTSH-IPEN+MnCl₂	Diferença com relação ao controle (%)
Nível de galactosilação	99,1	99,3	+0,2
Nível de sialilação	82,1	88,0	+5,9

4.3.5 – Ocupação dos sítios de glicosilação

Baseado na massa média dos glicanos (Tabela 19) e na massa relativa determinada por MALDI-TOF (Tabela 16) das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂, o número de sítios ocupados por molécula foi calculado, bem como a ocupação (%), considerando que o hTSH tem 3 sítios de glicosilação (Tabela 20).

É possível observar que a adição de MnCl₂ ao meio de cultura resultou em um aumento de 1,3% na ocupação dos sítios de glicosilação quando comparado à preparação controle.

Tabela 19 Contribuição em massa dos glicanos nas preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂

Estrutura	Massa do glicano	% relativa		Contribuição em massa do glicano	
		Controle	MnCl ₂	Controle	MnCl ₂
(Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1640,59	1,0	0,9	16,40	14,77
(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₁ + (Man) ₄ (GlcNAc) ₂	1728,61	0,9	0,7	15,56	12,10
(NeuAc) ₁ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1931,69	18,6	19,8	359,29	382,47
(NeuAc) ₁ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2077,74	3,1	2,2	64,41	45,71
(Gal) ₂ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2135,79	1,1	0,8	23,49	17,09
(NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2222,78	38,1	46,9	846,88	1042,48
(NeuAc) ₁ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2296,82	1,4	0,8	32,16	18,37
(NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2368,84	10,4	8,7	246,36	206,09
(NeuAc) ₂ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2587,91	5,9	4,8	152,69	124,22
(NeuAc) ₂ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2733,97	2,6	1,4	71,08	38,28
(NeuAc) ₃ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2878,01	9,4	8,1	270,63	233,20
(NeuAc) ₃ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3025,07	6,0	3,4	181,50	102,85
(NeuAc) ₃ (Gal) ₄ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3390,20	0,8	0,6	27,12	20,34
(NeuAc) ₄ (Gal) ₄ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3681,30	0,7	1,0	25,77	36,81
Massa dos glicanos (Da)				2333,34	2294,76

Tabela 20 Ocupação dos sítios de glicosilação das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂

Preparação	Massa relativa glicanos (MALDI-TOF) (Da)	Massa média dos glicanos (estrutura) (Da)	Sítios ocupados por molécula	Ocupação (%)
r-hTSH IPEN Controle	5441,41	2333,34	2,33	77,7
r-hTSH IPEN+MnCl ₂	5428,40	2294,76	2,37	79,0

4.3.6 – Análise composicional

4.3.6.1 – Determinação de ácido siálico

O conteúdo de ácido siálico das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂ foi avaliado e os resultados desta análise encontram-se na Tabela 21. Observa-se um pequeno aumento (1,7%) no conteúdo de ácido siálico da preparação obtida na presença de MnCl₂ quando comparada com o controle, embora este aumento não seja significativo ($p < 0,05$). Ressaltamos que, mais uma vez, o conteúdo de nossas preparações recombinantes são quantitativamente comparáveis com o conteúdo de ácido siálico encontrado para a preparação referência recombinante Thyrogen®.

Tabela 21 Conteúdo de ácido siálico do r-hTSH IPEN Controle e do r-hTSH IPEN+MnCl₂

Preparação	Conteúdo de ácido siálico mol. ac. sial./mol proteína	Diferença com relação ao controle (%)
r-hTSH IPEN Controle	6,54 ± 0,82	-----
r-hTSH IPEN + MnCl ₂	6,65 ± 0,33	+1,7
r-hTSH Thyrogen	6,35 ± 0,23	-2,9

4.3.6.2 – Determinação de monossacarídeos neutros

Considerando a contribuição em massa de cada um dos monossacarídeos ao total de carboidratos, foi possível determinar seus conteúdos nas preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂ (Tabela 22).

O monossacarídeo N-acetilglucosamina foi o monossacarídeo mais abundante em ambas as preparações e a manose presente na preparação obtida na presença de MnCl₂ apresentou um pequeno aumento de aproximadamente 1,3%, refletindo o aumento da ocupação dos sítios de glicosilação do hTSH.

A adição de MnCl₂ ao meio de cultura gerou uma diminuição de 0,6% e 26,8% dos monossacarídeos neutros galactose e fucose, respectivamente, e um aumento de 0,3% e 1,3% dos monossacarídeos N-acetilgalactosamina e manose, respectivamente.

Tabela 22 Quantificação do conteúdo de monossacarídeos neutros das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂

Monossacarídeo*	Fração de massa do monossacarídeo (%)		Contribuição em massa do monossacarídeo no total de carboidratos (Da)		Conteúdo do monossacarídeo (mol/mol)	
	Controle	MnCl ₂	Controle	MnCl ₂	Controle	MnCl ₂
Manose	0,213	0,216	1158,01	1174,73	7,14	7,23
Galactose	0,157	0,156	853,56	848,42	5,27	5,24
N-acetilglucosamina	0,376	0,377	2044,19	2050,35	10,07	10,10
Fucose	0,015	0,011	81,55	59,82	0,56	0,41

* Massa molecular dos monossacarídeos: Manose e galactose – 162,05 Da
N-acetilglucosamina – 203,08 Da
Fucose – 146,06 Da

4.3.7 – Efeitos biológicos

4.3.7.1 – Atividade biológica

As respostas de T_4 obtidas para as preparações de r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+ $MnCl_2$ são mostradas na Tabela 23. Pode-se observar que não houve diferença significativa nos níveis de T_4 obtidos para as diferentes preparações recombinantes. Da mesma forma, não houve diferença significativa ($p < 0,25$) entre nossas preparações recombinantes e a preparação recombinante referência Thyrogen®, o que permite concluir que nossas preparações são tão ativas quanto aquela disponível comercialmente.

Tabela 23 Nível de T_4 de diferentes preparações de hTSH, determinadas por bioensaio *in vivo*

Preparação	T_4 ($\mu g/dL$)
Thyrogen®	$4,6 \pm 0,40$
r-hTSH IPEN Controle	$3,76 \pm 0,85$
r-hTSH IPEN + $MnCl_2$	$3,89 \pm 0,50$

4.3.7.2 – Farmacocinética

A concentração máxima de hTSH ocorreu após 90 minutos da sua administração tanto para as amostras de r-hTSH IPEN Controle quanto r-hTSH IPEN+ $MnCl_2$, da mesma forma que para as outras preparações recombinantes estudadas anteriormente (Figura 28). A Tabela 24 mostra os dados de meia vida circulatória do hTSH ($t_{1/2}$) e de sua exposição (AUC) nas duas preparações estudadas. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na meia vida circulatória do r-hTSH+ $MnCl_2$ entre as preparações estudadas. Da mesma forma, não houve diferença significativa na exposição do r-hTSH IPEN+ $MnCl$ quando comparado ao controle ($p > 0,05$).

Figura 28 Concentração plasmática de diferentes preparações de hTSH em 5 horas

Tabela 24 Parâmetros farmacocinéticos após a administração de r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+MnCl₂

Preparação	$t_{1/2}$ (minutos)	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$)
r-hTSH IPEN Controle	100 ± 12	$15524 \pm 807,32$
r-hTSH IPEN+MnCl ₂	107 ± 14	$16874 \pm 593,56$

4.4 – Tireotrofina humana recombinante obtida na presença de NaBu+MnCl₂

4.4.1 – Crescimento celular e produtividade do hTSH

A ação dos agentes anteriormente estudados (NaBu e MnCl₂) quando combinados foi analisada. Adicionando ambos os reagentes, nas mesmas concentrações utilizadas individualmente, ao meio de cultura de células CHO produtoras de r-hTSH, obteve-se o crescimento celular mostrado na Figura 29. O comportamento das células reproduz aquele obtido quando apenas o NaBu foi adicionado. Observou-se uma queda de até 54% no número de células viáveis quando ambos os reagentes foram adicionados. A proliferação das células CHO cultivadas em presença de NaBu+MnCl₂, nos cinco primeiros dias, foi aproximadamente 3 vezes mais lenta do que na cultura controle, sendo a inclinação das curvas de crescimento celular da cultura controle e da cultura com adição de NaBu e MnCl₂ de 1,10 e 0,41 células/dia, respectivamente. Na cultura controle há uma tendência de queda do número de células viáveis a partir do quinto dia, enquanto na cultura tratada com NaBu+MnCl₂ há uma tendência em se manter estável por mais dias. Este fato reflete provavelmente a ação do NaBu, que causa uma diminuição na velocidade de divisão celular, o que, por consequência, aumenta a longevidade celular.

Da mesma forma, a produtividade volumétrica e específica de hTSH também reproduziu o comportamento obtido com a adição apenas do NaBu, sendo obtido um aumento na produtividade volumétrica e específica com relação à cultura controle de aproximadamente 3 e 6 vezes, respectivamente (Figura 30).

Figura 29 Número de células viáveis ao longo de 6 dias de cultivo com e sem adição de NaBu+MnCl₂ ao meio de cultura.

Figura 30 Produtividade específica e volumétrica de hTSH na presença ou ausência de NaBu+MnCl₂

4.4.2 Purificação do r-hTSH

Os meios condicionados coletados diariamente foram reunidos e os “pools” correspondentes à cultura controle e à cultura a qual foi adicionado NaBu+MnCl₂ foram purificados em duas etapas, com rendimentos finais de 66% e 70%, respectivamente e pureza, confirmada por SDS-PAGE, semelhante à da preparação referência Thyrogen® (Tabela 25A e 25B e Figura 31).

O enriquecimento em hTSH dos “pools” resultantes das diferentes etapas do processo de purificação pode ser avaliado pelos perfis cromatográficos em RP-HPLC e HPSEC apresentados nas Figuras 32 e 33, que separam por hidrofobicidade e massa molecular, respectivamente.

Figura 31 SDS-PAGE, em condições não-redutoras, das diferentes preparações purificadas de hTSH. Coluna 1: marcadores de massa molecular; coluna 2: Thyrogen, utilizado como preparação de referência de hTSH recombinante; coluna 3: r-hTSH IPEN Controle; coluna 4: r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂.

Tabela 25A Purificação de r-hTSH IPEN Controle

Etapa da Purificação	Proteína total ¹ (mg)	hTSH (mg)	Rendimento da etapa (%)	Fração de massa (%)
Meio condicionado	412,0	2,57 ²	100	0,62
Eluato da troca catiônica	26,50	2,43 ²	95	9,2
Eluato da RP-HPLC	1,50	1,70 ³	70	113

¹ Estimado por BCA

² Estimado por RP-HPLC

³ Estimado por HPSEC

Tabela 25B Purificação de r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂

Etapa da Purificação	Proteína total ¹ (mg)	hTSH (mg)	Rendimento da etapa (%)	Fração de massa (%)
Meio condicionado	500,0	4,89 ²	100	0,98
Eluato da troca catiônica	117,0	4,50 ²	92	3,8
Eluato da RP-HPLC	3,1	3,44 ³	76	110

¹ Estimado por BCA

² Estimado por RP-HPLC

³ Estimado por HPSEC

Figura 32 Perfis cromatográficos das diferentes etapas de purificação: Meio condicionado controle (A) e tratado com NaBu+MnCl (D); após a primeira etapa de purificação, amostra controle (B) e tratada (E) e após a segunda etapa de purificação, amostra controle (C) e tratada (F). O tempo de retenção da preparação referência, neste ensaio, era de 34,36 min.

Figura 33 Perfis cromatográficos em HPLC das preparações de hTSH após a primeira etapa de purificação, amostra controle (A) e amostra tratada (C) e após a segunda etapa de purificação, amostra controle (B) e amostra tratada (D). O tempo de retenção da preparação referência neste ensaio foi de 20,13 min.

4.4.3 – Espectrometria de Massa

A massa molecular relativa (M_r) das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂ foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF (Tabela 26). O perfil encontrado para cada uma das amostras é mostrado na Figura 34.

Observa-se um pequeno aumento de 1,2% na massa molecular relativa da preparação r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂. Os valores experimentais encontrados por determinação direta para os heterodímeros estão de acordo com a somatória dos valores encontrados para suas respectivas subunidades.

Tabela 26 Massa molecular relativa (M_r) das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂ determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF

Preparação	Heterodímero (Experimental) (Mr)	Subunidade α (Mr)	Subunidade β (Mr)	($\alpha+\beta$)	($\alpha+\beta$) / Exp.
r-hTSH IPEN Controle	28981,09	13932,73	15151,64	29075,37	1,00
r-hTSH IPEN NaBu+MnCl ₂	29328,69	13875,14	15619,35	29494,49	1,01

Figura 34 Espectro de massa MALDI-TOF de preparações de hTSH IPEN produzidas na ausência (A) e na presença (B) de NaBu+MnCl₂

4.4.4 – Análise estrutural dos carboidratos

Neste estudo foram identificadas 14 estruturas do tipo complexa na preparação de r-hTSH IPEN Controle e 13 na preparação r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂ e uma estrutura híbrida nas duas preparações, com massas teóricas variando de 1866 a 3777 e com as intensidades relativas apresentadas na Figura 35.

As estruturas presentes apresentaram duas ou três antenas com diferentes níveis de sialilação, não sendo observadas quatro antenas em nenhuma das preparações (Figura 36).

A frequência das estruturas bi-antenárias e tri-antenárias foi praticamente igual nas duas preparações de hTSH. Estruturas bi-antenárias bi-sialiladas e bi-antenárias mono-sialiladas foram as estruturas predominantes em ambas as preparações. Na preparação r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂, as estruturas bi-antenárias bi-sialiladas, com e sem fucose, foram quantitativamente maior (12%) quando comparadas à preparação controle, enquanto as estruturas bi-antenárias mono-sialiladas foram 5,7% menor. Da mesma forma, a porcentagem de estruturas não sialiladas também foi menor (5,3%) quando comparada ao controle (Tabela 27). Com relação às estruturas tri-antenárias presentes na preparação r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂, observa-se uma pequena diminuição (aproximadamente 1,7%) nas estruturas di- e mono-sialiladas e um pequeno aumento nas estruturas tri-sialiladas (1,9%) e não sialiladas (0,3%).

Considerando apenas a porcentagem das estruturas sialiladas, independentemente da antenaridade, observa-se que as estruturas mais sialiladas (bi- e tri-sialiladas) da preparação r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂ aumentam com relação ao controle de 10,3% e 1,9% respectivamente, enquanto as estruturas não sialiladas e mono sialiladas diminuem de 5% e 7,3% respectivamente.

Figura 35 Intensidade relativa das estruturas encontradas nas preparações de hTSH IPEN Controle e hTSH IPEN NaBu+MnCl₂

Figura 36 Estruturas de N-glicanos do r-hTSH obtidos com ou sem adição de NaBu+MnCl₂ ao meio de cultura

Tabela 27 Distribuição dos N-glicanos de preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu+MnCl₂, de acordo com a antenaridade e o nível de sialilação.

Nível de Sialilação	% bi-Antenárias		% tri-Antenárias		% total por nível de sialilação	
	Controle	+NaBu+MnCl ₂	-Controle	+NaBu+MnCl ₂	Controle	+NaBu+MnCl ₂
0	8,1	2,8	1,0	1,3	9,1	4,1
1	35,0	29,3	4,8	3,2	39,8	32,5
2	36,0	48,0	9,3	7,6	45,3	55,6
3		ND	5,8	7,7	5,8	7,7
4		ND		ND		ND
Total por antena	79,1	80,1	20,9	19,8		

ND: Não Detectado

Com base nas estruturas encontradas nas duas preparações, o nível de sialilação e de galactosilação foi calculado. Observou-se um aumento de aproximadamente 6% no nível de sialilação e de 1,2% no nível de galactosilação da preparação r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂ quando comparada à preparação controle (Tabela 28).

Tabela 28 Nível de sialilação e de galactosilação das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN+NaBu+MnCl₂

	r-hTSH IPEN Controle	r-hTSH- IPEN+NaBu+MnCl₂	Diferença com relação ao controle (%)
Nível de galactosilação (%)	96,6	97,8	+1,2
Nível de sialilação (%)	73,3	79,2	+5,9

4.4.5 – Ocupação dos sítios de glicosilação

Baseado na massa média dos glicanos (Tabela 29) e na massa relativa determinada por MALDI-TOF (Tabela 26) das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂, o número de sítios ocupados por molécula foi calculado, bem como a ocupação (%), considerando que o hTSH tem 3 sítios de glicosilação (Tabela 30).

Um aumento de 3% na ocupação dos sítios de glicosilação foi observado para a preparação r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂, reproduzindo o ocorrido quando apenas o NaBu foi adicionado ao meio.

Tabela 29 Contribuição em massa dos glicanos nas preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂

Estrutura	Massa do glicano (Da)	% relativa		Contribuição em massa do glicano (Da)	
		Controle	NaBu+MnCl ₂	Controle	NaBu+MnCl ₂
(Gal) ₄ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1478,54	1,9	0,0	28,09	00,00
(Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1640,59	6,2	2,8	101,72	45,94
(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₁ + (Man) ₄ (GlcNAc) ₂	1728,61	1,5	2,1	25,93	36,30
(NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1769,64	3,1	1,3	54,86	23,01
(NeuAc) ₁ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1931,69	26,3	21,8	508,03	421,11
(NeuAc) ₁ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2077,74	4,1	4,1	85,19	85,19
(Gal) ₂ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2135,79	1,0	1,3	21,36	27,77
(NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2222,78	31,2	39,1	693,51	869,11
(NeuAc) ₁ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2296,82	3,7	2,3	84,98	52,83
(NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₂ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2368,84	4,8	8,9	113,70	210,83
(NeuAc) ₁ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2442,88	1,1	0,9	26,87	21,99
(NeuAc) ₂ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2587,91	7,7	5,8	199,27	150,10
(NeuAc) ₂ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2733,97	1,6	1,8	43,74	49,21
(NeuAc) ₃ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2878,01	4,9	5,3	141,02	152,53
(NeuAc) ₃ (Gal) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3025,07	0,9	2,4	27,23	72,60
Massa dos glicanos (Da)				2155,5	2218,52

Tabela 30 Ocupação dos sítios de glicosilação das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂

Preparação	Massa relativa glicanos (MALDI-TOF) (Da)	Massa média dos glicanos (estrutura) (Da)	Sítios ocupados por molécula	Ocupação (%)
r-hTSH IPEN Controle	4651,09	2155,50	2,16	72
r-hTSH IPEN NaBu+MnCl ₂	4998,69	2218,52	2,25	75

4.4.6 – Análise Composicional

4.4.6.1 – Determinação de ácido siálico

As preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂ foram analisadas quanto ao conteúdo de ácido siálico, e os resultados desta análise encontram-se na Tabela 31. Observa-se que houve um aumento de 14,4% no conteúdo de ácido siálico da preparação r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂ quando comparada ao controle, porém esta diferença não é estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Tabela 31 Conteúdo de ácido siálico do r-hTSH IPEN Controle e do r-hTSH IPEN+CHX

Preparação	Conteúdo de ácido siálico mol. ac. sial./mol proteína
r-hTSH IPEN Controle	6,10 ± 0,63
r-hTSH IPEN+NaBu+MnCl ₂	6,98 ± 1,8

4.4.6.2 – Determinação de monossacarídeos neutros

O conteúdo de monossacarídeos neutros nas diferentes preparações de TSH foi determinado considerando a contribuição em massa de cada um deles ao total de carboidratos (Tabela 32).

O monossacarídeo mais abundante em ambas as preparações, como em todas as preparações estudadas, é o N-acetilglucosamina. Com a adição simultânea de NaBu e MnCl_2 ao meio de cultura ocorreu um aumento no conteúdo de todos os monossacarídeos neutros presentes, que variou de 3,5% a 52%.

Tabela 32 Quantificação do conteúdo de monossacarídeos neutros das preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂

Monossacarídeo*	Fração de massa do monossacarídeo		Contribuição em massa do monossacarídeo no total de carboidratos (Da)		Conteúdo do monossacarídeo (mol/mol)	
	Controle	NaBu+MnCl ₂	Controle	NaBu+MnCl ₂	Controle	NaBu+MnCl ₂
Manose	0,231	0,223	1075,51	1113,14	6,64	6,87
Galactose	0,159	0,156	740,28	778,70	4,57	4,81
N-acetilglucosamina	0,399	0,385	1857,70	1921,79	9,15	9,46
Fucose	0,009	0,013	41,90	64,89	0,29	0,44

* Massa molecular dos monossacarídeos: Manose e galactose – 162,05 Da
 N-acetilglucosamina – 203,08 Da
 Fucose – 146,06 Da

4.4.7 – Efeitos biológicos

4.4.7.1 – Atividade biológica

As respostas de T_4 obtidas para as preparações r-hTSH IPEN Controle e r-hTSH IPEN NaBu+ $MnCl_2$ são mostradas na Tabela 33. É possível observar que as respostas de T_4 obtidas para a preparação r-hTSH IPEN NaBu+ $MnCl_2$ são um pouco menores quando comparadas ao controle, porém esta diferença não é significativa ($p < 0,20$). Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas entre nossas preparações recombinantes e a preparação recombinante disponível comercialmente.

Tabela 33 Nível de T_4 de diferentes preparações de hTSH, determinadas por bioensaio *in vivo*

Preparação	T_4 ($\mu g/dL$)
Thyrogen®	$2,37 \pm 0,29$
r-hTSH IPEN Controle	$3,05 \pm 0,70$
r-hTSH IPEN NaBu+ $MnCl_2$	$2,52 \pm 0,33$

4.4.7.2 – Farmacocinética

O tempo de máxima absorção de ambas as preparações ocorreu em 90 minutos, da mesma forma que para todas as outras preparações recombinantes estudadas neste trabalho (Figura 37).

Os resultados de meia vida circulatória ($t_{1/2}$) e da exposição (AUC) das diferentes preparações de r-hTSH encontram-se na Tabela 34. Não foi observada nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) no tempo de meia vida circulatória da preparação r-hTSH IPEN NaBu+ $MnCl_2$ quando comparada à meia vida circulatória da preparação controle. Da mesma forma, o tempo de exposição do r-hTSH IPEN NaBu+ $MnCl_2$ não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado ao da preparação controle.

Figura 37 Concentração plasmática de hTSH de diferentes preparações em 5 horas

Tabela 34 Parâmetros farmacocinéticos após a administração de diferentes preparações de hTSH

Preparação	$t_{1/2}$ (minutos)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)
r-hTSH IPEN Controle	$102,8 \pm 18,4$	$15539 \pm 1179,30$
r-hTSH IPEN NaBu+MnCl ₂	$100 \pm 8,8$	$16035 \pm 293,34$

5 – DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que ocorreram alterações na produtividade e na glicosilação de preparações de r-hTSH derivadas de células CHO cultivadas na presença de butirato de sódio, de cloreto de manganês ou de ambos simultaneamente, bem como na presença de cicloheximida, sem contudo comprometer a atividade biológica ou a depuração plasmática do hormônio recombinante.

Tem sido demonstrado na literatura que o conteúdo de ácido siálico pode ter grande impacto na atividade biológica de uma glicoproteína. De fato, SZKUDLINSKI et. al (2000; 2002) observaram variações na atividade biológica do hTSH dependendo dos níveis de sialilação das amostras, sendo que amostras pouco sialiladas apresentaram atividade biológica menor do que preparações mais sialiladas. No presente trabalho, o maior aumento no conteúdo de ácido siálico foi observado na preparação obtida na presença de NaBu+MnCl₂ (aproximadamente 14% de aumento com relação à preparação controle), porém este aumento não foi o suficiente para gerar alterações na atividade biológica, da mesma forma, a diminuição de aproximadamente 6% no conteúdo de ácido siálico presente na preparação obtida na presença de CHX, também não gerou alterações. Isto nos leva a crer que as diferenças no conteúdo de ácido siálico devem ser bem mais altas para serem capazes de afetar a atividade do hTSH. De fato, observamos uma diminuição de 3 a 4 vezes na atividade biológica do hTSH hipofisário quando comparado às preparações recombinantes desta glicoproteína. Essa grande diminuição na atividade biológica da preparação nativa pode ser explicada pelo menor conteúdo de ácido siálico a ela associado, aproximadamente 70% menor que na preparação recombinante (Tabela 12). Esta menor atividade do hTSH hipofisário encontrada no presente trabalho está de acordo com o descrito por SZKUDLINSKI et. al (1993), que também encontraram uma maior potência para as preparações recombinantes de hTSH.

O conteúdo de ácido siálico está também diretamente associado ao tempo de meia vida circulatória, uma vez que o ácido siálico ligado à galactose impossibilita o reconhecimento da glicoproteína pelos receptores assialoglicoproteicos existentes no fígado, que são os responsáveis diretos

pela depuração metabólica das glicoproteínas (THOTAKURA et. al, 1992; SZKUDLINSKI; THOTAKURA; WEINTRAUB, 1993; TAKAMATSU et. al, 2003). De fato, quando avaliamos a depuração metabólica das diferentes preparações de hTSH, observamos que o tempo de meia vida da preparação hipofisária de hTSH foi cerca de 2 vezes menor do que a meia vida encontrada para as preparações recombinantes e a exposição, ou seja, a área sob a curva de concentração plasmática de hTSH, foi cerca de 30% menor para a preparação hipofisária. Com relação às preparações recombinantes analisadas, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros tempo de meia vida circulatória e área sob a curva de concentração de hTSH. Mesmo o aumento de 14,4% ou a diminuição de 5,5% no conteúdo de ácido siálico da preparação r-hTSH IPEN NaBu+MnCl₂ e r-hTSH IPEN+CHX, respectivamente não foi suficiente para causar alterações no comportamento farmacocinético do hTSH.

Nossos resultados mostraram que o cultivo das células CHO na presença de NaBu e MnCl₂, individualmente ou simultaneamente, é uma alternativa possível para incrementar a sialilação das estruturas de carboidratos presentes no hTSH, o que está de acordo com a literatura (DONER; WASLEY; KAUFMAN, 1989; CHOTIGEAT et. al, 1994; LAMOTTE et. al, 1999; SANTEL et. al, 1999; CROWELL et. al, 2008; GAWLITZEK et. al, 2009). É importante salientar que a ação destes reagentes nas vias de sialilação é altamente dependente do sistema de expressão e da proteína expressa. Muito embora o mecanismo exato de ação do NaBu ainda não seja completamente entendido, acredita-se que sua presença modula a expressão de outras proteínas, como por exemplo a GRP78 e GRP94, que modulam o transporte de glicoproteínas ao complexo de Golgi e sua permanência nesta organela, aumentando assim a chance de sialilação (DORNER; WASLEY; KAUFMAN, 1989). Já o mecanismo sugerido para o MnCl₂ por Crowell et. al (2007a) está relacionado ao aumento da galactosilação das estruturas de carboidratos, oferecendo assim um maior substrato para a sialilação. Acredita-se que as alterações encontradas na sialilação não são provavelmente consequência direta da presença destes dois reagentes, mas possivelmente consequência de alterações do metabolismo celular produzido pelos mesmos.

Muito embora a ação principal do MnCl₂ seja aumentar a atividade da enzima β 1-4 galactosiltransferase (CROWELL; GRAMP, 2007a), a presença de

MnCl₂ no cultivo de células CHO produtoras de hTSH, neste trabalho, promoveu alteração mínima (0,2%) no nível de galactosilação. GRAMER et. al (2011), ao utilizar somente o MnCl₂ para a produção de anticorpos, também observaram que este íon por si só gerava apenas um pequeno aumento (aproximadamente 2%) na porcentagem de galactosilação de um anticorpo, mas quando combinado com uridina e galactose, aumentava a galactosilação de forma considerável (aproximadamente 16%). Esses dados levam a crer que o efeito do MnCl₂ na galactosilação pode ser também proteína específico.

A presença de NaBu ou MnCl₂ no cultivo de células CHO produtoras de hTSH provocou alterações na antenaridade das estruturas dos carboidratos. Um aumento do conteúdo de estruturas bi-antênárias e uma diminuição do conteúdo de estruturas tri-antênárias foi observado nos dois casos, embora estas alterações (14% e 7% para o NaBu e MnCl₂, respectivamente) tenham sido bem maiores quando o NaBu foi utilizado. CHUNG et. al (2001) obtiveram resultados semelhantes quando adicionaram 5mM de NaBu às células CHO produtoras de eritropoietina. Em contraste, RODRIGUEZ et. al (2005) e SPEARMAN et. al (2007) observaram um aumento nos glicanos com maior antenaridade ao adicionar NaBu na síntese de β -interferon. Por outro lado, MIMURA et. al (2001) relataram que a adição de NaBu ao meio de cultura de células CHO produtoras de IgG não provocou nenhuma alteração nas isoformas das estruturas de seus carboidratos. Estes resultados sugerem que o efeito do NaBu nas estruturas de N-glicanos das glicoproteínas é específico para cada proteína, e dependendo da linhagem celular e da proteína expressa, a concentração de NaBu pode influenciar nas alterações causadas por este agente. O resultado por nós obtido com MnCl₂ está em desacordo com o que foi descrito por CROWELL et. al (2007a), que não obtiveram alterações na antenaridade das estruturas de glicanos da eritropoietina utilizando este agente no meio de cultura. Surpreendentemente, o produto obtido quando ambos os reagentes foram adicionados simultaneamente ao meio de cultura, apresentou alterações bem menores (aproximadamente 1%) na frequência das estruturas bi- e tri-antênárias com relação ao controle.

Quanto ao nível de sialilação destas estruturas, seja utilizando NaBu, MnCl₂ ou ambos, houve diminuição das estruturas não sialiladas e monossialiladas e aumento das bi-sialiladas, nos três casos.

O conteúdo de monossacarídeos neutros não obedeceu a um padrão de aumento ou diminuição na presença de NaBu ou MnCl_2 , tendo alguns aumentado e outros diminuído. A adição simultânea de NaBu e MnCl_2 resultou em um aumento de todos os monossacarídeos presentes, mostrando uma possível ação conjunta destes dois reagentes. A fucose, presente em baixa frequência, se mostrou o monossacarídeo mais instável, cujo conteúdo variou muito entre as preparações. Sua presença em anticorpos tem impacto na atividade biológica dos mesmos, sendo que anticorpos terapêuticos não fucosilados apresentam uma eficácia de 50-1000 vezes maior que anticorpos fucosilados (KONNO et. al, 2012). Muitas doenças, incluindo alguns tipos de cânceres, estão relacionadas à altos níveis de fucose em proteínas específicas dos grupos A e B do sistema sanguíneo (BECKER; LOWE, 2003). Para outras glicoproteínas, no entanto, a função da fucose é ainda desconhecida.

A completa glicosilação de proteínas recombinantes é comumente associada à maximização do conteúdo de galactose e ácido siálico, bem como à ocupação de todos os sítios de glicosilação presentes na glicoproteína (BUTLER, 2005). Ao adicionar 1mM de NaBu ao meio de cultura obtivemos um aumento de 3% na ocupação dos sítios de glicosilação. A capacidade que tem o NaBu de aumentar a ocupação dos sítios de glicosilação das glicoproteínas já havia sido reportada anteriormente por ANDERSEN et. al (2000) que ao adicionarem 1,5 mM de NaBu, obtiveram um aumento de 5% na ocupação dos sítios de glicosilação do t-PA. Por outro lado, GAWLITZEK et. al (2009) reportaram um aumento de apenas 1% na ocupação dos sítios de glicosilação desta mesma glicoproteína utilizando 0,75mM de NaBu, o que nos permite concluir que a concentração de NaBu utilizada é fundamental para este efeito.

Por se acreditar que a oligossacariltransferase tem sua ação aumentada na presença de MnCl_2 , esperava-se um aumento na ocupação dos sítios de glicosilação na presença deste agente. Observamos que, para o caso do hTSH, na presença de MnCl_2 houve um discreto aumento (1,3%) na ocupação dos sítios de glicosilação em relação à preparação controle. Estes dados estão de acordo com o reportado por GAWLITZEK et. al (2009), que reportaram um aumento de 2,5% na ocupação dos sítios de ocupação do t-PA quando MnCl_2 foi adicionado ao meio de cultura.

Para o hTSH, a junção dos dois reagentes resultou em um aumento de 3%, reproduzindo o efeito causado apenas pelo NaBu na ocupação dos sítios de glicosilação.

Uma diminuição de aproximadamente 10% na ocupação dos sítios de glicosilação do hTSH foi observada quando CHX foi utilizada no cultivo das células CHO. Este resultado está em desacordo com o reportado pela literatura que descreve um aumento considerável na ocupação dos sítios de glicosilação da prolactina em presença de CHX (SHELIKOFF; SINSKEY; STEPHANOPOULOS, 1994). Uma possível explicação para esta diminuição seria uma inacessibilidade da oligossacariltransferase aos potenciais sítios de glicosilação do hTSH, provocada pela competição cinética entre a glicosilação e o folding da molécula (KORNFELD; KORNFELD, 1985).

A principal vantagem relativa à adição ao meio de cultura de NaBu e $MnCl_2$, individualmente ou simultaneamente, está relacionada ao aumento da síntese de hTSH recombinante provocado por estes agentes. O aumento significativo na produtividade volumétrica e específica do hTSH (aproximadamente 3 e 5 vezes, respectivamente) obtido no presente trabalho quando 1mM de NaBu foi adicionado ao meio de cultivo está entre um dos maiores reportados na literatura para diferentes proteínas derivadas de células CHO, incluindo anticorpos, como pode ser visto em comparação com os trabalhos listados na Tabela 35.

O NaBu é um reagente bem conhecido por sua capacidade de causar um atraso no ciclo celular, fazendo com que as células permaneçam mais tempo na fase G1 do ciclo celular (fase onde se dá a produção de proteínas) resultando em uma redução da taxa de divisão celular, o que gera uma diminuição no número de células viáveis e um aumento na produtividade específica da proteína de interesse (KUMAR; GAMMEL; CLYNES, 2007, SINLEY; BUTLER, 2010).

Tabela 35 Produtividade volumétrica e específica de diferentes proteínas recombinantes com adição de 1-3mM de NaBu ao meio de cultura de células CHO

Referência	Proteína	Aumento produtividade volumétrica (vezes)	Aumento produtividade específica (vezes)
LAMOTTE et. al, 1999	γ -INF	1,5	3
HENDRICK et. al, 2001	t-PA	2	3
YOON et. al, 2004	EPO	---	2
SUNG et. al, 2005	TPO	3	9
RODRIGUEZ et. al, 2005	β -INF	1,2	4
GOULART et. al, 2010	PRL	2	3
MIMURA et. al, 2001	IgG quimérico	3,5	15
HONG et. al, 2011	Anticorpo	1,5	4
Presente trabalho	hTSH	3	5

Já o uso de 10 μ M $MnCl_2$ no cultivo de células CHO produtoras de hTSH provocou um aumento na produtividade volumétrica e específica bem menor (40% e 30%) com relação ao controle. Este resultado foi inesperado, uma vez que é descrito na literatura que a adição de $MnCl_2$ ao meio de cultura não afeta nem a produtividade, nem a proliferação celular (CROWELL; GRAMP, 2007a). CROWELL et. al (2007a) utilizaram concentrações de $MnCl_2$ variando de 4 a 40 μ M e observaram que a presença deste íon se torna tóxica para as células em concentrações maiores. Para o caso das células CHO produtoras de hTSH, em concentrações de $MnCl_2$ maiores que 10 μ M, ocorreu uma diminuição na produtividade volumétrica e específica do hTSH. Quando NaBu e $MnCl_2$ foram utilizados simultaneamente, resultados semelhantes aos resultados obtidos com a utilização apenas do NaBu foram obtidos, evidenciando que, com relação ao metabolismo e cinética celular, o NaBu tem um efeito predominante, uma vez que atua nas células controlando a divisão celular.

O decréscimo na produtividade com a adição de CHX ao meio de cultura era esperado uma vez que a cicloheximida é um potente inibidor da síntese proteica. Este se mostrou dose dependente, chegando a ser 95% menor quando adicionado 0,3 μ g/mL ao meio de cultura. É importante ressaltar que

além de dose dependente, o efeito da CHX é também proteína específica, uma vez que, em nosso laboratório, HELLER et. al (2010) utilizaram uma concentração 10 vezes maior do que a utilizada no presente trabalho (0,6 $\mu\text{g/mL}$) e obtiveram produtividade útil de prolactina expressa em CHO.

Por ser um inibidor de síntese protéica, a CHX pode ser altamente tóxica para as células. De fato, foi observada uma drástica redução no número de células viáveis quando a CHX foi adicionada ao meio, porém este efeito parece variar de acordo com a linhagem celular. SHELKOFF et. al (1994), por exemplo, utilizando células da linhagem C127 obtiveram 80% de viabilidade celular, mesmo utilizando uma concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida.

Salientamos a importância dos resultados alcançados, principalmente do ponto de vista industrial, uma vez que abre caminhos para o aumento da produtividade volumétrica de glicoproteínas recombinantes de interesse terapêutico, alterando ou não o perfil de glicosilação e sialilação das mesmas, sem, no entanto alterar sua eficácia.

6 – CONCLUSÕES

O presente trabalho enfatizou a importância do conhecimento sobre possíveis alterações na glicosilação, sialilação e atividade biológica da tireotrofina humana, geradas quando butirato de sódio, cloreto de manganês e cicloheximida são adicionados ao cultivo de células CHO produtoras desta glicoproteína.

O butirato de sódio aumentou significativamente a produtividade de hTSH (aproximadamente 3 vezes), sem comprometer a eficácia do hormônio, representando uma alternativa bastante útil à produção deste hormônio recombinante.

O cloreto de manganês também aumentou a produtividade de hTSH (cerca de 40%) sem comprometer suas propriedades biológicas, representando também uma alternativa viável à produção deste hormônio.

Estes dois reagentes usados simultaneamente não apresentaram vantagens adicionais às obtidas com cada um individualmente.

O uso da cicloheximida, por sua vez, mostrou não ser uma estratégia viável para a produção de hTSH, por diminuir cerca de 54% a produtividade do hormônio, embora as propriedades biológicas tenham sido mantidas.

Fica claro então que a investigação dos aspectos envolvidos na produção de proteínas recombinantes, especialmente daquelas destinadas ao tratamento e diagnóstico de diversas doenças, é de extrema importância, não só do ponto de vista farmacêutico, mas também para o controle de qualidade dos biofármacos em geral.

7 - Referências Bibliográficas

1. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER P. Molecular biology of the cell. In: **Intracellular compartments and proteins sorting**. New York – NY: Garland Science, 2008. p. 695-748.
2. ANDERSEN, D.C.; BRIDGES, T.; GAWLITZEK, M.; HOY, C. Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator. **Biotechnol. Bioeng**, v. 70, p. 25-31, 2000.
3. AMORESANO, A.; SICILIANO, R.; ORRU, S.; NAPOLEONI, R.; ALTAROCCHA, V.; DE LUCA, E.; SIRNA, A.; PUCCI, P. Structural characterization of human recombinant glycohormones follitropin, lutropin and choriogonadotropin expressed in Chinese hamster ovary cells. **Eur. J. Biochem.**, v. 242, p. 608-618, 1996.
4. ANUMULA, KR. Rapid quantitative determination of sialic acid in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with a sensitive fluorescence detection. **Anal. Biochem.**, v. 230, p. 24-30, 1995.
5. BAENZIGER, J.U. Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it! **FASEB J.**, v. 8, p. 1019-1025, 1994.
6. BAIK, J.Y.; JOO, E.J.; KIM, Y.H.; LEE, G.M. Limitations to the comparative proteomic analysis of thromboietin producing Chinese hamster ovary cells treated with sodium butyrate. **J. Biotechnol.**, v. 133, p. 461-468, 2008.
7. BECKER, D.J.; LOWE, J.B. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. **Glycobiology**, v. 53, p. 2003.
8. BERGMAN, L.W.; KUEHL, W.M. Temporal relationship of translation and glycosylation of immunoglobulin heavy and light chains. **Biochemistry**, v. 24, p. 5174-5180, 1978
9. BERTOZI, C.R.; KIESSLING, L.L. Chemical glycobiology. **Science**, v. 291, p. 2357-2364, 2001.
10. BETENBAUGH, M.J.; **US Pat.** 2005/0287637 A1, 2005.

11. BONNEMA, S.J.; HEGEDÜS, L. Radioiodine therapy in benign thyroid diseases: effects, side effects, and factors affecting therapeutic outcome. **Endocr. Rev.**, v. 33, p. 920-980, 2012.
12. BORK, K.; HORSTKORT, R.; WEIDEMANN, W. Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway. **J. Pharm. Sci.**, DOI: 10.1002/jps.21684, 2009.
13. BRAGONZI, A.; DISTEFANO, G.; BUCKBERRY, L.D.; ACERBIS, G.; FOGLIENI, C.; LAMOTTE, D.; CAMPI, G.; MARC, A.; SORIA, M.R.; JENKINS, N.; MONACO, L. A new Chinese hamster ovary cell line expressing $\alpha 2,6$ -sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1474, p. 273-282, 2000.
14. BULLEID, N.J.; BASSEL-DUBY, R.S.; FREEDMAN, R.B.; SAMBROOK, J.F. GETHINGM, J. H. Cell-free synthesis of enzymically active tissue-type plasminogen activator. **Biochem. J.**, v. 286, p. 275-280, 1992.
15. BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, p. 283-291, 2005.
16. BUTLER, M. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. **Cytotechnology**, v. 50, p. 57-76, 2006.
17. BUTLER, M.; MENESES-ACOSTA, A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 96, p. 885-894, 2012.
18. BYRNE, B.; DONOHOE, G.G.; O'KENNEDY, R. Sialic acid: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. **Drug Discov. Today**, v. 12, p. 319-326, 2007.
19. CARVALHAL, A.V.; SANTOS, S.S.; CALADO, J.; HAURY, M.; CARRONDO, M.J. Cell growth arrest by nucleotides, nucleosides and bases as a tool for improved production of recombinant proteins. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 69-83, 2003.
20. CARVALHO, C.M.; OLIVEIRA, J.E.; ALMEIDA, B.E.; UEDA, E.K.M.; TORJESEN, P.A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Efficient isolation

- of the subunits of recombinant and pituitary glycoprotein hormones. **J. Chromatogr. A.**, v. 1216, p. 1431-1438, 2009.
21. CHEN, M.K.; DODDAMANE, I.; CHENG, D.W. Recombinant human thyrotropin-stimulating hormone as an alternative for thyroid hormone withdrawal in thyroid cancer management. **Curr. Opin. Oncol.**, v.22, p. 6-10, 2010.
 22. CHOI, B.K.; WARBURTON, S.; LIN, H.; PATEL, R.; BOLDOG, I.; MEELH, M.; D'ANJOU, M.; PON, L.; STADHEIN, T.A.; SETHURAMAN, N. Improvement of N-glycan site occupancy of therapeutic glycoproteins produced in *Pichia pastoris*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 95, p. 671-682, 2012.
 23. CHOTIGEAT, W.; WATANAPOKASIN, Y.; MAHLER, S.; GRAY, P.P. Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. **Cytotechnology**, v. 15, p. 217-221, 1994.
 24. CHUNG, B.S.; JEONG, Y.T.; CHANG, K.M.; KIM, J.S.; KIM, J.H. Effects of sodium butyrate on glycosilation of recombinant erythropoietin. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, p. 1087-1092, 2001.
 25. CROWELL, C.K.; GRAMP, G.E.; ROGERS, G.N.; MILLER, J.; SCHEINMAN, R.I. Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 96, p. 538-549, 2007.
 26. CROWELL, C.K.; GRAMP, G.E. Production of glycoproteins using manganese. United States. Patent Application 2007011084, 2007a.
 27. CROWELL, C.K.; QIN, Q.; GRAMP, G.E.; RADCLIFFE, R.A.; ROGERS, G.N.; SHEINMAN, R.I. Sodium butyrate alters erythropoietin glycosylation via multiple mechanism. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 99, p. 201-213, 2008.
 28. DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J.E.; VORAUER-UHL, K.; PERONI, C.N.; VIANNA, E.G.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Stable expression of a human-like sialylated recombinant thyrotropin in a Chinese hamster ovary cell line expressing α 2,6-sialyltransferase. **Protein Expr. Purif.**, v. 67, p. 7-14, 2009.

- 29.DAMIANI, R.; ALMEIDA, B.E.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Enhancement of human thyrotropin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 7, p. 1658-1672, 2013.
- 30.DORNER, A.J.; WASLEY, L.C.; KAUFMAN.; R.J.Increasead synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 20602-20607, 1989.
- 31.DRACOPOLI, N.C.; RETTIG, W.J.; WHITFIELD, G.K.; DARLINGTON, G.J.; SPENGLER, B.A.; BIEDLER, J.L.; OLD, L.J.; KOURIDES, I.A. Assignment of the gene for the β subunit of thyroid-stimulating hormone to the short arm of human chromosome 1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 1822-1826, 1986.
- 32.ELLGAARD, L.; HELENIUS, A. Quality control the endoplasmic reticulum. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 181-191, 2003.
- 33.EMERSON, C.H.; TORRES, M.S.T. Recombinant human thyroid-stimulating hormone – Pharmacology, clinical applications and potential uses. **Biodrugs**, v. 17(1), p. 19-38, 2003.
- 34.FIDDES, J.C.; GOODMAN, H.M. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. **J. Mol. Appl. Genet.**, v. 1, p. 3-18, 1981.
- 35.FUSSENEGGER, M.; BAILEY, J.E. Molecular regulation of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: implications for biotechnology. **Biotechnol. Prog.**, v. 14, p. 807-833, 1998.
- 36.GAVEL, Y.; VON HEIJINE, G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. **Protein Eng.**, v. 5, p. 433-442, 1990.
- 37.GAWLITZEK, M.; ESTACIO, M.; FÜRCH, T.; KISS, R. Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 103, p. 1164-1175, 2009.
- 38.GOULART, H.R.; ARTHUSO, F.S.; CAPONE, M.V.N.; OLIVEIRA, T.L.; BARTOLINI, P.; SOARES, C.R.J. Enhancement of human prolactin

- synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. **J. Biomed. Biotechnol.**, doi: 10.1155/2010/405872, 2010.
39. GRAMER, M.J.; ECKBLAD, J.J.; DONAHUE, R.; BROWN, J.; SHULTZ, C.; VICKERMAN, K.; PRIEM, P.; VAN DE BRAMER, E.T.J.; GERRITSEN, J.; VAN BERKEL, P.H.C. Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride and galactose. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 108, p. 1591-1602, 2011.
 40. GROSSMANN, M.; WONG, R.; THE, N.G.; TROPEA, J.E.; EAST PALMER, J.; WEINTRAUB, B.D.; SZKUDLINSKI, M.W. Expression of biologically active human thyrotropin (hTSH) in a baculovirus system: Effect of insect cell glycosylation on hTSH activity in vitro and in vivo. **Endocrinology**, v. 138, p. 92-100, 1997.
 41. GU, J.; TANIGUCHI, N. Regulation of integrin functions by N-glycans. **Glycoconj. J.**, v. 21, p. 9-15, 2004.
 42. HAUGEN, B.R.; PACINI, E.; REINERS, C.; SCHLUMBERGER, M.; LADENSON, P.W.; SHERMAN, S.I.; COOPER, D.S.; GRAHAM, K.E.; BRAVERMAN, L.E.; SKARULIS, M.C.; DAVIES, T.F.; DEGROOT, L.J.; MAZZAFERRI, E.L.; DANIELS, G.H.; ROSS, D.S.; LUSTER, M.; SAMUELS, M.H.; BECKER, D.V.; MAXON, H.R.; CAVALIERI, R.R.; SPENCER, C.A. A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 3877-3885, 1999.
 43. HAY, I.D.; BAYER, M.F.; KAPLAN, M.M.; KLEE, G.G.; LARSEN, P.R.; SPENCER, C.A. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. **Clin. Chem**, v. 37, p. 2002-2008, 1991.
 44. HELLENIUS, a.; MARKUS, A. Intracellular function of N-glycans. **Science**, v. 291, p. 2364-2369, 2001.
 45. HELLER, S.R.; RODRIGUES-GOULART, H.; ARTHUSO, F.S.; OLIVEIRA, T.L.; BARTOLINI, P.; SOARES, C.R.J. Synthesis, purification and characterization of recombinant glycosylated human prolactin (G-hPRL) secreted by cycloheximide-treated CHO cells. **J. Biotechnol.**, v. 145, p. 334-340, 2010.

46. HENDRICK, V.; WINNEPENNINCKX, P.; ABDELKAFI, C.; VANDEPUTTE, O.; CHERLET, M.; MARIQUE, T.; RENEMANN, G.; LOA, A.; KRETZMER, G.; WERENNE, J. Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. **Cytotechnology**, v. 36, p. 71-83, 2001.
47. HONG, J.K.; LEE, G. M.; YOON, S. K. Growth factor withdrawal in combination with sodium butyrate addition extends culture longevity and enhances antibody production in CHO cells. **J. Biotechnol.**, v. 155, p. 225-231, 2011.
48. HOSSLER, P.; KHATTAK, S.F.; LI, Z.J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. **Glycobiology**, v. 19, p. 936-949, 2009.
49. JENKINS, N.; CURLING, E.M.A. Glycosilation of recombinants proteins: Problems and prospects. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 354-364, 1994.
50. JENKINS, N.; MELEADY, P.; TYTHER, R.; MURPHY, L. Strategies for analyzing and improving the expression and quality of recombinant proteins made in mammalian cells. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 53, p. 73-83, 2009.
51. JEONG, Y.T.; CHOI, O.; LIM, H.R.; SON, Y.D.; KIM, H.J.; KIM, J.H. Enhanced silalylation of recombinant erythropoietin in CHO cells by human glycosiltransferase expression. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 1945-2952, 2008.
52. JING, Y.; QIAN, Y.; LI, Z.J. Sialylation enhancement of CTLA4-Ig fusion in Chinese hamster ovary cells by dexamethasone. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 107, p. 488-496, 2010..
53. JONES, J.; KRAG, S.S.; BETENBAUGH, M.J. Controlling N-linked site occupancy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1726, p. 121-131, 2005.
54. KARP, G. Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos. In: **Sistema de membranas citoplasmáticas: estrutura, função e tráfego de membranas**. Barueri – SP: Manole, 2005, p. 279-332.

55. KELLEHER, D.J.; KREIBICH, G.; GILMORE, R.
Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48kd protein. **Cell**, v. 69, p. 55-65, 1992.
56. KONNO, Y.; KOBAYASHI, Y.; TAKAHASHI, K.; TAKAHASHI, E.; SAKAE, S.; WAKITANI, M.; YAMANO, K.; SUZAWA, T.; YANO, K.; TOSHIO, O.; KOIKE, M.; WAKAMATSU, K.; HOSOI, S. Fucose content of monoclonal antibodies can be controlled by culture medium osmolality for high antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Cytotechnology**, v. 64, p. 249-265, 2012.
57. KORNFIELD, R.; KORNFIELD, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 631-664, 1985.
58. KUMAR, N.; GAMMEL, P.; CLYNES, M. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. **Cytotechnology**, v. 53, p. 33-46, 2007.
59. LAMOTTE, D.; BUCKBERRY, L.; MONACO, L.; SORIA, M.; JENKINS, N.; ENGASSER, J.M.; MARC, A. Na-butyrate increases the production and α 2,6-sialyltransferase engineered CHO cells. **Cytotechnology**, v. 29, p. 55-64, 1999.
60. LATIF, R.; GRAVES, P.; DAVIES, T.F. Oligomerization of the human thyrotropin receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 45217-45224, 2001.
61. LIU, C.; CHU, I.; HWANG, S. Pentanoic acid, a novel protein synthesis stimulant for Chinese hamster ovary (CHO) cells. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 91, p. 71-75, 2001.
62. LUSTER, M. Present status of the use recombinant human TSH in thyroid cancer management. **Acta Oncol.**, v. 45, p. 1018-1030, 2006.
63. MENDONÇA, F.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotropin and its immunological, biological, physico-chemical and mass spectral characterization. **J. Chromatogr. A**, v. 1062, p. 103-112, 2005.
64. MIMURA, Y.; LUND, J.; CHURCH, S.; DONG, S.; LI, J.; GOODALL, M.; JEFFERIS, R. Butyrate increases production of human IgG in CHO-K1 cells whilst maintaining function and glycoform profile. **J. Immunol. Methods**, v. 547, p. 205-216, 2001.

- 65.MOLINARI, M. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. **Nat. Chem. Biol.**, v. 3, p. 313-320, 2007.
- 66.MRÁZEK, H.; WEIGNEROVÁ L.; BOJAROVÁ, P.; NOVÁK, P.; VANEK, O.; BEZOUSKA, K. Carbohydrate synthesis and biosynthesis technologies for cracking of the glycan code: Recent advances. **Biotechnol. Adv.**, v. 31, p. 17-37, 2013.
- 67.NYBERG, G.B.; BALCARCEL, R.R.; FOLLSTAD, B.D.; STEPHANOPOULOS, G.; WANG, D.I.C. Metabolic effects on recombinant interferon- γ glycosylation in continuous culture of chinese hamster ovary cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 62, p. 336-347, 1998.
- 68.OGAWA, H.; RAFIEE, P.; FISHER, P.J.; JOHNSON, N.A.; OTTERSON, M.F.; BINION, D.G. Butyrate modulates gene and protein expression in human intestinal endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, p. 521-519, 2003.
- 69.OLIVEIRA, J.E.; MENDONÇA, F.; PERONI, C.N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.P. Determination of Chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 787, p. 345-355, 2003.
- 70.OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Practical reversed-phase high-performance liquid chromatography methods for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. **J. Chromatogr. A**, v. 1164, p. 206-211, 2007.
- 71.OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; VORAUER-UHL, K.; BARTOLINI, P.; RIBELA. Influence of a reduced CO₂ environment on the secretion yield, potency and glycan structures of recombinant thyrotropin (hTSH) from CHO cells. **Mol. Biotechnol.**, v.39, p. 159-166, 2008.
- 72.PERONI, C.N.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Sensitive human thyrotropin immunoradiometric assay set up by the identification and minimization of non specific bindings. **J. Immunoassay**, v.18, p. 247-265, 1997.
- 73.PERONI, C.N.; SOARES, C.R.J.; GIMBO, E.; MORGANTI, L.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of

- dicistronic expressio vectors followed by a dual-marker amplification strategy. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 35, p. 19-26, 2002.
74. PIERCE, J.G.; PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 50, p. 465-495, 1981.
75. PLESS, D.D.; LENNARZ, W.J. Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 74, p. 134-138, 1977.
76. POWELL, J.T.; BREW, K. Metal ion activation of galactosyltransferase. **J. Biol. Chem.**, v. 12, p. 3645-3652, 1976.
77. RAJU, T.S.; BRIGGS, J.B.; BORGE, S.M.; JONES, A.J.S. Species-specific variation in glycosilation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. **Glycobiology**, v. 10, p. 477-486, 2000.
78. RIBELA, MTCP, BIANCO, A.C.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human thyrotropin produced by Chinese hamster ovary cells for the preparation of immunoassay reagents. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 249-256, 1996.
79. RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Synthesis and chormatographic purification of recombinant human pituitary hormones. **J. Chromatogr. B**, v. 790, p. 285-316, 2003.
80. RODRIGUEZ J, SPEARMAN M, HUZEL N, BUTLER M. Enhanced production of monomeric interferon- β by CHO cells through the control of culture conditions. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 22-30, 2005.
81. ROTH, J.; BERGER, E.G. Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae. **J. Cel. Bio.**, v. 93, p. 223-229, 1982.
82. ROTH, J.; ZUBER, C.; PARK, S.; JANG, I.; LEE, Y.; KYSELA, K.G.; FOURN, V.L.; SANTIMARIA, R.; GUHL, B.; CHO, J.W. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. **Mol. Cells**, v. 30, p. 497-506, 2010.
83. SANTELL, L.; ETCHEVERRY, T.; SANTORIS, M.; DUTINA, G.; WANG, A.; GUNSON, J.; WARNER, T.G. Aberrant metabolic sialylation of recombinant protein expressed in Chinese hamster ovary cells in high

- productivity cultures. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 258, p. 132-137, 1999.
84. SHELIKOFF, M.; SINSKEY, A.J.; STEPHANOPOULOS, G. The effect of protein synthesis inhibitors on the glycosylation site occupancy of recombinant human prolactin. **Cytotechnology**, v. 15, p. 195-208, 1994.
 85. SPEARMAN, M.; RODRIGUEZ, J.; HUZEL, N.; BUTLER, M. Production and glycosylation of recombinant β -interferon in suspension and cytopore microcarrier cultures of CHO cells. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 31-39, 2007.
 86. SUNG, Y.H.; SONG, Y.J.; LIM, S.W.; CHUNG, J.Y.; LEE, G.M. Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells. **J. Biotechnol.**, v. 112, p. 323-335, 2004.
 87. SUNG YH, LEE GM. Enhanced human Thrombopoietin production by sodium butyrate addition to serum-free suspension culture of B1c-2-overexpressing CHO Cells. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 50-57, 2005.
 88. SUNLEY, K.; BUTLER, M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. **Biotechnol. Adv.**, v. 28, p. 385-394, 2010.
 89. SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; BUCCI, I.; JOSHI, L.R.; TSAI, A.; EAST-PALMER, J.; SHILOACH, J.; WEINTRAUB, B.D. Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by Chinese-hamster ovary cells – the role of sialylation and sulfation in TSH bioactivity. *Endocrinology*, v. 133, p. 1490-1503, 1993.
 90. SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D. Subunit-specific functions of N-linked oligosaccharides in human thyrotropin: Role of terminal residues of α - and β -subunits oligosaccharides in metabolic clearance and bioactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 9062-9066, 1995.
 91. SZKUDLINSKI, M.W.; GROSSMANN, M.; LEITOLF, H.; WEINTRAUB, B.D. Human thyroid-stimulating hormone: structure-function analysis. **Methods**, v. 21, p. 67-81, 2000.

92. SZKUDLINSKI, M.W.; FREMONT, V.; RONIN, C.; WEINTRAUB, B.D.
Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 473-502, 2002.
93. TABUCHI, Y.; ARAI, Y.; KONDO, T.; TAKEGUSHI, N.; ASANO, S.
Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 293, p. 1287-1294, 2002.
94. TAKAMATSU, S.; FUKUTA, K.; ASANAGI, M.; ABE, R.; YOKOMATSU, T.; FUJIBAYASHI, Y.; MAKINO, T. Monitoring biodistribution of glycoproteins with modified sugar chains. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1622, p. 179-191, 2003.
95. TIAN, Y.; ZHANG, H. Glycoproteomics and clinical applications. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 4, p. 124-132, 2010.
96. THOTAKURA, N.R.; DESAI, R.K.; SZKUDLINSKI, M.W.; WEINTRAUB, B.D. The role of the oligosaccharide chains of the thyrotropin alpha-subunit and beta-subunit in hormone action. **Endocrinology**, v. 131, p. 82-88, 1992.
97. WITSELL, D.L.; CASEY, C.E.; NEVILLE, M.C. Divalent cation activation of galactosyltransferase in native mammary golgi vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 15731-15737, 1990.
98. WONG, C.H. Protein glycosylation: new challenges and opportunities. **J. Org. Chem.**, v. 70, p. 4219-4225, 2005.
99. YOON, S.K.; HONG, J.K.; LEE, G.M. Effect of simultaneous applications of stressful culture conditions on specific productivity and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. **Biotechnol. Prog.**, v. 20, p. 1393-12-96, 2004.
100. ZHANG, W.; WEARSCH, P.A.; ZHU, Y.; LEONHARDT, R.M.; CRESSWELL, P. A role for UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase in expression and quality control of MHC class I molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 108, p. 4956-4961, 2011.