



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

Expressão, purificação e caracterização de gonadotrofina coriônica humana produzida em células CHO cultivadas em suspensão

LARISSA ANDRADE ALMEIDA

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

**Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares**

**São Paulo
2023**

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

Expressão, purificação e caracterização de gonadotrofina coriônica humana produzida em células CHO cultivadas em suspensão

Versão Corrigida

Versão Original Disponível no IPEN

LARISSA ANDRADE ALMEIDA

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

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares

São Paulo
2023

Fonte de Financiamento: CAPES

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

Como citar:

ANDRADE ALMEIDA, L. . **Expressão, purificação e caracterização de gonadotrofina coriônica humana produzida em células CHO cultivadas em suspensão**. 2023. 70 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa).

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

Andrade Almeida, Larissa
Expressão, purificação e caracterização de gonadotrofina coriônica humana produzida em células CHO cultivadas em suspensão / Larissa Andrade Almeida; orientador Carlos Roberto Jorge Soares. -- São Paulo, 2023.
70 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2023.

1. hCG recombinante. 2. gonadotrofina coriônica humana. 3. células CHO. 4. proteínas recombinantes. I. Roberto Jorge Soares, Carlos, orient. II. Título.

“A boa ciência só acontece quando tiramos conclusões baseadas nas evidências disponíveis, não só nas fáceis, nem nas que confirmam as nossas hipóteses.”

“A ciência é confiável em sua inconstância. A ciência faz o que quer.”

Ali Hazelwood.

Dedico esse trabalho:

*Aos meus pais Maria Betânia e Celso,
pelo amor, paciência, educação e por
sempre acreditarem em mim.*

*Às minhas avós Maria Rosário e
Maria Zilda (in memoriam) pelo amor,
carinho e conhecimento da minha
ancestralidade.*

*Ao meu irmão Gabriel pelo amor,
apoio e amizade de sempre.*

AGRADECIMENTO

A Deus e à minha família, pois sem eles nada disso seria possível.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, pela orientação desde a minha iniciação científica e oportunidade de desenvolver esse trabalho, também pelo constante incentivo e acreditação na evolução da ciência. O meu sincero obrigada!

À Dra. Miriam Fussae Suzuki que me acolheu desde a iniciação científica, sempre disposta a ajudar com toda a sua sabedoria e gentileza inabalável. Muito obrigada Mi, por todos os ensinamentos, amizade e por ser quem você é, sem o seu apoio esse processo teria sido muito mais difícil.

Aos pesquisadores do Centro de Biotecnologia (Cebio) que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, Dr. João Ezequiel de Oliveira por todo o auxílio, principalmente nos experimentos que envolviam cromatografia. E à Dra. Cibele Nunes Peroni pelo suporte e disponibilidade em ajudar.

Aos alunos e amigos do Cebio, especialmente à Stephanie Angelo Pomin pela parceria desde a graduação. Muito obrigada amiga, por estar sempre disposta a ouvir e compartilhar alegrias e angustias. À Mayelle Paz por todos os momentos, risadas e pela indicação de ótimos doramas. À Thais Monteiro pelas conversas e sua incrível habilidade de deixar tudo mais leve e descontraído. À Giovanna Dias pelo seu coração gigante e por não medir esforços para ajudar quem precisar. Também aos amigos, Noemy Rosan, Eliana Lima, Amanda Palermo, Filipe Menezes, Dino Gushiken, Leonardo Wilians, Valentina Dutton, Vanessa Luna, Alex Alves, Nicole Dolores, Dr. Daniel Perez, Dra. Rosa Maria, Dr. Paolo Bartolini, Dra. Regina Affonso, Dra. Patrícia Falcão, Dr. Patrick Spencer. Obrigada a todos, vocês foram muito importantes neste processo.

Aos ex-alunos e amigos do Cebio que também fizeram parte desta jornada, Renan Passos, Felipe Douglas, Ana Cristina, Thais Sevilhano, Thais Caramori, Alissandra Moura, sou muito grata por todos os ensinamentos e experiências.

Aos funcionários do Cebio/IPEN, Junqueira, Marlene, Mariana, Cida, Joana, Rosângela, Neide. Obrigada a todos por todo o suporte técnico e contribuição de toda forma.

Aos pesquisadores e colaboradores do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), especialmente ao Sérgio Fernandes por todo suporte no processo de purificação e estar sempre disposto a ajudar. Ao Antônio Montemor pelo auxílio no cultivo das células mLTC-1. Ao Alexandre Wendel e Taciana Freire, pela amizade e pelos momentos de descontração. Também a Patrícia Leo, Guilherme, Fernando e Alice. Muito obrigada a todos pelos ensinamentos.

Às minhas amigas e confidentes Anelise Alves, Larissa Reis e Bianca Pandeló, sou extremamente grata pela amizade, parceria e companheirismo de sempre.

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

À FAPESP e CAPES pela concessão de recursos financeiros.

RESUMO

ALMEIDA, L. A. **Expressão, purificação e caracterização de gonadotrofina coriônica humana produzida em células CHO cultivadas em suspensão.** 2023. 70 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é um hormônio glicoproteico de 237 aminoácidos, cuja glicofoma regular apresenta cerca de 37.180 Da, sendo 30 % dessa massa molecular composta por açúcares. Este hormônio é produzido fisiologicamente em grandes quantidades pelas células sinciciotrofoblásticas das vilosidades placentárias durante a gravidez, onde exerce a função de estimular a produção de progesterona e manter o corpo lúteo, nas primeiras 6 semanas da gestação, enquanto a placenta se desenvolve. Também está bem estabelecido que altos níveis de β -hCG estão relacionados com a malignidade tumoral. A hCG assim como os hormônios FSH, LH e TSH, é uma proteína heterodimérica, ou seja, formada por duas subunidades: subunidade α em comum com os outros hormônios citados e subunidade β que confere características específicas para cada hormônio. O objetivo deste trabalho é expressar a gonadotrofina coriônica humana recombinante (r-hCG) em linhagem de células CHO em suspensão, purificar e caracterizar a hCG obtida. Na metodologia empregada para produção deste hormônio, foram construídos dois plasmídeos, um para a expressão da subunidade α e outro para a β . Após a confirmação do sequenciamento, os plasmídeos contendo o cDNA foram empregados para transfectar de forma transiente as células ExpiCHO-S, utilizando lipídeo catiônico (lipofectamina). Na transfecção transiente a proporção dos plasmídeos com as subunidades α e β foram avaliados, a relação $1\alpha:1\beta$ foi a que se mostrou mais eficiente durante oito dias de produção. O processo de purificação consistiu de uma troca aniônica seguida por uma exclusão molecular e o hCG obtido apresentou alto grau de pureza. O r-hCG confirmou atividade imunológica por Western Blotting e ELISA. A atividade biológica *in vitro* foi confirmada por estudos de proliferação celular e citometria de fluxo utilizando células intersticiais de testículo de camundongo mLTC-1 (células de Leydig). Também foram realizadas análises por MALDI-TOF/TOF para determinar a porcentagem de N-glicanos e O-glicanos em cada subunidade do hCG. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a gonadotrofina coriônica humana recombinante, produzida e purificada em nosso laboratório, atende aos requisitos de autenticidade, pureza e eficácia necessária para sua aplicação, seja para a utilização *in vitro* ou em ensaios biológicos.

Palavras-chave: hCG recombinante; gonadotrofina coriônica humana; células CHO; proteínas recombinantes.

ABSTRACT

ALMEIDA, L. A. **Expression, purification and characterization of human chorionic gonadotropin produced in suspended CHO cells.** 2023. 70 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Human chorionic gonadotropin (hCG) is a glycoprotein hormone of 237 amino acids, whose regular glycoform has about 37,180 Da, 30% of which is composed of sugar. This hormone is produced physiologically in large quantities by the syncytiotrophoblastic cells of the placental villi during pregnancy, where it exerts the function of stimulating the production of progesterone and maintaining the corpus luteum in the first 6 weeks of pregnancy, as the placenta develops. It is also well established that high levels of β -hCG are related to tumor malignancy. The hCG as well as the hormones FSH, LH and TSH, is a heterodimeric protein, that is, formed by two subunits: subunit α in common with the other mentioned hormones and subunit β that confers specific characteristics for each hormone. The objective of this work is to express recombinant human chorionic gonadotropin (r-hCG) in a CHO cell line in suspension, purify and characterize the hCG obtained. In the methodology used for the production of this hormone, two plasmids were constructed, one for the expression of the subunit α and another for the β . After confirmation of sequencing, the plasmids containing the cDNA were employed to transiently transfect the cells ExpiCHO-S, using cationic lipid (lipofectamine). In the transient transfection the proportion of plasmids with the subunits α and β were evaluated, the relation 1 α :1 β was the one that was more efficient during eight days of production. The purification process consisted of an anionic exchange followed by a molecular exclusion and the hCG obtained showed a high degree of purity. The r-hCG confirmed immunological activity by Western Blotting and ELISA. Biological activity *in vitro* was confirmed by cell proliferation and flow cytometry studies using interstitial cells of mouse testicle mLTC-1 (Leydig cells). Analyses were also performed by MALDI-TOF/TOF to determine the percentage of N-glycans and O-glycans in each subunit of hCG. The results obtained in this work demonstrate that the human chorionic gonadotropin recombinant, produced and purified in our laboratory, meets the requirements of authenticity, purity and efficacy necessary for its application, for *in vitro* use or for biological testing.

Keywords: recombinant hCG; human chorionic gonadotropin; CHO cells; recombinant proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das subunidades α e β dos hormônios hLH, hCG, hFSH e hTSH	15
Figura 2 – Estrutura cristalográfica da hCG	16
Figura 3 – Diferentes modelos de N-glicanos ligados ao <i>sequon</i> Asn-X-Ser/Thr	21
Figura 4 – Representação da estrutura mais comum de um O-glicano, chamado <i>core 1</i>	22
Figura 5 – Sequencia de nucleotídeos do hCG. A) Nucleotídeos que contem o cDNA codificador da subunidade α de hCG; B) Nucleotídeos que contem o cDNA codificador da subunidade β de hCG. Em vermelho indica o códon de inicio e em azul o códon de parada.	28
Figura 6 – Imagem esquemática do vetor pcDNA 3.4 TOPO	29
Figura 7 – Foto representativa das células mLTC-1	35
Figura 8 - Representação da ligação de anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina e do iodeto de propídeo (PI) intracitoplasmático	37
Figura 9 – Análise da digestão dos plasmídeos pcDNA 3.4 TOPO com as subunidades α e β de hCG em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo	39
Figura 10 - SDS-PAGE e gráfico com amostras de meio condicionado do controle positivo contendo IgG de coelho produzido durante 8 dias nas células <i>ExpiCHO-S</i>	40
Figura 11 - Gráfico apresentando a viabilidade e concentração celular, durante 8 dias de produção realizada através da transfecção transiente nas células <i>ExpiCHO-S</i>	41
Figura 12 – Testes de gravidez utilizados para detectar a presença de r-hCG no meio condicionado das três produções	42

Figura 13 – Western Blotting das três produções de rhCG em células <i>ExpiCHO-S</i>	42
Figura 14 – Cromatograma da purificação de hCG em coluna cromatográfica de afinidade POROS™ CaptureSelect™ hCG Affinity	43
Figura 15 - Perfil cromatográfico da análise por RP-HPLC	45
Figura 16 – A) Cromatograma da purificação de hCG em coluna cromatográfica de troca aniônica <i>Q Sepharose Fast Flow</i> ... B) <i>Western Blotting</i>	47
Figura 17 – A) Cromatograma da segunda etapa de purificação de hCG em coluna cromatográfica de exclusão molecular <i>Sephacryl S100</i> ... B) <i>Western Blotting</i>	48
Figura 18 - Perfil cromatográfico da análise por HPSEC, após a purificação por exclusão molecular na coluna <i>Sephacryl S100</i>	50
Figura 19 – Avaliação da atividade biológica da r-hCG <i>in vitro</i>	52
Figura 20 – Identificação por citometria de fluxo do estágio de apoptose nas células mLTC-1 submetidas a 24 horas de incubação com 1 µg/mL de r-hCG	53
Figura 21 – Espectro de massas por MALDI-TOF/TOF da r-hCG referência (Ovidrel) utilizando a matriz de DHB	56
Figura 22 – Espectro de massas por MALDI-TOF/TOF da r-hCG produzida pelas células <i>ExpiCHO-S</i> , utilizando a matriz de DHB	57
Figura 23 – Espectro de massas por MALDI-TOF/TOF da r-hCG produzida pelas células <i>ExpiCHO-S</i> , utilizando a matriz de SA	58
Figura 24 – Espectro de massas por MALDI-TOF/TOF da r-hCG referência (Ovidrel) utilizando a matriz de SA	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Gonadotrofina coriônica humana	14
1.1.1	Importância clínica da hCG	17
1.1.2	hCG disponível comercialmente	18
1.2	Glicosilação em glicoproteínas	19
1.2.1	N-glicosilação	20
1.2.2	O-glicosilação	21
1.3	Células de ovário de hamster chinês (CHO)	22
1.3.1	Células CHO no Centro de Biotecnologia do IPEN	24
1.4	Transfecção transiente em células de mamíferos	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivos específicos	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Confirmação do plasmídeo pcDNA 3.4 TOPO subunidades α e β	27
3.2	Transfecção transiente das células <i>Exp</i>iCHO-S	29
3.3	Análise por gel SDS-PAGE	31
3.4	Análise por <i>Western Blotting</i> (WB)	31
3.5	Cromatografia líquida de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC)	32
3.6	Cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular (HPSEC)	32
3.7	Purificação da r-hCG	33
3.7.1	Purificação por cromatografia de afinidade	33
3.7.2	Purificação por cromatografia de troca iônica	34
3.7.2.1	Purificação por cromatografia de exclusão molecular	34
3.8	Teste de atividade biológica <i>in vitro</i> com células de Leydig	34
3.8.1	Ensaio de viabilidade celular	35
3.8.2	Ensaio de morte celular por citometria de fluxo	36
3.9	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	37
3.10	Análise da hCG por espectrometria de massas	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Confirmação dos plasmídeos α e β	38
4.2	Produção por transfecção transiente nas células <i>Exp</i>iCHO-S	39

4.3	Purificação por afinidade	43
4.4	Análise por RP-HPLC	44
4.5	Purificação por troca aniônica	46
4.6	Purificação por exclusão molecular	47
4.7	Análise por HPSEC	49
4.8	Atividade biológica do r-hCG <i>in vitro</i>	51
4.9	Análise da r-hCG por MALDI-TOF/TOF	54
4.9.1	Estudo com a r-hCG comercial (Ovidrel)	54
4.9.2	Estudo com a r-hCG produzida pelas células <i>Exp1CHO-S</i>	57
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÃO	64
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gonadotrofina coriônica humana

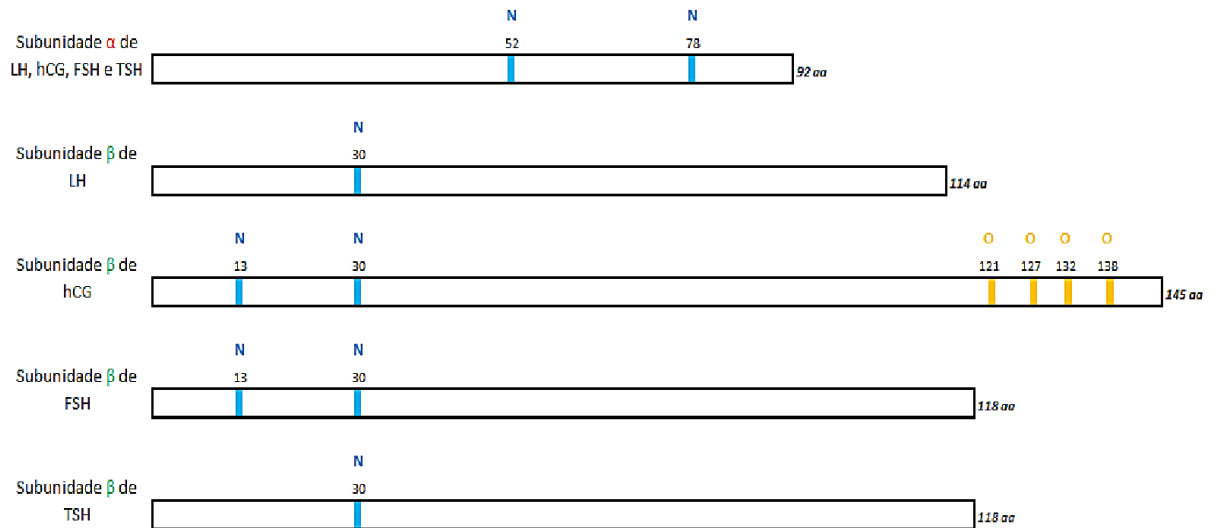
A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é um integrante da família dos hormônios glicoproteicos, cuja glicofoma regular apresenta cerca de 37.180 Da, sendo 30 % dessa massa molecular composta por resíduos de carboidratos (COLE, 2012). A hCG é produzida principalmente pelas células do sinciciotrofoblasto, que em conjunto com os citotrofoblastos e a mesoderme extraembrionária formam o córion (BERNDT *et al*, 2013), porção adjunta à placenta que é muito vascularizada e fornece nutrientes para o embrião no início da gestação.

A função fisiológica da hCG é manter o corpo lúteo, nas primeiras 6 semanas da gestação e estimular a produção de hormônio esteróide (principalmente progesterona) até que a atividade esteroidogênica da placenta consiga produzir progesterona suficiente para assumir essa função. Além disso, promove a angiogênese nas artérias espirais do miométrio durante a gravidez (ZYGMUNT *et al*, 2003), a diferenciação das células do citotrofoblasto em sinciciotrofoblasto e a quiescência das contrações no miométrio uterino (COLE, 2010). Também demonstrou desempenhar um papel imunológico na gravidez, promovendo a produção e liberação da citocina, fator inibidor de macrófagos (WAN *et al*, 2007).

A hCG é uma glicoproteína complexa composta por duas subunidades (subunidade α e subunidade β) altamente glicosiladas, que são conectadas por interações hidrofóbicas e iônicas monovalentes (OYATOGUN *et al*, 2021). A subunidade α , que é comum com os hormônios gonadotróficos hipofisários (hormônio luteinizante - LH, hormônio folículo-estimulante - FSH, hormônio estimulante da tireoide - TSH), contém 92 resíduos de aminoácidos com dois locais de N-glicosilação e é codificada por um único gene localizado no cromossomo 6q21.1-23 (FIDDES; GOODMAN, 1981).

Já as subunidades β são diferentes para cada um dos hormônios gonadotróficos, permitindo a estes apresentar propriedades e atividades biológicas específicas (Figura 1). A subunidade β da hCG contém 145 aminoácidos com dois sítios de N-glicosilação e quatro sítios de O-glicosilação, e é codificada por um grupo de genes (FOURNIER, 2016).

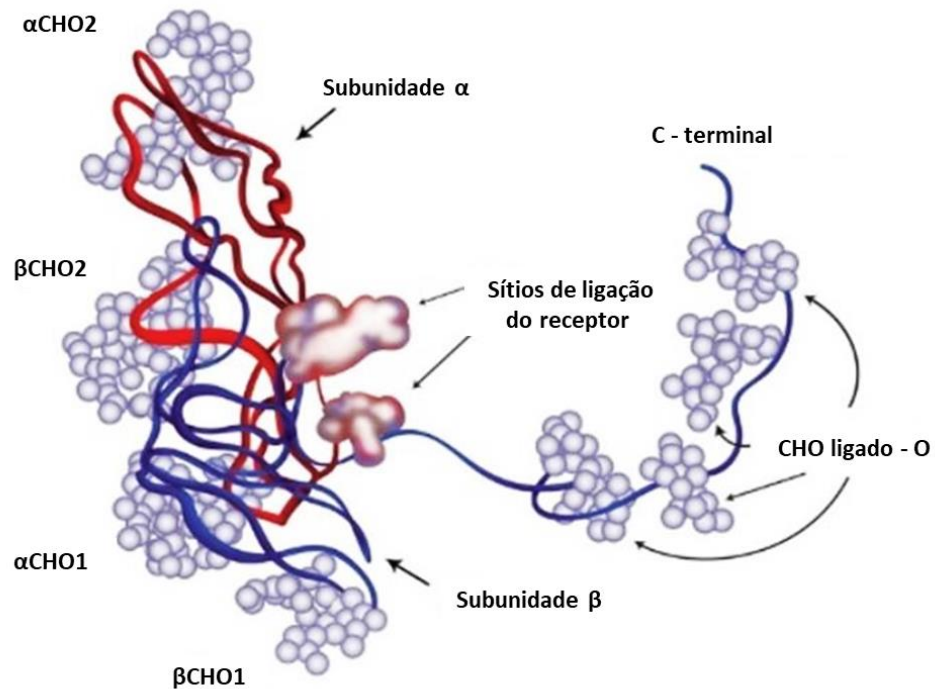
Figura 1 – Representação das subunidades α e β dos hormônios hLH, hCG, hFSH e hTSH. As fitas estão com tamanho proporcional ao número de resíduos de aminoácidos que possuem. Os aminoácidos com N-glicosilação (azul) e O-glicosilação (amarelo).



Fonte: Adaptação de (STORRING, 1992).

Embora, a subunidade β de hCG contenha uma sequência de aminoácidos semelhante ao hLH, uma diferença considerável é a presença de um longo segmento carboxi-terminal com 24 aminoácidos, contendo quatro sítios de ligação glicosídica tipo O (Figura 2). Além disso, apresenta um sítio de N-glicosilação a mais que o hLH, devido a este maior número de regiões com glicosilação e resíduos de ácido siálico, a hCG exibe uma meia-vida sérica mais longa, de 24 horas, em comparação à do hLH de aproximadamente 30 minutos (LEÃO; ESTEVES, 2014).

Figura 2 – Estrutura cristalográfica da hCG. A subunidade α está representada em vermelho, e a β em azul. É notável a presença de um longo segmento carboxi-terminal O-glicosilado (CHO ligado à O), conferindo meia-vida mais longa ao hCG.



Fonte: Adaptação de LEÃO; ESTEVES, 2014.

Existem várias formas de hCG que se diferem em estrutura e função, mas ainda preservam a sequência de aminoácidos da subunidade β de hCG, são elas: 1 - hCG produzido por células sinciciotrofoblásticas, já mencionados anteriormente; 2 - hCG hiperglicosilado (hCG-H) produzido por células citotrofoblásticas; 3 - subunidade β livre produzida por múltiplas malignidades não trofoblásticas; 4 - hCG hipofisário produzido pelas células gonadotrópicas da hipófise anterior (COLE, 2010). Subunidades α livres de hCG também podem ser encontradas e detectadas clinicamente (OYATOGUN *et al*, 2021).

A hCG-H, com massa molecular de 42.800 Da, é a principal variante de hCG produzida no início da gravidez, compreende cerca 87% da hCG total produzida no soro durante a terceira semana de gestação (COLE, 2010). Esta modificação de glicosilações da proteína pode fazer com que sua função deixe de ser hormonal para ser autócrina. A hCG-H liga-se aos receptores de membrana TGF- β , bloqueando esses receptores e fazendo com que as células do trofoblasto permaneçam vivas por mais tempo, produzindo e liberando enzimas invasivas,

metaloproteinases, colagenases e fatores de angiogênese que auxiliam a fixação do embrião (BERNDT *et al.*, 2013)

Estudos relatam que a subunidade β de hCG pode estar presente em células cancerosas como β -hCG livre ou como homodímeros, podendo desempenhar um papel importante na malignidade em tumores de células não germinativas (KVIRKVELIA *et al.*, 2018), como carcinoma hepatocelular (XIANGBING *et al.*, 2010), carcinoma de células renais, carcinoma de bexiga, câncer colorretal (KVIRKVELIA *et al.*, 2018) e neoplasias do córion (COLE, 2012).

O β -hCG e β -hCG livre agem de maneira autócrina e ligam-se aos receptores de TGF β nas células produtoras, antagonizando a ação antitumoral destes receptores e bloqueando a apoptose, efeito de TGF β 1 em células neoplásicas de origens diferentes, por ligação ao receptor de TGF β (TOPRAK *et al.*, 2017).

1.1.1 Importância Clínica da hCG

Nos últimos anos, a procura pela conservação da fertilidade devido a motivos oncológicos e não oncológicos, bem como por motivos individuais, teve um aumento significativo (DONNEZ; DOLMANS, 2017); conseqüentemente o desenvolvimento de técnicas de fertilização *in vitro*, aumentou a importância clínica da hCG (NIEDERBERGER *et al.*, 2018).

Nesse processo de fertilização, quando os folículos ovarianos atingem determinadas dimensões, a ovulação é desencadeada pela administração de uma injeção de hCG recombinante ou não recombinante, provocando a maturação de diversos oócitos simultaneamente (AL RAHWANJI *et al.*, 2022). A hCG também estimula os corpos lúteos a produzirem progesterona, a fim de preparar o endométrio para a fixação do embrião (DUTTA, 2015). Nos homens, a hCG pode ser usada para estimular a produção de testosterona pelas células de Leydig em casos de deficiência hormonal, bem como no hipogonadismo masculino (LUNENFELD *et al.*, 2019).

A hCG também é um bom marcador de malignidades gestacionais e não gestacionais, de modo que, o teste de hCG desempenha um papel crucial na doença trofoblástica gestacional (CAROLINE E FRANKS *et al.*, 2023), bem como o β -hCG em cânceres não trofoblásticos, podendo ser utilizado para melhorar a precisão do diagnóstico e prognóstico em alguns tumores (SISINNI; LANDRISCNA, 2015), como câncer testicular (MAYOR-DE-CASTRO *et al.*, 2022),

germinoma intracraniano (SUZUKI et al, 2023), adenocarcinoma e câncer de mama (KÖLBL et al, 2018). Sendo que para a última malignidade comentada, a hCG pode ter uma utilização na prevenção ou intervenção terapêutica (RAO, 2017).

1.1.2 hCG disponível comercialmente

Durante muito tempo, a gonadotrofina coriônica humana urinária (u-hCG) foi favorecida para diversas aplicações devido à facilidade de coleta. No entanto, a estrutura final dessas preparações derivadas da urina apresenta diferenças significativas do produto natural da placenta. Com a evolução da tecnologia de DNA recombinante, tornou-se possível o desenvolvimento da hCG recombinante (r-hCG) que garante alta pureza e consistência entre lotes (HUGUES, 2004).

Na prática clínica, estudos foram realizados para comparar a eficácia e a segurança das preparações urinárias e recombinantes de hCG. No geral, os dados relatados mostram que as preparações de r-hCG são pelo menos tão eficazes quanto os produtos de u-hCG na reprodução dos eventos foliculares, produzindo respostas farmacodinâmicas consistentes com a fisiologia da hCG (MADANI et al, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS - 2001), algumas características como os níveis séricos e a taxa de hiperestimulação ovariana (OHSS), podem sugerir uma potência mais alta da r-hCG em comparação com a u-hCG. Algumas hipóteses podem explicar essa aparente tendência, como o fato da r-hCG ser quantificado em massa (μg de proteína), enquanto a u-hCG é quantificado com um bioensaio animal. Além disso, os produtos de r-hCG garantem um melhor ambiente hormonal durante a fase lútea (HUGUES, 2004) e podem apresentar uma menor taxa de reações adversas relacionadas ao local de injeção da proteína, do que a u-hCG (YOUSSEF; ABOU-SETTA; LAM, 2016).

Contudo, apesar das preparações de u-hCG apresentarem um menor custo no mercado, o desenvolvimento da gonadotrofina recombinante está atualmente em maior destaque. Porém, somente a r-hCG produzido em células CHO pelo Laboratório Serono nos Estados Unidos é aprovado para ser comercializado no Brasil, com um custo elevado, outras preparações recombinantes também expressas em células CHO, como demonstrado na tabela

1, só estão disponíveis em mercados restritos e aprovados pelas autoridades regulatórias locais.

Tabela 1 – Lista de r-hCG produzidos em células CHO e disponíveis comercialmente.

Produto comercial	Origem	Referência
Ovidrel® ou Ovitrelle®	Laboratório Serono (Estados Unidos)	GARCIA, 2004
rhCG DA-3803	Dong-A Pharmaceutical (Coréia do Sul)	SEO et al., 2011 CHA et al., 2015
rhCG Lidebao®	Livzon (China)	DENG et al., 2023
SB005	Sun Pharmaceutical Industries Ltd. (Índia)	THENNATI et al., 2018
Triggerix®	Lupin Pharma Ltd. (Índia)	ALLAHBADIA; ALLAHBADIA, 2016
Choriorel®	Reliance Life Sciences (Índia)	BHATTACHARYA et al., 2018

Fonte: Autora da dissertação.

1.2 Glicosilação em glicoproteínas

A glicosilação de proteínas é uma das modificações pós-traducionais mais frequentes e complexas, esse processo tem impactos significativos na função das proteínas (EICHLER, 2019), pois contribui para o correto enovelamento, solubilidade e transporte da proteína, bem como para o reconhecimento e ligação ao seu receptor específico. Além disso, desempenha um papel importante na ativação ou manutenção da atividade biológica da glicoproteína, pois está envolvida na regulação do tempo de meia-vida plasmática ou no *clearance* da proteína (WALSH, 2010; TIAN e ZHANG, 2010).

A glicosilação é um processo que envolve a adição de estruturas simples ou complexas de carboidratos, conhecidas como glicanos, à formação dessas estruturas pode ser dividida em três etapas. Na primeira etapa, os açúcares nucleotídicos (oligossacarídeos) são sintetizados no citoplasma. Na segunda etapa, esses oligossacarídeos são transportados para o retículo endoplasmático (RE) ou para o Golgi. Na terceira etapa, glicosiltransferases específicas ligam os

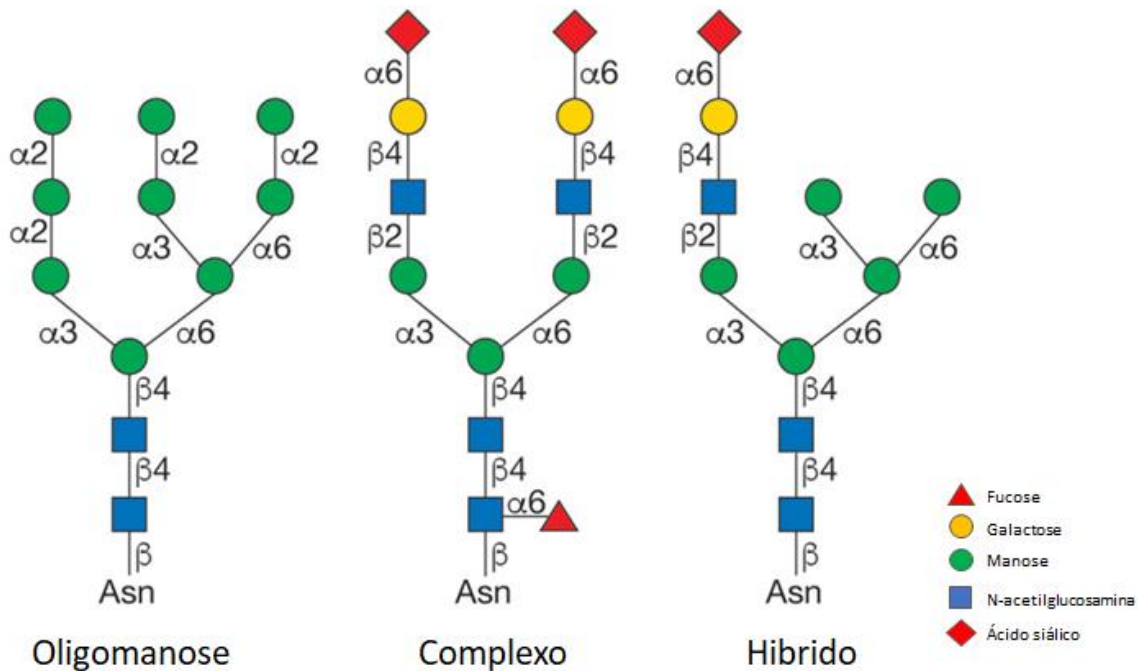
açúcares a uma proteína ou a um glicano no RE ou Golgi (WOPEREIS *et al.*, 2006). Existem dois modos diferentes de glicosilações que acontecem em glicoproteínas, são eles: N-glicosilação e O-glicosilação.

1.2.1 N-glicosilação

As glicosilações do tipo N ocorrem quando glicanos são ligados covalentemente a resíduos de asparagina por uma ligação N-Glicosídica, e esse processo só acontece numa sequência peptídica específica: Asn-X-Ser/Thr, onde um resíduo de asparagina seguido de outro aminoácido, exceto prolina, e termina com resíduos de serina ou treonina. Estas estruturas base recebem o núcleo pentassacarídico composto por dois resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e três resíduos de manose (Man), por meio do transportador lipídico dolicol-fosfato no RE (BUTLER, 2006).

Posteriormente, ocorre uma série de reações de adição e retirada de oligossacarídeos por glicosidases e glicosiltransferases no lúmen do RE e continua no complexo de Golgi (STANLEY *et al.*, 2017). Contudo, devido a complexidade de todo o processo o N-glicano maturo pode adquirir três diferentes formas: Oligomanose, com somente resíduos de manose em sua estrutura; Complexo, com ramificações iniciadas por N-acetilglicosamina no núcleo pentassacarídico e uma fucose ligada na estrutura base ($\alpha 6$) e; Híbrido, com uma ramificação iniciada por N-acetilglicosamina e uma prolongação de resíduos de manose; demonstrada na figura 3.

Figura 3 – Diferentes modelos de N-glicanos ligados ao *sequon* Asn-X-Ser/Thr. As letras α e β indicam a configuração estereoquímica do monossacarídeo em relação à ligação glicosídica, enquanto os números ao lado especificam qual átomo de carbono está envolvido na ligação glicosídica.



Fonte: Adaptado de STANLEY *et al*, 2017

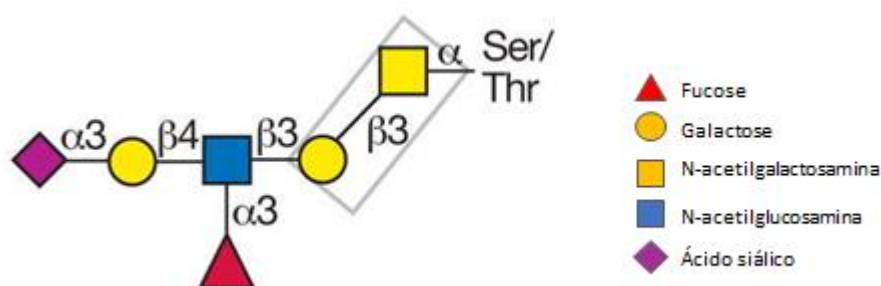
Os N-glicanos têm influência sobre várias características das glicoproteínas, como sua estrutura, solubilidade, antigenicidade, funcionalidade e reconhecimento por proteínas que se ligam a glicanos (GBPs). A adição de N-glicanos é uma abordagem empregada para localizar ou direcionar uma glicoproteína ao longo da via de secreção, ou para rastrear sua trajetória dentro da célula (GO; KONG NG, 2018).

1.2.2 O-glicosilação

As glicosilações do tipo O mais comuns em humanos ocorrem no complexo de Golgi por meio de uma ligação covalente da N-acetilgalactosamina (GalNAc) ao -OH da serina ou treonina, formando as estruturas denominadas mucinas O-glicanos ou O-GalNAc glicanos (BROCKHAUSEN *et al.*, 2009). No total, oito estruturas centrais do tipo mucina podem ser distinguidas, dependendo da ligação do segundo açúcar (WOPEREIS *et al.*, 2006). O mais comum é denominado *core* 1, pois é encontrado em muitas glicoproteínas e mucinas, por apresentar características antigênicas também é chamado de antígeno T, podendo ser

modificados pelo ácido siálico para formar -T sialilados, como representado na figura 4.

Figura 4 – Representação da estrutura mais comum de um O-glicano, chamado *core 1*. As letras α e β indicam a configuração estereoquímica do monossacarídeo em relação à ligação glicosídica, enquanto os números ao lado especificam qual átomo de carbono está envolvido na ligação glicosídica.



Fonte: Adaptado de BROCKHAUSEN *et al.*, 2009.

No caso da hCG, um estudo realizado por Birken (2005) utilizando um anticorpo para resíduos de glicanos presentes na subunidade β de hCG, identificou a presença de O-glicano *core 2* em amostras hiperglicosiladas derivadas de mulheres na gestação. Essa forma de glicano pode possuir importante aplicação clínica no início da gravidez, até a 6ª semana de gestação, podendo ser usado para prever o estado de saúde da gravidez em clínicas de fertilidade.

Além disso, as medições dessas isoformas *core 2* de hCG são úteis para a previsão de gestações com síndrome de Down, sendo também importante no diagnóstico e monitoramento do câncer, visto que sua concentração parece correlacionar-se com a malignidade. Contudo, o estado de glicosilação da hCG varia com o estágio da gravidez, sua fonte de produção e patologia (FOURNIER, 2016).

1.3 Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO)

Desenvolvidas por Puck (1958) as células CHO inicialmente não foram previstas para produção de proteínas, sua utilidade ocorreu devido a facilidade de investigações em citogenética, acarretando em décadas de pesquisas onde as células derivadas serviram para estudar números, estruturas e localizações de genes de mamíferos, com o objetivo de desvendar funções e princípios genéticos de cromossomos em mamíferos (WURM; WURM, 2021). No entanto, o interesse

dos pesquisadores Urlaub e Chasin (1980) na enzima dihidrofolato redutase (DHFR) originou a linhagem CHO-DXB11, sendo este o ponto de partida da era da biotecnologia envolvendo células recombinantes de mamíferos (WURM, 2013).

Ao decorrer do tempo diversas pesquisas foram realizadas e diferentes populações de células CHO foram estabelecidas, dentre estas as CHO cultivadas em suspensão que foram desenvolvidas em South San Francisco na Genentech Inc., EUA, pois as células aderentes não produziam quantidades suficientes de ativador de plasminogênio tecidual humano (TPA) (WURM; WURM, 2021).

Para expressar proteínas em aplicações indústrias, os meios de cultivo devem suportar altas densidades de células viáveis, ao mesmo tempo em que estimulam a síntese e o transporte extracelular de produtos biológicos, visto isso se deu o desenvolvimento de meios livres de soro e quimicamente definidos (CD) (RITACCO; WU; KHETAN, 2018). A utilização de meios CD tem auxiliado na padronização da expressão de proteínas recombinantes, pois permite uma avaliação mais fina da produção (VALK *et al.*, 2010) e do perfil de glicosilação de certas proteínas recombinantes (GAWLITZEK *et al.*, 2009).

As células de mamíferos atualmente tornaram-se dominantes na produção de bioprodutos terapêuticos (WALSH, 2022). Dos 159 produtos aprovados feitos por meios recombinantes em sistemas de células, a maioria, cerca de 107 produtos, são feitos em células de mamíferos, sendo que 95 desses produtos utilizaram as células CHO como sistema de expressão, o que reflete os pontos fortes e bem conhecidos desta plataforma de produção.

Dentre as vantagens de utilização das células CHO, o fato de produzirem uma glicosilação não imunogênica e quase semelhante à humana é geralmente levado em consideração para a escolha deste sistema (WALSH, 2018). Por exemplo, as células CHO não expressam alfa-1,3-galactosiltransferases, que produzem o epítipo alfa-galactosil imunogênico (embora possuam o gene).

Em contrapartida, linhagens de células que também são murinas como NS0 e Sp2/0, e que também expressão estruturas de glicano semelhantes aos humanos, produzem epítipos imunogênicos como o epítipo Gal α (1–3)Gal e possuem um alto teor de ácido siálico NeuGc, e é por isso que são menos comumente utilizadas para produção de bioprodutos (GOH; KONG NG, 2018).

Uma lista notável e crescente de estudos em várias tecnologias ômicas vem melhorando significativamente a compreensão das células CHO em

diferentes níveis. Como os avanços na edição do genoma, engenharia celular e glicoengenharia, com CRIPR/Cas9 por exemplo (LEE *et al.*, 2015), a otimização do sistema de expressão está em evidência, buscando aprimorar a produtividade, qualidade e estabilidade de produtos de interesse farmacêutico (DONINI; HASLAM; KONTORAVDI, 2021).

1.3.1 Células CHO no Centro de Biotecnologia do IPEN

O grupo de hormônios do Centro de Biotecnologia, localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) foi um dos pioneiros no estudo e utilização das células CHO para produção de proteínas recombinantes no Brasil. Alguns trabalhos realizaram a expressão de prolactina humana (SOARES *et al.*, 2000; HELLER *et al.*, 2010), outros a expressão e caracterização de hormônios heterodiméricos como o TSH (PERONI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Entretanto, as células CHO utilizadas ainda eram cultivadas em monocamada. Com a adaptação destas células para cultura em suspensão, livre de soro e antibióticos (ARTHUSO *et al.*, 2012), alguns trabalhos começaram a ser realizados utilizando as CHO cultivadas em suspensão para produzir proteínas recombinantes (CAPONE *et al.*, 2015).

1.4 Transfecção transiente em células de mamíferos

A transfecção é um procedimento que permite explorar a atividade de genes ou produtos gênicos, seja estimulando ou inibindo a expressão de genes específicos nas células, bem como expressar proteínas recombinantes em células de mamíferos.

A inserção do material genético nas células pode ser realizada de duas maneiras: de forma estável ou transiente. No caso da transfecção estável, os materiais genéticos introduzidos contêm, normalmente, um gene marcador para seleção, que é incorporado ao genoma do hospedeiro, isso permite que o gene marcador seja expresso continuamente mesmo após a replicação das células hospedeiras. Por outro lado, os genes transfectados de forma transiente são expressos apenas por um período de tempo determinado e não são incorporados ao genoma. Cada forma de transfecção possui vantagens e desvantagens, portanto, o método ideal depende do objetivo (RECILLAS-TARGA, 2006).

Os métodos de transfecção também podem ser classificados em três grupos: biológicos, químicos e físicos. Os métodos de transfecção química são os métodos mais amplamente utilizados na pesquisa contemporânea e foram os primeiros a serem usados para introduzir genes estranhos em células de mamíferos. Estes geralmente usam polímero catiônico, fosfato de cálcio, aminoácido catiônico ou lipídio catiônico (SCHENBORN; GOIFFON, 2000).

O princípio dos lipídeos catiônicos consiste basicamente em lipossomas carregados positivamente, que formam complexos com a carga negativa da molécula de DNA, permitindo sua fusão com a membrana plasmática da célula. Este complexo é capaz de aumentar a transfecção em diversos tipos de células, tecidos e até mesmo em combinação com partículas virais. Importante ressaltar que a proporção de lipossomas para DNA em cada tipo de célula e molécula de DNA é fundamental, porque o excesso de lipossomas catiônicos pode ser tóxico para uma determinada linhagem de células.

Cuidados adicionais também são necessários durante o procedimento de acoplamento do complexo, pois precisa ser feito lentamente com adição de quantidades progressivas de DNA para que cada partícula de lipossoma se forme com a maior quantidade de DNA plasmidial. Portanto, transfecções transientes podem alcançar ótimos níveis de expressão (KIM; EBERWINE, 2010; RECILLAS-TARGA, 2006).

2 OBJETIVO

Esse estudo teve como objetivo expressar a gonadotrofina coriônica humana recombinante (r-hCG) em linhagem de células CHO em suspensão, purificar a r-hCG obtida e caracterizar por técnicas físico-químicas e biológicas.

2.1 Objetivos específicos

- Transfectar de forma transiente as células CHO em suspensão utilizando dois tipos de plasmídeos, um contendo o cDNA da subunidade α da hCG e outro o cDNA da subunidade β ;
- Cultivar as células CHO transfectadas, sob agitação, em meio livre de proteínas, soro e antibióticos;
- Obter níveis de expressão de hCG acima de $1 \mu\text{g/mL}/10^6$ células;
- Purificar a hCG obtida, com utilização de diferentes técnicas cromatográficas;
- Caracterizar a r-hCG por meio de diferentes técnicas físico-químicas;
- Verificar a atividade biológica da proteína purificada;
- Analisar o perfil de glicanos do hCG por espectrometria de massas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Confirmação do plasmídeo pcDNA 3.4 TOPO subunidades α e β

Os plasmídeos contendo o cDNA correspondente às subunidades α e β foram previamente construídos no laboratório (α por SANT'ANA *et al.*, 2018 e β por FERNANDES, 2022), cujo a sequência de nucleotídeos obtida no GenBank está representada na figura 5. Foi utilizado o vetor pcDNA 3.4 TOPO (Invitrogen - *Thermo Fisher Scientific*). Cada plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição XbaI Fast digest (*Thermo Fisher Scientific* Baltics UAB, Vilnius, Lituânia) para confirmar a obtenção dos segmentos de DNA esperados, visualizados em gel de agarose 1% (Sinapse Inc.- EUA) em TAE corados com brometo de etídio (Sigma-Aldrich, 10 mg/ml). Para a digestão foram utilizados: 15 μ L de água ultrapura, 2 μ L de tampão Fast digest, 1 μ g de DNA e 1 μ L de enzima XbaI, o que totalizou uma solução de 20 μ L que foi mantido na estufa a 37 °C por 1 hora.

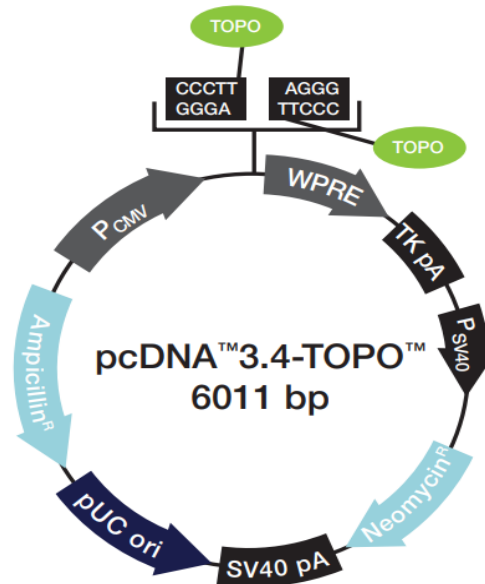
Outro estudo para confirmação dos plasmídeos foi um PCR convencional, com o primer CMV forward 5'-CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG-3'; primer reverse 5'-CAA CAT AGT TAA GAA TAC CAG TC-3' e controle do Kit comercial pcDNA 3.4 TOPO. Um esquema desse vetor é apresentado na Figura 6 (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, EUA).

Figura 5 – Sequência de nucleotídeos do hCG. A) Nucleotídeos que compõem o cDNA codificador da subunidade α de hCG; B) Nucleotídeos que compõem o cDNA codificador da subunidade β de hCG. O códon de início está indicado em vermelho e o códon de parada em azul.

A	1	ATG GATTACT ACAGAAAATATGCAGCTATC TTTCTGGTCA CATTGTCGGT GTTTCTGCAT
	61	GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGCAGGAT TGCCCAGAAT GCACGCTACA GGAAAACCCA
	121	TTCTTCTCCC AGCCGGGTGC CCCAATACTT CAGTGCATGG GCTGCTGCTT CTCTAGAGCA
	181	TATCCCCTC CACTAAGGTC CAAGAAGACGATGTTGGTCC AAAAGAACGT CACCTCAGAG
	241	TCCACTTGCT GTGTAGCTAA ATCATATAAC AGGGTCACAG TAATGGGGGG TTTCAAAGTG
	301	GAGAACCACACGGCGTGCCA CTGCAGTACT TGTTATTATC ACAAATCTTA A
B	1	AGACAAGGCA GGGGACGCAC CAAGG ATG GA GATGTTCCAG GGGCTGCTGC TGTTGCTGCT
	61	GCTGAGCATG GGCGGGACAT GGGCATCCAA GGAGCCGCTT CGGCCACGGT GCCGCCCCAT
	121	CAATGCCACC CTGGCTGTGG AGAAGGAGGG CTGCCCCGTG TGCATCACCG TCAACACCAC
	181	CATCTGTGCC GGCTACTGCC CCACCATGAC CCGCGTGCTG CAGGGGGTCC TGCCGGCCCT
	241	GCCTCAGGTG GTGTGCAACT ACCGCGATGT GCGCTTCGAG TCCATCCGGC TCCCTGGCTG
	301	CCCGCGCGGC GTGAACCCCG TGGTCTCCTA CGCCGTGGCT CTCAGCTGTC AATGTGCACT
	361	CTGCCGCCGC AGCACCCTG ACTGCGGGGG TCCAAGGAC CACCCCTTGA CCTGTGATGA
	421	CCCCCGCTTC CAGGACTCCT CTTCTCAA AAA GGCCCTCCC CCCAGCCTTC CAAGCCCATC
	481	CCGACTCCCG GGGCCCTCGG ACACCCCGAT CCTCCACAA TAA AGGCTTC TCAATCCGC

Fonte: GenBank.

Figura 6 – Imagem esquemática do vetor pcDNA 3.4 TOPO. Pcmv *promoter*: promotor de citomegalovírus; TOPO™: sítio de clonagem, onde se localiza o gene das subunidades α ou β da hCG; WPRE: elemento de regulação pós-transcricional originado do vírus de hepatite WoodChuck; TKpA: região de poliadenilação; SV40 *promoter*: região promotora de vírus vacuolante símio 40; Neomycin^R: gene de resistência ao antibiótico neomicina; SV40 pA: região promotora do sítio de poliadenilação; pUC ori: sítio de origem da replicação; Ampicillin^R: gene de resistência ao antibiótico ampicilina.



Fonte: pcDNA™3.4 TOPO™ TA Cloning Kit (Catalog number: A14697)

Após a confirmação da inserção dos cDNA das subunidades de r-hCG na orientação correta, foram realizadas transformações bacterianas através do método de choque térmico utilizando a cepa DH5 α de *Escherichia coli*, as bactérias transformadas foram semeadas em meio LB (Luria Bertani) líquido.

Após o crescimento, foi realizada a extração e purificação do plasmídeo utilizando o kit *NucleoBond Xtra Midi kit transfection-grade plasmid DNA* (Macherey-Nagel, Duren, Nordrhein-Westfalen, Alemanha) para obtenção de quantidades suficientes para as transfecções. As concentrações de DNA plasmidial foram quantificadas utilizando o equipamento Nanodrop™ e a pureza foi verificada por absorvância pela razão dos valores obtidos para 260 e 280 nm.

3.2 Transfecção transiente das células ExpiCHO-S

Posteriormente, os plasmídeos contendo o cDNA α e β foram empregados para transfectar as células ExpiCHO-S provenientes do kit *ExpiCHO Expression System* (ThermoFisher Scientific) que foram cultivadas em suspensão no meio “ExpiCHO Expression Medium” (ThermoFisher Scientific) em frascos erlenmeyer com tampa de filtro HEPA (125 mL) com agitação orbital (120 rpm), em

incubadora de células com temperatura ajustada para 37 °C com atmosfera de 8% CO₂.

O processo de transfecção transiente com lipofectamina (Invitrogen) foi fundamentado na experiência do grupo com o uso de kits comerciais de transfecção transiente (SILVA *et al*, 2019); utilizando simultaneamente os dois plasmídeos pcDNA 3.4-TOPO (Invitrogen): um com a sequência da subunidade α e outro com a sequência da subunidade β da hCG.

Para a transfecção transiente foram utilizados 30 μ g de DNA plasmidial dividido entre as subunidades α e β para 30 mL de suspensão celular com 5×10^6 células por mL e 80 μ L de *ExpiFectamina* (*Thermo Fisher Scientific*). Porém, como foram testadas três diferentes proporções dos plasmídeos para saber qual seria melhor, as quantidades de DNA foram distintas em cada transfecção como demonstrado na tabela 2. Após 18 a 22 horas da transfecção, foram adicionados o *Enhancer e Feed* (*ThermoFisher Scientific*).

Tabela 2 – Representação das quantidades de plasmídeos pcDNA 3.4-TOPO hCG subunidade α e β utilizadas em cada transfecção transiente das células *ExpiCHO-S*.

Proporções das transfecções				
Concentração de DNA :	Proporção		Porcentagem	Volume
	1 α : 1 β	α	41 %	2,3 μ l
		β	59 %	5,9 μ l
α - 5.400 ng/ μ l	1 α : 2 β	α	26 %	1,4 μ l
		β	74 %	7,4 μ l
β - 3.000 ng/ μ l	2 α : 1 β	α	58,5 %	3,2 μ l
		β	41,5 %	4,1 μ l

Fonte: Autora da dissertação.

Durante o período de produção, as células foram analisadas diariamente, por 4 a 10 dias. A viabilidade e a concentração celular foram determinadas utilizando 20 μ L de meio condicionado com as células, corando com o azul de Tripán (diluição na proporção 1:2) e analisadas em uma câmara de Neubauer. Alíquotas de 1 mL de meio condicionado foram separadas diariamente, centrifugadas a 1200 rpm por 10 min, para retirar as células, e armazenadas a -80 °C, para posterior análise em SDS-PAGE, Western blotting, RP-HPLC e HPSEC.

3.3 Análise por gel SDS-PAGE

Foram realizadas análises do meio condicionado e das frações resultantes das etapas de purificação da hCG mediante eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condição não-reduzida. O método utilizado foi por eletroforese vertical, com um marcador de massa molecular de 12-225 kDa, e como referência de hCG foi utilizado o Ovidrel® hCG produzido pelo Laboratório Serono (Estados Unidos da América), aplicando-se uma corrente com intensidade de 35 mA. Após a corrida de aproximadamente uma hora com o tampão Tris-Glicina 1x, o gel foi retirado do aparato e fixado com solução metanol 40% e ácido acético 10%, por uma hora, sob agitação.

Após a fixação, a coloração do gel foi realizada com a imersão em solução composta por azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) em seguida foi realizada uma descoloração em solução de ácido acético 10%, overnight, sob agitação, e o registro do gel foi realizado em fotodocumentador (Alliance Q9 Advanced - UVITEC).

3.4 Análise por *Western Blotting* (WB)

Para a execução do WB as amostras submetidas ao gel de SDS-PAGE, foram transferidas de forma semi-seca utilizando o equipamento de transferência (Hoefer™ – TE70) e membrana de Nitrocelulose (*Thermo Fisher Scientific* - porosidade de 0,45 µm), posteriormente foi realizado o bloqueio da membrana em solução composta por 5% de leite (Itambé® - Desnatado Instantâneo) em PBS, sob agitação, por 10 minutos. Após o bloqueio para redução das ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em anticorpo primário anti-hCG policlonal de coelho (*Thermo Fisher Scientific* - Abcam, ab54410) diluído na solução de bloqueio com a diluição de 1:20.000 (1 µL/20 mL), overnight, sob agitação, em temperatura ambiente.

Depois de remover o anticorpo primário a membrana foi lavada em solução de PBS com 5% de leite e incubada com anticorpo secundário, anti-IgG de coelho policlonal, produzido em cabra, conjugado com HRP (*Signalway Antibody LLC*), na diluído de 1:5.000 (10 µL/50 mL), sob agitação, a temperatura ambiente, por 1 hora. A revelação foi realizada utilizando-se substrato de detecção de HRP

(Pierce™ ECL Western Blotting Substrate - Thermo Fisher Scientific) e fotodocumentador (Alliance Q9 Advanced - UVITEC).

3.5 Cromatografia líquida de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC)

Foi utilizado o sistema de HPLC da marca Shimadzu Modelo SCL-10 A, acoplado a um detector de UV SPD-10 AV (Shimadzu, MD, USA), usando o software *LC Solutions*. Como fase estacionária foi utilizada a coluna C4 Grace Vydac 214 TP 54 (5µm, 25 cm x 10 mm D.I.) e uma pré-coluna C4 Grace Vydac 214 FSK 54 (5µm, 1 cm x 10 mm D.I.) colocada entre o injetor de amostra e a coluna principal. Além disso, para a proteção da coluna principal, uma coluna de sílica empacotada com LiChrosorb Si-60, 7,9-12,4 µm (Merck, Darmstadt, Germany) foi instalada entre a bomba e o injetor.

A fase móvel foi composta por um tampão A: fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 e tampão B: acetonitrila, o modo de eluição empregado foi um gradiente linear de 15 a 60 % de B durante 40 minutos, seguido por um método isocrático com 60 % de B durante 10 minutos, conseqüentemente, o tempo total de corrida foi de aproximadamente 50 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL/min, com leitura do detector de luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 220 nm. A temperatura da coluna foi mantida a 25 °C e o volume da amostra aplicada entre 25 e 200 µL (ALMEIDA et al., 2010).

A análise e quantificação das amostras foi obtida através da área do pico correspondente ao r-hCG, comparada à área obtida pela amostra de hCG referência: r-hCG Ovidrel™ e uhCG CG5 (Lote: SLBT1002 - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

3.6 Cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular (HPSEC)

Para análise por exclusão molecular foi utilizada uma coluna de aço inoxidável TSK G2000 SW (60 cm x 7,5 mm D.I.), com tamanho das partículas de 10 µm e tamanho dos poros de 125 Å (TosoHaas, Montgomeryville, PA, USA) acoplada a uma pré-coluna TSK SW (7,5 cm x 7,5 mm D.I.). A fase móvel foi constituída de bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,0 ajustado com ácido fosfórico 2% e a corrida foi realizada de forma isocrática. O fluxo da fase móvel foi

de 1,0 mL/min e a leitura no detector de luz ultravioleta (UV) com o comprimento de onda de 220 nm.

Assim como na RP-HPLC, a análise e quantificação das amostras também foi obtida através da área do pico correspondente ao r-hCG, comparado à área obtida pela amostra de hCG referência: r-hCG Ovidrel™ e uhCG CG5 (Lote: SLBT1002 - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

3.7 Purificação da r-hCG

Para a purificação da r-hCG secretada pelas células *ExpiCHO-S* no meio condicionado, foram estudadas duas estratégias distintas de cromatografia preparativa, são elas: afinidade e troca iônica.

3.7.1 Purificação por cromatografia de afinidade.

Para esta condição foi utilizado um cromatógrafo Äkta Explorer (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia), com bomba de injeção de amostras P-960 e coletor Frac-950. A coluna utilizada foi a “Poros Capture Select hCG™” (Thermo Fisher® Scientific - 4,6 mm x 50 mm , volume 0,8 mL), que possui fragmentos de anticorpos monoclonais anti-hCG recombinantes, produzidos em *Saccharomyces cerevisiae*. Estes anticorpos ligam-se à subunidade α da hCG, podendo reconhecer subunidades α livres e outras glicoproteínas que apresentam subunidade α (FERNANDES, 2022).

A fase móvel utilizada para ambientar a coluna foi tampão Tris 0,1M pH 7,0 com 10mM de NaCl, em um fluxo de 1 mL/min e a proteína foi eluída com um *step* de 100% de Glicina 0,1M pH 3,0 em um fluxo de 0,5 mL/min. Antes de entrar na coluna a amostra foi concentrada no sistema Amicon® Ultra – 15 *Centrifugal Filters Ultracel® 3K* (Merck, Tullagreen, CO, Irlanda), por centrifugação em temperatura ambiente a 4000 g por 120 minutos. O monitoramento das frações eluídas foi feito por detector UV a 215 nm e 280nm. As amostras de 1 mL coletadas pelo coletor de frações tiveram seu pH corrigido para 7,0 com NaOH 0,1 M e foram armazenadas a -80 °C para análise e quantificação por SDS-PAGE, WB e RP-HPLC.

3.7.2 Purificação por cromatografia de troca iônica

Para esta estratégia foi utilizado um cromatógrafo Äkta Purifier (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia), com bomba de injeção de amostras P-960 e coletor Frac-920. A coluna com 12,5 cm e volume máximo de 25 mL utilizada foi empacotada com a resina *Q Sepharose Fast Flow* (QFF). Um ligante carregado negativamente foi aplicado na matriz da coluna, a proteína no caso a hCG carregada positivamente, devido ao pH da solução ser abaixo do ponto isoelétrico, se liga aos trocadores de cátions (JUNGBAUER; HAHN, 2009).

Como fase móvel foi utilizou-se o tampão A: fosfato de sódio 0,05M pH 5,0 e um gradiente de tampão B: fosfato de sódio 0,05M pH 5,0 com adição de 1M de NaCl. Antes de entrar na coluna a amostra foi dialisada em membrana (SnakeSkin, poro de 3,5 kDa, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) utilizando o tampão A, com a realização de três trocas, *overnight*, sob agitação na geladeira (4 °C).

Com as frações coletadas (5 mL) contendo a r-hCG resultantes da QFF, foi feito um pool que foi concentrado no sistema Amicon[®] Ultra – 15 *Centrifugal Filters Ultracel[®] 3K* (Merck, Tullagreen, CO, Irlanda), por centrifugação em temperatura ambiente a 4000 g; por 120 minutos. Também foram separadas alíquotas para análise por SDS-PAGE e WB.

3.7.2.1 Purificação por cromatografia de exclusão molecular

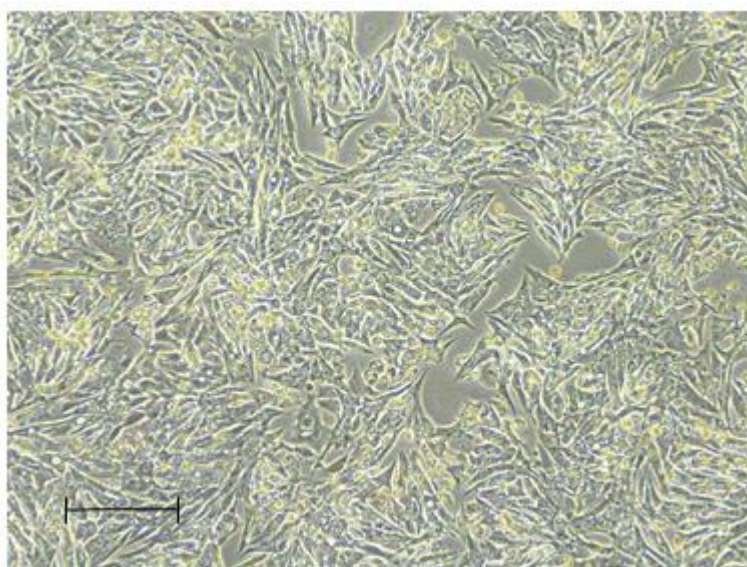
Após a primeira etapa de purificação por troca iônica, foi realizada uma segunda etapa por exclusão molecular com as frações coletadas e concentradas da QFF, utilizou-se também o cromatógrafo Äkta Purifier (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) e a coluna *Sephacryl S-100 16/100* (volume máximo de 200 mL), na qual a proteína é separada de acordo com a sua massa molecular. Como fase móvel foi utilizado o tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,0 em uma corrida isocrática. Frações de 2 mL contendo a r-hCG foram coletadas, para posterior análise por WB, HPSEC e avaliação da atividade biológica.

3.8 Teste de atividade biológica *in vitro* com células de Leydig

A atividade biológica *in vitro* da r-hCG foi avaliada com células intersticiais de testículo de camundongo (células de Leydig). O teste utiliza a linhagem celular

mLTC-1 (ATCC® CRL-2065™, Manassas, VA, EUA) tumorigênica, representada na figura 7, que expressam receptores CGLHR e em resposta a presença e ligação de hCG ou hLH. Esta linhagem foi estabelecida e caracterizada por Rebois (1982). Estas células foram mantidas em cultura utilizando o meio de crescimento RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina) e 0,01% de antifúngico (2,5 µg/mL de anfotericina B).

Figura 7 – Foto representativa das células mLTC-1. Células mantidas em cultura de monocamada, imagem ampliada 40x.



Fonte: Autora da dissertação.

3.8.1 Ensaio de Viabilidade celular

O teste para resposta ao r-hCG e material referência Ovidrel® - 250 µg / 0,5 mL (Merck Serono S.p.A, Bari, Itália), foi adaptado de Park *et al* (2013), que demonstrou que a exposição prolongada a uma dose elevada de hCG induziu a morte das células mLTC-1, via apoptose.

Para o ensaio, células foram distribuídas em uma placa de 96 poços com uma concentração de células de 3×10^3 células/poço em um volume final de 100 µL do mesmo meio utilizado para o crescimento. Após 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂ para a adesão das células na placa, foram adicionadas diferentes concentrações das amostras de r-hCG e do material de referência, e depois de 24 horas em incubação, a leitura do ensaio com MTS/PMS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio / Metilsulfato de fenazina) foi

realizada utilizando um leitor de microplacas (Dynat-ech, modelo MR4000, Chantilly, VA, EUA) com absorvância de 490 nm.

3.8.2 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo

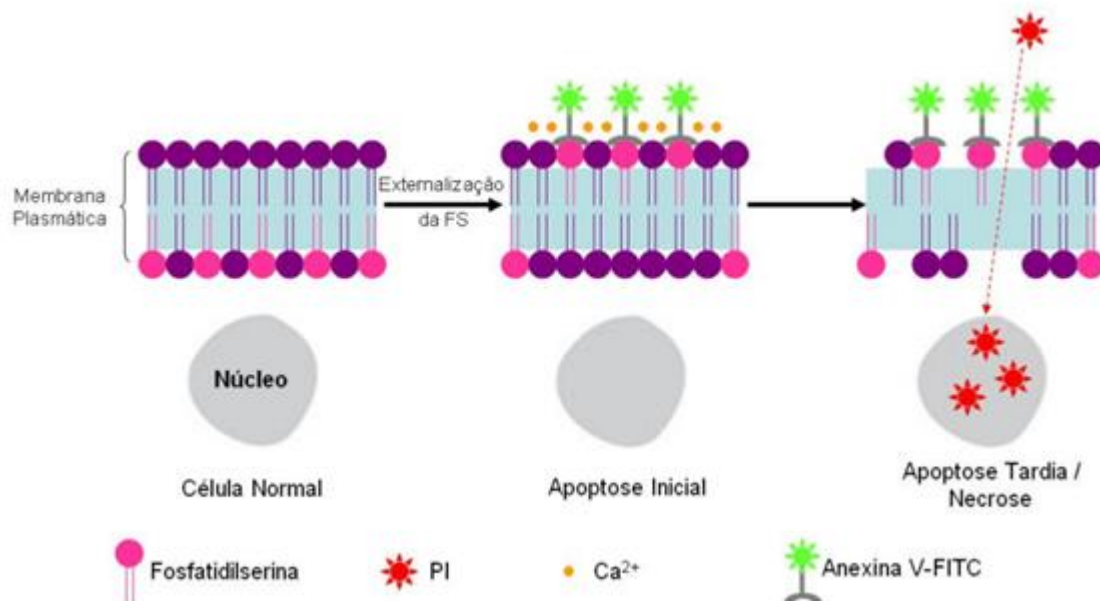
Para confirmar a ocorrência do processo de apoptose nas células mLTC-1 após a incubação com hCG, foi realizado um teste utilizando o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus e o Kit *Dead Cell Apoptosis Kits with Annexin V for Flow Cytometry* (Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific) para avaliar a viabilidade e apoptose das células. O kit consiste em anexina V, uma proteína conjugada com fluoresceína (FITC), e iodeto de propídeo (PI) um corante intracitoplasmático.

O princípio do ensaio é a ligação eficaz da anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina presentes na camada interna da membrana plasmática, porém, durante o processo de morte celular programada (apoptose), esses resíduos são rapidamente translocados para a camada externa da membrana, permitindo a ligação da anexina V.

O PI é utilizado para diferenciar as células viáveis das não viáveis, onde as células viáveis, com membranas intactas, são impermeáveis ao corante, enquanto as células danificadas ou mortas apresentam membranas permeáveis, como demonstrado na figura 8. A combinação entre a anexina V e o PI é utilizada para identificar células em diferentes estágios de apoptose (VAN ENGELAND *et al.*, 1996). Desse modo, o ensaio possibilita a determinação de:

- Células vivas (anexina V- / PI -),
- Células em estágios iniciais de apoptose (anexina V+ / PI -),
- Células em estágios tardios de apoptose (anexina V+ / PI+),
- Células em necrose (anexina V-/P+).

Figura 8 - Representação da ligação de anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina e do iodeto de propídeo (PI) intracitoplasmático.



Fonte: CAMPAGNARO, 2012.

3.9 Ensaio imunoenzimático (ELISA).

Para quantificar a concentração de proteína recombinante nas amostras contendo r-hCG foi utilizado o Kit de ELISA (*Human hCG intact* ELISA kit RAB0092 Sigma-Aldrich®). Segundo o fabricante o Kit determina a quantidade de hCG intacto, que pode estar presente em plasma, urina, lisados de tecidos ou células e sobrenadantes de cultivo.

A determinação de proteína seguiu as instruções fornecidas no produto, que utiliza o princípio de detecção por reação de biotina e HRP estreptavidina, com leitura em 450 nm. O ensaio foi realizado em duplicatas, e a curva de hCG padrão foi obtida com o software de análise online (myassays.com) que utiliza o modelo 4PL para ajuste de curva.

3.10 Análise da hCG por espectrometria de massas.

Para identificação da relação massa/carga (m/z) dos glicanos presentes na hCG, amostras de r-hCG comercial Ovidrel produzido nas células CHO foi enviada para o Laboratório de Espectrometria de Massas do Centro de Facilidade em Pesquisa – CEFAP, localizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; onde as amostras foram submetidas a análise por MALDI-TOF/TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight*

Mass Spectrometry) utilizando o equipamento MALDI-TOF/TOF AutoFlex Bruker Daltonics.

Antes da análise as amostras foram dessalinizadas em água destilada utilizando o sistema Amicon, posteriormente a amostra foi reduzida com DTT (Ditiotreitol) e alquilada com IAA (Iodoacetamida), portanto, na avaliação das massas devemos considerar a carbamidometilação nas cisteínas (+57 Da). Também foi realizada a aquisição de espectro de massas do material referência (Ovidrel), sem realizar a redução e alquilação da amostra. Para retirada dos glicanos N-ligados parte da amostra foi tratada com a enzima PNGase F, estas amostras foram analisadas antes e após a deglicosilação com PNGase F.

Foram realizadas aquisições utilizando as matrizes de SA (ácido sinapínico), DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) com a concentração de 10 mg/mL em meio de acetonitrila e 50 % de água acidificada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). Os parâmetros utilizados foram: modo linear positivo com defletor desligado e faixa de massa de aquisição (m/z) de 1000-45.000 Da, o número de pulsos do laser foi de 500 e a frequência do laser de 500Hz.

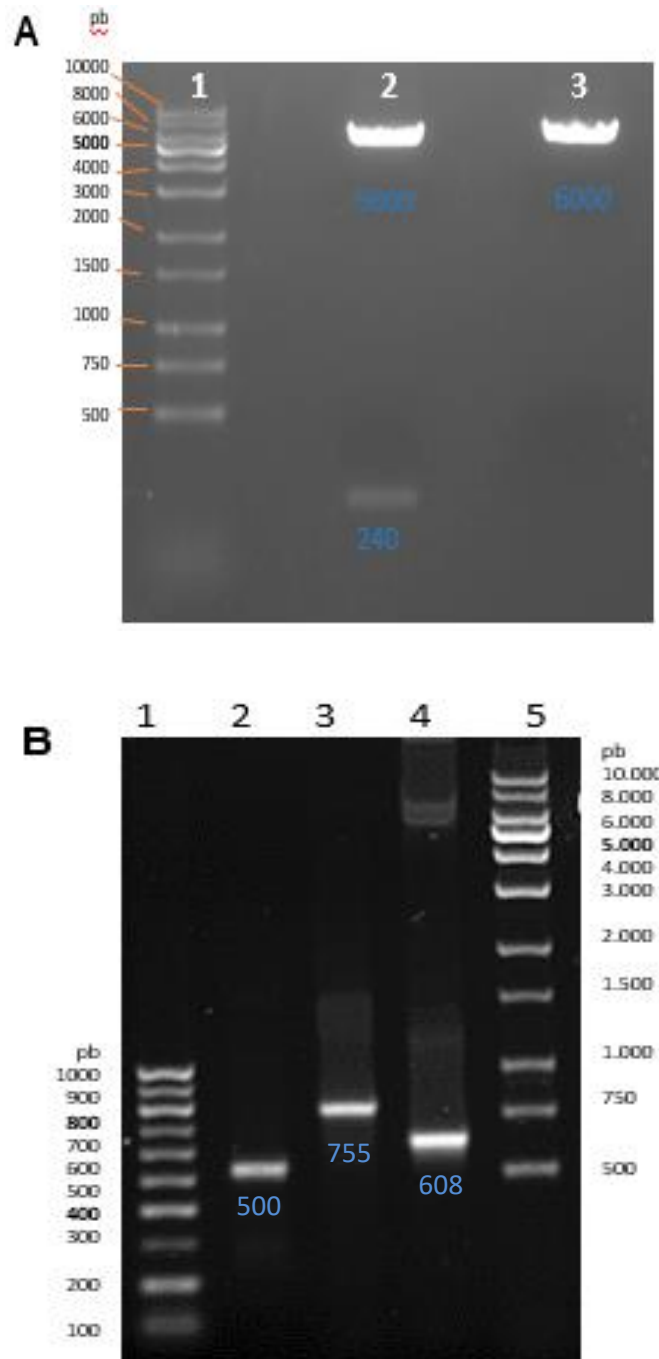
4 RESULTADOS

4.1. Confirmação dos plasmídeos α e β

Os plasmídeos pcDNA 3.4 TOPO hCG α e hCG β após a digestão com enzima de restrição XbaI resultaram em fragmentos com tamanho esperado. O plasmídeo referente à subunidade α produziu um fragmento de 5600 pb e outro de 240 pb, enquanto o da subunidade β produziu um único fragmento de 6000 pb, visualizados no gel de agarose 1%, representado na figura 9A.

Para a confirmação por PCR convencional, com os primers *forward* e *reverse* do Kit comercial pcDNA 3.4 TOPO, conforme esperado o plasmídeo da subunidade α produziu um fragmento de 608 pb e o da subunidade β um fragmento de 755 pb, observados em gel de agarose 1 % (Figura 9B).

Figura 9 – Análise da digestão dos plasmídeos pcDNA 3.4 TOPO com as subunidades α e β de hCG em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A – Referente à digestão com a enzima XbaI: 1) Ladder 1kb; 2) Subunidade α de hCG; 3) Subunidade β de hCG. B – Referente ao PCR: 1) Ladder 100 pb; 2) Controle do kit 500 pb; 3) hCG subunidade β 755 pb; 4) hCG subunidade α 608 pb; 5) Ladder 1 kb.



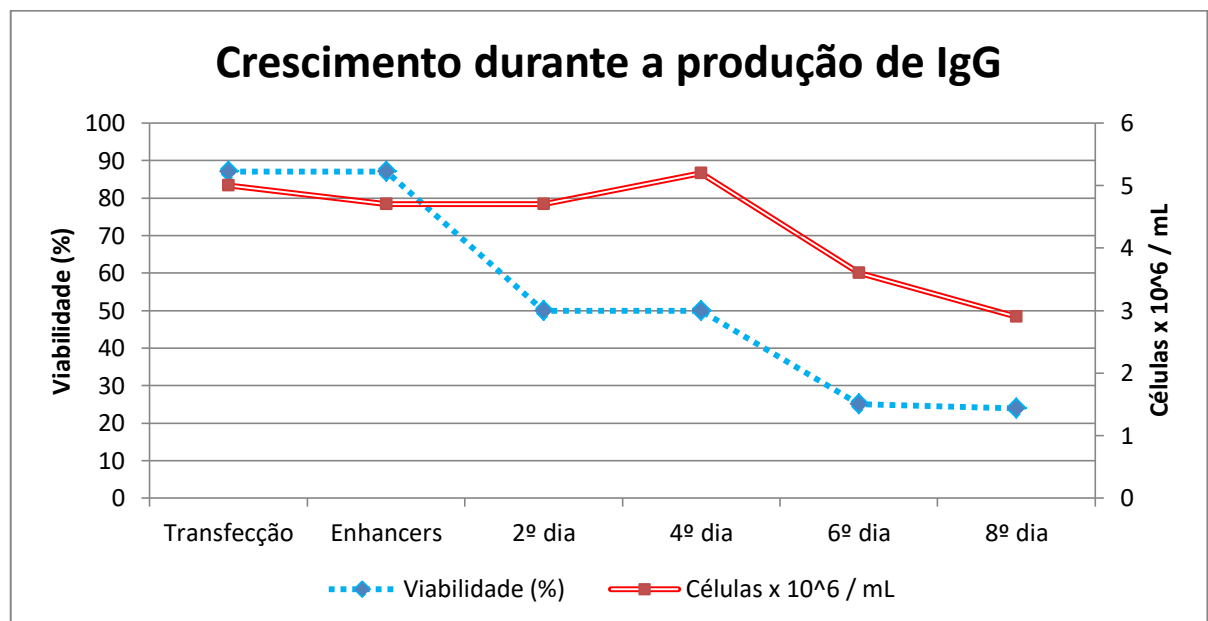
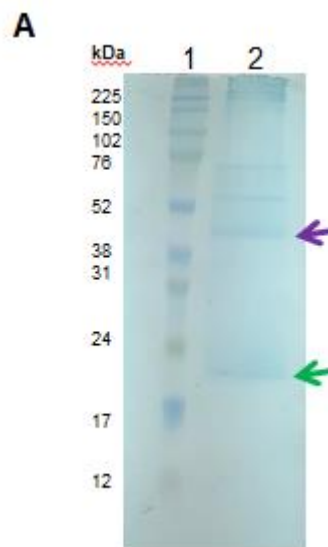
Fonte: Autora da dissertação.

4.2. Produção por transfecção transiente nas células *ExpiCHO-S*

Após a confirmação dos plasmídeos foi realizado primeiramente um teste, para verificar e validar o processo de produção com o kit *ExpiCHO Expression*

System, utilizando o controle positivo fornecido pelo fabricante, composto por um plasmídeo pcDNA 3.4 que expressa as cadeias pesadas e leves de IgG de coelho. A cadeia leve apresentou em torno de 22 kDa e a cadeia pesada em torno de 50 kDa, como observado na figura 10A. Durante o processo de produção do IgG a viabilidade e densidade celular foram monitoradas diariamente, até o 8º dia de produção (figura 10B).

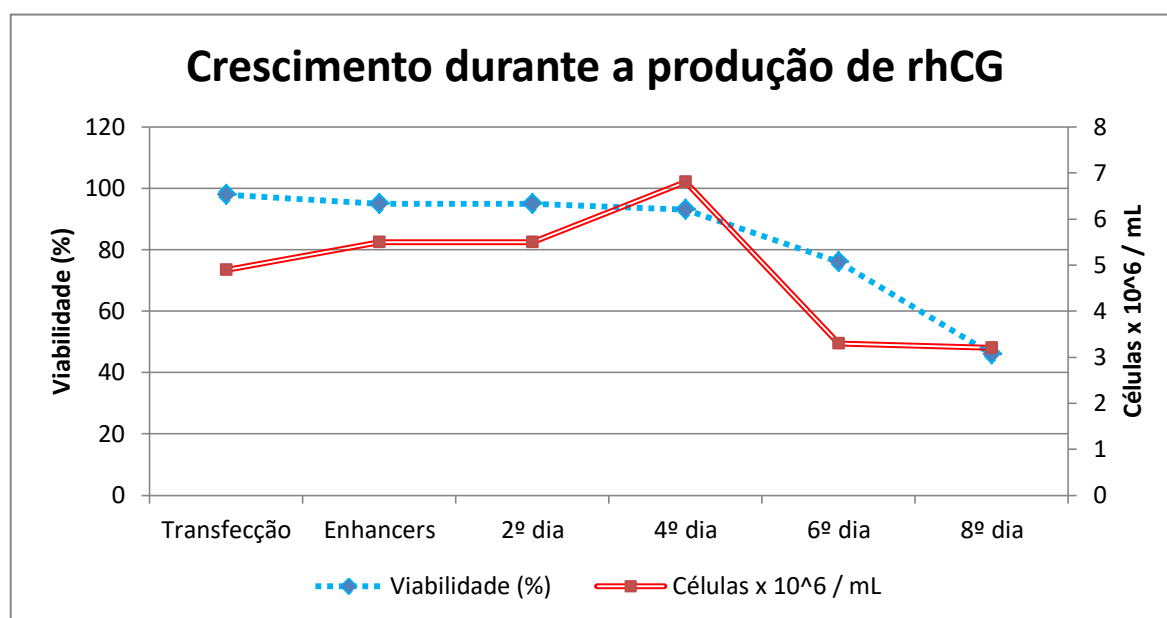
Figura 10 - SDS-PAGE e gráfico com amostras de meio condicionado do controle positivo contendo IgG de coelho produzido durante 8 dias nas células *ExpiCHO-S*. A - SDS-PAGE da produção de IgG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Meio condicionado contendo IgG de coelho; seta verde indica a cadeia leve e seta roxa indica a cadeia pesada. B - Gráfico apresentando a relação entre a viabilidade e concentração celular, nos dias de produção do controle positivo (IgG).



Fonte: Autora da dissertação.

Confirmada a produção utilizando o kit *ExpiCHO Expression System* através do controle positivo; foi realizada a expressão de r-hCG nas mesmas condições, com o monitoramento da viabilidade e densidade celular diariamente (figura 11), onde pode-se notar que tanto a viabilidade quanto a concentração celular foram diminuindo no decorrer dos dias de produção, assim como observado na produção do controle positivo (figura 10), possivelmente devido ao estresse celular e diversos outros fatores.

Figura 11 - Gráfico apresentando a viabilidade e concentração celular, durante 8 dias de produção realizada através da transfecção transiente nas células *ExpiCHO-S*.



Fonte: Autora da dissertação.

Para certificar de forma prática e rápida que as células estavam de fato produzindo o rhCG foram utilizadas fitas de teste de gravidez Needs[®] (Guangzhou Wondfo Biotech Co, Guangzhou, China). Estas fitas são utilizadas para verificar a presença de hCG na urina de mulheres com suspeita de gravidez: quando positivos indicam dois traços no teste e quando negativos indicam somente um traço. Ao imergir a fita do teste no meio condicionado coletado do cultivo celular, a mesma apresentou dois traços, indicando que havia r-hCG (figura 12).

Figura 12 – Testes de gravidez utilizados para detectar a presença de r-hCG no meio condicionado das três produções; onde as setas azuis indicam o traço referente ao resultado positivo para hCG. A) Produção 1 α :1 β ; B) Produção 2 α :1 β e C) Produção 1 α :2 β .



Fonte: Autora da dissertação.

Com as amostras das três produções de diferentes proporções de subunidades foram realizados SDS-PAGE, mas como a quantidade de proteína estava abaixo de 1 μ g (sensibilidade do método), a visualização ficou comprometida com *Coomassie Brilliant Blue*. Entretanto, com o *Western Blotting* utilizando o anticorpo primário anti-hCG (*Thermo Fisher Scientific - Abcam*, ab54410) foi possível confirmar a presença de hCG. Para a realização WB foram utilizados 10 μ L de amostras dos dias de produção, e 2,5 μ g/ 1 μ L de Ovidrel na produção 1:1, 5 μ g/ 2 μ L de Ovidrel na produção 2:1 e aproximadamente 10 μ g/ 10 μ L de u-hCG na produção 1:2 (Figura 13).

Figura 13 – Western Blotting das três produções de rhCG em células *Exp1CHO-S*. A – Produção 1:1: 1) Padrão r-hCG (Ovidrel - CHO); 2) Padrão u-hCG (Sigma Aldrich - CG5); 3) Dia 4 ; 4) Dia 5; 5) Dia 6 ; 6) Dia 7; 7) Dia 8. B - Produção 2:1: 1) Padrão r-hCG (Ovidrel - CHO); 2) Padrão u-hCG (Sigma Aldrich - CG5); 3) Dia 4; 4) Dia 5; 5) Dia 6; 6) Dia 7; 7) Dia 8. C - Produção 1:2: 1) Padrão u-hCG (Sigma Aldrich - CG5); 2) Dia 4; 3) Dia 5; 4) Dia 6; 6) Dia 7; 6) Dia 8.



Fonte: Autora da dissertação.

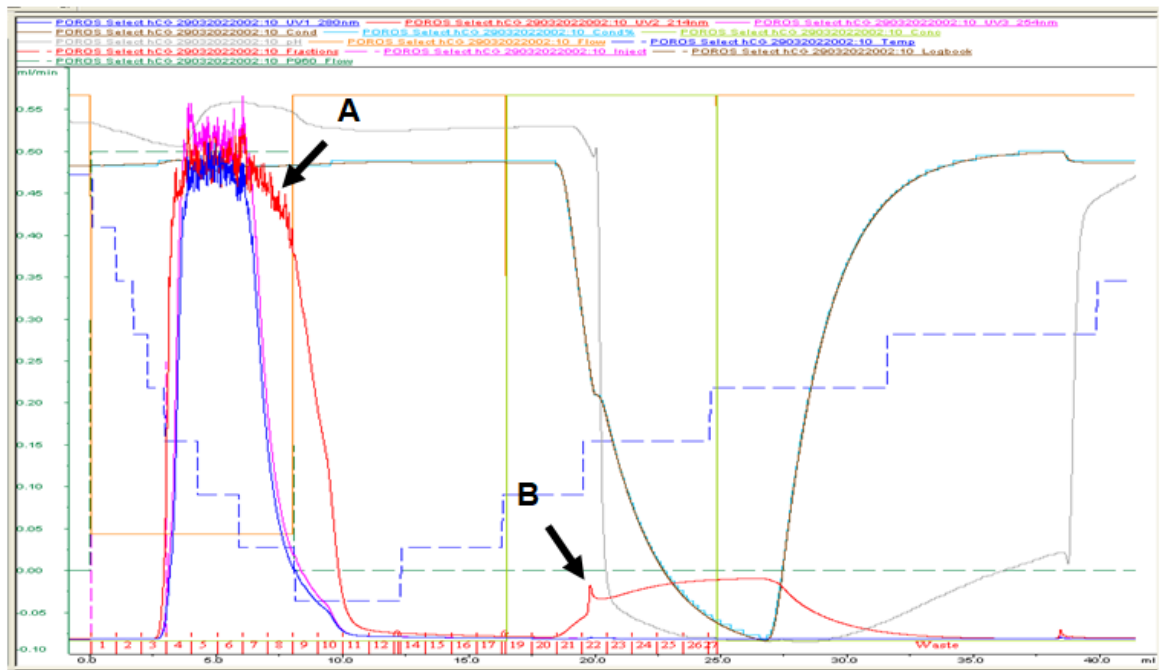
Visto que, a produção na proporção 1 α :1 β apresentou um melhor resultado, com uma maior quantidade de proteína reconhecida pelo anticorpo anti-hCG no *Western blotting* no 8 $^{\circ}$ dia (figura 13A), essa condição de produção foi escolhida para seguir com a purificação, e todas as produções a partir deste resultado foram realizadas com a proporção 1:1 de α e β .

4.3. Purificação por afinidade

Para a purificação da hCG a partir do meio condicionado coletado no oitavo dia, antes de entrar na coluna, os 30 mL de meio condicionado foram concentrados 10x por centrifugação utilizando colunas Amicon ® Ultra – 15 Centrifugal Filters Ultracel ® 10K, à 20 °C, 4000g, durante aproximadamente 30 min. O volume de 3 mL de meio concentrado foi posteriormente filtrado (filtro de 0,45 µm) e aplicado na coluna.

Durante a corrida cromatográfica, os comprimentos de onda de 214 nm e 280 nm (melhor para leitura de proteínas) foram monitorados. Comparando-se a corrida do meio condicionado com a do padrão comercial Ovidrel ®, o pico referente ao rhCG foi eluído e coletado na fração #22, como demonstrado na figura 14.

Figura 14 – Cromatograma da purificação de hCG em coluna cromatográfica de afinidade POROS™ CaptureSelect™ hCG Affinity. A) Pico da fração não ligada a coluna, B) Pico referente ao rhCG eluído em 100% de Glicina 0,1 M pH 3,0 e leitura no UV de 214 nm,

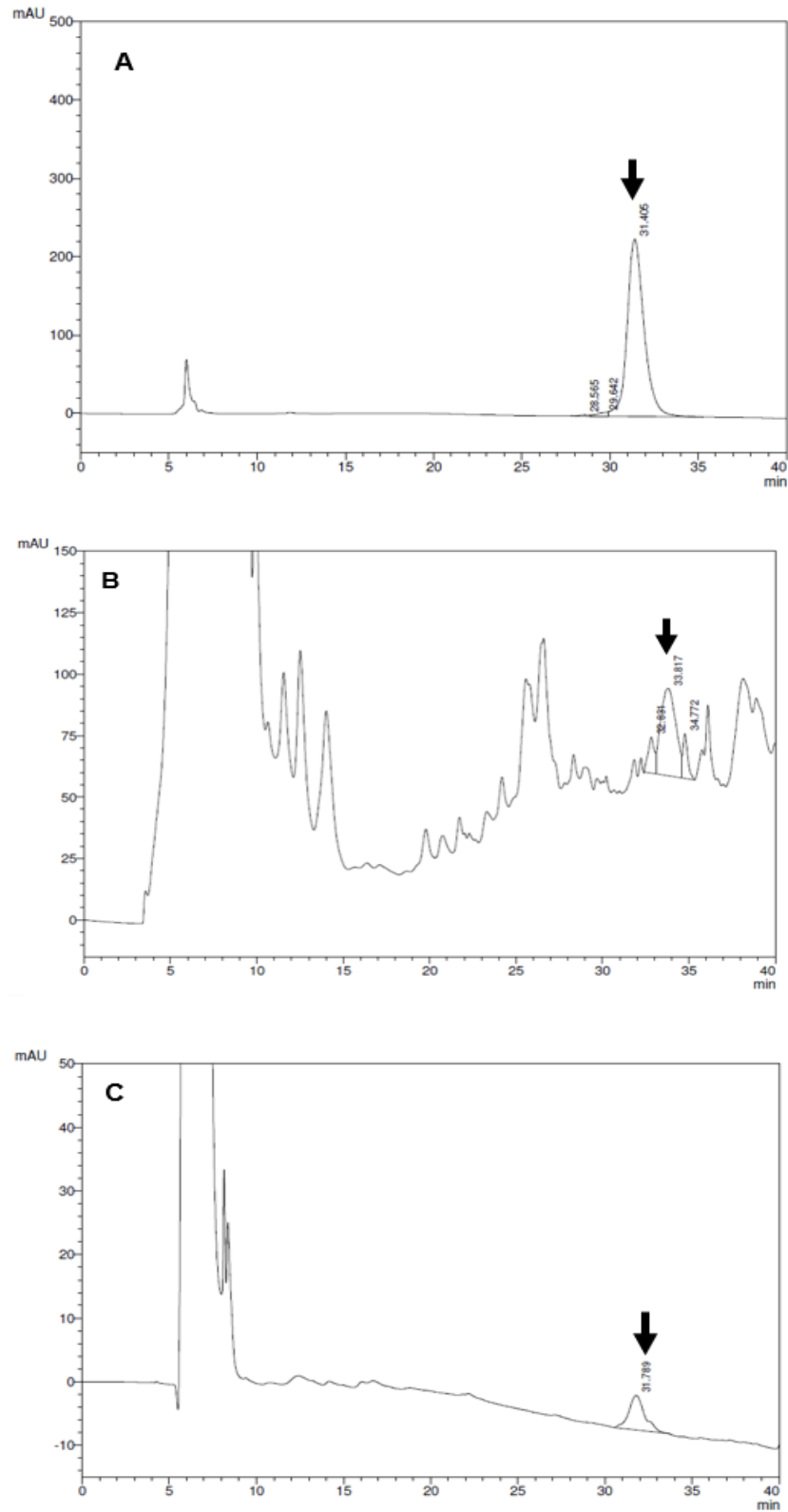


Fonte: Autora da dissertação.

4.4. Análise por RP-HPLC

Após a etapa de purificação, análises por RP-HPLC foram realizadas comparando o Hcg referência do Ovidrel® ao do meio condicionado coletado no oitavo dia, e com a fração #22, referente ao rhCG purificado pela coluna de afinidade. Para análise do padrão foram aplicados 20 µl que corresponde a 10 µg de hCG e o tempo de retenção (TR) foi de 31,40 min; com relação ao meio condicionado foi aplicado 200 µl e o TR do pico correspondente ao r-hCG foi de 33,81 min; já para a fração #22 da purificação foram aplicados 500 µl e o TR obtido foi de 31,78 min (figura 15). Calculando-se através da área do pico comparada com a área do Ovidrel (figura 15A), foi possível obter aproximadamente 0,45 µg/mL de r-hCG ao final da purificação por afinidade (figura 15C).

Figura 15 - Perfil cromatográfico da análise por RP-HPLC; em que as setas indicam o pico referente ao rhCG. A) Cromatograma do Padrão Ovidrel[®]. B) Cromatograma do Meio Condicionado. C) Cromatograma da fração #22 do rhCG purificado pela coluna de afinidade.



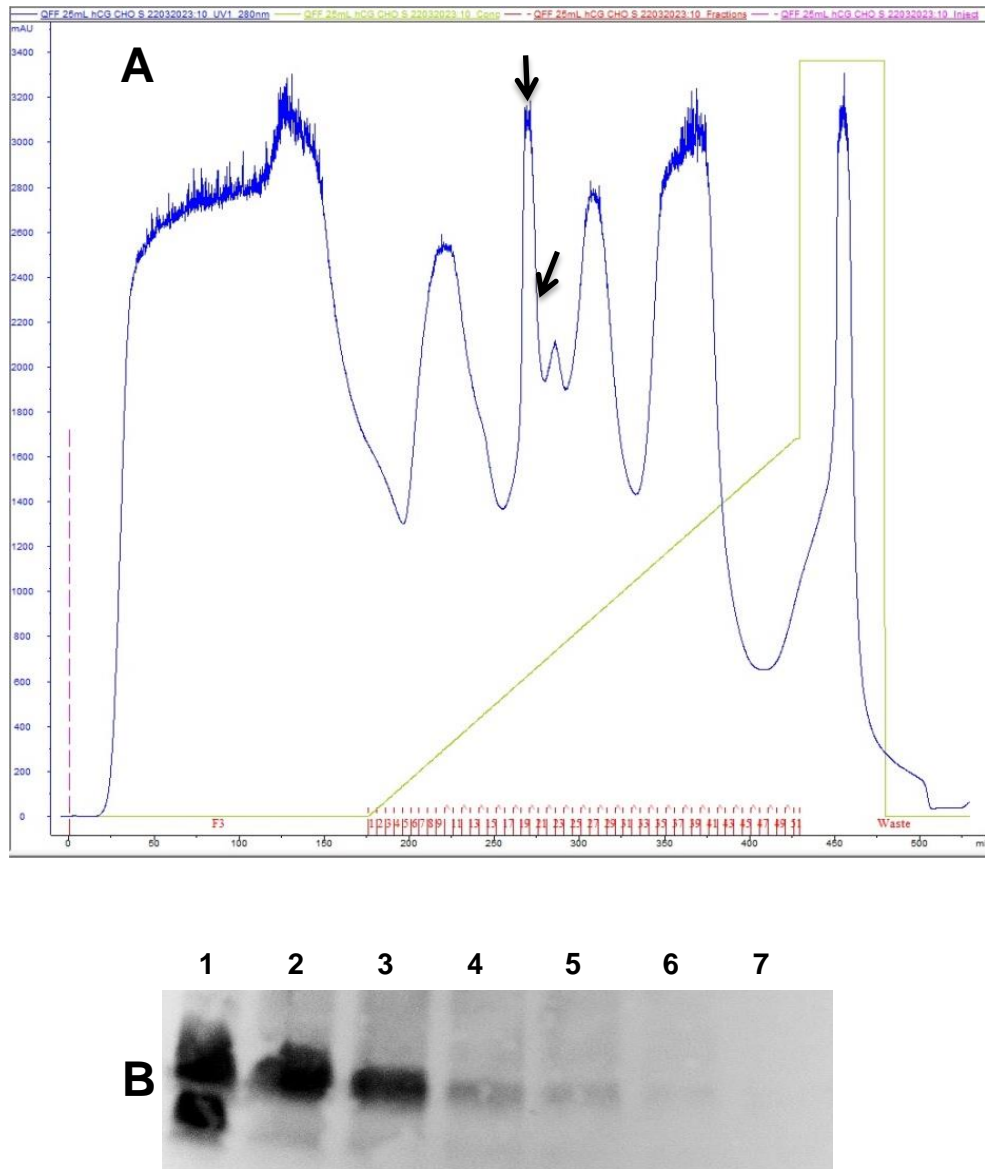
Fonte: Autora da dissertação.

4.5. Purificação por troca aniônica

Devido à quantidade de proteína obtida ao final da purificação por afinidade ter sido muito baixa, ou seja, houve grandes perdas de proteína, outra metodologia foi estudada para purificação. A cromatografia por troca aniônica, visto que o potencial isoelétrico (pI) da hCG é de caráter mais ácido, com pI variando de 3,2 a 3,5 de acordo com a quantidade e qualidade das glicosilações presentes (COLE, 2012), esta técnica de purificação pareceu ser mais apropriada.

Portanto, foram dialisadas 4 produções de rhCG, cerca de 120 mL, antes de entrar na coluna QFF de troca aniônica, onde foi possível observar diversos picos no cromatograma (Figura 16A), então para identificar qual dos picos se referia ao rhCG, foi realizada a análise por WB (Figura 16B) de todos os picos eluídos na coluna, e as frações #9 e #14 foram as que apresentaram maior intensidade de rhCG reconhecido pelo anticorpo. Os picos do cromatograma referente a presença de proteína de interesse estão indicados pelas setas na Figura 16A.

Figura 16 – A) Cromatograma da purificação de hCG em coluna cromatográfica de troca aniônica *Q Sepharose Fast Flow*, em que os picos indicados pelas setas se refere ao r-hCG reconhecido no *Western Blotting*. B) *Western Blotting* referente aos picos eluidos no cromatograma; 1) Padrão Ovidrel® 7 µL/3,5 µg; 2) Fração #9 coletada da QFF; 3) Fração #14 coletada da QFF; 4) Fração #19 coletada da QFF; 5) Fração #22 coletada da QFF; 6) Fração #27 coletada da QFF; 7) Fração #38 coletada da QFF. Volume aplicado de amostra 20 µL.



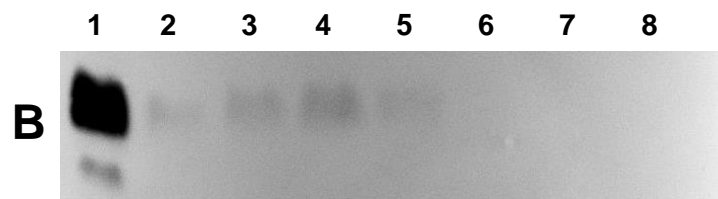
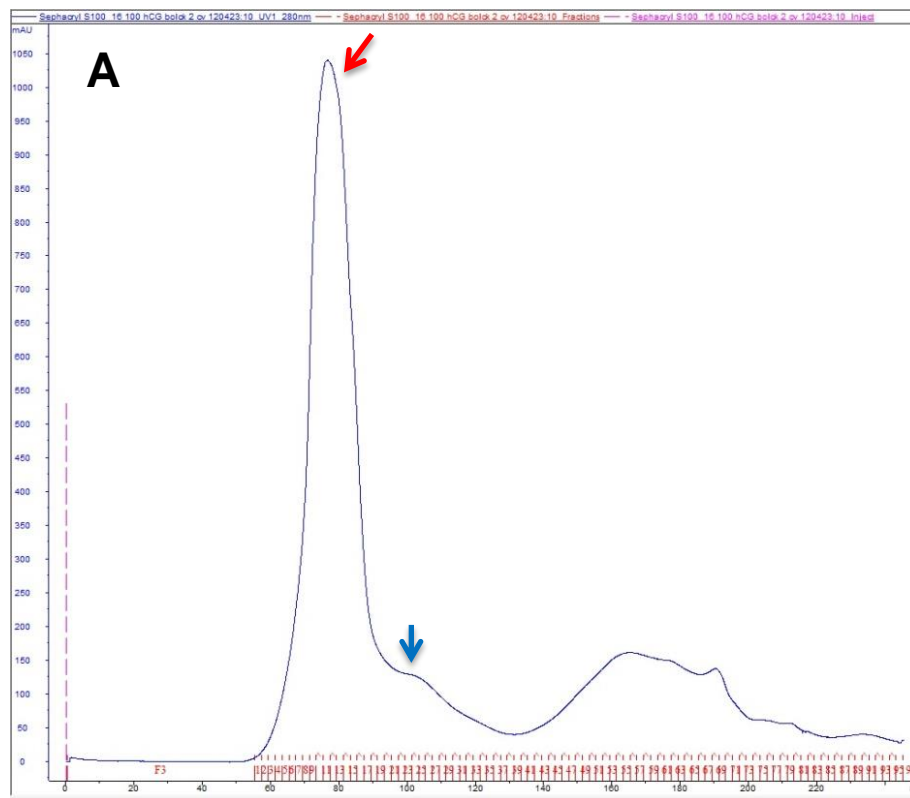
Fonte: Autora da dissertação.

4.6. Purificação por exclusão molecular

Após a identificação que as frações #5 à #15 continham o r-hCG, foi realizado um *pool* das mesmas, totalizando 50 mL, que em seguida foram concentrados 5x por centrifugação no Sistema *Amicon*®, ficando aproximadamente 10 mL de amostra. Estes 10 mL foram aplicados na coluna de exclusão molecular *Sephacryl S100* (Figura 17A) e para identificar qual dos picos

continham r-hCG, também foi realizada a análise por WB de todos os picos eluídos na coluna. As frações do primeiro (frações #10, #11, #12, indicado pela seta vermelha na figura 17A) e segundo pico (fração #24, indicada pela seta azul na figura 17A) foram reconhecidas pelo anticorpo anti-hCG (Figura 17B).

Figura 17 – A) Cromatograma da segunda etapa de purificação de hCG em coluna cromatográfica de exclusão molecular *Sephacryl* S100, em que os picos indicados pelas setas se refere ao r-hCG reconhecido no *Western Blotting*. B) *Western Blotting* referente aos picos eluídos no cromatograma; 1) Padrão Ovidrel® 5 µL/2,5 µg; 2) Fração #10 coletada da *Sephacryl*; 3) Fração #11 coletada da *Sephacryl*; 4) Fração #12 coletada da *Sephacryl*; 5) Fração #24 coletada da *Sephacryl*; 6) Fração #55 coletada da *Sephacryl*; 7) Fração #61 coletada da *Sephacryl*; 8) Fração #68 coletada da *Sephacryl*. Volume aplicado de amostra 20 µL.

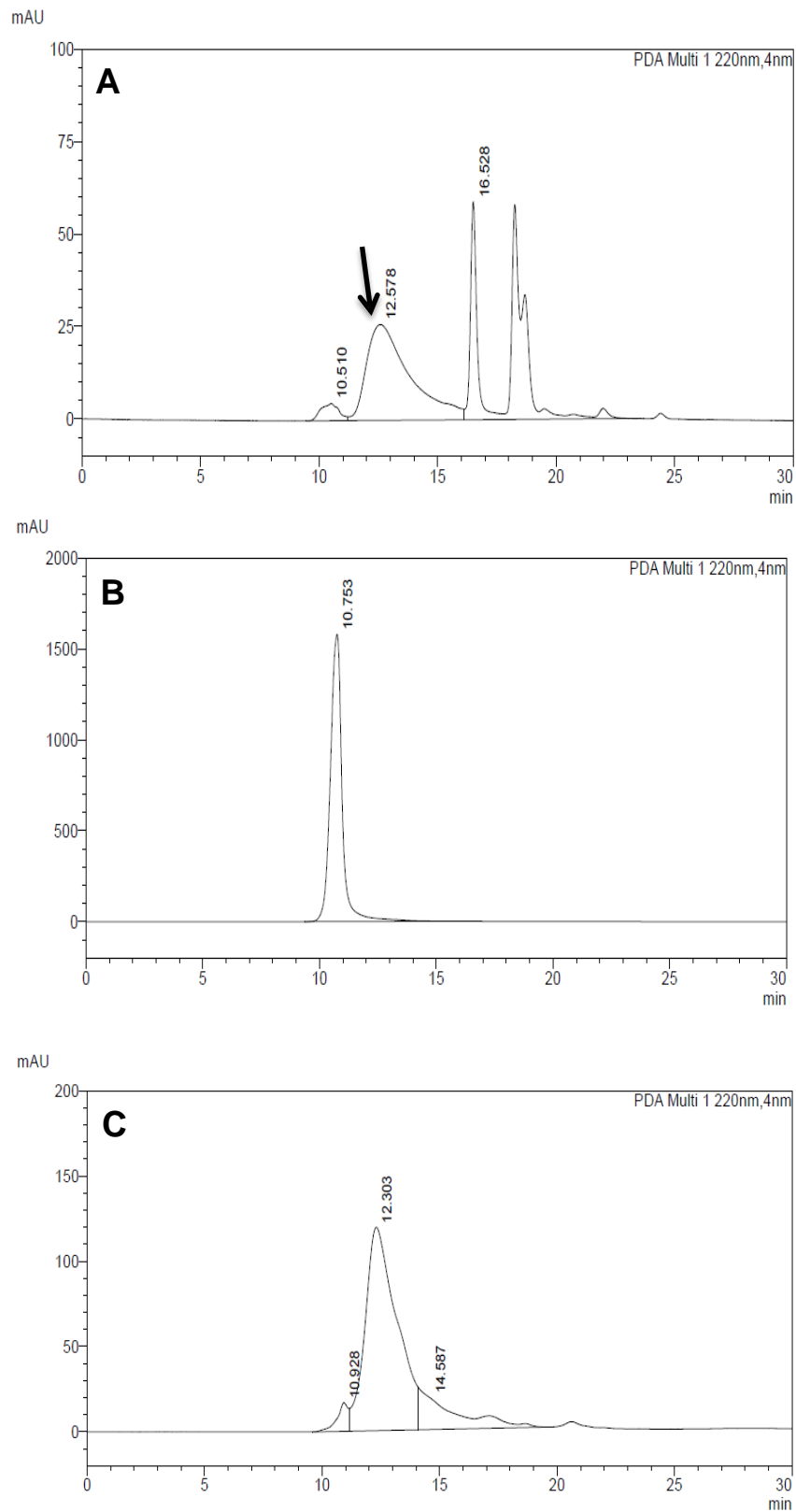


Fonte: Autora da dissertação.

4.7. Análise por HPSEC

Após a purificação por troca aniônica e exclusão molecular, foi realizada análise por HPSEC comparando o cromatograma do r-hCG Ovidrel® ao das frações #11 e #24 coletadas da *Sephacryl* e reconhecidas pelo WB. Para a análise do r-hCG referência Ovidrel foram aplicados 10 µl que corresponde a 5 µg e o tempo de retenção (TR) do pico principal foi de 12,57 min; em contrapartida da fração #11 foi aplicado 100 µl e o TR do pico foi de 10,75 min; já para a fração #24 da purificação foram aplicados 200 µl e o TR obtido foi de 12,30 min (figura 18).

Figura 18 - Perfil cromatográfico da análise por HPSEC, após a purificação por exclusão molecular na coluna *Sephacryl S100*. A) Cromatograma do Ovidrel®, em que o pico referente ao r-hCG está indicado pela seta ®; B) Cromatograma da fração #11; C) Cromatograma da fração #24.



Fonte: Autora da dissertação.

Ao analisar os cromatogramas da figura 18, foi observado que o TR do r-hCG Ovidrel® ficou muito semelhante ao da fração #24 coletada da *Sephacryl* (figura 18C), porém o TR da fração #11 (figura 18B) ficou com aproximadamente 2 minutos de diferença, indicando possivelmente a presença de um agregado, já que a mesma foi reconhecida pelo anticorpo anti-hCG no WB e também no ensaio de ELISA.

Calculando-se através da área do pico em relação à área do Ovidrel (figura 18A), foi possível obter um total de 99,5 µg de r-hCG ao final da purificação pela QFF e *Sephacryl* (figura 18C). Portanto, comparando-se o processo de purificação por afinidade e troca iônica seguida por exclusão molecular, foi observado que com a troca aniônica houve uma melhor recuperação de proteína (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação do rendimento obtido entre os processos de purificação da r-hCG utilizados.

Purificação da r-hCG	Volume inicial (mL)	Concentração inicial (µg)	Volume após purificação (mL)	Concentração após purificação (µg)	Recuperação (%)
Cromatografia de afinidade	30	1446,9*	1	0,45**	0,03
Cromatografia de troca iônica e exclusão molecular	120	2170,2*	2	99,5**	9,2

*Quantificado por ELISA; **Quantificado por HPLC.

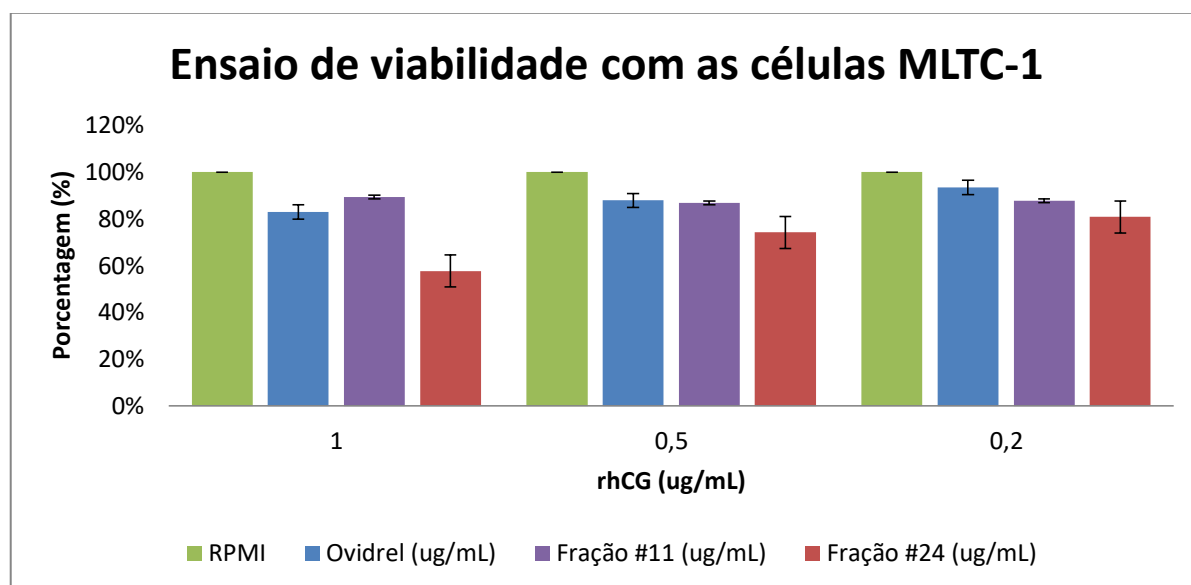
Fonte: Autora da dissertação.

4.8. Atividade biológica do r-hCG *in vitro*

A atividade biológica do r-hCG foi medida em um teste com diferentes concentrações de Ovidrel (como controle positivo para apoptose) e as frações de r-hCG coletadas da HPSEC (figura 18B e C), ou seja, frações #11 e #24, também foram medidas amostras de cultivo somente com meio RPMI (como controle negativo para apoptose). As concentrações de amostras utilizadas foram de 0,2; 0,5 e 1 µg/mL, sendo que a maior concentração utilizada de 1 µg/mL corresponde a aproximadamente 25 UI/mL (calculado de acordo com as informações fornecidas no material de referência, Ovidrel), o período de incubação das amostras foi de 24 horas.

Ao analisar o resultado obtido na figura 19, foi observado que houve uma diminuição na porcentagem das células mLTC-1 se comparado ao RPMI (controle negativo, figura 19 na cor verde), tanto na amostra de referência – Ovidrel (figura 19, na cor azul), quanto na fração #11 (figura 19, na cor roxa) produzida pelas células *ExpiCHO-S*, indicando que a fração #11 possui atividade biológica semelhante ao do Ovidrel. Com a fração #24 (figura 19, na cor vermelha), pode-se notar que independente da concentração de r-hCG utilizada a porcentagem de células foi inferior a amostra do Ovidrel, indicando possivelmente uma atividade biológica superior a apresentada na amostra referência disponível comercialmente.

Figura 19 – Avaliação da atividade biológica da r-hCG *in vitro*. Bioensaio com células mLTC-1, comparando a atividade da amostra referência (Ovidrel) com as amostras produzida nas células *ExpiCHO-S* e somente com meio RPMI (controle negativo).



Fonte: Autora da dissertação.

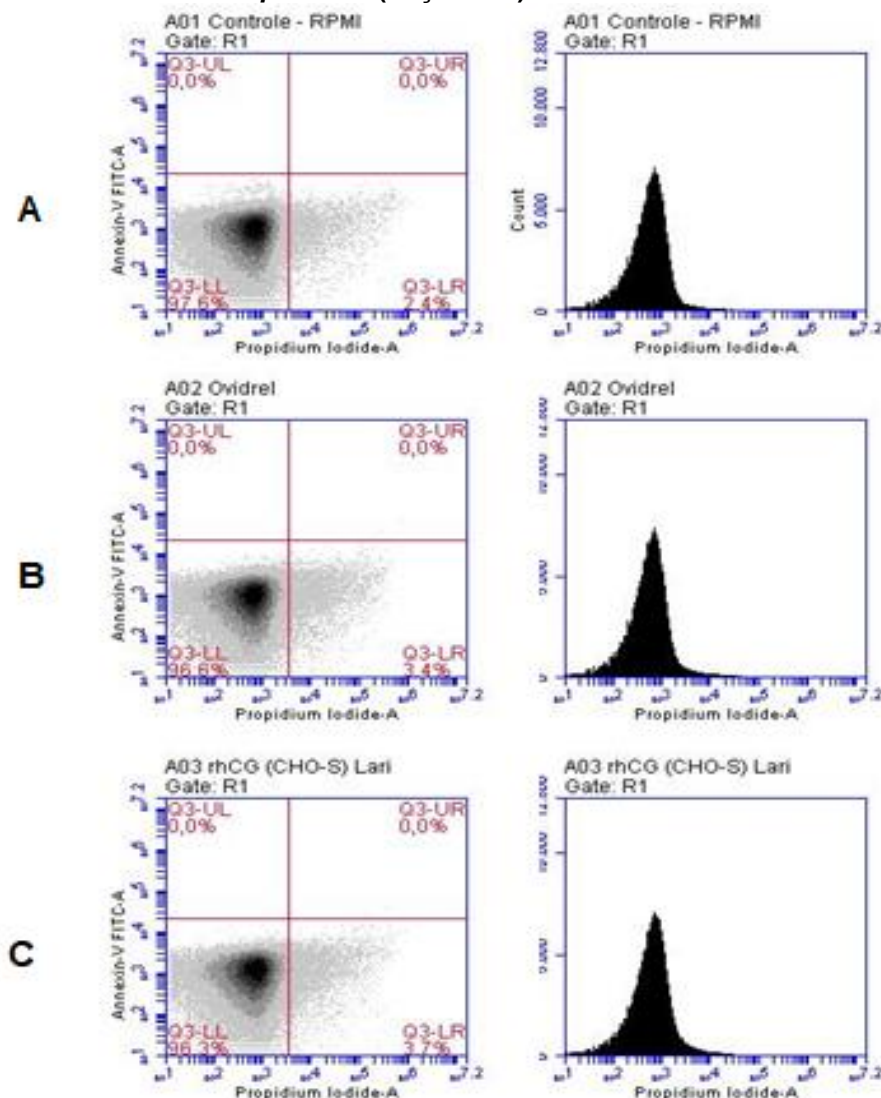
Depois de verificar qual a influência o r-hCG produzida nas células *ExpiCHO-S*, foi realizado outro ensaio por citometria de fluxo para identificar em que fase da apoptose, inicial ou tardia, as células submetidas a hCG estavam. Para este estudo, a concentração de r-hCG utilizada foi de 1 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas, visto que esta apresentou melhor resposta no ensaio de atividade biológica (figura 19).

O ensaio por citometria de fluxo demonstrou que 3,7% das células mLTC-1 encontram-se em um estágio de necrose (Q3-LR) após o período de 24 horas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de r-hCG da fração #24 (figura 20C), um aumento sutil do

percentual quando comparado com somente 2,4% da amostra controle; conseqüentemente o percentual de células viáveis (Q3-LL), diminuiu de 97,6% no controle, para 96,3% nas células submetidas ao r-hCG produzido em *ExpiCHO-S*.

Contudo, os estágios de apoptose tardia (Q3-UR) e apoptose inicial (Q3-UL), não apresentaram percentual significativo (figura 20). Levando em consideração que é uma cultura celular, e a manipulação das células para a citometria pode lizar ou causar dendritos celulares, esse percentual de célula em fase de necrose é baixo, podendo ser considerado normal. Portanto pode-se concluir que nenhum tipo de morte celular foi observado em células tratadas com r-hCG.

Figura 20 – Identificação por citometria de fluxo do estágio de apoptose nas células mLTC-1 submetidas a 24 horas de incubação com 1 µg/mL de r-hCG. A) Gráfico em *dot plots* e histograma do controle negativo; B) Gráfico em *dot plots* e histograma das células incubadas com Ovidrel; C) Gráfico em *dot plots* e histograma das células incubadas com o r-hCG produzido nas células *ExpiCHO-S* (fração #24).



Fonte: Autora da dissertação.

4.9. Análise da r-hCG por MALDI-TOF/TOF

4.9.1. Estudo com a r-hCG comercial (Ovidrel)

Para analisar o hCG por espectrometria de massa optamos por realizar os primeiros estudos com o produto comercial da Ovidrel. Partimos da ideia de analisar primeiro o hormônio na sua forma íntegra e em seguida analisar após reação com a enzima PNGase-F que separa os N-glicanos, lembrando que nessa condição a subunidade β do hCG continuaria com os O-glicanos. Foi realizada a análise por MALDI-TOF/TOF com a matriz de DHB, SA e HCCA, priorizamos a matriz DHB, pois apresentou um sinal mais intenso para o Ovidrel. Observamos que as duas subunidades se separaram quase que totalmente durante a análise.

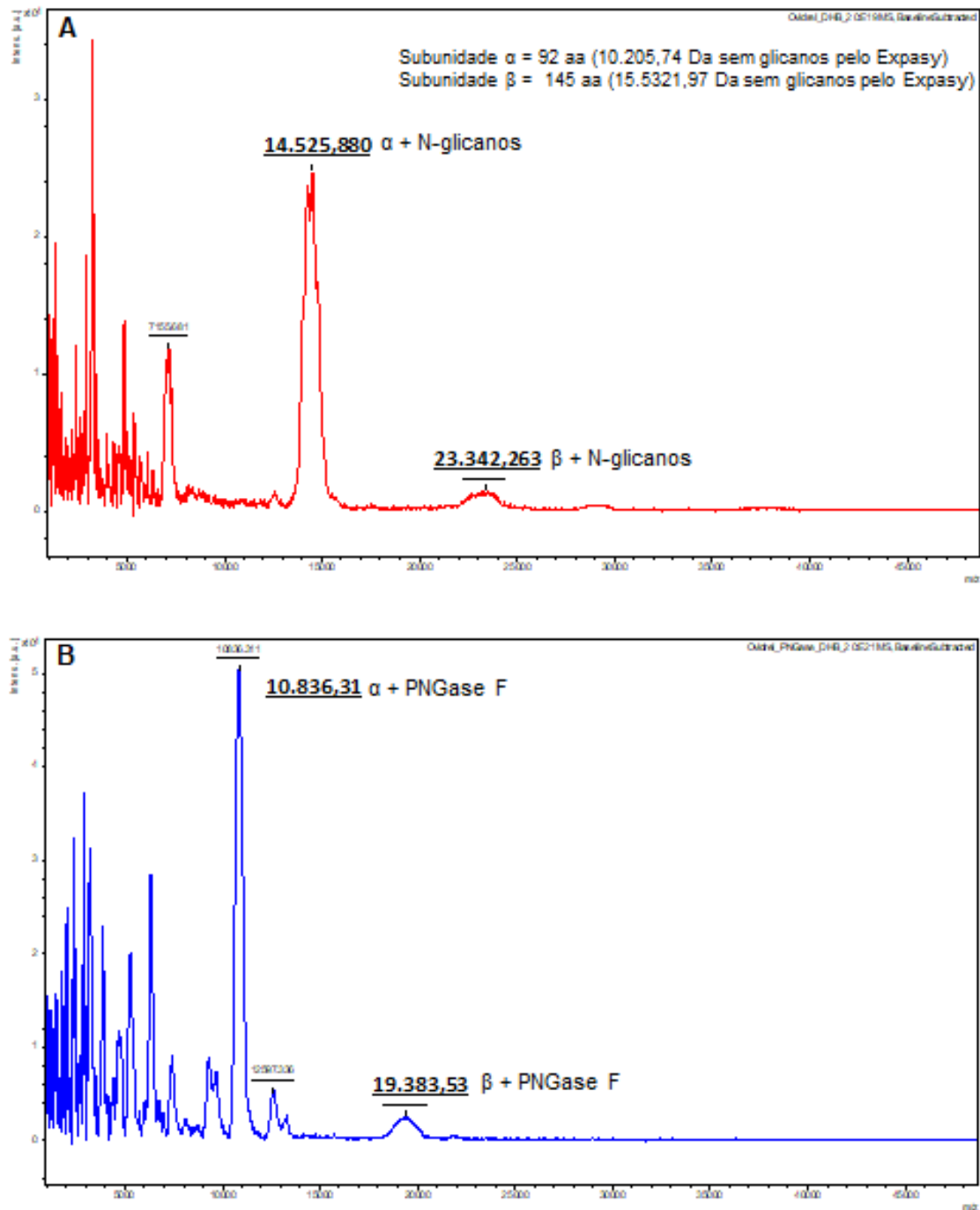
Um fator que contribuiu fortemente para separação das subunidades foi o tratamento com DTT e IAA antes da análise, além do aspecto redutor das matrizes utilizadas. Analisando os espectros da amostra sem a digestão com PNGase F (Figura 21A), observamos na matriz DHB um sinal relativamente baixo e largo identificado como 23.342,263 Da, referente à subunidade β glicosilada. O sinal com 14.525,88 Da corresponde à subunidade α que também apresenta diferentes formas glicosiladas, reflexo da variação nos valores de massa observados. Somando-se os dois valores teríamos o hCG completo com um valor médio experimental de 37.868,143 Da, compatível com o valor esperado.

Considerando que uma massa de 25.737,71 Da seria proveniente da massa polipeptídica do hormônio (10.205,74 Da de α + 15.531,97 Da de β), podemos inferir uma massa total de N-glicanos e O-glicanos de 12.130,43 Da (37.868,143 – 25.737,71), ~32% da massa total do hCG analisado. Relacionado ao espectro do hCG tratado com a enzima PNGase F (Figura 21B), há a presença de um forte sinal na posição correspondente a 10.836,31 Da, referente a subunidade α praticamente sem os glicanos, portanto, podemos inferir que a massa aproximada de glicanos na subunidade α seria 14.525,880 Da - 10.205,74 Da, ou seja, 4.320,14 Da.

Seguindo raciocínio similar, podemos estimar a massa de N-glicanos da subunidade β , seria 23.342,263 Da – 19.132,65 Da = 4.209,61 Da. Com o mesmo método, podemos inferir a massa de O-glicanos da subunidade β , nesse caso, seria 19.132,65 Da - 15.531,97 Da (teórico sem glicanos), ou seja, 3.600,38 Da.

Em suma, através desta análise a massa de glicanos totais (N-glicanos da subunidade α + N-glicanos da subunidade β + O-glicanos da subunidade β) é 12.130 Da, ou seja, 8.530 Da de N-glicanos e 3.600 Da de O-glicanos. Podemos, com essas análises de MALDI-TOF/TOF, calcular a porcentagem de N-glicanos e O-glicanos tanto nas subunidades separadas como na proteína total.

Figura 21 – Espectro de massas por MALDI-TOF/TOF da r-hCG referência (Ovidrel) utilizando a matriz de DHB. A) Espectro correspondente ao Ovidrel somente reduzido com DTT e alquilado com IAA; B) Espectro do Ovidrel reduzido, alquilado e deglicosilado com a enzima PNGase F.

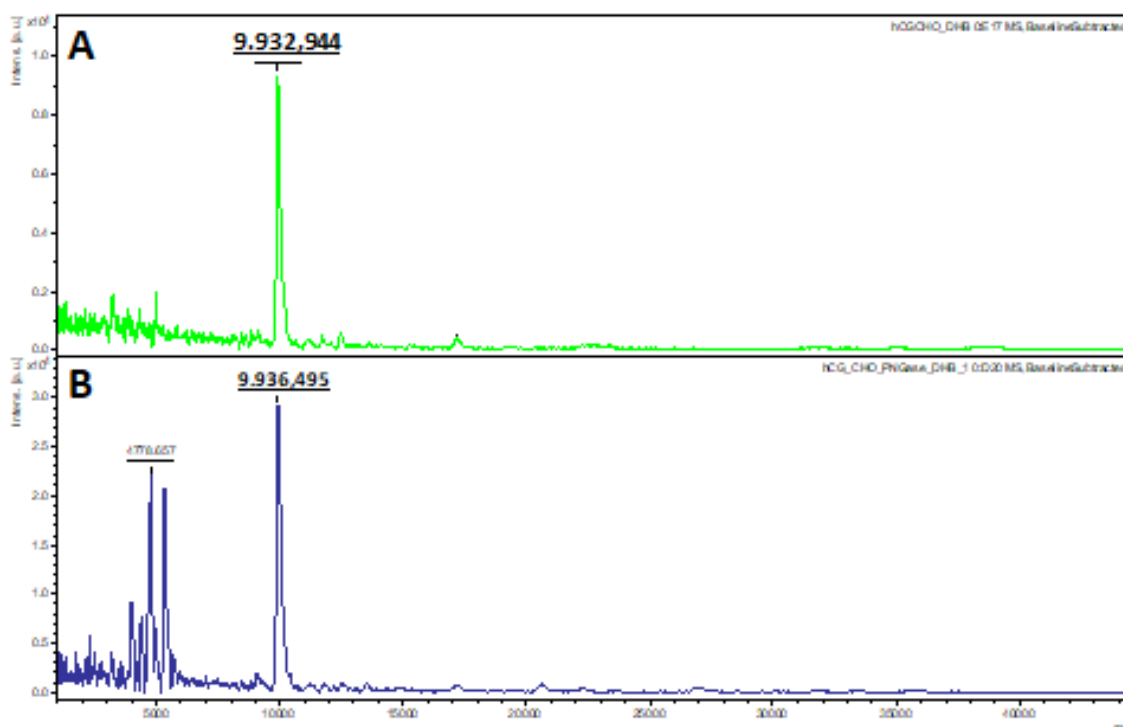


Fonte: Autora da dissertação.

4.9.2. Estudo com a r-hCG produzida pelas células *ExpiCHO-S*

A análise por MALDI-TOF/TOF da r-hCG produzida pelas células *ExpiCHO-S* foi realizada nas mesmas condições utilizadas para a r-hCG da Ovidrel (Figura 22).

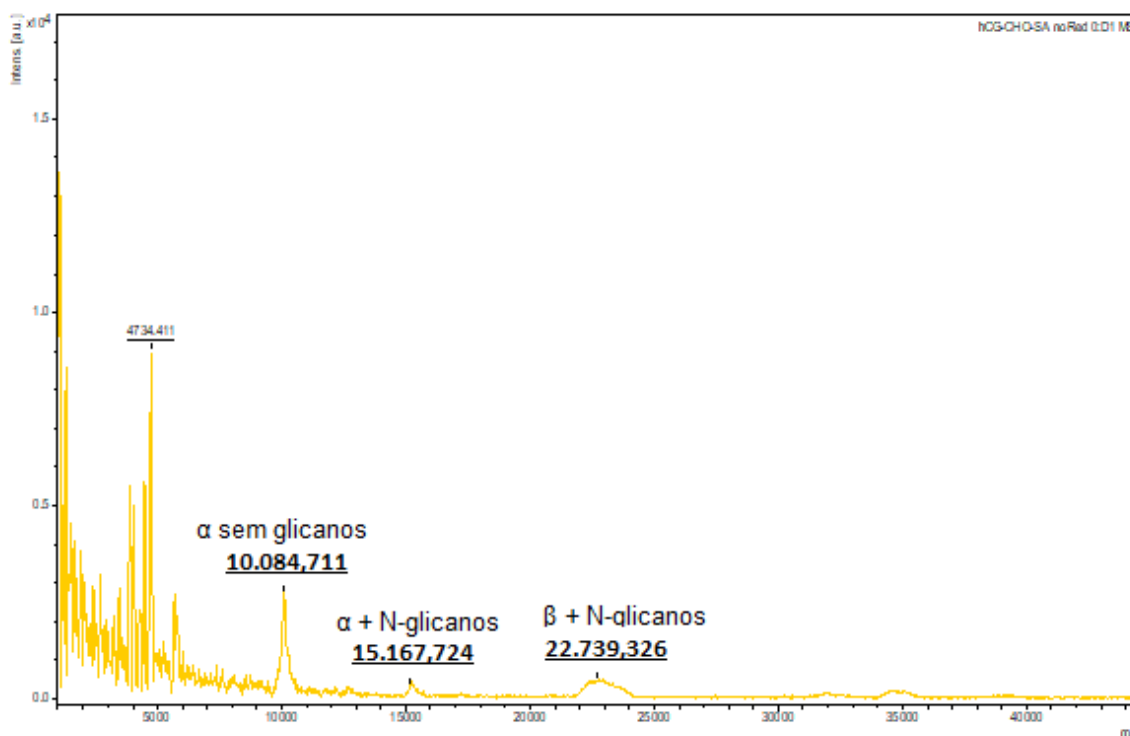
Figura 22 – Espectro de massas por MALDI-TOF/TOF da r-hCG produzidos pelas células *ExpiCHO-S* utilizando a matriz de DHB. A) Espectro correspondente ao hormônio somente reduzido com DTT e alquilado com IAA; B) Espectro do hormônio reduzido, alquilado e deglicosilado com a enzima PNGase F.



Fonte: Autora da dissertação.

Os resultados obtidos não reproduziram os da amostra de Ovidrel. Nos dois espectros foram observados apenas uma relação m/z correspondente à subunidade α do hCG não glicosilada, as subunidades glicosiladas não foram detectadas. Foram testadas diferentes matrizes (SA e HCCA) com e sem DTT, ou seja, com redução e sem redução. O espectro que apresentou melhor resultado para se observar as formas glicosiladas presentes no hCG produzido nesse trabalho foi utilizando a matriz de SA e sem redução (Figura 23).

Figura 23 – Espectro de massa por MALDI-TOF/TOF da r-hCG produzidos pelas células EXPiCHO-S utilizando a matriz de SA, sem redução e alquilado com IAA.

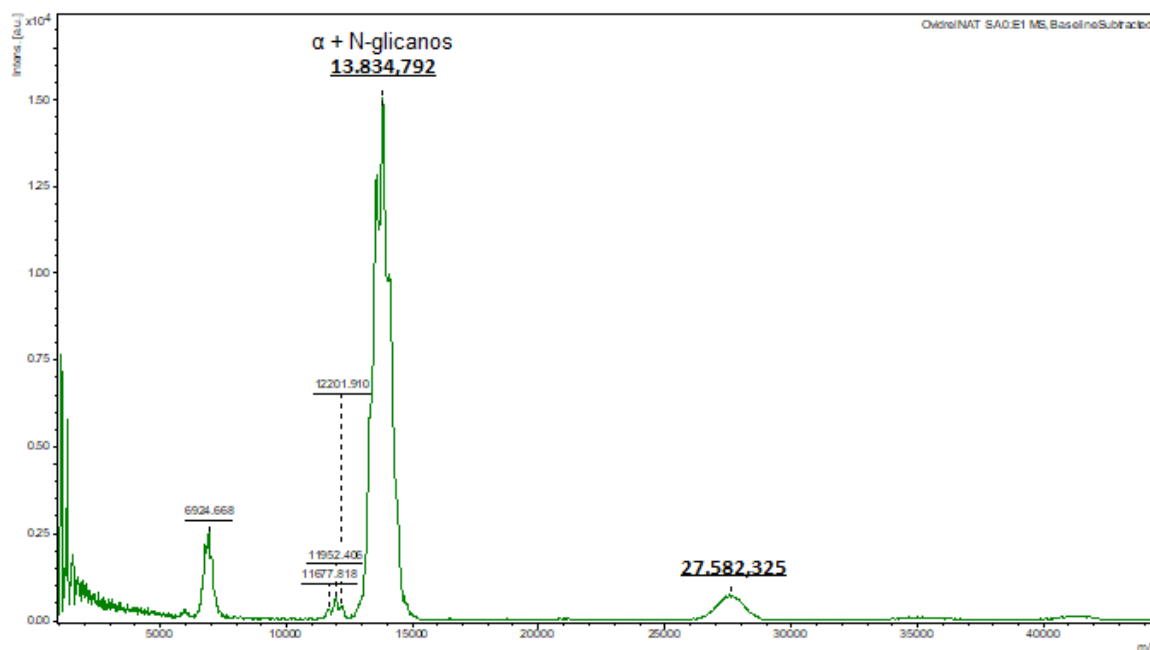


Fonte: Autora da dissertação.

Com os espectros obtidos na amostra de r-hCG produzida nas células *Expicho-S*, utilizando a matriz de SA e sem reduzir a amostra (figura 22), identificamos que as duas subunidades do r-hCG expresso nas *Expicho-S* também separaram totalmente. Portanto, somando-se os valores obtidos nas duas subunidade glicosiladas (15.167,72 Da + 22.739,32 Da) temos 37.907,05 Da, valor compatível com o esperado. O sinal com 10.084,71 Da corresponde à subunidade α sem glicanos, pois o valor experimental obtido está muito próximo do teórico (Expasy) da subunidade α sem glicanos, estimado em 10.205,74 Da.

O espectro da análise do r-hCG da Ovidrel nessa mesma condição com a matriz de SA é apresentado na figura 24. Observamos a ausência da subunidade β , possivelmente devida a uma ionização deficiente. E a presença de um sinal correspondente a um dímero.

Figura 24 – Espectro de massa por MALDI-TOF/TOF da r-hCG referência (Ovidrel) utilizando a matriz de SA, sem redução e alquilado com IAA.



Fonte: Autora da dissertação.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a gonadotrofina coriônica humana recombinante, produzida e purificada em nosso laboratório, atende aos requisitos de autenticidade, pureza e eficácia necessária para sua aplicação, seja para a utilização *in vitro* ou em ensaios biológicos.

Visto que, para o melhor aproveitamento da expressão de outros hormônios heterodiméricos recombinantes como o TSH em células CHO (PERONI *et al.*, 2002) e o próprio r-hCG em células HEK293 (FERNANDES, 2022) foi necessária a utilização de proporções distintas de plasmídeos com as subunidades α e β , o resultado obtido neste trabalho, diferentemente dos trabalhos comentados, demonstrou que a melhor proporção para produzir uma maior quantidade do r-hCG nas células *ExpiCHO-S* foi a de 1:1, determinado com base na intensidade da banda apresentada no WB (figura 13A). Em massa essa proporção é o equivalente a aproximadamente 41% de α e 59% de β .

O sistema de produção de proteínas em células animais cultivadas em suspensão utilizando os frascos *erlenmeyer* em agitação orbital é frequentemente utilizado pelo nosso grupo de pesquisa por apresentar resultados satisfatórios, porém no início do projeto devido à intercorrências a viabilidade das células

estava sendo prejudicada, não atingindo a densidade recomendada pelo fabricante para a produção, depois de solucionada esta questão houve necessidade de realizar uma produção controle de imunoglobulina G.

Nessa produção controle foi possível notar que a partir do 4^o dia de produção o número de células decaiu (figura 10B), o que pode ser considerado natural devido a formação de aglomerados celulares na parede do frasco *erlenmeyer*. Apesar disto, as células produziram boas quantidades de IgG visualizadas em gel de poliacrilamida (figura 10A), por este motivo seguimos com a produção de r-hCG (figura 11) que assim como o controle também houve uma diminuição do número de células a partir do 4^o dia.

Para o processo de purificação a estratégia utilizada inicialmente foi por cromatografia de afinidade com a coluna “POROS™ *CaptureSelect*™ hCG *Affinity*”. Esta coluna apesar de pouco relatada na literatura, estava sendo utilizada para a purificação de r-hCG expresso em células humanas HEK293, onde a proteína apresentou alto grau de pureza (FERNANDES, 2022). Entretanto, apesar da relativa pureza da proteína (figura 14C), para a r-hCG produzida em células *ExpiCHO-S* resultou em uma recuperação de somente 0,03% de proteína ao final da purificação (tabela 3).

Buscando minimizar a perda de proteína na purificação, encontramos no trabalho do Cole (2012) que a hCG é uma glicoproteína que apresenta forte caráter ácido, com o potencial isoelétrico (pI) variando de 3,2 a 3,5 de acordo com as glicosilações presentes, devido ao pI baixo e a disponibilidade da coluna Q-Sepharose *Fast Flow* de troca aniônica no laboratório, já utilizada no grupo como estratégia de purificação de hTSH recombinante produzido em células CHO (MENDONÇA, 2003), optamos com sucesso em adaptar essa estratégia para a purificação de r-hCG neste trabalho.

O processo de purificação por troca aniônica (figura 15), seguida pela exclusão molecular (figura 16) se mostrou eficiente quando comparado com a cromatografia por afinidade. Na análise por HPSEC foi observada a semelhança do tempo de retenção entre o hCG comercial e a fração #24 coletada do cromatógrafo e produzida em células *ExpiCHO-S*. Foram obtidos um total de 99,5 µg/mL de r-hCG com alto grau de pureza a partir de 120 mL de meio condicionado, valor este que é superior ao adquirido pelo grupo para prolactina humana também produzida em células CHO cultivadas em suspensão

(ARTHUSO *et al.*, 2012) por transfecção permanente, diferentemente da transfecção transiente do kit *ExpiCHO-S Expression System*.

Apesar da quantidade de r-hCG produzida em células *ExpiCHO-S* e obtida ao final da purificação no nosso grupo ser satisfatória 0,8 mg/L, há relatos de até 5,1 mg/L como reportado por Deng *et al* (2019) na China. Contudo, é importante ressaltar que para conseguir produzir altas concentrações de r-hCG em células CHO, o trabalho do Deng *et al* (2019), assim como o de García (2004) com o r-hCG comercial Ovidrel®, descrevem modificações genéticas nas células CHO utilizadas, visando uma produção mais eficiente das O-glicosilações presentes na subunidade β de hCG, e estas modificações não foram realizadas no nosso estudo.

Para verificar a atividade biológica da hCG o ensaio mais utilizado é a dosagem da progesterona que as células mLTC-1 produzem na presença da hCG ou hLH (REBOIS, 1982), mas devido à algumas dificuldades, como o alto custo, a demora para obter Kits de ELISA, a impossibilidade de utilizar outras técnicas como espectrometria de massas e HPLC por falta de colunas apropriadas, não foi possível realizar esta dosagem. A utilização de serviços de Laboratórios de Análises Clínicas foi uma opção, mas devido a procedimentos de boas práticas laboratoriais, este serviço não era disponibilizado, sendo assim, optamos por padronizar em nosso laboratório os ensaios de apoptose celular com MTS/PMS e por citometria de fluxo.

Com o ensaio de MTS/PMS (figura 19) foi observado que ocorreu uma resposta dose dependente, em que a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ apresentou maior atividade e conseqüentemente maior taxa de morte celular das células mLTC-1, o que é esperado de acordo com Park *et al* (2013) e também como mencionado por Wang *et al* (2021), pois o tratamento frequente com alta concentração de hCG resulta em estresse do reticulo endoplasmático (ZHAO *et al*, 2022) nestas células, levando-as à apoptose celular.

Com o objetivo de confirmar que as células estavam realmente no processo de morte celular programada (apoptose) foi realizado o ensaio por citometria de fluxo (figura 20), onde foi observado que após 24 horas de incubação com 1 $\mu\text{g/mL}$ de r-hCG, as células se encontravam em um estágio de necrose, porém como explicado anteriormente, esse percentual é baixo, podendo ser considerado normal na manipulação de cultura celular.

Na análise por MALDI-TOF/TOF utilizando a matriz de DHB foi possível identificar as subunidades α e β de hCG na amostra de referência Ovidrel com e sem os N-glicanos (figura 21), essa técnica possibilita avaliar a porcentagem de N-glicanos e O-glicanos em cada uma das subunidades. É interessante observar na figura 21A que ambas as subunidades aparentam estar 100% glicosiladas, pois não observamos nenhum sinal correspondente às subunidades não glicosiladas.

Outra observação é a relativa baixa ionização da subunidade β , o que de fato confirma o já relatado na literatura, sobre a dificuldade de ionização da subunidade β , em parte justificada pela presença dos seis sítios de glicosilação (AL MATARI, 2021). Entretanto, nessa mesma condição, não foi possível identificar sinal das subunidades α e β glicosiladas na amostra de r-hCG produzido em células *Exp1CHO-S* (figura 22). A condição que permitiu visualizar as subunidades glicosiladas foi com a matriz SA, sem redução (figura 23).

A razão disso não está clara, algumas hipóteses seriam a degradação da amostra durante a estocagem, mesmo a -70°C ou a quantidade e a qualidade da glicosilação produzida e consequente alteração na capacidade de ionização da amostra, haja vista que como mencionado anteriormente, é conhecido o fato que a CHO utilizada na produção do hCG da Ovidrel foi modificada geneticamente para otimizar a expressão desse hormônio.

Com relação às análises por espectrometria de massa da hCG produzida pela *Exp1CHO-S* a presença da subunidade α não glicosilada (figuras 23 e 24), é curioso, considerando que durante o processo de purificação e caracterização isso não tenha sido observado, nossos resultados de purificação e análise não indicam que essa subunidade tenha sido produzida em excesso ou liberada no meio cultura de forma prematura, não formando dímero com a subunidade β . Cabe lembrar que a técnica de MALDI-TOF/TOF, como observado, não é quantitativa, pois é a facilidade de ionização que possibilita a visualização de um sinal mais intenso.

Importante ressaltar que o tratamento da amostra com PNGase F ocorre para fazer o isolamento somente dos N-glicanos. Para uma possível análise dos O-glicanos existentes na subunidade β de hCG seria necessária a realização de uma reação denominada eliminação β , onde ocorre a liberação dos O-glicanos por condições alcalinas que podem ser mediadas por um tratamento com

hidróxido de sódio (BROCKHAUSEN *et al.*, 2009), porém este processo não foi realizado neste estudo.

De maneira geral, as metodologias empregadas alcançaram resultados satisfatórios e promissores, abrindo possibilidades para futuras pesquisas envolvendo r-hCG, como estudar mais especificamente alguma das formas de aplicação deste hormônio em potenciais estudos *in vivo*, averiguar a possibilidade do escalonamento do processo de produção e também devemos levar em consideração que a subunidade β do hCG está relacionada diretamente em diferentes tumores, abrindo um amplo campo de estudo.

6 CONCLUSÕES

Com a metodologia empregada e os resultados obtidos concluímos que a produção e purificação de hCG recombinante obtida através do método de transfecção transiente com a proporção 1 α :1 β de plasmídeos em um período de 8 dias, se mostraram as condições mais favoráveis para as células *ExpiCHO-S*, atendendo aos requisitos de autenticidade, pureza e eficácia necessários para sua aplicação, seja para a utilização *in vitro* ou em ensaios biológicos.

A estratégia utilizada para purificação da r-hCG através das colunas Q *Sepharose Fast Flow* e *Sephacryl*, apresentou uma recuperação consideravelmente melhor que o obtido pela coluna de afinidade *POROS™ CaptureSelect™ hCG Affinity*. Atingindo a concentração de 99,5 $\mu\text{g/mL}$ de r-hCG com alto grau de pureza.

A r-hCG purificada apresentou atividade biológica aparentemente com potência superior ao hCG recombinante utilizado como referência, e os ensaios aplicados para esta verificação apesar de não serem os comumente utilizados, apresentaram bons resultados possibilitando a sua utilização para outras proteínas produzidas no laboratório, como por exemplo, o hormônio luteinizante, por apresentar atividade fisiológica semelhante ao hCG, ou até mesmo o hCG produzido em outras linhagens celulares.

A análise dos glicanos por MALDI-TOF/TOF abre possibilidade de novos estudos visando a otimização da técnica ou utilizando o espectrômetro de massas quadrupolo-Orbitrap, pois este pode conferir maior sensibilidade e poder de resolução nas amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AL MATARI, A. **Development of new analytical methods for the analysis at the intact level of glycoforms of hCG and other gonadotropins by nano liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry**. 2021. 238 p. Thesis (Doctorate in analytical chemistry). Université Paris sciences et lettres, France.

ALLAHBADIA, G. N.; ALLAHBADIA, A. Recombinants versus biosimilars in ovarian stimulation. In: ***Ovarian Stimulation Protocols***. New Delhi: Springer India. p. 71-77, 2016.

ALMEIDA, B.E.; OLIVEIRA, J.E.; CARVALHO, C.M.; DALMORA, S.L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v. 53, p. 90-97, 2010.

ARTHUSO, F.S.; BARTOLINI, P.; SOARES, C.R.J. Laboratory production of human prolactin from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 167, n. 8, p. 2212-24, 2012.

BHATTACHARYA, S.; NAIK, S. N.; PATEL, P. J.; MAV, U. G. The recent trend in bio-similar drugs development, ***Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences***, v. 5, n. 2, 2018.

BIRKEN, S. Specific measurement of o-linked core 2 sugar-containing isoforms of hyperglycosylated human chorionic gonadotropin by antibody b152. ***Tumor Biology***, v. 26, n. 3, p. 131-141, 2005.

BROCKHAUSEN, I.; WANDALL, H.; TEN HAGEN, K.; STANLEY, P. O-GalNAc Glycans. In: *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3 ed. ***Cold Spring Harbor Laboratory Press***, 2009.

BUTLER, M. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. ***Cytotechnology***, v. 50, n. 1-3, p. 57-76, 2006.

CAMPAGNARO, B. P. ***Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2r1c sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos***. 2012. 159 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

CAPONE, M. V. N.; SUZUKI, M. F.; OLIVEIRA, J. E.; DAMIANI, R.; SOARES, C. R. J.; BARTOLINI, P. N-glycoprofiling analysis in a simple glycoprotein model: a comparison between recombinant and pituitary glycosylated human prolactin. ***Journal of Biotechnology***, v. 20, n. 202, p. 78-87, 2015.

CHA, Y.J.; KIM, K.A.; OH, T.Y.; PARK, J.Y. Pharmacokinetics and safety profile of DA-3903, a proposed biosimilar of recombinant chorionic gonadotropin, in health subjects. ***BioDrugs***, v. 29, i. 3, p. 199-205, 2015.

COLE, L. A. HCG variants, the growth factors which drive human malignancies. *American Journal of Cancer Research*, v. 2, n. 1, p. 22, 2012.

COLE, L. A. Hyperglycosylated hCG, a review. *Placenta*, v. 31, n. 8, p. 653-664, 2010.

DENG, Q.; HE, L.; XU, F.; DENG, Q.; XU, T.; JIANG, J.; HU, Z.; YANG, J. Characterization of beta subunit variants of recombinant human chorionic gonadotrophin. *Analytical Biochemistry*, v. 668, p. 115089, 2023.

DENG, Z.; YI, X.; CHU, J.; ZHUANG, Y. A study on enhanced O-glycosylation strategy for improved production of recombinant human chorionic gonadotropin in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biotechnology*, n. 306, p. 159-168, 2019.

DONINI, R.; HASLAM, S. M.; KONTORAVDI, C. Glycoengineering Chinese hamster ovary cells: a short history. *Biochemical Society Transactions*, v. 49, n. 2, p. 915-931, 2021.

DONNEZ J.; DOLMANS MM. Fertility preservation in women. *New England Journal of Medicine*, v. 377, n. 17, p. 1657-1665, 2017.

EICHLER, J. Protein glycosylation. *Current Biology*, v. 29, n. 7, p. R229-R231, 2019.

FERNANDES, S. **Síntese de gonadotrofina coriônica humana recombinante em células HEK293: produção, purificação e caracterização físico-química**. 2022. 82 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo.

FIDDES, J. C.; GOODMAN, H. M. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, v. 1, n. 1, p. 3-18, 1981.

FOURNIER, T. Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. In: *Annales d'endocrinologie*. Elsevier Masson, p. 75-81, 2016.

FRANKS, C. E.; LI, J.; MARTINEZ, M.; FARNSWORTH, C. W.; JONES, P. M.; GRENACHE, D. G.; ... & GRONOWSKI, A. M. Utility of Commercially Available Quantitative hCG Immunoassays as Tumor Markers in Trophoblastic and Non-Trophoblastic Disease. *Clinical Chemistry*, v. 69, n. 6, p. 606-614, 2023.

GARCÍA, J. L. Ingeniería genética y biotecnología. **Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XV: Nuevos avances en medicamentos**, p. 199-236, 2004.

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. *Biotechnology and Bioengineering*, v.103, n. 6, 1164-1175, 2009.

GOH, J.B.; KONG NG, S. Impact of host cell line choice on glycan profile. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 38, no. 6, 851-867, 2018.

HELLER, S. R.; RODRIGUES-GOULART, H.; ARTHUSO, F. S.; OLIVEIRA, T. L.; BARTOLINI, P.; SOARES, C. R. Synthesis, purification and characterization of recombinant glycosylated human prolactina (G-hPRL) secreted by cycloheximide-treated CHO cells. **Journal of Biotechnology**, v. 145, n. 4, p. 334-340, 2012.

HUGUES, J. Comparative use of urinary and recombinant human chorionic gonadotropins in women. **Treatments in Endocrinology**, v. 3, p. 371-379, 2004.

INTERNATIONAL RECOMBINANT HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN STUDY GROUP et al. Induction of ovulation in World Health Organization group II anovulatory women undergoing follicular stimulation with recombinant human follicle-stimulating hormone: a comparison of recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) and urinary hCG. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 6, p. 1111-1118, 2001.

JUNGBAUER, A.; HAHN, R. Ion-exchange chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 349-371, 2009.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 3173-3178, 2010.

KÖLBL, A. C.; SCHLENK, K.; BEHRENDT, N.; ANDERGASSEN, U. The importance of hCG in human endometrial adenocarcinoma and breast cancer. **The International Journal of Biological Markers**, v. 33, n. 1, p. 33-39, 2018.

LEE, J. S.; GRAV, L. M.; LEWIS, N. E.; KILDEGAARD, H. F. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of CHO cell factories: Application and perspectives. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 7, p. 979-994, 2015.

LUNENFELD, B.; BILGER, W.; LONGOBARDI, S.; ALAM, V.; D'HOOGHE, T.; SUNKARA, S. K. The development of gonadotropins for clinical use in the treatment of infertility. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 429, 2019.

MADANI, T.; MOHAMMADI, Y. L.; EZABADI, Z.; HASANI, F.; CHEHRAZI, M. Comparing the efficacy of urinary and recombinant hCG on oocyte/follicle ratio to trigger ovulation in women undergoing intracytoplasmic sperm injection cycles: a randomized controlled trial. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 239-245, 2013.

MAYOR-DE-CASTRO, J.; ARAGÓN-CHAMIZO, J.; CAÑO-VELASCO, J.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, C. Biomarkers in testicular cancer. **Archivos Espanoles de Urologia**, v. 75, n. 2, p. 113-117, 2022.

MENDONÇA, F. **Expressão, purificação e caracterização de tireotrofina recombinante humana (rec-hTSH) em células de ovário de hamster chinês (CHO)**. 2003. 122 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações). Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

OLIVEIRA, J. E.; DAMIANI, R.; VORAUER-UHL, K.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Influence of a reduced CO₂ environment on the secretion yield, potency and N-glycan structures of recombinant thyrotropin from CHO cells. ***Molecular Biotechnology***, v. 39, n. 2, p. 159-166, 2008.

OLIVEIRA, J. E.; MENDONÇA, F.; PERONI, C. N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Determination of Chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. ***Journal of Chromatography B***, v. 787, n. 2, p. 345-355, 2003.

OYATOGUN, O.; SANDHU, M.; BARATA-KIRBY, S.; TULLER, E.; SCHUST, D. J. A rational diagnostic approach to the “phantom hCG” and other clinical scenarios in which a patient is thought to be pregnant but is not. ***Therapeutic Advances in Reproductive Health***, v. 15, 2021.

PARK S. J.; KIM T. S.; PARK C. K.; LEE S. H.; KIM J. M.; LEE K. S.; LEE I. K.; PARK J. W.; LAWSON M. A.; LEE D. S. hCG-induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6 in Leydig cells of the testis. ***Journal of Molecular Endocrinology***, v. 50, n. 2, p. 151-166, 2013.

PERONI, C. N.; SOARES, C. R.; GIMBO, E.; MORGANTI, L.; RIBELA, M. T.; BARTOLINI, P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. ***Biotechnology and Applied Biochemistry***, v. 35, n. 1, p. 19-26, 2002.

PUCK, T.T.; CIECIURA, S.J.; ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells.III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. ***The Journal of Experimental Medicine***, v. 108, p. 945-956, 1958.

RAO, C. V. Protective effects of human chorionic gonadotropin against breast cancer: how can we use this information to prevent/treat the disease?. ***Reproductive Sciences***, v. 24, n. 8, p. 1102-1110, 2017.

REBOIS, R. V. Establishment of Gonadotropin-responsive Murine Leydig Tumor Cell Line, ***The Journal of Cell Biology***, n. 94, p. 70-76, 1982.

RECILLAS-TARGA, F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. ***Molecular Biotechnology***, v. 34, p. 337-354, 2006.

RITACCO, F. V.; WU, Y.; KHETAN, A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. ***Biotechnology Progress***, v. 34, n. 6, p. 1407-1426, 2018.

SANT'ANA, P.M.; OLIVEIRA, J.E.; LIMA, E.R.; SOARES, C.R.J. ; PERONI, C.N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Human thyroid-stimulating hormone synthesis in human embryonic kidney cells and related N-glycoprofiling analysis for carbohydrate composition determination. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, n.102, p.1215 -1228, 2018.

SCHENBORN, E. T.; GOIFFON, V. DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Transcription Factor Protocols*, p. 147-153, 2000.

SEO, K.S.; YOON, J.W.; NA, K.H.; BAE, E.J.; WOO, J.G.; LEE, S.H.; KANG, S.H.; MNG, J. Evaluation of process efficiency and bioequivalence of biosimilar recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG). *Bio Drugs*, v. 25 (2), p. 115-127, 2011.

SISINNI, L.; LANDRISCINA, M. The role of human chorionic gonadotropin as tumor marker: biochemical and clinical aspects. *Advances in Cancer Biomarkers: From biochemistry to clinic for a critical revision*, p. 159-176, 2015.

SOARES, C. R.; MORGANTI, L.; MILOUX, B.; LUPKER, J. H.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-hamster ovary cells. *Biothology and Applied Biochemistry*, v. 32, n. 2, p. 127-135, 2000.

STANLEY, P.; TANIGUCHI, N.; AEBI, M. N-glycans. In: Essentials of Glycobiology [Internet]. 3 ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2017.

SUZUKI, T.; SHIRAHATA, M.; ADACHI, J. I.; MISHIMA, K.; NISHIKAWA, R. Clinical significance and pitfalls of human chorionic gonadotropin-related tumor markers for intracranial germinomas. *Child's Nervous System*, p. 1-7, 2023.

THENNATI, R.; SINGH, S.K.; NAGE, N.; PATEL, Y.; BOSE, S.K.; BURADE, V.; RANBHOR, R.S. Analytical characterization of recombinant hCG and comparative studies with reference product. *Biologics: Targets and Therapy*, v.12, p. 23–35, 2018.

TIAN, Y.; ZHANG, H. Glycoproteomics and clinical applications. *Proteomics–Clinical Applications*, v. 4, n. 2, p. 124-132, 2010.

URLAUB, G.; CHASIN, L. A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 77, n. 7, p. 4216-4220, 1980.

USP THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, XXVIII ed., <Chorionic gonadotropin> monograph, Rockville, 2015.

VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; SVENNINGSSEN, Å. F.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L. E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M. L.; GSTRAUNTHALER, G. Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro*, v. 24, n. 4, 1053-1063, 2010.

VAN ENGELAND, M.; RAMAEKERS, F. C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, v. 24, n. 2, p. 131-139, 1996.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, v. 36, n. 12, p. 1136-1145, 2018.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, v. 15, n. 17/18, p. 773-780, 2010.

WALSH, G.; WALSH, E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nature Biotechnology*, v. 40, n. 12, p. 1722-1760, 2022.

WAN, H.; VERSNEL, M. A.; CHEUNG, W. Y.; LEENEN, P. J.; KHAN, N. A.; BENNER, R.; KIEKENS, R. C. Chorionic gonadotropin can enhance innate immunity by stimulating macrophage function. *Journal of Leucocyte Biology*, v. 82, n. 4, p. 926-933, 2007.

WANG, L.; MENG, Q.; YANG, L.; YANG, D.; GUO, W.; LIN, P.; CHEN, H.; TANG, K.; WANG, A.; JIN, Y. Luman/CREB3 knock-down inhibit hCG induced MLTC-1 apoptosis. *Theriogenology*, v. 161, p. 140-150, 2021.

WOPEREIS, S.; LEFEBER, D. J.; MORAVA, E.; WEVERS, R. A. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clinical Chemistry*, v. 52, n. 4, p. 574-600, 2006.

WURM, F. M. CHO quasispecies—implications for manufacturing processes. *Processes*, v. 1, n. 3, p. 296-311, 2013.

WURM, M. J.; WURM, F. M. Naming CHO cells for bio-manufacturing: Genome plasticity and variant phenotypes of cell populations in bioreactors question the relevance of old names. *Biotechnology Journal*, v. 16, n. 7, p. 2100165, 2021.

YOUSSEF, M. A.; ABOU-SETTA, A. M.; LAM, W. S. Recombinant versus urinary human chorionic gonadotrophin for final oocyte maturation triggering in IVF and ICSI cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 4, 2016.

ZHAO, W.; REN, W.; HUANG, D.; SANG, Y.; CAO, L.; HUANG, J. Cell structure and physiology. In *Cell Movement in Health and Disease*. Academic Press, p. 3-16, 2022.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MÜNSTEDT, K.; LANG, U.; LIANG, O. D. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 110, p. S10-S18, 2003.

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

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