

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**CONTRIBUIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE  
METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE DESINTEGRINA  
RECOMBINANTE PRODUZIDA EM CULTIVOS DE CÉLULAS  
CHO-K1.**

**SÃO CARLOS**

**JUNHO / 2004**

**GRACINDA MARINA CASTELO DA SILVA**

**CONTRIBUIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE  
METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE DESINTEGRINA  
RECOMBINANTE PRODUZIDA EM CULTIVOS DE CÉLULAS  
CHO-K1**

**Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química da Universidade  
Federal de São Carlos como parte dos  
Requisitos necessários à obtenção do  
Título de Mestre em Engenharia  
Química, área de concentração em  
Pesquisa e Desenvolvimento de  
Processos Químicos, sob orientação da  
Prof.<sup>(a)</sup> Dr.<sup>(a)</sup> Teresa Cristina  
Zangirolami.**

**SÃO CARLOS – SP**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C348cd

Castelo da Silva, Gracinda Marina.

Contribuição ao desenvolvimento de metodologia para  
detecção de desintegrina recombinante produzida em  
cultivos de células CHO-K1 / Gracinda Marina Castelo da  
Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

151 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2004.

1. Biotecnologia. 2. Células CHO-K1. 3. Proteína  
recombinante. 4. Engenharia bioquímica. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

*Dedico este trabalho:*

*Aos meus referenciais,*

*Meus pais Mário e Purificação, pela confiança, apoio, afeto e pelo orgulho que me fazem sentir de suas trajetórias.*

*Meus irmãos, Mário Jorge e Bruna por serem parte do que sou e junto com meus pais configurarem meu porto seguro.*

*Meu marido Nélvio por sua paciência, companheirismo e ajuda quase infinita nesta jornada.*

*Meus filhos, Eduarda e Felipe por me mostrarem o verdadeiro significado da palavra AMOR.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, por toda dedicação, carinho e amor que precisei durante a realização e finalização deste trabalho.*

*Aos amigos de laboratório com os quais foram compartilhados conhecimentos e experiências: Marcelo Vargas Querino, Patrícia Aparecida Santiago, Kamilla Swiech, Tássia Raffoul, Eduardo Baldo, Clóvis Sacardo da Silva, Gersón Garaffono, Álvaro Baptista Neto e Amadeus pela amizade, discussões e auxílio ocasional.*

*Aos amigos e colaboradores do Departamento de Fisiologia da UFSCar: Carol, Márcia, Oscar, Beth, Juliana, Cristina, Ana Flávia, Carmem, Renner, Raquel, Lílíane e Sabrina pelo intercâmbio de conhecimentos e companherismo.*

*À Prof. Dra Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo pela ajuda e colaboração na busca de soluções dos problemas ocasionados na detecção e quantificação da proteína recombinante e pelo uso do Laboratório de Ciências Fisiológicas.*

*Ao Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo por sua grande influência e pela ajuda prestada na formação do presente trabalho.*

*À CAPES pelo apoio financeiro.*

*E por fim, gostaria de agradecer à Prof. Dra Teresa Cristina Zangirolami pela sua dedicada orientação, confiança, bom senso e a constante preocupação em desenvolver um trabalho de qualidade.*

*Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos direta e indiretamente que contribuíram para a realização deste trabalho e finalizo por revelar a satisfação pelos conhecimentos adquiridos durante esta jornada.*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 Objetivo</b> .....	6
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
<b>2.1. Célula CHO-K1</b> .....	7
2.1.1 Engenharia Genética – Tecnologia do ADN recombinante.....	8
<b>2.2. Estrutura e Propriedades das Proteínas Integrina e desintegrina</b> .....	11
2.2.1. Desintegrinas.....	11
2.2.2. Integrinas.....	14
<b>2.3. Adesão Celular</b> .....	16
<b>2.4. Cultivos de Células Animais</b> .....	20
2.4.1. Vantagens e desvantagens do Cultivo Celular.....	21
2.4.2 Frasco Spinner .....	23
2.4.3 Microgarregadores.....	24
2.4.4 Meios de Cultivo.....	24
2.4.4.1 Meios de cultivo com alto teor de proteína, contendo soro fetal bovino.....	27
2.4.4.2.Meios de cultivo isentos de soro.....	29
<b>2.5 Métodos de Purificação</b> .....	34

2.5.1 Ultracentrifugação Zonal.....	40
2.5.2 Centrifugação Diferencial.....	40
2.5.3 Diálise.....	40
2.5.4 Eletroforese em Gel ou PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis.....	41
2.5.5 Métodos cromatográficos para a purificação de proteínas.....	42
<b>2.6 Procedimentos empregados para a purificação da proteína desintegrina.....</b>	<b>54</b>
<b>2.7 Considerações Finais.....</b>	<b>60</b>
<b>3. METODOLOGIA DE PESQUISA .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1 Materiais e Equipamentos .....</b>	<b>62</b>
3.1.1 Célula Animal.....	62
3.1.2 Meio de Cultura.....	62
3.1.3 Microcarregador.....	63
3.1.4 Reagentes necessários ao cultivo.....	64
3.1.4.1 Solução de Tripsina .....	64
3.1.4.2 Solução tampão fosfato- PBS ( Phosphate Buffer Saline)..	65
3.1.5. Materiais e equipamentos empregados nos cultivos.....	65
3.1.6. Materiais e equipamentos empregados nos ensaios de detecção da proteína desintegrina.....	66
<b>3.2 Métodos Analíticos.....</b>	<b>67</b>
3.2.1 Determinação do número de células.....	67
3.2.2 Determinação da viabilidade celular.....	67
3.2.3 Determinação da Adesão Celular.....	67
3.2.4 Determinação da concentração de glicose.....	68

3.2.5	Teste de atividade caseínolítica.....	68
3.2.6	Dosagem de proteínas totais.....	69
3.2.7	Determinação da desintegrina.....	69
<b>3.3</b>	<b>Procedimento Experimental .....</b>	<b>70</b>
3.3.1	Descongelamento de células.....	70
3.3.2	Cultivo nas garrafas de cultura.....	70
3.3.3	Cultivo no frasco spinner.....	71
3.3.4	Determinação da massa seca.....	74
3.3.5	Concentração e clarificação da amostra retirada do cultivo em frasco Spinner.....	74
3.3.6	Detecção da Proteína Recombinante.....	75
3.3.7	Purificação da Proteína Desintegrina em meio CHO-S-SFM II condicionado das células CHO-ZMD.....	75
3.3.8	Purificação da proteína em meio DMEM contendo 10% de FBS.....	76
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>79</b>
4.1	Detecção da proteína - ensaios preliminares.....	79
4.2	Cultivos com o microcarregador Pronectin F em meio livre de soro.....	82
4.2.1	Primeiro Ensaio.....	84
4.2.2	Segundo Ensaio.....	86
4.3	Detecção e quantificação da desintegrina –Estudos Complementares.....	91
4.3.1.	Detecção e quantificação por “dot blot”.....	91
4.3.2.	Purificação parcial da desintegrina por cromatografia por troca iônica. ....	93



4.3.3. Detecção de desintegrina produzida com suplementação de hemolinfa ao meio de cultivo.....	100
4.3.4. Detecção de desintegrina produzida com suplementação de soro fetal bovino ao meio de cultivo.....	105
<b>4.4 Comparação entre as análises das amostras aplicadas.....</b>	<b>107</b>
<b>4.5 Análise da ocorrência de degradação da proteína recombinante.....</b>	<b>112</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>116</b>
<b>6. SUGESTÕES.....</b>	<b>119</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>126</b>

## RESUMO

Desintegrinas são proteínas presentes no veneno de serpentes que têm despertado interesse da indústria farmacêutica por sua capacidade de impedir a progressão de células cancerígenas. Uma proteína-chave receptora chamada integrina direciona a formação de novos vasos sanguíneos instruindo as células do tumor a crescerem e se espalharem. A desintegrina atua como um inibidor que bloqueia essa interação. Para que quantidades substanciais de desintegrina possam ser produzidas em escala industrial, realizou-se a expressão da mesma em células CHO-K1, produzidas por clonagem do ADN característico retirado das glândulas produtoras do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Normalmente as células CHO-K1 são cultivadas em meio contendo soro fetal bovino. No entanto, a presença do mesmo no meio de cultivo dificulta as etapas de detecção, extração e purificação da proteína de interesse. O objetivo deste trabalho foi estudar o crescimento de células CHO-K1 e a produção da desintegrina em meio livre de soro, assim como desenvolver uma metodologia para a detecção e quantificação da desintegrina presente no meio. Os cultivos foram realizados em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> e 150cm<sup>2</sup> e posteriormente em frasco spinner com um volume de 500mL, incubados em estufa com uma quantidade de CO<sub>2</sub> controlada em 10% v/v, pH entre 7,0 a 7,4, a uma temperatura de 37 °C em condições de agitação brandas. As células foram cultivadas na presença do microcarregador sólido Pronectin F, que possibilita a obtenção de uma alta concentração de células. Os meios de cultura DMEM e CHO-S-SFM II foram utilizados nos cultivos por um processo de adaptação gradual para um meio livre de soro, reduzindo-se a proporção de meio com soro a cada troca, até que fosse totalmente substituído para o meio livre de soro. As células foram mantidas em meio 100% livre de soro durante 6 h com a retirada de 250 ml após 3 h e o restante após 6 h de cultivo. Para a detecção da desintegrina, as amostras foram primeiramente filtradas em filtro Millipore e o filtrado concentrado em ultrafiltro Amicon e centrifugadas em membranas Centriprep e Centricon. A desintegrina, proteína de ~70KDa presente nas amostras tratadas, foi detectada utilizando-se equipamento Bio Dot em membrana de nitrocelulose incubada com anticorpos específicos. As amostras foram aplicadas em coluna de troca iônica e as frações obtidas aplicadas em membrana de nitrocelulose. Nos cultivos realizados em meio livre de soro com o microcarregador Pronectin F foi atingida uma concentração celular máxima de  $1,74 \cdot 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>, a qual é ligeiramente inferior ao valor alcançado nos cultivos em meio contendo soro ( $2,7 \cdot 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>). Entretanto no que se refere à formação do produto o resultado na membrana de nitrocelulose evidencia a presença da desintegrina no meio de cultivo livre de soro. Cultivos realizados em meio suplementado com 1% v/v de hemolinfa apresentaram concentração celular máxima de  $2,6 \cdot 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> em frasco Spinner, com um volume de 200mL e utilizando microcarregador Citodex 1. O método de detecção desenvolvido foi efetivo na identificação da proteína de interesse nas amostras retiradas do cultivo em meio contendo hemolinfa. Testes preliminares demonstraram que a proteína pode estar degradando gradativamente em meio de cultivo ou ficando retida na coluna de troca iônica.

## ABSTRACT

Disintegrins are proteins present in the poison of serpents that have been calling the pharmaceutical industry attention due to their capacity to prevent the progression of cancerous cells. A receiving key-protein called integrin addresses the formation of new blood vessels instructing the tumor cells to increase and spread. The disintegrin acts as an inhibitor that blocks this interaction. In order to produce substantial amounts of disintegrin in industrial scale, its expression in CHO-K1 cells was carried out by cloning the characteristic DNA extracted from the poison producing glands of the serpent *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Usually CHO-K1 cells are cultivated in medium containing bovine fetal serum. However, its presence in the cultivation medium hinders the stages of detection, extraction and purification of the protein of interest. The objective of this work was to study the CHOZMD cell growth and the disintegrin production in serum free medium, as well as to develop a methodology for the detection and quantification of the disintegrin present in the medium. The cultivations were carried in culture bottles of 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> and 150cm<sup>2</sup> and later in spinner flask with a volume of 500mL, incubated with an amount of CO<sub>2</sub> controlled in 10% v/v, pH between 7.0 to 7.4, a temperature of 37 °C, under agitation conditions. The cells were cultivated in the presence of the microcarrier Pronectin F which enables the attainment of high cell concentration. The culture media DMEM and CHO-S-SFM II were used in the cultivations by means of a gradual adaptation process for a serum free medium, through the reduction of DMEM+serum proportion at each change, until that it was totally replaced by the serum free medium. The cells were maintained in 100% serum free medium during 6h with the withdrawal of 250 ml after 3 h and of the remaining volume after 6h of cultivation. For the detection of the disintegrin, the samples were initially filtered in Milipore filter, then concentrated in ultra filter Amicon and finally centrifuged in membranes Centriprep and Centricon. The disintegrin, protein of ~70kDa, present in the treated samples was detected using Bio Dot equipment with nitrocelulose membrane incubated with specific antibodies. The samples were applied in ion exchange column and the fractions obtained applied in nitrocelulose membrane. In the cultivations carried out in serum free medium with the microcarrier Pronectin F a maximum cell concentration of 1.74.10<sup>6</sup> cel.ml<sup>-1</sup> was reached, which is slightly inferior to the value reached in the cultivations in medium containing serum (2.7.10<sup>6</sup> cel.mL<sup>-1</sup>). However, concerning product formation, the immunodetection results revealed the presence of the disintegrin in the cultivations carried out with serum free medium. Cultivations carried out in spinner flask, with a volume of 200mL and using microcarrier Citodex 1 and medium supplemented with 1% hemolymph (v/v) presented maximum cell concentration of 2.6.10<sup>6</sup> cel.mL<sup>-1</sup>. The detection method developed was effective in the identification of the target protein in the samples from the cultivation medium containing hemolymph. Preliminary tests demonstrated loss of protein might be related to gradual degradation in cultivation medium or retention in ion exchange column.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática de um procedimento típico de clonagem.....	09
<b>Figura 2.</b> Domínios estruturais das SVMPs.....	12
<b>Figura 3.</b> Esquema de proliferação de uma célula tumoral.....	16
<b>Figura 4.</b> Modelo de Adesão Celular de interações célula-matriz e célula-célula.....	19
<b>Figura 5:</b> Esquema ilustrativo de um frasco spinner.....	23
<b>Figura 6.</b> Cultivo de células CHO recombinantes em suspensão utilizando frasco spinner contendo um volume de 200 mL de meio CHO-S-SFM suplementado com diferentes proporções de soro fetal bovino, sob agitação de 65rpm. A legenda indica a quantidade de meio livre de soro em relação ao volume total de cultivo.....	31
<b>Figura 7.</b> Esquema da separação de macromoléculas por diálise. ....	41
<b>Figura 8.</b> Cuba de eletroforese em gel poliacrilamida. ....	42
<b>Figura 9.</b> Princípio da cromatografia de afinidade.....	47
<b>Figura 10.</b> Fluxograma do processo de purificação de uma metaloprotease recombinante pró-atrolisina E, originária do veneno de serpente da <i>Crotalus atrox</i> , expressa em células HEK-293.....	55
<b>Figura 11.</b> Fluxograma do processo de purificação de uma proteína recombinante originária do veneno de serpente <i>Crotalux atrox</i> expressa em células Sf9.....	57
<b>Figura 12.</b> Fluxograma do processo de purificação da proteína recombinante do veneno de serpente da <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i> , expressa em células CHOZMD cultivadas em meio DMEM .....	59
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática da metodologia empregada para tratamento das amostras obtidas em cultivos de células CHOZMD em Frasco Spinner para a produção de desintegrina.....	77
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática do tratamento aplicado às amostras obtidas em cultivos em frasco spinner de células CHOZMD para produção de	

desintegrina, para realização de ensaio de imunodeteção e purificação em HPLC.....	78
<b>Figura 16.</b> Amostras do cultivo de célula CHOZMD com o microcarregador Cytodex 1 em meio DMEM com 1% de soro, analisadas por eletroforese em gel poliacrilamida 15% para deteção de desintegrina. ....	79
<b>Figura 17.</b> Deteção da proteína obtida em cultivo da célula CHOZMD, utilizando o microcarregador Cytodex 1 em meio sem soro CHO-S-SFM II, por “dot blot”.....	81
<b>Figura 18.</b> Deteção da desintegrina produzida em cultivos da célula CHOZMD utilizando microcarregadores e meios de cultivo diferentes.....	82
<b>Figura 19.</b> Crescimento celular, viabilidade e consumo de glicose durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 1). Trocas de meio realizadas nos instantes indicados por M.Composição do meio a cada troca descrita na Tabela 15. Os valores experimentais encontram-se no Apêndice A.....	85
<b>Figura 20.</b> Crescimento celular, viabilidade e consumo de glicose durante cultivo da célula CHO-K1 com microcarregador Pronectin F em frasco spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 2). Trocas de meio realizadas nos instantes indicados por M. Composição do meio a cada troca descrita na Tabela 16. Os valores experimentais encontram-se no Apêndice A.....	87
<b>Figura 21.</b> Formação de agregados de células viáveis em suspensão. (200x Escala=50µm).....	88
<b>Figura 22.</b> Crescimento celular, viabilidade e consumo de glicose durante cultivo da célula CHO-K1 com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 300mL de meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. As setas indicam os momentos de troca de meio.....	90
<b>Figura 23.</b> Células CHOZMD aderidas a uma partícula do microcarregador Pronectin F (200x, Escala=50µm).....	90

<b>Figura 24.</b> Relação do número de células por partícula de microcarregador referente aos cultivos realizados em frasco spinner com um volume de trabalho de 500mL, considerando que o Pronectin F apresenta $3,9 \cdot 10^5$ partículas/g de microcarregador. Os valores experimentais se encontram no Apêndice A. ....	91
<b>Figura 25.</b> Identificação da proteína desintegrina em duplicata. Amostras retiradas ao final dos cultivos 1 e 2, realizados em meio isento de soro. ....	92
<b>Figura 26.</b> Construção da curva padrão utilizando como padrão proteína Alternagin-C aplicando 100µl de cada amostra em membrana de nitrocelulose. As amostras foram eluídas em TBS-1X contendo Tween 20. Os valores descritos na figura equivalem a quantidade em massa µg. ....	93
<b>Figura 27.</b> Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do primeiro ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 3 horas. Volume aplicado 500µl, HPLC Shimadzu.....	96
<b>Figura 28.</b> Imunodeteccção das frações coletadas após fracionamento das amostras dos ensaios 1 e 2. Anticorpos: anti-MD recombinante (1:500) e anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (1:5000). Volume aplicado: 100µl de cada fração, HPLC Shimadzu. Bandas 1 a 11→ Frações coletadas durante fracionamento da amostra de 3h Ensaio 1. Bandas 1*a 6*→ Frações coletadas durante fracionamento da amostra de 6h Ensaio 1. Bandas 1. a 6.→ Frações coletadas durante fracionamento da amostra de 3h Ensaio 2. Bandas 1- a 12-→ Frações coletadas durante fracionamento da amostra de 6h Ensaio 2.....	96
<b>Figura 29.</b> Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do primeiro ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 6 horas. Volume aplicado 500µl, HPLC Shimadzu.....	97
<b>Figura 30.</b> Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do segundo ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 3 horas. Volume aplicado 500µl, HPLC Shimadzu.....	97

<b>Figura 31.</b> Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do segundo ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 6 horas. Volume aplicado 500µl, HPLC Shimadzu.....	98
<b>Figura 32.</b> Ampliação da região da Figura 31 onde estão localizados os picos nos quais foi detectada a desintegrina.....	98
<b>Figura 33.</b> Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do segundo ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 6 horas. Volume aplicado 200µl, com gradiente mais suave, HPLC Shimadzu.....	100
<b>Figura 34.</b> Cultivo de célula CHOZMD em meio DMEM suplementado com 1%v/v de hemolinfa e 10% de FBS com um volume de trabalho de 200mL, utilizando o microcarregador Cytodex 1 (RAFFOUL, 2004). Os valores experimentais encontram-se no Apêndice A.....	102
<b>Figura 35.</b> Identificação da proteína desintegrina por imunodeteção em amostras concentradas obtidas no final do cultivo de célula CHOZMD em meio suplementado com 1% v/v de hemolinfa. Volume aplicado: 200 µl.....	103
<b>Figura 36.</b> Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada de cultivo com meio DMEM suplementado com 1% de hemolinfa e 10% de soro, tempo de 3 horas, em meio CHO-S-SFM. Volume aplicado 200µl, HPLC Shimadzu. ....	103
<b>Figura 37.</b> Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada de cultivo com meio DMEM suplementado com 1% de hemolinfa e 10% de soro, tempo de 6 horas, em meio CHO-S-SFM. Volume aplicado 200µl, HPLC Shimadzu.....	104
<b>Figura 38.</b> Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada após 144 horas de cultivo em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, utilizando microcarregador Pronectin F. Volume aplicado: 2mL; coluna Affi-Blue.....	106

- Figura 39.** Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina, realizado em frasco T contendo meio DMEM suplementado 10% de soro. Adição de soro interrompida 48 horas antes de retirada da última amostra. Volume aplicado ao HPLC: 500 µl, coluna Mono-Q..... 110
- Figura 40.** Identificação da proteína desintegrina em um volume de 5 µl de controle positivo obtido no cultivo de células K562- (erytroleukemia cells) em frasco T de 150cm<sup>2</sup> para produção de desintegrina em meio DMEM. O meio foi armazenado a uma temperatura de - 20°C e a fração de 5µl de controle positivo foi aplicada na data de 22/04/2003..... 113
- Figura 41.** Identificação da proteína desintegrina em um volume de 100 µl de controle positivo. A alíquota de 100 µl foi aplicada na data de 20/05/2004 após o descongelamento (tempo 0 h) e após períodos de permanência à temperatura ambiente de 4 e de 12 horas..... 113
- Figura 42.** Identificação da proteína desintegrina em um volume de 100µl de amostras concentradas retiradas ao final do cultivo em meio suplementado com 1%v/v de hemolinfa, após 3 meses de armazenamento a uma temperatura de - 20°C..... 114
- Figura 43.** Identificação da proteína desintegrina em um volume de 200µl de amostras concentradas retiradas ao final do cultivo em meio suplementado com 1%v/v de hemolinfa, após 3 meses armazenamento a temperatura - 20°C, mantidas por 48 horas à temperatura ambiente..... 114



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de produtos farmacêuticos que são produzidos comercialmente pela célula CHO.....	08
<b>Tabela 2.</b> Algumas integrinas e seus ligantes.....	15
<b>Tabela 3:</b> Principais moléculas de adesão celular (CAMs) .....	20
<b>Tabela 4.</b> Características do soro fetal bovino .....	27
<b>Tabela 5.</b> Composição do meio DMEM (Cultilab).....	28
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos em cultivos de células BHK21 recombinantes com adaptação para o meio livre de soro CHO-S-SFM II .....	30
<b>Tabela 7.</b> Produção de trombopoetina e crescimento celular em cultivos de células CHO empregando diferentes meios.....	32
<b>Tabela 8.</b> Composição do meio livre de soro (SFM) projetado para produção da trombopoetina humana (hTPO) em células de Ovário de Hamster Chinês (rCHO), o qual foi adicionado ao meio IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) como suplemento. ....	33
<b>Tabela 9.</b> Algumas proteínas com interesse farmacêutico.....	36
<b>Tabela 10.</b> Técnicas de separação mais usadas para purificação em larga escala.....	39
<b>Tabela 11.</b> Classificação das técnicas de cromatografia líquida. ....	51
<b>Tabela 12.</b> Informações adicionais referentes ao microcarregador Pronectin F.....	64
<b>Tabela 13.</b> Composição da solução de tripsina.....	64
<b>Tabela 14.</b> Composição da solução de PBS.....	65
<b>Tabela 15.</b> Quantidade adicionada de meio DMEM e CHO-S-SFM II referentes às trocas realizadas no primeiro ensaio em Frasco Spinner.....	86
<b>Tabela 16.</b> Quantidade adicionada de meio DMEM e CHO-S-SFM II referentes às trocas realizadas no segundo ensaio em Frasco Spinner.....	89
<b>Tabela 17.</b> Perfil de eluição do gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl aplicados em comatógrafo das amostras condicionadas e concentradas referente ao cultivo de células CHOZMD para a produção de	

desintegrina.....	94
<b>Tabela 18.</b> Perfil de eluição do gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl aplicados em comatógrafo das amostras condicionadas e concentradas referente ao cultivo de células CHOZMD para a produção de desintegrina procurando adicionar um gradiente mais suave em relação a tabela 17.....	99
<b>Tabela 19.</b> Concentração celular, volume inicial de amostra e intensidade da coloração da banda para as diferentes amostras concentradas submetidas ao ensaio de imunodeteção. Volume final da amostra concentrada: 1 a 1,5 mL.....	107
<b>Tabela 20.</b> Frações de maior volume obtidas na separação cromatográfica das amostras coletadas nos cultivos realizados em meio livre de soro e em meio suplementado com hemolinfa (Figuras 27, 29, 30, 31, 36 e 37) e a análise da intensidade de coloração da banda quando aplicadas ao teste de imunodeteção (Figuras 28 e 35). Valores da medida da absorbância dos picos obtidos (UA), volume da fração injetado na coluna Mono-Q com os respectivos tempo de retenção e volume das frações aplicado na membrana de nitrocelulose.....	108
<b>Tabela 21.</b> Atividade proteolítica, dosagem de proteínas totais e atividade específica das amostras concentradas obtidas ao final dos cultivos da célula CHOZMD.....	111
<b>Tabela A1.</b> Valores dos dados experimentais das células em suspensão, células aderidas e viabilidade durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 1) .....	127
<b>Tabela A2.</b> Valores dos dados experimentais do consumo da glicose durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 1).....	128
<b>Tabela A3.</b> Valores dos dados experimentais das células em suspensão, células aderidas e viabilidade durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 2).....	129

<b>Tabela A4.</b> Valores dos dados experimentais do consumo da glicose durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 2).	130
<b>Tabela A5.</b> Valores dos dados experimentais das células em suspensão, células aderidas e viabilidade durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Citodex 1 em Frasco Spinner com um volume de 200mL de meio de cultura DMEM suplementado com 1% v/v hemolinfa (RAFFOUL, 2004).....	131
<b>Tabela A6.</b> Relação do número de células por partícula de microcarregador referente ao cultivo realizado em Frasco Spinner considerando que o Pronectin F apresenta $3,9 \cdot 10^5$ partículas/g de microcarregador (Ensaio 1).....	132
<b>Tabela A7.</b> Relação do número de células por partícula de microcarregador referente ao cultivo realizado em Frasco Spinner considerando que o Pronectin F apresenta $3,9 \cdot 10^5$ partículas/g de microcarregador (Ensaio 2)....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACL:** *Agkistrodon contortrix laticinctus*, uma serpente crotálica
- ADAMS:** proteína multimodular que apresenta os domínios da metaloprotease e similar a desintegrina (**A Desintegrin And Metalloproteases**)
- CAMs:** grupo de moléculas de adesão celular
- CHO-K1:** células de ovário de hamster chinês (Chinese Hamster Ovary)
- CHO-S-SFM** Meio livre de soro, Gibco, para o cultivo de célula CHO
- II:**
- CHOZMD:** Células CHO-K1 contendo DNA característico da desintegrina
- kDa** kDalton(s), unidade de massa molecular
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- DMEM:** meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
- ECD:** sequência tripeptídica de aminoácidos (ácido glutâmico, cisteína, ácido aspártico)
- EGF:** fator de crescimento epitelial (**E**pithelial **G**rowth **F**actor)
- ECM:** Matriz extracelular
- FBS:** Soro fetal bovino
- HPLC:** cromatografia líquida de desempenho (High Performance Liquid Chromatography)
- MPS:** metaloproteases
- PBS:** Phosphate buffer solution
- pCDNA3:** Vetor de expressão da desintegrina
- SDS:** Dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio (Sodium Duodecyl Sulfate)
- SDS-PAGE:** eletroforese com gel poliacrilamida com SDS (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
- SVMPs:** metaloproteases de veneno de serpente (**S**nake **V**enom **M**etalloproteases)
- TBS:** Solução tamponada com NaCl e Tris (Tris Buffered Saline)

## **1. INTRODUÇÃO**

A produção de proteínas para fins terapêuticos a partir de culturas de células animais vem se tornando comercialmente interessante com o desenvolvimento de tecnologia para expressão e purificação de proteínas em larga escala. Além dos aspectos relacionados à produção de proteínas, um considerável esforço de pesquisa vem sendo feito para caracterizar a estrutura das mesmas, o que possibilita a descoberta de novas estruturas e a utilização deste conhecimento para projetar drogas e desenvolver outras estratégias terapêuticas, como, por exemplo, expressar apenas um domínio ativo de uma proteína.

A proteína a ser empregada em uma aplicação terapêutica pode ser obtida a partir de sua fonte original ou a partir de organismos geneticamente modificados. O aparecimento das chamadas “proteínas recombinantes” oferece novos meios para o desenvolvimento de medicamentos contra doenças, entre elas o câncer. Atualmente o câncer constitui a segunda causa morte por doença no Brasil. Em 1994, as neoplasmas foram responsáveis por 10,8% dos 887.594 óbitos registrados (INCA 2002). Dentre as várias estratégias que vêm sendo investigadas para o tratamento do câncer, destaca-se a possibilidade de minimizar a formação do tumor por meio da redução do suprimento de sangue que as células cancerígenas necessitam para crescerem. Uma proteína-chave receptora chamada de integrina é quem direciona a formação de novos vasos sanguíneos. Ligando-se a outras proteínas, como a angiostatina e a endostatina, produzidas pelas células tumorais;

a integrina modifica sua forma ao se ligar ao seu ligante, permitindo a ela enviar sinais químicos instruindo as células do tumor a crescerem e se espalharem (*SCIENCE EXPRESS*, 2002).

Pelo conhecimento das interações moleculares entre esse receptor e seu ligante, vem sendo estudada uma nova proteína denominada desintegrina, que pode ser classificada como um inibidor que bloqueia essa interação e assim, previne ou evita a progressão e a angiogenese do tumor que pode escapar para a corrente sanguínea e entrar em metástase. Esta proteína apresenta a característica de atuar de forma a impedir a adesão de uma célula à outra. No caso de interagir com a integrina, a desintegrina atua na destruição dos componentes da matriz extracelular. Por esse motivo a célula não se adere a nenhum outro componente da matriz e, conseqüentemente não se adere a outra célula, não podendo ligar-se, evitando assim que ocorra a metástase (IEMMA, 2002).

As desintegrinas inicialmente isoladas a partir de venenos de serpentes serviram como matéria-prima para os estudos sobre suas propriedades terapêuticas. No entanto, a produção de desintegrina em larga escala se torna economicamente mais promissora se a tecnologia de DNA recombinante for empregada. Dentre os possíveis hospedeiros, a célula animal CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) se destaca por ser capaz de realizar modificações tradicionais, além de apresentar outras características interessantes, como um bom desenvolvimento celular (BUTLER, 1991; CARTWRIGHT, 1994; DOYLE e GRIFFITHS, 1998). Além da modificação genética, são necessários estudos sobre

as condições de cultivo das células CHO recombinantes (composição do meio de cultivo, microcarregadores mais adequados, concentração de inóculo, etc) assim como da efetiva capacidade das mesmas em expressar a proteína de interesse com estrutura física e funcional idêntica à encontrada na proteína extraída do veneno de serpente.

Normalmente as células CHO-K1 são cultivadas em meio contendo soro fetal bovino, componente fundamental para o crescimento satisfatório de células animais. No entanto, como o soro fetal bovino contém uma grande quantidade de proteínas, a presença do mesmo no meio de cultivo dificulta as etapas posteriores de detecção, extração e purificação da proteína de interesse. Com a intenção de minimizar a interferência dos componentes do meio de cultura na purificação da proteína de interesse assim como reduzir seu custo de sua produção, estudos mais recentes têm demonstrado que é possível alcançar níveis satisfatórios de crescimento celular empregando meios com baixo teor de proteínas, isentos de soro fetal bovino. A utilização de meios com baixo teor de proteínas para cultivos de células animais cujo produto é incorporado em medicamentos também vem sendo recomendada pela FDA (Food and Drug Administration), para evitar riscos de contaminações por vírus ou prions que podem estar presentes no soro fetal bovino (HANSEN, *et al.*, 1997; CRUZ *et al.*, 1998; WONG *et al.*, 2002; SUNG *et al.*, 2003).

Para a obtenção de desintegrina e sua utilização em medicamentos também é necessária a busca por métodos de separação eficientes e de custo reduzido para

separação e purificação da mesma, extraíndo-a do meio de cultura aonde ocorre o crescimento das células animais (HALDANKAR *et al.*, 1999; SUNG *et al.*, 2003). Diversos trabalhos podem ser encontrados na literatura, apresentando métodos elaborados para a purificação de desintegrina presente no veneno de serpentes. No entanto, estudos sobre a produção de desintegrina em culturas de célula CHO são escassos. Por outro lado, embora existam vários trabalhos envolvendo clonagem de cDNA para diversas desintegrinas de venenos de serpentes para fins de estudos de suas características adesivas e terapêuticas, até o presente momento, poucos trabalhos têm descrito a expressão de proteínas recombinantes em células animais envolvendo a produção das SVMPs (SHIMOKAWA *et al.*, 1996; JIA *et al.*, 1997; IEMMA, 2002).

Inicialmente para a produção de desintegrina, o cDNA que codifica uma SVMP da classe PIII, a ACLD, foi isolado e identificado por Selistre-de-Araújo e colaboradores em 1997, da glândula venenífera da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*. O produto desta clonagem foi introduzido em células CHO-K1 originando as células CHOZMD pelo trabalho de Iemma em 2002. Os estudos efetuados com esta célula recombinante confirmaram a produção da desintegrina e a ação inibidora dessa molécula na adesão celular (IEMMA, 2002). Para o desenvolvimento dos estudos visando o aumento do rendimento celular e ampliação de escala de produção para obtenção de maiores quantidades de desintegrina, foi feita uma parceria entre a Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre-de-Araújo do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar e o Prof. Dr.



Cláudio Alberto Torres Suazo do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, levando à implantação do Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular no Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Em 2003, Swiech iniciou os trabalhos com a célula CHOZMD, avaliando e comparando o desempenho de uma nova técnica de cultura, o cultivo de células em microcarregadores, com o intuito de selecionar o mais apropriado para a obtenção de altas concentrações celulares. Outros estudos, abordando diferentes aspectos dos cultivos das células CHOZMD e visando sempre a obtenção de maiores concentrações celulares, vêm sendo desenvolvidos deste então, tais como a suplementação do meio de cultivo com hemolinfa (RAFFOUL, 2004) e o desenvolvimento de tecnologia para o cultivo em biorreatores (QUERINO e SANTIAGO, 2004). Em todos os trabalhos citados anteriormente, o crescimento e a viabilidade celular foram as principais variáveis avaliadas. No entanto, a produção de desintegrina, informação fundamental para a comparação entre as alternativas de processos, ampliação de escala e otimização das condições de cultivo, assim como para elucidar a cinética de formação de produto em cultivos de células animais, não foi abordada. O presente trabalho se insere dentro do projeto global de cultivo das células CHOZMD, tendo como contribuição o desenvolvimento e a consolidação de uma metodologia eficiente, confiável e relativamente simples para detectar e quantificar a desintegrina produzida ao longo do cultivo.

## **1.1 OBJETIVOS DO TRABALHO**

O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de metodologia para detecção e quantificação da proteína recombinante desintegrina produzida em cultivos de células CHOZMD em frasco spinner utilizando-se microcarregadores.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A revisão bibliográfica apresentada a seguir aborda os assuntos relacionados ao objetivo deste trabalho, incluindo a descrição da estrutura e propriedades das proteínas integrina e desintegrina, considerações sobre a metodologia de cultivo celular em microcarregadores, os diferentes meios de cultivos empregados e a apresentação de alternativas para os processos posteriores de separação e purificação da proteína em questão.

### **2.1. CÉLULA CHO-K1**

As células CHO (Chinese Hamster Ovary) foram obtidas pela primeira vez de um hamster adulto em 1957 (BUTLER, 1991). Os hamster e humanos têm mecanismos de glicosilação de proteínas por serem eucariotos. Por esse fato a células CHO, que é uma célula eucariótica, é muito utilizada para expressar proteínas. O sistema eucariótico desta célula possui organelas que glicosilam proteínas e a glicosilação é um passo importante para as proteínas. Além disso esta célula apresenta um bom desenvolvimento, incluindo um baixo tempo de duplicação, além de possuir a característica de célula ancorante. Sendo consideradas as mais utilizadas para expressão de proteínas glicosiladas, as células CHO-K1 são capazes de produzir proteínas heterólogas, o que, aliada à sua adaptação ao desenvolvimento em meio com soro facilita a secreção do produto para o meio extracelular (DOYLE e GRIFFITHS, 1998). Por esse motivo foi escolhida a célula CHO-K1 para expressar a proteína. Alguns produtos farmacêuticos licenciados que são produzidos pelas células CHO se encontram

detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de produtos farmacêuticos que são produzidos comercialmente pela célula CHO (CARTWRIGHT,1994).

<b>Produto</b>	<b>Uso clínico</b>	<b>Sistema de Produção</b>
Beta-interferon	Câncer, infecção viral	Vários
Eritropoietina	Anemia	Garrafas giratórias
Ativador tecidual plasminogênico	Trombose	Tanque agitado
Fator VIII	Hemofilia	Vários
Antígeno superficial hepatite B	Vacina	n.c.*
Fator estimulante da colônia de granulócitos	Quimioterapia	Tanque agitado
Antígeno hepatite B	Vacina	n.c.*

\* n.c. nada consta

### 2.1.1 Engenharia Genética – Tecnologia do ADN recombinante.

O processo de clonagem consiste em inserir basicamente um fragmento de ADN num plasmídeo a fim de produzir numerosas cópias do ADN (Figura 1). A replicação tem normalmente lugar quando o plasmídeo se introduz num hospedeiro apropriado (ex: uma bactéria ou uma célula de levedura) e o aparelho de síntese do ADN do hospedeiro replica o ADN inserido na célula hospedeira. Normalmente, o ADN corresponde a uma pequena porção do genoma de uma célula e encontra-se representado por uma ou duas cópias por célula. Antes da extração do ADN, é necessário obter uma quantidade suficiente de células. Depois de se ter obtido um número suficiente de células, contendo o material genético de interesse, as células são rompidas e o material genético extraído.

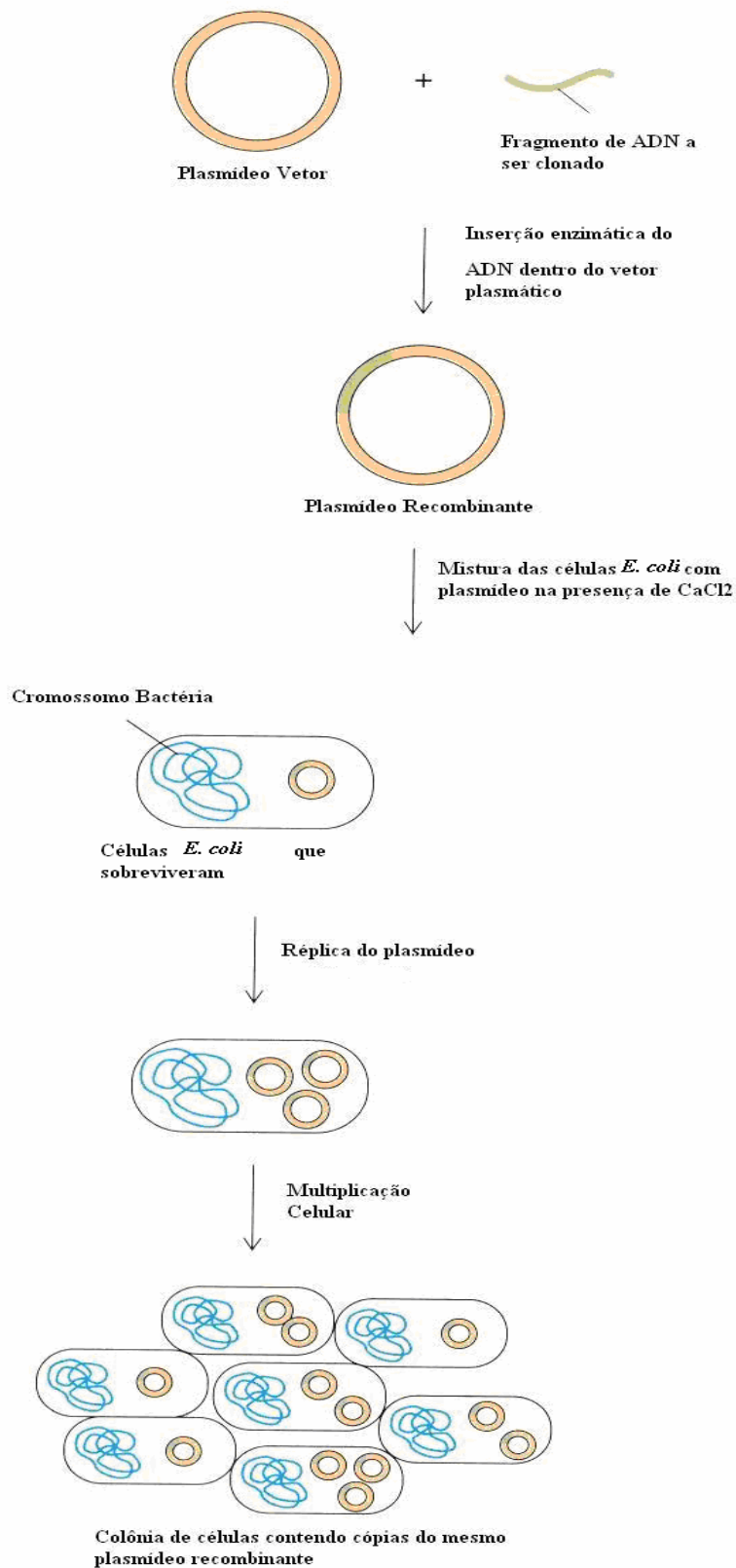


Figura 1 – Representação esquemática de um procedimento típico de clonagem (NICHOLL, 1994).

Primeiramente seleciona-se um plasmídeo adequado (vetor) para a inserção de um gene determinado (ADN). Um vetor é uma molécula de ADN à qual o ADN estranho pode ser ligado e posteriormente inserido nas células de modo a que o ADN «recombinante» possa replicar. Existem vários tipos de vetores utilizados nos procedimentos de clonagem. Dentre estes, os mais frequentes são os plasmídeos e bacteriófagos (vírus bacterianos), uma vez que se introduzem facilmente nas células e são manipulados no laboratório independentemente do tipo (NICHOLL, 1994).

Tanto o ADN como o vetor tem seqüências de ADN específicas (4 - 6 pares de bases) nas quais endonucleases de restrição “cortam” as cadeias do ADN. *In vitro* mistura-se o fragmento de ADN contendo o gene a ser clonado e em outro tubo, o plasmídeo no qual o gene será inserido, com a endonuclease de restrição escolhida. A enzima escolhida deverá cortar o plasmídeo num só local. O plasmídeo cortado pode então receber uma porção adicional de ADN. Incuba-se os fragmentos de ADN e os plasmídeos cortados e abertos, com a enzima ligase que liga fragmentos de ADN e plasmídeos. Desta ligação resulta um plasmídeo recombinante que contém o fragmento de ADN desejado. As células que adquiriram os plasmídeos dizem-se «transformadas» e, neste caso, são resistentes ao antibiótico ampicilina.

Especificamente para a produção da desintegrina, o cDNA que codifica uma SVMP da classe PIII, a ACLD, foi isolado e identificado por Selistre-de-Araújo e colaboradores em 1997, a partir da glândula venenífera da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Esse cDNA foi subclonado em *E. coli*, a qual passou a expressar a metaloprotease/desintegrina na sua forma madura e

contendo o domínio desintegrina rico em cisteína. O produto desta clonagem levou à obtenção do ADN plasmidial denominado pCDNA3ZMD. Após a confirmação da subclonagem, o ADN pCDNA3ZMD foi introduzido em células CHO-K1 originando nas células CHOZMD. Os trabalhos efetuados com esta célula recombinante confirmaram a produção da desintegrina e a ação inibidora dessa molécula na adesão celular (IEMMA, 2002).

## **2.2. ESTRUTURA E PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS INTEGRINA E DESINTEGRINA**

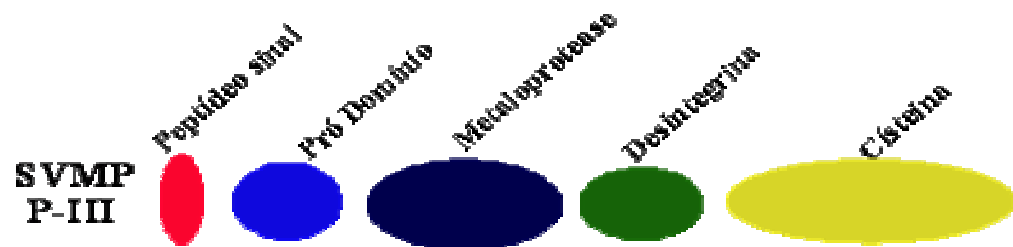
Para se conseguir separar uma dada proteína é necessário o estudo das suas propriedades físico-químicas. A concepção do processo ótimo de separação tem de explorar estas propriedades da maneira mais eficiente possível de forma a conseguir a desejada separação. A caracterização de uma proteína passa fundamentalmente pelo conhecimento da sua carga elétrica, peso molecular, hidrofobicidade, ponto isoelétrico e interações bioespecíficas disponíveis.

### **2.2.1. Desintegrinas**

Os venenos são misturas complexas de proteínas (cerca de 90 % do peso seco), compostos orgânicos de baixa peso molecular e compostos inorgânicos. As SVMPS, metaloproteases multimodulares encontradas no veneno bruto, são divididas em quatro classes de acordo com seus domínios (HITE *et al.*, 1994). As SVMPS da classe P-III possuem domínio desintegrina seguido de um domínio rico em cisteína (SHIMOKAWA *et al.*, 1997). A classe P-III contém a seqüência

tripeptídica ECD (ácido glutâmico, cisteína, ácido aspártico) que inibe a adesão celular ao colágeno tipo I via integrina  $\alpha 2\beta 1$  (SOUZA *et al.*, 2000; MOURA e SILVA *et al.*, 2000).

Os domínios da SVMP da classe P-III são mostrados na Figura 2, sendo sucintamente descritos a seguir (RAMOS, 2001):








-  Peptídeo Sinal
-  Pró Domínio
-  Metaloprotease ou Domínio Catalítico
-  Domínio Desintegrina
-  Domínio Rico em Cisteína

Figura 2. Domínios estruturais das SVMPs. (Extraído e modificado de STONE *et al.*, 1999).

- a) Peptídeo sinal: com a função de dirigir a proteína para sua localização subcelular ou secreção (SHAH *et al.*, 2000).



- b) Pró Domínio: regula a atividade enzimática com o zinco presente no domínio catalítico (MORGUNOVA *et al.*, 1999).
- c) Metaloprotease ou Domínio Catalítico: contém o sítio ativo enzimático, necessita de um metal para se ligar, normalmente o zinco.
- d) Desintegrina As ADAMs ancoradas na membrana podem interagir com as integrinas através do tripeptídeo, promovendo a adesão célula-célula. Em contrapartida quando presentes em proteínas livres inibem a adesão célula-célula e célula-matriz através de competição (JIA *et al.*, 1996).
- e) Domínio Rico em Cisteína: possui alta densidade de resíduos de cisteína, ocasionando a inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno (JIA *et al.*, 1999).

As desintegrinas são peptídeos desprovidos de atividade enzimática, que podem ser divididas em classes de acordo com o peso molecular. As de pequena massa molecular (entre 5 a 7 kDa) são as desintegrinas derivadas das SVMPs da classe P-II, que contém seqüências RGD (Arg-Gly-Asp) ou KGD (região desintegrina), pelas quais elas podem se ligar às integrinas da superfície plaquetária (receptores de membrana) potencializando a inibição da agregação plaquetária (KAMIGUTI *et al.*, 1996). Essas desintegrinas também são classificadas de acordo com sua estrutura monomérica, onde todas possuem seqüências RGD ou KGD na sua composição. As desintegrinas de maior peso molecular, aproximadamente 30 kDa, são derivadas da classe P-III das SVMPs. O domínio tipo desintegrina apresenta essa denominação para distinguir das desintegrinas-RGD, que podem ser classificadas como desintegrinas heterodiméricas, descobertas recentemente (IEMMA, 2002).

As desintegrinas são potentes inibidores da agregação plaquetária, por por ligarem-se especificamente a integrina  $\alpha\beta_2$ , receptor fibrinogênio. São inibidores específicos de integrinas de subfamílias  $\beta_1$  e  $\beta_2$  incluindo o receptor fibrinogênio GPIIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}/\beta_3$ ), a vitronectina ( $\alpha_v\beta_3$ ) e o receptor fibronectina ( $\alpha_5\beta_1$ ) (GASMI *et al.*, 2000).

### 2.2.2. Integrinas

O termo integrina foi aplicado em 1987 por Hynes para descrever uma família de receptores presentes na superfície celular, responsáveis pela integração do citoesqueleto intracelular com os componentes da matriz extracelular, mediando a migração e adesão celular. Essas interações são cruciais para diversos processos fisiológicos tais como: diferenciação celular, desenvolvimento embrionário, transdução de sinais, resposta imunológica, manutenção da estrutura celular, metástase tumoral etc (WAGNER e WYSS, 1994).

As integrinas são um grupo de moléculas de adesão celular (CAMs) expressas nos mais variados tipos celulares. Esses receptores na forma de heterodímeros são compostos de duas subunidade,  $\alpha$  e  $\beta$ , ligadas por ligações não covalentes. As combinações entre os vários tipos de subunidade é o que forma os mais de 20 tipos de integrinas existentes e define sua alta afinidade e especificidade pelos ligantes (ALBERTS *et al.*, 1994). As integrinas são responsáveis pela interação da matriz extracelular (junção, posição, estímulo mecânico, estímulo químico) à célula.

Nos mamíferos, pelo menos 22 tipos de integrinas compostas de 17 tipos de subunidades  $\alpha$  e 8 tipos de subunidades  $\beta$  são conhecidos. Uma simples cadeia  $\beta$  pode interagir com múltiplas cadeias  $\alpha$ , formando integrinas que unem diferentes ligantes. A Tabela 2 apresenta algumas integrinas e seus respectivos ligantes. Essa variedade de integrinas e seus ligantes na matriz extracelular permitem à célula migrar para o lugar certo durante a morfogênese do tecido e ajuda a esculpir o plano do corpo de um embrião.

Tabela 2. Algumas integrinas e seus ligantes (LODISH *et al.*, 1999).

Subunidades		Ligantes
$\beta_1$	$\alpha_1$	Colágeno, laminina
	$\alpha_2$	Colágeno, laminina
	$\alpha_3$	Fibronectina, laminina
	$\alpha_4$	Fibronectina, VCAM-1
	$\alpha_5$	Fibronectina
	$\alpha_6$	Laminina
	$\alpha_7$	Laminina
$\beta_2$	$\alpha_V$	Fibronectina, vitronectina
	$\alpha_L$	ICAM-1, ICAM-2
	$\alpha_M$	C3b, fibrogênio, fator X, ICAM-1
$\beta_3$	$\alpha_X$	Fibrogênio, C3b
	$\alpha_{IIb}$	Fibrogênio, fibronectina, fator de von Willebrand, vitronectina, trombospondina
$\beta_3$	$\alpha_V$	Fibrogênio, fibronectina, fator de von Willebrand, vitronectina, trombospondina, osteopontina, colágeno

### 2.3. ADESÃO CELULAR

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm como característica principal o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, alterando a estrutura genética (ADN) das células, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA, 2002). O que o torna tão letal é o seu crescimento invasivo, que pode comprometer órgãos vitais, e a sua capacidade de metastatização, a formação de um novo tumor à distância do tumor original, sem continuidade com este (GOMES, 1997). Para metastatizar, células tumorais têm que se desprender de sua localização original, invadir o tecido local, penetrar em um vaso sanguíneo ou linfático, viajar pela circulação até um local distante e estabelecer uma nova colônia celular (RUOSLATHI, 1996). A Figura 3 mostra um esquema ilustrativo da proliferação do câncer.

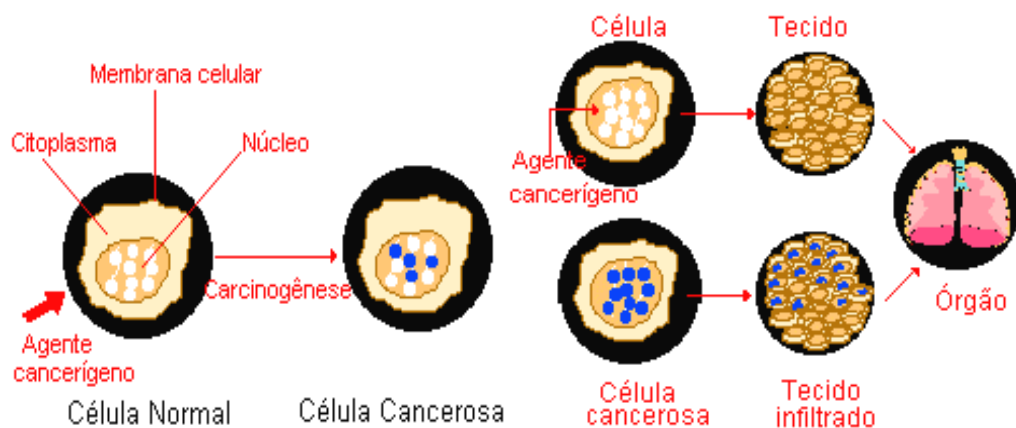


Figura 3. Esquema de proliferação de uma célula tumoral (INCA, 2002) .

As células podem sofrer alterações nos genes e a partir daí o material genético que foi alterado passa a fornecer instruções erradas para as atividades celulares. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais. Essas células diferenciadas são denominadas cancerosas.

Estudos recentes têm investigado o papel de moléculas genericamente chamadas de Moléculas de Adesão Celular (*Cell Adhesion Molecule – CAM*) na invasão local, um passo importante no processo de metastatização. Essas moléculas mediam a adesão entre as células e entre estas e a matriz extracelular. Esses estudos demonstraram que a diminuição da expressão das moléculas de adesão nas células cancerosas, com a conseqüente diminuição da coesão entre estas, parece exercer papel importante no processo de invasão local, tanto ao facilitar que as células cancerosas se desprendam do tumor, quanto ao induzir a estas uma maior mobilidade (STEINBERG e FOTY, 1997; FOTY *et al.*, 1998; GRIMSTAD, 1987). A diminuição da adesão celular entre células cancerosas também parece estar relacionada com a morfologia dos tumores. Tumores benignos geralmente apresentam uma interface nítida e regular com o tecido normal. Já em tumores malignos, a interface com o tecido normal é irregular e rugosa (GOMES, 1997).

Por outro lado, sabe-se que processos biológicos que envolvem a reprodução celular, tais como cicatrização de feridas, desenvolvimento embrionário e o próprio desenvolvimento tumoral, implicam na reorganização

espacial das células, e que esta reorganização também é dependente das CAM. Um dos principais mecanismos de reorganização celular envolvendo as CAM é o da **adesão celular**.

A **adesão celular** é atração entre dois corpos sólidos, com superfícies de contato comuns, produzida pela existência de forças atrativas intermoleculares de ação a curta distância. O termo adesão celular descreve todas as formas de comunicação celular devido ao contato direto entre células ou entre células e a matriz extracelular (Figura 4). O mecanismo de adesão é um processo de múltiplos passos envolvendo quatro fases: adsorção, contato, junção e propagação (GRINELL, 1978).

1. Adsorção. Um fator importante para a adsorção é a natureza química da superfície, sendo que a adesão a uma superfície sólida provoca o aumento da viabilidade celular. O primeiro estágio de adsorção requer a presença de proteínas, que podem ser fornecidas pelas próprias células ou através de soro. O fator importante é a presença de cargas negativas. Superfícies tais como vidro e metal que tem altas energias de superfície são então convenientes para adesão de células.
2. Contato. As superfícies de células separadas possuem microtubos (SPRINGER *et al.*, 1976), que estão envolvidos no próximo estágio.
3. Junção. Uma vez feito o contato por meio de micro-extensões citoplasmáticas, essas estruturas adicionais desaparecem da superfície da célula. Eles são essenciais para superar as forças eletrostáticas entre células carregadas negativamente e a carga negativa na superfície de junção.
4. Propagação. Uma vez anexada a célula, a mesma se estende e, no primeiro

estágio, a espalha-se. No último estágio de propagação, a célula se espalha, envolvendo componentes do citoesqueleto, incluindo microfilamentos e microtubos.

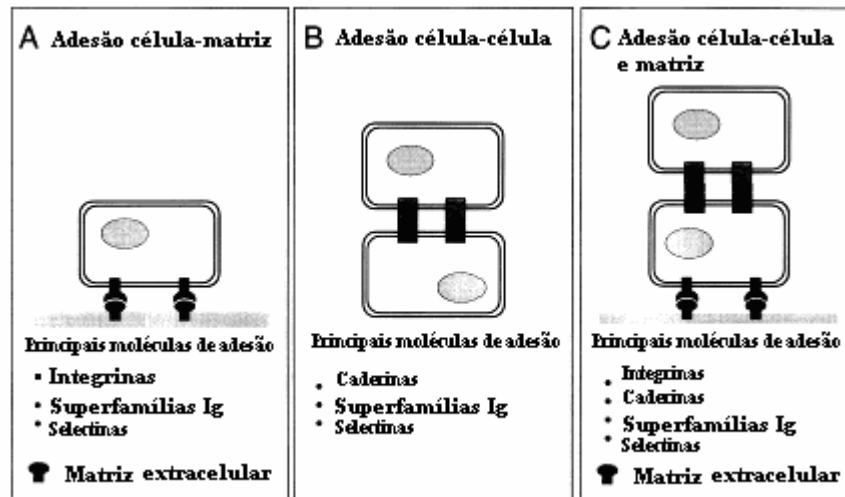


Figura 4. Modelo de Adesão Celular de interações célula-matriz e célula-célula (LOSTER, 1999).

Finalmente, a presença de componentes bioquímicos da célula (glicoproteínas) determina se uma célula é dependente de ancoramento ou não (HYNES e ADEUS, 1974). As glicoproteínas tem um peso molecular de  $2-2,5 \times 10^5$ . Outros fatores que influenciam a junção seriam a concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , a presença de grupos sulfídricos e a temperatura de incubação.

O termo “adesão celular” descreve todas as formas de comunicação celular devido ao contato direto entre células ou entre células e a matriz extracelular. A adesão celular foi um elemento chave durante a evolução: a adesão específica célula-célula foi essencial ao desenvolvimento de organismos multicelulares e representa juntamente com a adesão célula-matriz um papel fundamental na regulação da célula, embriogênese, morfologia, fisiologia do tecido e regeneração (DRIESCH, 1897; SPEMANN, 1906; WILSON, 1907; HOLTFRETER, 1939).

A perda de certas moléculas de adesão em células tumorais pode levar à migração das células para outros tecidos. As moléculas de adesão conferem à célula um tipo de endereço. Elas podem ancorar células em tecidos específicos ou "endereçar" células migrantes a determinadas regiões do corpo. As principais moléculas de adesão são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Principais moléculas de adesão celular (CAMs).

Selectinas	As selectinas interagem com açúcares nas glicoproteínas e na matriz. Promovem uma adesão fraca inicial que pode dar início às etapas posteriores
Caderinas	Moléculas de adesão dependentes da concentração de $Ca^{+2}$ . São importantes para adesão das células de um mesmo tecido. Ex. E-caderina nos epitélios. Associam-se ao citoesqueleto.
Integrinas	São moléculas importantes na adesão das células à lâmina basal e demais componentes da matriz extracelular, assim como na interação linfocitária. Diferentes integrinas são expressas em tecidos diferentes, que possuem matriz e tipos celulares diferentes.
ICAMs	InterCellular Adhesion Molecules. Pertencem à superfamília das imunoglobulinas. Ex: V-CAM vascular, E-CAM endotélio, N-CAM no tecido nervoso

## 2.4. CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMAIS

A tecnologia envolvida na exploração das células animais está de perto associada com a utilizada em processos tradicionais da fermentação microbiana, cultivos de bactérias e fungos. As características de culturas de células animais são, entretanto, significativamente diferentes de tais culturas microbianas. Em



geral, o desenvolvimento é menor, as células são mais frágeis e os nutrientes requeridos são mais complexos (BUTLER, 1991).

Uma das maiores dificuldades no manuseio de células animais é a manutenção de culturas livres de contaminação *in vitro*, necessitando de técnicas assépticas rígidas. Após a descoberta em 1940 de antibióticos tais como a penicilina e estreptomicina, a incorporação dos mesmos ao meio de cultura de células animais contribuiu para minimizar a ocorrência de contaminação. Entretanto, um significativo avanço na habilidade para iniciar culturas de células livres de tecido foi o uso da tripsina, também empregada posteriormente em subculturas de células dependentes de ancoramento. Esta técnica, inicialmente introduzida por Ross e Jones em 1916, não foi completamente desenvolvida até 1950, quando possibilitou o estabelecimento de populações de células homogêneas. Isto encorajou um maior emprego da cultura de células em laboratório, após uma variedade de células mostrarem características de ótimo desenvolvimento *in vitro* (BUTLER, 1991). Os avanços técnicos e o aparecimento de um grande número de companhias comerciais que investiram no desenvolvimento de meios, soros e uma gama de outros produtos necessários para linhagens celulares, fizeram do cultivo celular uma tecnologia viável.

#### 2.4.1. Vantagens e desvantagens do Cultivo Celular

No cultivo celular em meio líquido é possível controlar precisamente o ambiente e a composição do meio de cultivo. Em um cultivo podem ser controlados todos os fatores físico-químicos (pH, temperatura, pressão osmótica,

níveis de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ), e fisiológicos (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular,...).

Células animais geneticamente modificadas são as mais indicadas para a produção de proteínas complexas, originalmente secretadas por mamíferos. Para exercerem funções terapêuticas, estas proteínas necessitam passar por uma série de modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação, sialização, amidação, sulfatação e formação de ligações de enxofre (MAINS *et al.*, 1987). As células animais são capazes de secretar proteínas na sua forma ativa e com modificações pós-traducionais corretas, tornando possível a síntese *in vitro* de produtos comercialmente interessantes.

Em contrapartida, o cultivo celular apresenta algumas desvantagens. Em comparação com os cultivos de microrganismos, o cultivo de células animais requer o emprego de técnicas mais elaboradas e de condições de assepsia mais rigorosas, apresentando dificuldades a nível instrumental e exigindo pessoal qualificado para a manipulação. Meios de cultura complexos, fragilidade mecânica, baixa velocidade de crescimento e necessidade de desenvolvimento contínuo de linhagens são características das células animais. O custo de produção é alto. Além dos custos de meios, nutrientes, reagentes e equipamentos necessários para o cultivo, como a quantidade obtida da proteína de interesse é muitas vezes pequena, os processos de extração e purificação envolvem várias etapas, algumas com relativa sofisticação tecnológica, encarecendo o produto final. Outro problema comumente encontrado em cultivos de células animais é a instabilidade das linhagens, ocasionando variação na concentração celular e na composição de um cultivo para outro.

#### 2.4.2. Frasco Spinner

Os biorreatores tipo Frasco-Spinner são projetados para cultivar células animais (GRIFFITHS 1995, WANG *et al.*, 2002). Um típico Frasco Spinner (Figura 5) é feito de copo de borossilicato, com um cabo conectado ao agitador que contém o ímã. As aberturas laterais podem ser usadas para inoculação, retirada de amostras, adição ou remoção de meio de cultura, entrada de eletrodo de pH, fornecimento de oxigênio ou gás carbônico etc. Outro tipo de frasco spinner é equipado com um agitador na forma de esfera preso à tampa do frasco. O fundo é ligeiramente convexo para ajudar na agitação, promovendo uma mistura suave e homogênea em todo o conteúdo do frasco. Em geral, os frascos spinner são utilizados em cultivos de células em suspensão, porém, podem ser adaptados para o cultivo de células dependentes de ancoramento. O preço do equipamento é uma das limitações principais quando comparado com outros dispositivos de cultura de células (KUMAR, 2004). No entanto, a produtividade é mais alta em comparação com a obtida em culturas estáticas (KUMAR *apud* IBARRA *et al.*, 2002).

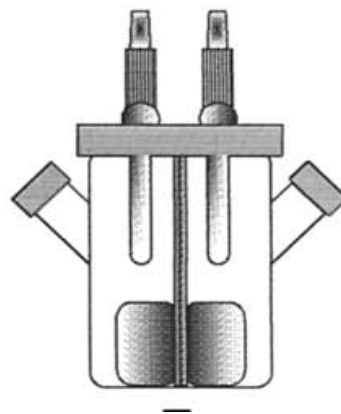


Figura 5. Esquema ilustrativo de um Frasco Spinner (adaptado de KUMAR, 2003).

### 2.4.3. Microcarregadores

As células animais dependentes de ancoramento crescem na superfície de pequenas partículas denominadas microcarregadores (aproximadamente 100 a 250 $\mu$ m de diâmetro), que são mantidas em suspensão no meio de cultivo.

O emprego da tecnologia de cultura de células em microcarregadores permite o aumento da capacidade de produção de biomoléculas, devido à razão extremamente alta entre a área da superfície e o volume disposto por microcarregadores, possibilitando assim alto rendimento sem necessidade de equipamentos volumosos. Outras vantagens do sistema de microcarregadores são facilidade de controle, redução do trabalho e do risco de contaminação. Os microcarregadores podem ser obtidos a partir de uma grande variedade de materiais, como vidro, sílica, dextrana e plásticos. Como desvantagens desta tecnologia, destaca-se a dificuldade em remover as células das partículas e a ocorrência de forças de cisalhamento que podem prejudicar células frágeis, devido às freqüentes trocas de meio (SIGMA SOLOHILL).

### 2.4.4. Meios de cultivo

Em geral, para garantir um bom crescimento em cultivos de células animais é necessário acrescentar ao meio: glicose como fonte de carbono e energia, aminoácidos, soro fetal bovino (FBS), sais e antibióticos, como penicilina e estreptomicina. O uso de antibióticos em meios para cultivo celular deve ser considerado mais como uma medida adicional de segurança, mas não como um método de esterilização de meio de cultura.

A temperatura e o pH são algumas das condições operacionais acompanhadas durante o cultivo das células animais. A maioria das células animais é cultivada a 37°C. A temperatura é fator de grande importância para a célula, pois influencia o metabolismo, a síntese e a degradação de proteínas secretadas no produto. Dependendo da linhagem celular, a diminuição da temperatura ao longo do cultivo acarreta em perdas nas taxas de síntese protéica (MATHER *et al.*, 1990). O pH do meio deve ser ajustado entre 7,2 e 7,4. Para pequena escala, até 1L de cultura, bons resultados para o controle do pH podem ser obtidos apenas agindo sobre as mudanças de coloração do indicador vermelho de fenol presente nos meios. Ele é vermelho quando o pH é 7,4; torna-se laranja no 7,0; amarelo no 6,5; amarelo limão quando o pH está abaixo de 6,5; rosa no pH de 7,6 e púrpura a 7,8.

O correto suprimento tanto de oxigênio como de gás carbônico é importante para a obtenção de um alto rendimento de produto, pois estes gases possuem funções metabólicas. O CO<sub>2</sub> contribui para o controle do pH do meio e o oxigênio é considerado nutriente chave do meio de cultura. O gás carbônico desempenha um papel mais complexo que o oxigênio dentro do meio de cultivo, pelo fato de suas ações estarem inter-relacionadas, como por exemplo, o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> diminui o pH do meio de cultivo das células. (CARTWRIGHT, 1994).

A presença de aminoácidos essenciais, ou seja, aqueles que não são sintetizados pelo organismo, é fundamental para o desenvolvimento da cultura. A concentração dos mesmos usualmente limita a obtenção da concentração máxima de células, podendo influenciar na sua sobrevivência e taxa de crescimento.

cistina, glutamina, isoleucina e serina são os aminoácidos utilizados mais rapidamente pelas células e portanto, são os primeiros a serem consumidos.

Além de ter importância fundamental no metabolismo, a glutamina é precursora da síntese de ácidos nucleicos assim como uma importante fonte de carbono e fonte primária de nitrogênio para a célula através das reações de transaminação utilizadas para a síntese do ácido nucleico. É um dos aminoácidos mais instáveis e se decompõe no meio de cultura formando ácido carboxílico e amônia. Um adequado suprimento de glutamina é também importante por ela participar da formação das moléculas envolvidas na adesão célula substrato (BLANCH e CLARK, 1997).

Os sais contendo íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{HCO}_3^-$  são os principais componentes que contribuem para a osmolaridade do meio. Os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  regulam o potencial da membrana, enquanto que os íons  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{HCO}_3^-$  são precursores nutricionais de macromoléculas além de reguladores da carga intracelular.

Para o cultivo de células CHO-K1 utiliza-se soro fetal bovino, cujas principais características estão descritas na Tabela 4, devido a grande quantidade de fatores que estimulam o crescimento presentes no soro. O soro é, usualmente, um componente essencial para a cultura de células animais e sua ausência pode ocasionar um baixo crescimento de células. Ele possui duas funções vitais. A primeira consiste em auxiliar a adesão das células às superfícies de cultura, provavelmente pelo suprimento de glicoproteínas envolvidas neste processo. A segunda é promover a proliferação de células devido à presença de fatores de crescimento e hormônios responsável por estimular a divisão celular.

Tabela 4. Características do soro fetal bovino (Adaptado Gibco).

Descrição	Meio
Endotoxinas	0,356 mg/mL
pH	7,4
Proteínas Totais	3,8 g /100 mL
Albumina	2,3 g /100 mL
Insulina	10 mU / mL

2.4.4.1 Meios de cultivo com alto teor de proteína, contendo soro fetal bovino.

Tradicionalmente, as células CHO-K1 são cultivadas em meios em complexos, suplementados com soro fetal bovino. O meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) é o mais empregado. Ele consiste em uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Age como uma solução nutritiva em cultivo celular. Destina-se a cultura de células humanas e de tecidos ou células animais. Este meio é fornecido na forma em pó e líquida. Na forma em pó ele tem a vantagem de se manter estável por mais de 24 meses se conservado bem fechado e em geladeira. Determinadas células crescem muito bem com esse meio, como células de pulmão fetal, rins e linhagens celulares.

O meio de cultura deve conter uma grande reserva de nutrientes essenciais para suportar o crescimento das células, principalmente no ciclo final da cultura, onde usualmente mais de  $10^6$  células/mL estão presentes. O meio DMEM é o mais indicado quando se está trabalhando com uma alta densidade de células, possivelmente devido ao fato da concentração de certos aminoácidos essenciais e

vitaminas ser muito superior aos dos demais meios de cultura. A composição do meio DMEM é apresentada na Tabela 5. As principais características físico-químicas do meio DMEM são descritas abaixo.

Tabela 5. Composição do meio DMEM (Cultilab).

<b>Sais Inorgânicos</b>		<b>mg/L</b>		
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	265,00		L-serina	42,00
Fé(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0,10		L-treonina	95,00
KCL	400,00		L-triptofano	16,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200,00		L-tirosina	104,20
NaCL	6.400,00		L-valina	94,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	125,00			
NaHCO <sub>3</sub>	3.700,00		<b>VITAMINAS</b>	<b>mg/L</b>
			Cloreto de Colina	4,00
			pantotenato de cálcio	4,00
			ácido fólico	4,00
<b>Aminoácidos</b>	<b>mg/L</b>		Inositol	7,20
L-arginina.HCL	84,00		Nicotinamida	4,00
L-cistina	62,57		piridoxal.HCL	4,00
L-glutamina	548,00		Riboflavina	0,40
Glicina	30,00		tiamina.HCL	4,00
L-histidina.HCL.H <sub>2</sub> O	42,00			
L-isoleucina	105,00		<b>Outros</b>	<b>mg/L</b>
L-leucina	105,00		<b>Componentes</b>	
L-lisina.HCL	146,00		Glicose	4.500,00
L-metionina	30,00		piruvato de sódio	110,00
L-fenilalanina	66,00		vermelho de fenol	15,00

#### CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEIO DMEM:

- Aspecto : Pó ou líquido róseo e homogêneo
- Tamanho das Partículas : aproximadamente 20 microns
- Solubilidade: solução límpida na concentração de uso 1X
- pH a 25°C (Sem NaHCO<sub>3</sub>) : 6,3 ± 0,5
- pH a 25°C (Com NaHCO<sub>3</sub>) : 7,7 ± 0,5



-Osmolaridade (sem NaHCO<sub>3</sub>) : 234 ± 5%

-Osmolaridade (com NaHCO<sub>3</sub>) : 310 ± 5

#### 2.4.4.2. Meios de cultivo isentos de soro

Embora alguns processos de cultivo industrial ainda empreguem a suplementação com soro, por razões técnicas e econômicas, os processos mais novos estão sendo direcionados para o uso de meios de cultura com teor de soro reduzido ou por meios livres de soro. Apesar de sua importância para o crescimento e a adesão, a utilização do soro apresenta dificuldades em função da variabilidade entre os diferentes lotes de soro, que pode ter um impacto significativo no desempenho da cultura. Além disso, o soro é relativamente caro, apresentando um custo de aproximadamente 200 dólares por litro (GIBCO). Outras desvantagens da utilização do soro são a possibilidade de contaminação por vírus, bactérias, fungos e a presença de uma grande quantidade de proteínas que podem complicar o processo de separação e purificação do produto (CARTWRIGHT, 1994).

Os meios isentos de soro inicialmente consistiam em formulações enriquecidas com insulina, transferina, albumina e outros materiais protéicos de origem animal. No entanto, a preocupação com a possibilidade destes materiais de origem animal levarem a contaminação por vírus ou prions, estimulou os esforços para projetar meios mais definidos, livre de componentes derivados de animais. Destaca-se ainda que o uso de meios com baixo teor de proteínas pode facilitar e simplificar os processos de purificação, contribuindo para melhorar a recuperação do produto e baixar o custo de produção (WONG *et al.*, 2002).

O meio CHO-S-SFM II (meio livre de soro), desenvolvido pela empresa Gibco, é um dos resultados destes esforços. Ele é um meio de cultura celular complexo, livre de soro, com baixo teor de proteínas (<100 µg/mL), aperfeiçoado para o crescimento e manutenção de células CHO (Chinese Hamster Ovary) para produção de proteínas recombinantes. Schüt *et al.* (1997) comprovaram o crescimento de células CHO recombinantes em cultura em monocamada utilizando meio CHO-S-SFM II.

Cruz *et al.* em 1998, cultivaram células BHK21 (Baby Hamster Kidney) recombinantes com adaptação gradual para o meio livre de soro CHO-S-SFM II. De acordo com os resultados reproduzidos na Tabela 6, obteve-se uma concentração celular máxima de  $0,9 \cdot 10^6$  cel/mL<sup>-1</sup> e uma viabilidade de 79% com a adição de apenas 0,5% de soro fetal bovino.

Tabela 6. Resultados obtidos em cultivos de células BHK21 recombinantes com adaptação para o meio livre de soro CHO-S-SFM II (adaptado de CRUZ *et al.*, 1998).

Meio	Soro (%)	Dias para Confluência	Células Aderidas	Células em suspensão
CHO-S-SFM II	5	3	Morfologia normal	Poucas
	2,5	5	Morfologia normal	Algumas
	1	6	Alguns agregados	Muitos
	0,5	7	Agregados	Muitos
	0	9	Agregados	Muitos

Haldankar *et al.* em 1999, cultivaram células CHO recombinantes em suspensão utilizando frasco Spinner e adaptando-as para um meio livre de soro (CHO-S-SFM) com o objetivo de produzir hormônio de crescimento humano (hGH). Pela Figura 6 pode-se observar que a concentração celular máxima obtida

foi de aproximadamente  $1,0 \cdot 10^6$  cel. mL<sup>-1</sup> e que a viabilidade celular foi de 85% quando o cultivo foi conduzido em meio contendo 0,1% de FBS.

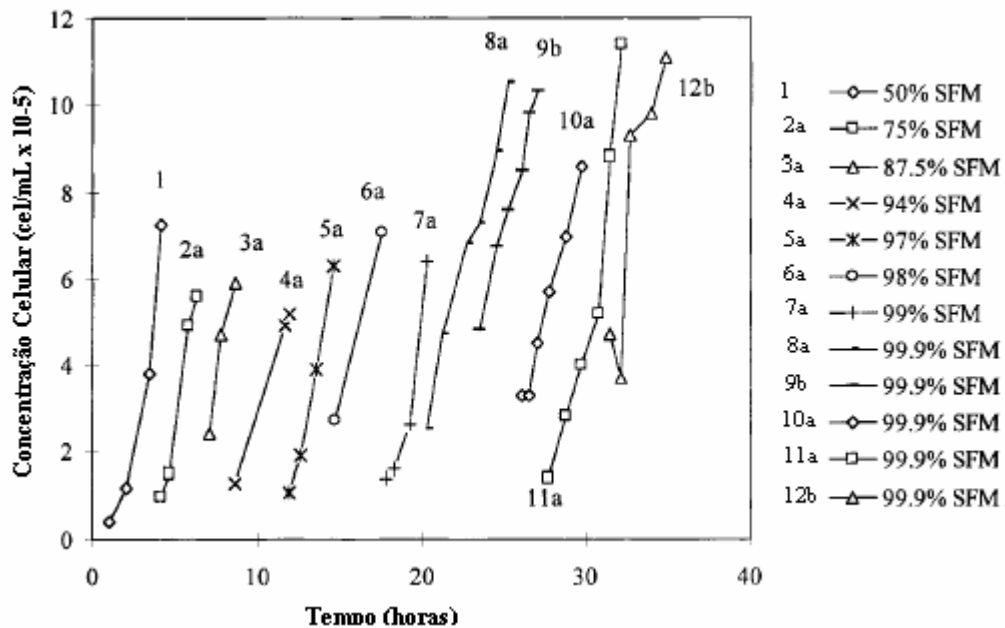


Figura 6. Cultivo de células CHO recombinantes em suspensão utilizando frasco spinner contendo um volume de 200 mL de meio CHO-S-SFM suplementado com diferentes proporções de soro fetal bovino, sob agitação de 65rpm. A legenda indica a quantidade de meio livre de soro em relação ao volume total de cultivo (Haldankar *et al.*, 1999).

Ainda de acordo com (HALDANKAR *et al.*, 1999), a adaptação das células CHO em meio CHO-S-SFM apresentou um efeito positivo no processo de purificação do produto, facilitando a regeneração das colunas e a eliminação dos passos de concentração. O uso de um meio livre de soro mostrou ser vantajoso para a obtenção de um produto secretado como hormônios de crescimento, contribuindo para diminuir o tempo e aumentar a eficiência do processo de purificação (HALDANKAR *et al.*, 1999).

Sung *et al.* (2003) estudaram a produção de uma trombopoetina e o crescimento de células CHO em culturas em suspensão empregando meio livre de

soro suplementado com extrato de levedura em substituição ao soro. O extrato de levedura é um produto comercial de baixo custo, consistindo em misturas indefinidas de componentes de baixo peso molecular, incluindo aminoácidos, peptídeos, vitaminas e outros elementos, que são freqüentemente utilizados como aditivos em meios livre de soro (SFM) por serem necessários como nutrientes em cultivos celulares (DONALDSON E SHULER 1998; NYBERG *et al.*, 1999; HEIDEMANN *et al.*, 2000). Os resultados obtidos nos experimentos realizados e a composição do meio SFM utilizado nos cultivos por Sung e colaboradores se encontram resumidos na Tabela 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7. Produção de trombopoetina e crescimento celular em cultivos de células CHO empregando diferentes meios (adaptado de Sung *et al.*, 2003).

Meio	Concentração Celular Máxima ( $10^6$ cel. mL <sup>-1</sup> )	Concentração Máxima de hTPO ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )
SFM + YH (5g.L <sup>-1</sup> ) *	1,5 ± 0,8	40,41 ± 4,12
SFM	0,99 ± 0,05	3,50 ± 0,03
CHO-S-SFM II	1,10 ± 0,39	6,18 ± 0,64
IMDM + 10% dFBS*	4,42 ± 0,36	14,42 ± 2,3

\* IMDM- Iscove's modified Dulbecco's medium.

dFBS - Soro Fetal Bovino dializado.

YH – Extrato de levedura.

Os autores verificaram um aumento de 294% na produção de qhTPO e um prolongamento da longevidade de cultura em 2 dias para o meio suplementado com extrato de levedura, em relação ao meio SFM. Além disso, a viabilidade celular no cultivo com meio SFM suplementado com extrato de levedura foi mais alta do que com quaisquer outros meios testados, mantendo-se em 50% ao final do

cultivo e resultando em menor liberação de proteases e glicosidasas de células mortas.

Tabela 8. Composição do meio livre de soro (SFM) projetado para produção da trombopoetina humana (hTPO) em células de Ovário de Hamster Chinês (rCHO), o qual foi adicionado ao meio IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) como suplemento.

<b>Componente</b>	<b>Concentração (mg. L<sup>-1</sup>)</b>
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	2
CuCl <sub>2</sub>	0,0025
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1
L- Alanina	12,5
L- Leucina	105
L-Triptofan	16
L-Lisina.HCl	146
Insulina humana recombinante	5
Citrato Férrico	2
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,017
Etanolamina	3
Fosfatidilcolina	5
Pluronic F68	1.000
Putrescina	1

Outro aspecto importante destacado por Sung e colaboradores foi a maior retenção da atividade biológica da proteína recombinante produzida no cultivo em meio suplementado com extrato de levedura em comparação com a obtida nos cultivos com outros meios. Este fato é atribuído pelos autores à presença de componentes no extrato de levedura que contribuem para a diminuição da degradação proteolítica.

A degradação proteolítica pode estar relacionada à presença de proteases no meio de cultivo. No entanto, existem poucas informações disponíveis na literatura sobre proteases expressas extracelularmente por linhagens de CHO-K1. A atividade das proteases extracelulares pode ter um efeito significativo na

produção de proteínas recombinantes, interferindo diretamente com o rendimento de proteína intacta. Uma identificação das proteases produzidas e de suas especificidades em termos de substrato permitiria prever se uma proteína recombinante específica poderia ser expressa sem sofrer degradação proteolítica ou ainda possibilitar o desenvolvimento de estratégias para minimizar o efeito destas proteases (ELLIOT *et al.*, 2003).

## 2.5. MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO

A maior parte dos produtos biológicos comercializados pela indústria farmacêutica destina-se a aplicações terapêuticas (Tabela 9). Grande parte destes produtos possui uma natureza essencialmente protéica, desaconselhando-se por isso a sua utilização por via oral face às condições desnaturantes associadas aos processos de assimilação gastrintestinal. Embora outros sistemas possam constituir futuramente alternativas viáveis, praticamente todas proteínas são atualmente administradas por injeção direta ou infusão no corpo humano. Os elevados níveis de pureza exigidos pelas agências reguladoras são então plenamente justificáveis, tendo assim os processos de separação um papel fundamental na obtenção destes produtos (WALSH E HEADON, 1994).

Essas proteínas podem ser obtidas a partir de sua fonte natural, como é o caso da albumina, obtida a partir do plasma humano, ou a partir de sua produção em organismos geneticamente modificados, sendo conhecidas como proteínas recombinantes. Hoje em dia, graças aos avanços da engenharia genética, é possível produzir quantidades quase ilimitadas dessas proteínas numa variedade de hospedeiros que inclui bactérias, leveduras, células vegetais e animais. Uma

característica comum a estas proteínas é a baixa concentração que apresentam no material de origem ( $< 1 \text{ mg/cm}^3$ ), fato que origina custos de purificação elevados, que podem atingir 80 a 90 % dos custos totais de produção. Sendo assim, é de fundamental importância do ponto de vista econômico não só limitar o número de etapas do processo global de separação e purificação, mas também recorrer a etapas que proporcionem rendimentos e resoluções elevados ( DWYER, 1984).

O grande desafio do desenvolvimento de uma metodologia para separação e purificação de proteínas é o exaustivo trabalho para se encontrar as melhores estratégias, e, se for o caso, a adequação da metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para seu uso.

A metodologia de purificação de uma proteína é composta por múltiplas etapas que devem ser cuidadosamente definidas e que consistem na distinção das proteínas com base na seqüência de aminoácidos, no conteúdo de carboidratos e de lipídeos de estrutura tridimensional, na sua atividade biológica, entre outras características dessas macromoléculas.

É essencial considerar que, na maioria dos casos, as proteínas são macromoléculas muito frágeis, ou seja, sofrem facilmente alterações físico-químicas que levam à modificação ou perda de sua atividade. Até mesmo a exposição a temperaturas moderadas (como  $37^\circ\text{C}$ ) pode causar lenta e gradativa desnaturação de algumas proteínas. As proteínas também são sensíveis à oxidação, especialmente as citoplasmáticas, que se encontram, naturalmente, em um meio com potencial redutor relativamente alto e que possuam resíduos de cisteína passíveis de ser oxidados. Dessa forma, é razoável minimizar as

condições oxidantes do meio, por exemplo, através da adição de agentes redutores, como o b-mercaptoetanol, ou, simplesmente, se evitando a formação excessiva de bolhas. Muitas vezes as proteínas são instáveis quando estão em solução muito diluídas ou muito concentradas, por exemplo, abaixo de 10mM ou acima de 1mM, respectivamente (DEUTSCHER, 1990).

Tabela 9. - Algumas proteínas com interesse farmacêutico (adaptado de WALSH, 1994).

Proteínas	Aplicações
Insulina	Tratamento de diabetes
Interleucinas (IL-1, 2, 3 e 4)	Tratamento do câncer e SIDA
Interferons (a , b , g )	Tratamento do câncer, alergias e doenças infecciosas
Anticorpos monoclonais	Várias aplicações (desde tratamento do reumatismo a diagnósticos vários)
Dismutase do superóxido	Prevenção da toxicidade do oxigênio
Hormônio do crescimento	Tratamento do câncer, certos tipos de úlceras e deficiências de crescimento em crianças

Não existe uma estratégia universal para a definição de uma metodologia de purificação de uma dada proteína, sendo que a obtenção de uma proteína pura, sem contaminantes, numa única operação é um objetivo sempre a alcançar. No entanto, tal objetivo continua a constituir uma miragem e, em geral, três ou quatro passos são necessários até se atingir a pureza final requerida para uma dada aplicação. Deve-se ter sempre em mente, para qualquer metodologia de



purificação de proteínas, há três objetivos principais associados, independentemente da origem da matéria-prima (JANSONE E RYDEN, 1993):

1. Primeiro Objetivo:

- a. Separação das células;
- b. Ruptura celular e separação dos restos celulares (para proteínas intracelulares);
- c. Concentração;

2. Segundo Objetivo:

- a. Tratamento primário;
- b. Purificação de alta resolução;

3. Terceiro Objetivo:

- a. Polimento do produto final.

O primeiro objetivo consiste na obtenção de uma solução clarificada e concentrada de proteína. Muitas técnicas podem não resolver o problema de clarificação da amostra, trazendo uma série de transtornos como a obtenção de uma solução contendo ainda material em suspensão, entupimento das membranas de filtração, manipulação de um grande volume num tempo excessivamente longo, custo elevado, entre outros. Na maioria das vezes, utilizam-se técnicas de precipitação por centrifugação ou de filtração (ASENJO, 1990).

Para atingir o segundo objetivo, têm-se utilizado alguns passos intermediários de purificação, normalmente cromatográficos, onde a maior parte dos contaminantes é removida (cromatografia de afinidade, de interação hidrofóbica e troca iônica são exemplos). O uso de cromatografia de adsorção tem sido a técnica mais comum de purificação de proteínas. A cromatografia em

coluna de gel, filtração ou adsorção (DEUTSCHER, 1990) são os sistemas mais utilizados para a separação de proteínas. Apesar de existir uma lógica no emprego desses métodos, geralmente a otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, especialmente pelo fato de que mesmo quando se conhece as características físico-químicas das proteínas a serem purificadas, é muitas vezes imprevisível o comportamento delas no decorrer do processo de purificação. Nesse caso, durante a purificação, não raramente ocorrem mudanças na estrutura das proteínas, que podem provocar desde pequenas alterações nas suas características físico-químicas até modificação ou perda de sua atividade biológica.

O passo de polimento final é freqüentemente necessário para obter elevados índices de pureza, dependendo da aplicação final do produto. Se mais nenhuma propriedade do produto final pode ser explorada, uma filtração em gel deverá ser usada de modo a conseguir a separação de dímeros do produto (devido a fenômenos de agregação) ou produtos de hidrólise (devido à ação de proteases), baseada em diferentes pesos moleculares.

Sendo assim o planejamento da estratégia de purificação deverá considerar:

1. As necessidades regulamentadoras: especificações determinadas pela farmacopéia de referência, Ministério da Saúde e órgãos reguladores.
2. Aplicação final do produto: humano, veterinário, diagnóstico.
3. Fase de desenvolvimento do projeto.
4. Escala de manufatura para atender à demanda do produto.
5. Viabilidade econômica.

6. Existência de facilidades de produção ou não, devendo ser considerada, inclusive, a terceirização da produção, etc.

As técnicas mais utilizadas para a separação em larga escala estão relacionadas na Tabela 10.

Tabela 10. Técnicas de separação mais usadas em larga escala. (WHEELWRIGHT, 1987 e GARCIA, 1993).

<b>Técnicas</b>	<b>Propriedades</b>	<b>Aplicações</b>
Centrifugação	Densidade	Vírus, Proteínas
Ultrafiltração	Tamanho	Concentração
Cromatografia de Troca Iônica	Carga eléctrica	Proteínas
Cromatografia de Afinidade	Ligação específica	Anticorpos
Cromatografia de Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Proteínas
Filtração em Gel	Volume hidrodinâmico (tamanho e forma)	Remoção de sais e polimento final
Focagem Isoelétrica	Ponto isoelétrico	Proteínas
Eletroforese	Tamanho e mobilidade eléctrica	Proteínas
Diálise	Tamanho	Troca de solvente

Uma descrição sucinta dos principais métodos utilizados nas diferentes etapas de separação é apresentada a seguir.

### 2.5.1. Ultracentrifugação Zonal

A solução contendo as macromoléculas é separada de acordo com a densidade. Durante a centrifugação, cada espécie de macromolécula se move através do gradiente, de acordo com seu coeficiente de sedimentação. Após a centrifugação, as zonas individuais são recolhidas com auxílio de uma seringa.

### 2.5.2. Centrifugação Diferencial

O fracionamento celular de tecidos homogeneizados é feito por este método. O homogeneizado é centrifugado sob a força de várias gravidades por um determinado período de tempo, quantas vezes forem necessárias, de modo que diferentes classes de células sejam depositadas.

### 2.5.3. Diálise

É uma técnica útil para separar macromoléculas de componentes de baixo peso molecular presentes numa amostra. A solução contendo a macromolécula é colocada no interior do saco de diálise como mostrado na Figura 7, que é imerso em um grande volume de solvente. Após várias horas chega-se ao equilíbrio entre as concentrações dos dois meios, sendo que as macromoléculas continuam no interior do saco de diálise e as outras moléculas passam para o exterior.

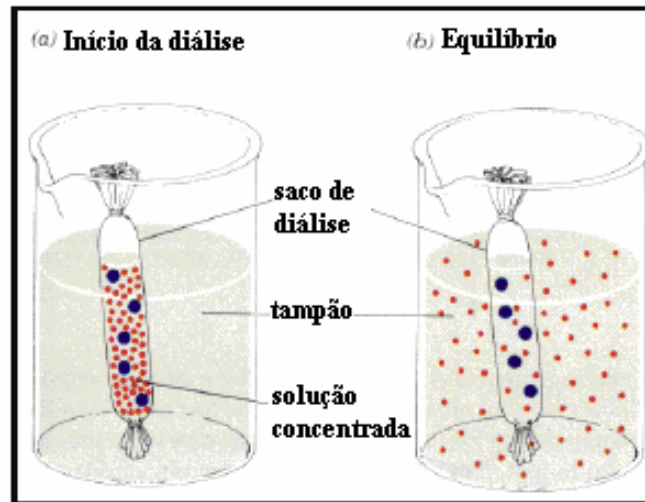


Figura 7. Esquema da separação de macromoléculas por diálise.

#### 2.5.4. Eletroforese em Gel ou PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Este método separa as proteínas em função da mobilidade eletroforética. A polimerização do gel de acrilamida é feita em tampão adequado. A amostra é dissolvida em glicerol ou sacarose (para não se misturar com o tampão) e é aplicada no topo do gel em locais apropriados como mostra a Figura 8. A corrente é aplicada e as proteínas migram em direção aos pólos de carga oposta. Decorrido o tempo necessário, o gel é removido e é feita a revelação utilizando-se azul de Coomassie ou prata. A aplicação mais comum desta técnica é na determinação do peso molecular de proteínas, através de prévia desnaturação por fervura na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e separação no gel que contém SDS, dodecil sulfato de sódio, um detergente iônico. O peso molecular da proteína desconhecida é avaliado em função da mobilidade de padrões.

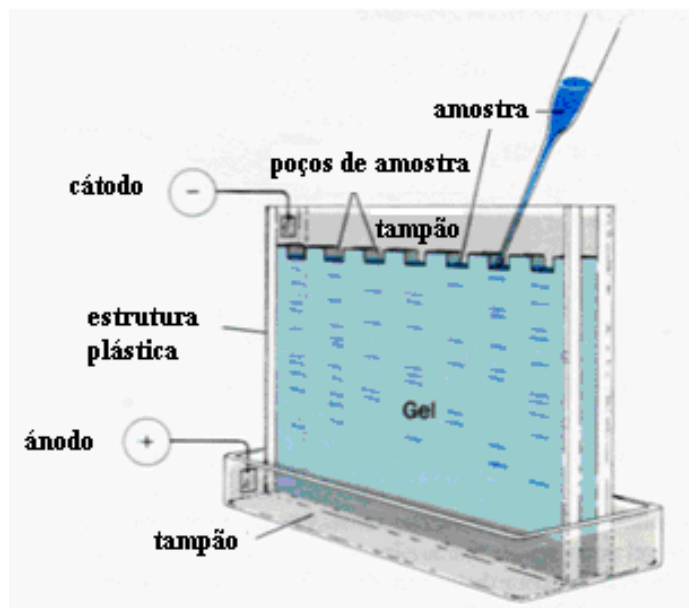


Figura 8. Cuba de eletroforese em gel poliacrilamida.

#### 2.5.5. Métodos cromatográficos para a purificação de proteínas

A seleção dos processos cromatográficos é baseada na eficiência das diferentes técnicas cromatográficas para separar a proteína de interesse dos demais componentes da mistura. Diferentes técnicas exploram diferentes propriedades nas proteínas. Com a cromatografia de troca iônica consegue-se obter uma elevada resolução mesmo com pequenas diferenças das interações eletrostáticas, sendo uma operação considerada extremamente eficiente para separar proteínas. A cromatografia de afinidade é também uma técnica com elevada resolução, normalmente com uma alta especificidade para uma proteína particular ou um pequeno grupo de proteínas, o que permite elegê-la como uma técnica quase-ideal para reduzir o número de passos de separação. Um dos inconvenientes da cromatografia de troca iônica são os elevados custos de investimento e de

manutenção, mesmo tendo em conta que o suporte poderá ser reutilizado várias vezes. A cromatografia de interação hidrofóbica permite, em geral, uma boa resolução mas nem sempre muito elevada uma vez que a distribuição de resíduos hidrofóbicos à superfície das proteínas nem sempre é suficientemente discriminadora. A filtração em gel não é normalmente usada para o fracionamento de proteínas com alta resolução devido, fundamentalmente, à baixa eficiência em explorar as diferenças na peso molecular (KNIGHT, 1989).

#### a) Cromatografia de Filtração em Gel

Este método é utilizado para a determinação do peso molecular de diferentes proteínas (geralmente desnaturadas, para que suas formas sejam as mais semelhantes possíveis). Após o empacotamento da coluna, aplica-se a amostra e é feita a eluição. As moléculas maiores, que não são capazes de penetrar nos poros do gel, serão eluídas antes das moléculas menores.

#### b) Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são divididos entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área e a outra, um fluido insolúvel na fase estacionária que escoa na mesma. A cromatografia líquida é hoje um dos principais e mais eficientes métodos de separação existentes. De maneira geral, a

técnica tem como base o princípio da adsorção seletiva. A cromatografia em coluna emprega uma grande variedade de adsorventes sólidos, incluindo sílica, alumina e sílica gel.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC do inglês High Performance Liquid Chromatography), uma variável desta técnica que hoje tem uso bastante comum, promove a adsorção de líquidos em partículas extremamente pequenas e uniformes, alcançando uma alta sensibilidade. É uma técnica cromatográfica que se baseia na separação química de componentes de uma amostra em coluna na qual a fase estacionária é um enchimento sólido de partículas de reduzidas dimensões (5-10 micra), uma fase móvel líquida que é bombeada através da coluna e sistemas de detecção contínua do eluato. Dependendo do sistema e tipo de coluna empregado pode ter cromatografia de adsorção, de partição, de troca iônica e cromatografia em gel (GPC).

A HPLC é empregada nas separações de elementos ao nível de traços em matrizes complexas, fornecendo resultados rápidos, exatos e precisos. Além disso, permite análises multielementares em uma única injeção com alta resolução, sensibilidade e seletividade, necessitando de apenas alguns microlitros de amostra

### c) Cromatografia por Troca Iônica

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é uma matriz sólida porosa contendo grupos químicos funcionais ionizados, à qual estão ligados os grupos iônicos. O material dessa matriz pode ter como base o poliestireno (resinas), a celulose ou mesmo substâncias geleiformes do tipo das que são usadas



em cromatografia de exclusão. Nos trocadores aniônicos, os grupos funcionais têm carga positiva sendo o contra-íon (com carga oposta) um anion, como por exemplo o íon cloreto. A amostra com carga oposta é atraída pela fase estacionária e as iguais caminham pela fase móvel. São exemplos deste tipo de trocadores a dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose; celulose) ou a resina de poliestireno contendo grupos funcionais, que pode ser deslocado pelos íons da fase móvel de carga similar a ele. Nos trocadores catiônicos os grupos funcionais têm carga negativa sendo o contra-íon um cátion como por exemplo o sódio. São exemplos deste tipo de trocadores a carboximetil-celulose ou a resina de poliestireno sulfonada (Dowex 50).

Durante a separação cromatográfica ocorre, numa primeira etapa (introdução da amostra e início da eluição), ligação por interações eletrostáticas entre substâncias da amostra aplicada e os grupos funcionais ionizados da matriz: o contra-íon é substituído (trocado) pelas substâncias da amostra com carga do mesmo sinal que o contra-íon.

Nesta etapa substâncias com carga do mesmo sinal que a matriz ou com fraca ligação à matriz podem ser eluídas. Numa segunda etapa as substâncias ligadas ao trocador podem ser seletivamente separadas da matriz usando outros eluentes como soluções salinas com mais altas concentrações do contra-íon ou soluções amortecedoras que provocam modificação do valor do pH de tal forma que as ligações que mantêm as substâncias unidas à matriz sejam enfraquecidas. A fase móvel é assim uma solução salina ou em distintas fases do processo distintas soluções salinas são empregadas.

#### d) Cromatografia de Afinidade

Análises de dados obtidos na literatura revelam que o método de cromatografia de afinidade é a segunda técnica de purificação mais utilizada, sendo mais efetiva do que outras técnicas cromatográficas (BONNERJEA *et al.*, 1986). O processo de adsorção por afinidade foi desenvolvido entre as décadas de 60 e 70. É uma técnica que incorpora o mecanismo de interação entre moléculas biológicas e ligantes complementares, como enzima-substrato ou antígeno-anticorpo (LOWE *et al.*, 1992).

Um ligante reage com o complexo, formando uma ligação covalente. A amostra é aplicada e a proteína que possui afinidade pelo ligante se liga a ele enquanto as demais são eluídas da coluna. A proteína de interesse é então liberada da coluna, com o uso de uma substância que tenha mais afinidade pela proteína do que o ligante ou que altere as condições de ligação entre ligante e proteína, livre de impurezas. Os princípios envolvidos na separação estão ilustrados na Figura 9, a qual representa as fases de adsorção, eluição e dessorção da proteína de interesse. A fase estacionária consiste geralmente de agarose ligada a brometo de cianogênio, formando uma ligação covalente.

Na prática, a cromatografia de afinidade consiste no preparo de uma matriz na qual a proteína de interesse, e preferencialmente somente esta proteína, se ligará reversivelmente. A matriz tem que satisfazer as seguintes características: deve ser um polímero poroso, hidrofílico e deve possuir dimensões convenientes, de forma a permitir o acesso da macromolécula no interior dos poros. Pode ser utilizada agarose (Sepharose ou BioGel UM), poliacrilamida (BioGel P), dextrana

de ligação cruzada (Sephacryl) (BOOT, 1999), sílica, etc. (CHASE, 1984), na qual um ligante se prende covalentemente. A natureza química do ligante é determinada pela especificidade biológica da proteína a ser purificada.

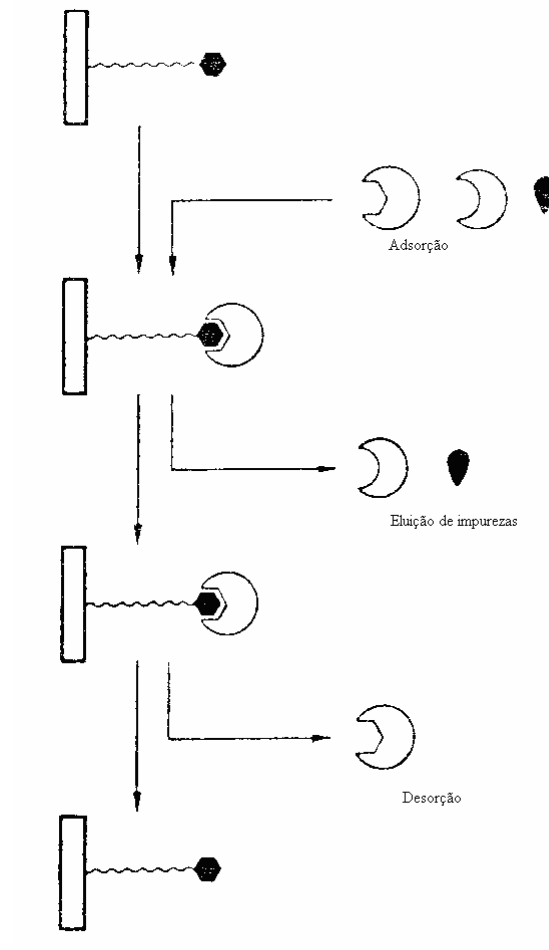


Figura 9. Princípio da cromatografia de afinidade (ASENJO e CLONIS, 1990).

A etapa de eluição ou desorção também tem que ser prevista para o sucesso da recuperação da proteína desejada. Uma enzima pode ser especificamente desorvida pela adição de uma alta concentração de substrato ou inibidor competitivo, ou mudando o pH e/ou força iônica para romper a ligação enzima-ligante (BOOTH, 1999).

De forma geral os principais requerimentos para o sucesso de uma adsorção de afinidade são (SCOPES, 1987):

- i. tanto a ligação do ligante à matriz como a ligação da proteína ao ligante não devem ser seriamente perturbadas;
- ii. interações não específicas (contaminantes) não devem ser muito grandes, ou seja, não haver outras ligações que não aquelas com a proteína de interesse,
- iii. as ligações devem ser estáveis às prováveis condições a serem usadas durante o processo, incluindo a regeneração do adsorvente.

A adsorção bioespecífica pode ser dividida em 2 principais grupos (ARVE e LIAPIS, 1987) como segue:

- Adsorção de um único componente

Neste caso, o ligante usado possui um alto reconhecimento bioespecífico de somente uma espécie. Portanto, o ligante removeria somente um componente de uma mistura complexa. Adsorção de um único componente pode também ocorrer quando um grupo específico ou geral de ligantes são usados e a composição da solução de alimentação é tal que somente uma espécie é adsorvida pelo ligante.

- Adsorção multicomponente

Ocorre quando um grupo específico de ligantes são usados e diversos compostos afins podem interagir com o ligante. Adsorventes menos específicos são obtidos quando ligantes mais gerais são empregados.

Os contaminantes por outro lado, podem ser divididos em 4 grupos de acordo com suas interações com o adsorvente:

1. contaminante que não se difunde no interior do adsorvente, como partes de células dilaceradas;
2. espécies que simplesmente se difundem no fluido retido, mas que não são adsorvidas nem por adsorção bioespecífica e nem por adsorção não específica;
3. contaminantes que se difundem no interior da partícula e são adsorvidos não-especificamente pela matriz sólida do suporte;
4. espécies que se difundem no interior da partícula e competem com os solutos de interesse pelos ligantes.

Contaminantes pertencentes ao primeiro grupo podem ser separados das partículas adsorventes por centrifugação e filtração ou por extração num sistema aquoso binário. Remoção de contaminantes que pertencem ao segundo grupo é conseguido por suspensão das partículas adsorventes numa solução tampão fraca, a qual permite ao contaminante se difundir pelas partículas porosas para dentro da solução circundante. Se a quantidade total de contaminantes presentes no interior dos poros das partículas adsorventes é grande e um produto de alta pureza é requerido, então mais que uma lavagem pode ser necessária para reduzir a concentração dos contaminantes a baixos níveis. Para a remoção dos contaminantes que pertencem ao terceiro ou quarto grupo, lavagens com uma solução tampão fraca pode não ser suficiente e métodos mais efetivos devem ser empregados, os quais podem ser equivalentes a uma eluição branda.

Na Tabela 11 a classificação das técnicas de cromatografia líquida de

acordo com as características físico-químicas das proteínas exploradas é apresentada. A condição inicial necessária para a realização da técnica, os eluentes mais comuns e as condições em que a solução de proteína ficará após sua eluição da coluna são citados. O custo geral do processo é classificado levando-se em conta os valores aproximados das colunas e dos acessórios geralmente empregados em cada técnica (OGAWA *et al.*, 2000).

Em escala laboratorial, os primeiros passos de purificação geralmente são aqueles que possuem um menor poder de resolução, porém que permitem o tratamento de grande quantidade de material como a diálise ou a precipitação com grande concentração de etanol, acetona, sais inorgânicos, etc. O sulfato de amônio é um dos agentes precipitantes amplamente usados nessa etapa. Apresenta como características a capacidade de precipitar irreversivelmente as proteínas sem aumento considerável de temperatura. Além disso, a solução final não apresenta alta densidade, facilitando a obtenção do precipitado protéico após centrifugação. Esse primeiro passo na purificação de proteínas tem como vantagem aumentar a concentração de proteína na amostra e/ou preparar a amostra para ser aplicada em uma cromatografia.

Na segunda fase, a mais eficiente da purificação de proteínas, são exploradas diferentes características físico-químicas das proteínas. Muito freqüentemente compreende o uso de diferentes técnicas de cromatografia em coluna que são classificadas de acordo com a característica protéica selecionada (Tabela 11). A filtração em gel consiste na passagem de uma solução protéica em uma coluna preenchida com uma resina (o tipo de resina especifica a resolução, a velocidade do processo e, principalmente, a faixa de peso molecular a ser

separado) que apresenta poros de uma determinada faixa de tamanho. Moléculas com diâmetro molecular menor do que o do poro serão capazes de penetrar na resina, percorrendo então um caminho mais sinuoso e maior do que as moléculas que apresentam diâmetro molecular superior ao do poro, que não seriam retidas.

Tabela 11. Classificação das técnicas de cromatografia líquida.(adaptado de OGAWA *et al.* , 2000).

Tipo de Cromatografia	Característica da Proteína	Condição Inicial da Amostra	Eluentes	Condição Final da Amostra	Custo
Gel filtração	Volume Molecular	Volume da amostra < 5% do volume da coluna	Qualquer solução aquosa	Amostra diluída em eluente	+
Troca Iônica	Carga	Baixa concentração iônica	Soluções salinas ou com pHs distintos da condição inicial	Amostra concentrada em solução salina	++
Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Alta concentração de sal	Soluções com baixa concentração salina	Amostra concentrada em solução salina	++
Fase Reversa	Hidrofobicidade	Não pode conter altas concentrações de sais	Solvente inorgânico	Amostra sem sais em solventes voláteis	+++
Afinidade	Especificidade a ligantes	Condições específicas para ligação	Alta concentração de ligantes ou sais	Amostra concentrada contendo ou não ligante	+++

As colunas de adsorção possuem, em suas matrizes, grupamentos químicos responsáveis pela interação com a proteína. Incluem-se nesse caso as matrizes que

possuem grupamentos ionizados (carregados positivamente ou negativamente) nas cromatografias de troca iônica; que apresentam grupamentos hidrofóbicos (geralmente hidrocarbonetos lineares) nas cromatografias de fase reversa ou interação hidrofóbica e que possuem ligantes específicos (como  $\text{Ni}^{+2}$ , heparina, glutationa) nas chamadas cromatografias de afinidade. As proteínas retidas na coluna são eluídas gradualmente e, o que é mais importante, seletivamente, através da passagem de um gradiente de concentração de uma substância que compete pela ligação da proteína com os grupamentos químicos da resina (por exemplo: sais para as resinas de troca iônica, solventes orgânicos para fase reversa e solução contendo ligante específico para as de afinidade).

A fase final inclui, geralmente, um único passo, que retira quaisquer contaminantes que porventura ainda estejam presentes na amostra. Pode ser uma liofilização que permita a retirada de contaminantes voláteis sob baixas pressões (em torno de 15 bar); uma diálise para excluir sais ou outras moléculas não voláteis da solução protéica, ultrafiltração, que possui o mesmo propósito que a diálise, porém tem como princípio a filtração da solução de proteína por uma membrana com poros de pequeno diâmetro (por exemplo, 20 Å), forçada por pressão, entre outras técnicas já citadas.

Durante a fase de purificação, deve-se levar em conta os seguintes itens: 1 – para uma purificação mais eficiente é aconselhável à escolha de técnicas que explorem seqüencialmente diferentes propriedades físico-químicas das proteínas; 2 – a atividade biológica da proteína deve ser acompanhada em todos os passos de purificação, assim como a quantidade total de proteína, uma vez que esses parâmetros, em conjunto, são cruciais para a avaliação da eficiência da



purificação. A atividade da proteína deve ser verificada pelo método mais simples e sensível possível. A quantificação protéica pode ser estimada pela absorção de luz na faixa do ultravioleta (209-295 nm) ou através do uso de substâncias que ou se ligam a proteínas (como o corante Azul de Coomassie) ou reagem com essas, resultando em um produto colorido (como o sulfato de cobre II presente no Reagente de Lowry). Essas duas últimas são técnicas mais específicas, porém mais trabalhosas; 3 – a purificação também pode ser acompanhada usando-se anticorpos específicos, tanto por “Dot Blotting” como por “Western Blotting”; especialmente no caso de proteínas cuja atividade não seja conhecida, 4 – o conteúdo protéico de todas as etapas deve ser avaliado por eletroforese unidimensional ou bidimensional em gel de poliacrilamida. Através dessas análises é possível verificar se a amostra se encontra no grau de pureza desejado, ou se novos passos de purificação serão necessários; 5 - é comum sacrificar razoavelmente a recuperação da proteína em prol de um grande enriquecimento; desse modo, uma boa prática é iniciar a purificação com passos simples e com menor resolução, que geralmente são baratos e de maior capacidade, e, no decorrer do processo, ir aumentando a seletividade e a resolução dos passos de purificação, que são mais caros e possuem menor capacidade; 6 – procurar manter o processo de purificação o mais simples possível, de maneira a diminuir o custo do processo, além de aumentar a recuperação da proteína em questão (DEUTSCHER, 1990).

## 2.6. PROCEDIMENTOS EMPREGADOS PARA A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DESINTEGRINA

A metodologia a ser desenvolvida para quantificação da proteína desintegrina e para que a mesma possa ser extraída do meio de cultura das células CHOZMD empregará uma série de etapas compostas por diferentes tratamentos. Os procedimentos encontrados na literatura são descritos a seguir, indicando as principais etapas do tratamento.

**Shimokawa** e colaboradores em 1996 expressaram o zimogênio recombinante de uma pró-atrolisina E (~ 51,7 kDa) de uma serpente *Crotalus atrox* secretado em meio de cultura DMEM (Gibco) livre de soro utilizando células HEK 293 (human embryonic kidney). O procedimento empregado está esquematizado na Figura 10. A partir de um volume inicial de 500 mL de meio de cultura, foi feita uma diálise contra 2 mM TrisHCl pH 8,0. Foram utilizados dois passos de cromatografia de afinidade. com o mesmo tampão, a proteína foi lavada da coluna e dialisada novamente com 20mM Tris-HCl pH 7,1, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl. A fração dialisada foi então aplicada posteriormente em coluna Affi-Gel blue (Bio-Rad Laboratories) equilibrada com o mesmo tampão, removendo desta forma colagenases endógenas e albumina, respectivamente, do meio. Posteriormente foi utilizada uma cromatografia de troca iônica coluna DEAE-celulose (DE-52) (Whatman) e em seguida uma coluna Mono-Q HR5/5 (Pharmacia). Todas as frações foram aplicadas em SDS-PAGE 10%. O rendimento da proteína pura a partir de 500mL de meio de cultura variou em torno de 50 a 100µg e o SDS-PAGE 10% indicou a presença de pro-atrolisina E

homogênea, observada em coloração de Coomassie Blue. Todas as frações foram monitoradas por análise de Western blot e SDS-PAGE.

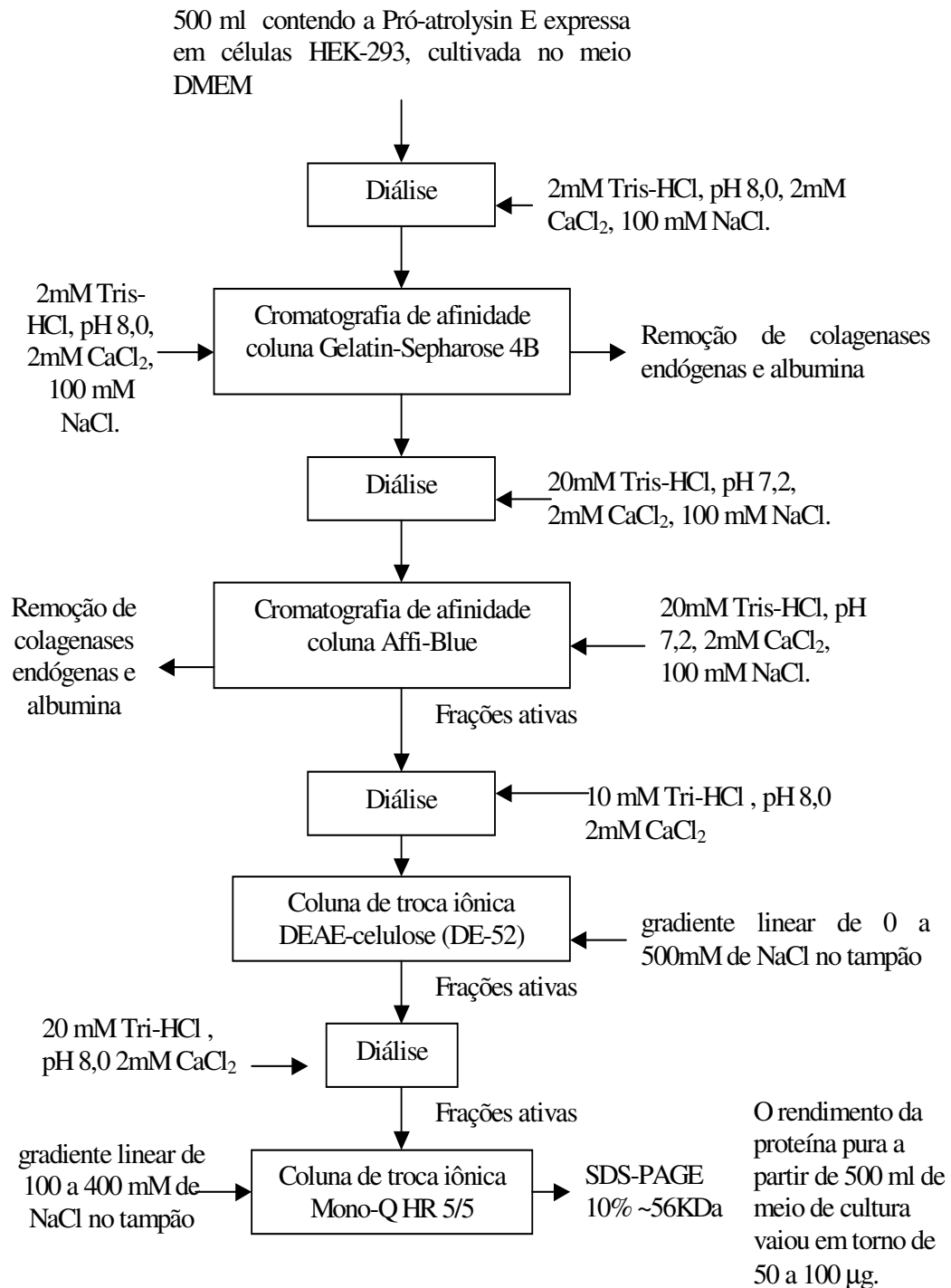


Figura 10. Fluxograma do processo de purificação de uma metaloprotease recombinante pró-atrolisina E, originária do veneno de serpente da *Crotalus atrox*, expressa em células HEK-293 (SHIMOKAWA *et al.*, 1996).

Primeiramente em coluna gelatin-Sepharose 4B (Pharmacia) equilibrada **Jia et al.** em 1997 expressaram o domínio em desintegrina e domínio rico em cisteína recombinante da Atrolisina A, uma metaloprotease hemorrágica da *Crotalux atrox* da classe P-III das SVMPS, utilizando células de inseto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). As células foram cultivadas em suspensão com meio FMNH suplementado com 10% de soro fetal bovino. A partir de 1 L de cultura de células transfectadas ( $2 \times 10^6$ /mL) o rendimento da proteína pura obtida dos fragmentos celulares foi de 600 µg. A proteína produzida intracelularmente foi purificada por cromatografia de troca iônica e filtração em gel, utilizando coluna DEAE-celulose e Mono Q 5/5 (Pharmacia), respectivamente. As frações foram concentradas por Centricon-30 (Amicon) e adicionadas a uma coluna Sephacryl S200 (Pharmacia). Os resultados mostraram um rendimento de 1 mg de proteína pura obtida a partir das células lisadas presentes em 1 litro de cultura de células transfectadas ( $2 \times 10^6$ /mL).

Em **Jia et al.** (1999) o processo de cultivo da proteína foi o mesmo citado no artigo de 1997, porém a metodologia de purificação utilizada foi diferente (Figura 11). Como a proteína foi produzida intracelularmente foi necessário lisar as células. A suspensão resultante foi centrifugada por 30 min a 4°C a 15.000 g. O sobrenadante foi dialisado contra tampão 20mM fosfato, pH 7,8, 500mM NaCl seguido por centrifugação a 15.000g por 30min. O sobrenadante foi adicionado a uma coluna de cromatografia de afinidade, carregado em coluna de níquel-**chelation** (Pharmacia), equilibrada pelo mesmo tampão. A coluna foi exaustivamente lavada com o tampão e eluída em 20mM fosfato, pH 6,3, 500mM NaCl. As frações carregadas foram dialisadas com o tampão de 20mM Tris-HCl,

pH 8,0, e aplicadas em coluna de troca iônica Mono Q 5/5 (Pharmacia) equilibrada com o mesmo tampão. Um passo final de cromatografia em fase reversa HPLC em coluna C-8 Aquapore (Applied Biosystems) foi necessário para purificar a proteína recombinante homogênea. Em SDS-PAGE com 16% de poliacrilamida foi estimado um peso molecular de ~22 kDa.

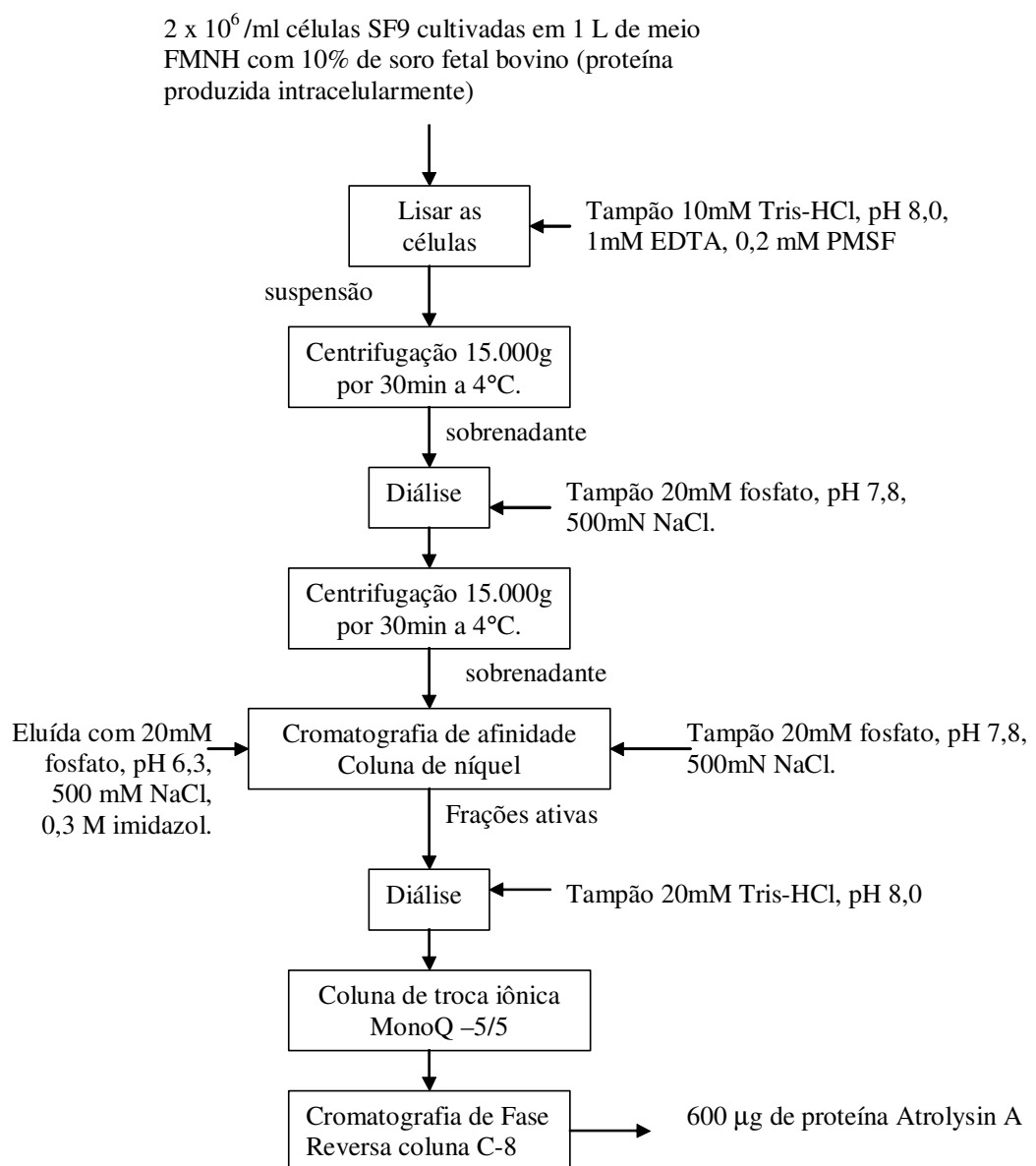
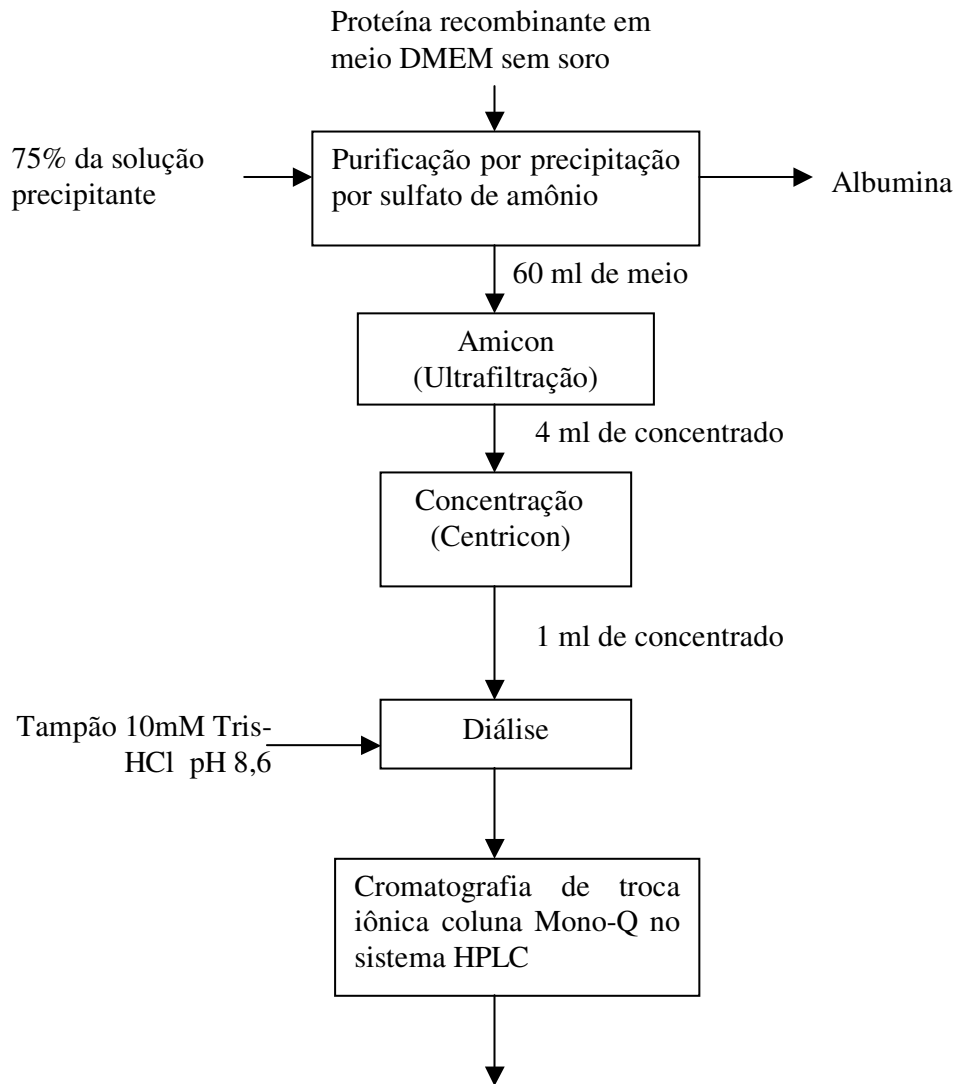


Figura 11. Fluxograma do processo de purificação de uma proteína recombinante originária do veneno de serpente *Crotalux atrox* expressa em células Sf9 (JIA *et al.*, 1997).

**Iemma et al.**, em 2002 subclonaram a ACLD e a expressaram em *E. coli*, buscando obter uma proteína solúvel na forma de zimogênio para a produção da ACLD. A expressão foi realizada em células CHOZMD, contendo a seqüência completa do ADN da ACLD. As células CHOZMD foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> o que ocasionou um aumento da área de superfície de adesão, conseqüentemente aumentando o número de células aderidas. Foi empregado o meio de cultura DMEM, suplementado com soro. Após a confluência, o meio com soro foi removido e as células foram incubadas por 48 h em meio sem soro. A proteína recombinante foi purificada pelo método de precipitação por sulfato de amônio, de forma a separar a sorobumina (Figura 12). A proteína foi detectada por imunodeteção, sendo que alguma quantidade de sorobumina foi observada. Sabe-se que o promotor do vetor pCADN3 é induzível pelos fatores de crescimento contidos no soro fetal bovino que suplementa o meio de cultura.

Foi utilizado um volume de 60mL de meio de cultura, o qual foi concentrado pelo sistema Amicon até 4mL e em seguida por Centricon até um volume de 1mL. A amostra concentrada assim obtida foi dialisada contra TrisHCl 10mM pH 8,6 e submetida ao fracionamento por cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna Mono-Q (Pharmacia) no sistema HPLC (Shimadzu). Obteve-se um perfil cromatográfico com boa resolução, onde se detectou a proteína de interesse em um único pico contendo contaminantes. Após a purificação a amostra foi submetida a imunodeteção, onde foi confirmada a presença da proteína no meio, a qual também indicou que, em função da intensidade de coloração da banda, o nível de rendimento foi relativamente baixo

(IEMMA, 2002). A purificação não foi concluída devido aos baixos níveis de expressão e à interferência das substâncias presentes no soro.



A purificação resultou apenas em um único pico, porém contendo alguns contaminantes. Pela análise por eletroforese em gel poliacrilamida o rendimento da expressão de acordo com a intensidade da banda foi extremamente baixo.

Figura 12. Fluxograma do processo de purificação da proteína recombinante do veneno de serpente da *Agkistrodon contortrix lactincintus*, expressa em células CHOZMD cultivadas em meio DMEM (IEMMA *et al.*, 2002).

Para realização do presente trabalho procurou-se utilizar a metodologia referente ao trabalho de Iemma (2002), visto ser a única referência bibliográfica encontrada em relação ao cultivo em garrafas de cultura da célula CHOZMD em meio DMEM contendo soro.

## 2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com as informações apresentadas na Revisão Bibliográfica, pode-se observar que devido às dificuldades de se obter uma grande quantidade da proteína de interesse a partir do veneno de serpentes, a tecnologia da clonagem e expressão destas proteínas em diversos organismos tem sido um instrumento empregado com frequência para se obter quantidades substanciais da proteína de interesse. O isolamento e a caracterização destes compostos ao nível de proteína fornece informações de fundamental importância para a compreensão dos processos fisiológicos.

Pode-se perceber pelo desenvolvimento do trabalho de Shimokawa e colaboradores (1996), que foram enfrentadas dificuldades na purificação devido à presença da albumina encontrada no soro adicionado ao meio de cultivo. O mesmo ocorreu no trabalho de Iemma (2002) com o cultivo das células CHOZMD. Em ambos os estudos, primeiramente se fez uso de métodos para retirar a albumina presente no soro, para posteriormente dar continuidade os procedimentos de detecção e purificação da proteína de interesse.

Nas pesquisas envolvendo o cultivo de células animais em meios isentos de soro (HALDANKAR *et al.*, 1999; SUNG *et al.*, 2003), foi verificada a



diminuição da interferência na metodologia de detecção e purificação. A presença de soro no meio torna mais complexos os procedimentos de detecção, quantificação e purificação da desintegrina, contribuindo para aumentar o custo do processo. Além disso, a utilização de meios com baixo teor de proteínas é recomendada para a produção de medicamentos para uso humano de acordo com as normas da U. S. FDA (Food and Drug Administration).

O cultivo adaptado a um meio livre de soro pode ser considerado como uma técnica recente e em constante aperfeiçoamento, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de novos meios que proporcionem um maior desenvolvimento celular e uma maior produtividade.

Outros estudos (SUNG *et al.*, 2003; HANSEN *et al.*, 1997) indicaram que as proteínas produzidas em meio de cultivo são extremamente instáveis, podendo se degradar facilmente, requerendo desta forma, manipulação a baixas temperaturas, em um curto tempo de processamento, ou a utilização de inibidores de proteases para preservar a atividade da proteína recombinante. Todos estes aspectos precisam ser considerados no desenvolvimento de uma metodologia confiável e de relativa simplicidade para a detecção de proteínas recombinantes em cultivos de células animais.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os tópicos a seguir abordam as técnicas de manipulação, normas, procedimentos e materiais específicos necessários para a concretização do presente trabalho.

#### 3.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

##### 3.1.1 Célula Animal

Para a produção da desintegrina foi utilizada uma linhagem modificada de células CHO-K1 da American Type Culture Collection CCL-61 (Figura 13), a CHOZMD cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloísa Selistre de Araújo, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

A linhagem CHOZMD foi construída a partir da célula CHO-K1 com o ADN característico da proteína desintegrina, retirado das glândulas produtoras de veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, com o vetor de expressão pCDNA3.

##### 3.1.2 Meio de cultura

O cultivo das células foi realizado em meio de cultura DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium, da Gibco e em meio de cultura livre de soro CHO-S-SFM II, Gibco. O meio DMEM foi suplementado com o aminoácido L-glutamina e com soro fetal bovino (FBS) e com os antibióticos, penicilina e estreptomicina. O meio CHO-S-SFM II foi suplementado com antibióticos. O aminoácido L-

glutamina é um complemento nutricional para as células, o soro fetal bovino fornece glicoproteínas e fatores de crescimento e os antibióticos permitem que não haja a proliferação de microorganismos, como bactérias e fungos, prejudiciais ao cultivo. O meio de cultivo foi esterilizado, utilizando-se um sistema de filtração contendo uma membrana com diâmetro de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3 Microcarregador

O microcarregador utilizado neste trabalho foi o que apresentou melhor rendimento no trabalho de SWIECH. O microcarregador ProNectin F (Sigma Solohill) é um tipo de microcarregador esférico, não poroso coberto com uma proteína recombinante, ProNectin® F (Protein Polymer Technologies, San Diego, CA).

Este microcarregador é envolvido por uma fina camada de um polímero recombinante, de fonte não animal, que apresenta múltiplas cópias da sequência adesiva RGD (Arg-Gly-Asp) presente na fibronectina (STEDRONSKY *et al.*, 1994). Livre de proteínas animais, este microcarregador em específico trabalha muito bem com meios livre de soro. As características, concentração de microcarregador e inóculo necessário para início do experimento do microcarregador ProNectin F foram fornecidas pelo fabricante na Tabela 12.

Tabela 12. Informações adicionais referentes ao microcarregador Pronectin F (Sigma Solohill, 2003).

CARACTERÍSTICAS	VALOR
Densidade (g.mL <sup>-1</sup> )	1,02
Diâmetro (µm)	125 - 212
Concentração Microcarregador (g.L <sup>-1</sup> )	20,0
Concentração Células (cel.mL <sup>-1</sup> )	1,1.10 <sup>5</sup>

### 3.1.4 Reagentes empregados nos cultivos

Estas soluções foram esterilizadas por microfiltração e armazenadas em frascos autoclavados.

#### 3.1.4.1 Solução de Tripsina

A solução de tripsina 0,25% foi fornecida pela Gibco, com pH ajustado para 7,7. A composição para cada litro de solução é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13. Composição da solução de tripsina (Gibco).

Composto	Quantidade (g)
NaCl	8,0
KCl	0,38
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1
Dextrose	1,0
Trizma base	3,0
Tripsina 1:250	2,5

### 3.1.4.2 Solução tampão fosfato- PBS ( Phosphate Buffer Saline).

O PBS (*phosphate-buffered saline*) funciona como solução tampão, com pH de 7,4 (Cultilab). A composição da solução de PBS para cada litro de solução é fornecida na Tabela 14.

Tabela 14. Composição da solução de PBS (Cultilab).

Composto	Quantidade (g)
NaCl	80,0
KCl	2,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0

### 3.1.5. Materiais e equipamentos empregados nos cultivos.

Nos cultivos das células CHOZMD foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- garrafas de cultura (Fracos T) com área superficial de 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> e 150 cm<sup>2</sup>. (Corning);
- frascos spinner Wheaton, com volume de 500mL
- câmara de fluxo laminar The Baker Company classe II, também conhecida comercialmente pelo nome de *SterilGARD III Advance*;
- estufa incubadora. (Thermo Forma) modelo 310 Series, com controle de concentração de CO<sub>2</sub> no ambiente;
- microscópio invertido Olympus CK2.

- centrífuga da empresa Incibrás, modelo Spin VI.

3.1.6. Materiais e equipamentos empregados nos ensaios de detecção da proteína desintegrina.

a) Análises em HPLC

Foram utilizadas as colunas Mono-Q HR 5/5 (Pharmacia Biotech) e KS-802 Shodex (Waters).

b) Concentração das amostras

- Membrana de nitrocelulose (0,45µm) – Hybond™-C (Amersham Life Science)
- Diaflo-Ultrafiltration Membranes (Amicon, Inc. – Berveley, MA, USA).
- Centricon-30 e Centriprep-10 (Amicon, Inc. – Berveley, MA, USA).
- Stirred Ultrafiltration Cells (Amicon, Inc. – Berveley, MA, USA).

c) Ensaios de imunodeteção

- Anticorpo Anti-MD (metaloprotease-desintegrina recombinante) de origem policlonal obtido pela imunização de camundongos.
- Anticorpo Anti- IgG (Imunoglobulina G) de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co. – St. Louis, Mo, USA).
- Bio-Dot SF filter paper ((Bio Rad Laboratories).
- Bio Dot® SF microfiltration Apparatus (Bio Rad Laboratories).
- Kit para revelação - Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio Rad Laboratories).

### **3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS**

As amostras retiradas durante o cultivo foram primeiramente utilizadas para determinação da concentração celular e viabilidade. Após filtração, o sobrenadante foi empregado para análise de glicose e após concentração foram realizados ensaios para determinar a atividade proteolítica, imunodeteção e separação em HPLC. Os métodos analíticos empregados são descritos a seguir.

#### **3.2.1 Determinação do número de células**

A concentração de células que se encontram em suspensão foi determinada em câmara de Neubauer, (FRESHNEY, 1994). As células foram colocadas em uma câmara de superfície plana e contadas no microscópio com uma ampliação de 100 vezes.

#### **3.2.2 Determinação da viabilidade celular**

Foi empregado o método de exclusão de corante Azul de tripan (Sigma) (FRESHNEY, 1994) onde a viabilidade é determinada pela porcentagem das células que não foram coradas. As células foram colocadas em câmara de Neubauer e contadas no microscópio com uma ampliação de 100 vezes.

#### **3.2.3 Determinação da adesão celular**

A adesão das células ao microcarregador foi determinada por contagem de núcleos de células viáveis após coloração com 1 mL de ácido cítrico 0,1 M, que

provoca a lise das células e 0,1% (p/v) de cristal violeta, que é responsável por corar o núcleo (PHARMACIA, 1981). Amostras de 1 mL foram retiradas e misturadas com 5 mL de meio DMEM, a fim de se evitar que células em suspensão se aderissem na superfície do microcarregador. Após a decantação dos microcarregadores, retirou-se totalmente de meio e adicionou a solução descrita acima. A solução foi mantida em incubação por 60 min a uma temperatura de 37° C, sendo submetida à agitação diversas vezes antes da contagem. Ao final da reação, as células viáveis apresentam o núcleo em coloração azul escura, sendo visualizadas no microscópio com uma ampliação de 100 vezes.

#### 3.2.4. Determinação da concentração de glicose

A determinação da concentração de glicose presente no meio durante o cultivo em frasco spinner foi realizada em HPLC, utilizando cromatógrafo da marca Shimadzu com solução de NaOH  $10^{-3}$  M como fase móvel e coluna Lonpack KS 803 da Shodex®.

#### 3.2.5 Teste de atividade caseínolítica

Este teste evidencia a clivagem da caseína por enzimas proteolíticas, fazendo com que os peptídeos resultantes da clivagem permaneçam em suspensão. As proteínas intactas precipitam e tornam-se insolúveis, separando-se do sobrenadante pela centrifugação.

Um volume de 25µl da solução contendo a proteína recombinante foi adicionado a 250µl de uma solução de caseína (0,5% em Tris-HCl 10mM, NaCl



100mM pH 8,6). A esta solução adicionou-se 225µl de CaCl<sub>2</sub> 20mM ou EDTA 15mM (dissolvidos no mesmo tampão). A mistura foi incubada por 1h a 37°C. Após o período de incubação a reação foi interrompida com 500µl de TCA 15% e a amostra foi centrifugada a 13000rpm por 5 minutos. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância (280nm) do sobrenadante. Para o branco, foi utilizado 25µl de tampão Tris-HCl 10mM pH 8,6, NaCl 100mM.

#### 3.2.4 Dosagem de proteínas totais

A quantidade de proteína total presente no sobrenadante das amostras retiradas durante o cultivo após concentração foi analisado pelo método de Bradford com curva padrão de BSA utilizando espectrofotômetro Ultrospec-2000 (Pharmacia Biotech).

#### 3.2.6 Determinação da desintegrina

A análise da desintegrina limitou-se a imunodeteção qualitativa das amostras coletadas no final do cultivo quando o meio DMEM com soro já havia sido totalmente substituído pelo meio sem soro CHO-S-SFM II. A detecção da desintegrina, proteína de ~70KDa, foi feita através de equipamento Bio Dot da marca Bio Rad com membrana de nitrocelulose incubada com os anticorpos anti-MD e anti-IgG, revelada com reagentes cromogênicos NBT e BCIP.

### 3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento para o cultivo da célula CHOZMD e detecção da proteína pode ser dividido em etapas, que se encontram descritas a seguir e ilustradas nas Figuras 14 e 15:

#### 3.3.1 Descongelamento de células

As células de CHOZMD foram conservadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  em criotubos de aproximadamente 1mL imersos em nitrogênio líquido. A concentração celular no criotubo foi de  $1,0 \cdot 10^6$  células/mL. Foi utilizado como criopreservante o DMSO (dimetil sulfóxido) a 10%. Para o descongelamento, o tubo foi retirado do nitrogênio para a manipulação e deixado em câmara de fluxo laminar. A manipulação das células foi realizada em capela de fluxo laminar de classe II, a fim de prevenir exposições a contaminações.

#### 3.3.2 Cultivo nas garrafas de cultura

O início da cultura foi realizado em frascos de cultura revestidos por poliestireno da marca Corning tendo áreas superficiais de  $25\text{cm}^2$ ,  $75\text{cm}^2$  e  $150\text{cm}^2$ . Durante este período as células foram cultivadas em incubadora com concentração de  $\text{CO}_2$  controlada em 10% v/v, além do controle da temperatura de incubação mantido a  $37^{\circ}\text{C}$ .

O pH do meio de cultivo nos frascos de cultura foi acompanhado pela alteração da coloração do meio de cultura. À medida que o mesmo perde a

coloração vermelha, o meio torna-se acidificado, indicando que o meio de cultura deve ser trocado. As células foram cultivadas nos frascos de cultura até atingirem a confluência, ou seja, até que a superfície do frasco estivesse totalmente recoberta de células.

A partir deste ponto as células foram tripsinizadas e transferidas para um frasco de cultura maior até se atingir a concentração necessária para o inóculo posterior no frasco spinner. Na tripsinização das células confluentes fez-se a lavagem com solução de PBS (*phosphate-buffered saline*). O meio tornou-se turvo o que indica que as células estão em suspensão. A suspensão resultante foi centrifugada por 5min a 1500rpm e o precipitado composto pelas células foi ressuspenso na quantidade de meio adequada para transferência para outros frascos de cultura ou para o congelamento. Nesta etapa foi retirada uma pequena amostra para analisar o número de células viáveis ou não viáveis, como também o número de células em suspensão. A manipulação das células foi realizada na capela de fluxo laminar. Durante todo o cultivo todas as soluções e equipamentos em contato com as células animais foram esterilizados.

### 3.3.3 Cultivo no frasco spinner

Antes do início do cultivo em frasco spinner, a viabilidade e o número de células (trypan blue) na confluência presentes no inóculo cultivado nos frascos T foram determinados. Para inoculação do frasco spinner foram utilizadas cerca de  $5 \cdot 10^7$  células para um volume de 500mL. Neste estágio da cultura, houve um aumento da densidade de células. As mesmas condições para o cultivo em frascos

foram utilizadas para o cultivo da célula CHOZMD no frasco spinner, com exceção da presença do microcarregador Pronectin F.

A concentração de microcarregador nessa etapa do cultivo foi de aproximadamente 10g/L, conforme recomendação do fabricante do microcarregador para cultivos em frascos spinner. As etapas de preparação do microcarregador, hidratação, lavagem, esterilização, quantidade de inoculo e quantidade de microcarregador foram de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente os microcarregadores foram hidratados com PBS (~150mL) por aproximadamente 3 horas em temperatura ambiente, agitando-se ocasionalmente. Depois de hidratado, descartou-se o sobrenadante e lavou-se com PBS durante alguns minutos, agitando lentamente. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se em torno de 150mL de PBS para esterilização. O frasco spinner foi autoclavado com as tampas em meia rosca por 15 minutos a 115° C.

Após a esterilização descartou-se a solução tampão contida no frasco spinner, contendo o microcarregador já tratado, e adicionou-se aproximadamente 150mL de meio de cultura. Após decantação dos microcarregadores, retirou-se o meio e adicionou-se meio de cultura novo (cerca de 1/3 do volume final do meio de cultura- 150mL). O spinner foi introduzido na incubadora a 37° C a 10% de CO<sub>2</sub>, por alguns minutos, para entrar em equilíbrio.

Depois de obtida a quantidade adequada de células para o microcarregador através do cultivo em frascos T, as mesmas foram inoculadas em 190mL de meio contido num frasco spinner de 500mL (Wheaton). Nas primeiras 6 horas, o cultivo foi realizado com uma agitação intermitente de 30rpm de 2min. a cada 30min., para a adaptação das células ao novo ambiente de crescimento. Após 6 horas, o

volume final de meio é completado até 500mL e a agitação foi mantida continuamente em uma velocidade suficiente para manter os microcarregadores em suspensão (cerca de 60rpm).

Para que as células pudessem se desenvolver adequadamente em meio livre de soro, elas foram submetidas a um processo de adaptação gradual, reduzindo-se a proporção de meio com soro a cada troca de meio até que o meio fosse totalmente trocado para o meio livre de soro. As trocas de meio de cultura foram realizadas de acordo com a necessidade de cada experimento, ou seja, à medida que o pH atingia o valor 7, trocando-se apenas 50% do volume do frasco spinner. Ao longo do cultivo, a concentração de glicose; a contagem e viabilidade de células foram determinadas. Para o monitoramento do crescimento celular retirou-se duas amostras de 2mL e 3mL, respectivamente, da suspensão meio, célula e microcarregadores, após a inoculação e durante todo o ensaio para análises.

Após a sedimentação das partículas de microcarregador presentes na amostra, o sobrenadante foi retirado para determinação do número de células em suspensão. A concentração de glicose foi determinada por cromatografia. As células em suspensão foram coradas com trypan blue 0,4% e contadas em hemacitômetro. As células aderidas aos microcarregadores foram determinadas pela contagem de núcleos. Os microcarregadores foram lavados com meio de cultura e ressuspensos em 1mL de ácido cítrico 0,1 M contendo 0,1% (p/v) de violeta cristal. Essa solução é agitada e deixada por 1 hora a 37° C. Após esse período de incubação, os núcleos corados liberados foram contados em hemacitômetro.

### 3.3.4 Determinação da massa seca

As amostras de microcarregadores foram filtradas em membrana de filtração 0,45µm, utilizando sistema de filtração Millipore. Para retirar a umidade a membrana ficou na estufa por um dia a uma temperatura de 60°C e no dessecador por 20min., pesou-se a membrana de filtração em seguida. As amostras foram filtradas lavando sempre com água destilada para que não ficassem resíduos no falcon, e foram colocadas novamente na estufa por um dia a uma temperatura de 60 °C e no dessecador por 20min., sendo em seguida pesados em balança analítica.

### 3.3.5 Concentração e clarificação da amostra retirada do cultivo em frasco Spinner.

As células foram mantidas em meio sem soro CHO-S-SFM II durante 6 h com amostragens de 3 e 6 h. O meio de cultura retirado do cultivo no frasco spinner foi separado dos restos celulares por filtração em de filtro Millipore 0,45µm. O filtrado coletado foi então submetido a uma ultrafiltração para concentração. O volume inicial de 250mL foi concentrado pelo sistema Amicon (MWCO de 10 KDa) até um volume de 10mL. Em seguida foi utilizado o Centriprep (MWCO de 30 KDa) até se obter um volume de 2mL e o Centricon (MWCO de 30 KDa) até 1,5mL, ambos da marca Amicon.

### 3.3.6 Detecção da Proteína Recombinante

Para a detecção da desintegrina foi feito ensaio de imunodeteção através de equipamento Bio Dot da marca Bio Rad aplicando alíquotas de 100µl de amostra em membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose inicialmente foi hidratada em solução de transferência juntamente com os filtros. Após a aplicação, a membrana foi incubada em solução de bloqueio de leite desnatado (Ninho) com TBS-1X (solução tamponada com NaCl e Tris) contendo Tween 20, por aproximadamente 60 minutos sob refrigeração. Após lavagem com TBS-1X contendo Tween 20 a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo anti-MD (metalo-desintegrina recombinante) diluído 1:500 em TBS-1X de camundongo por aproximadamente 24 horas sob refrigeração. Posteriormente, a membrana foi lavada em solução de TBS-1X contendo Tween-20 de 3 a 4 vezes por 5 minutos cada lavagem e incubada com o anticorpo primário que reage com a proteína de interesse anti-IgG (Imunoglobulina G) diluído 1:5000 de camundongo conjugado ALP (fosfatase alcalina) por aproximadamente 2 horas sob agitação suave. Novamente a membrana foi lavada e posteriormente revelada com reagentes cromogênicos NBT (nitroazol de tetrazolio) e BCIP (dimetilformamida).

3.3.7 Purificação da Proteína Desintegrina em meio CHO-S-SFM II condicionado das células CHO-ZMD por Cromatografia de Troca Iônica.

As amostras concentradas retiradas dos cultivos foram aplicadas em cromatografia de troca iônica utilizando coluna Mono-Q no sistema HPLC da Shimadzu. As alíquotas foram primeiramente dialisadas em tampão Tris-HCl 10mM pH 8,6, com três trocas a cada uma hora sob agitação e refrigeração. As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 13.000rpm a uma temperatura de 4°C. A coluna primeiramente foi lavada com o tampão por 45 minutos e eluída em 10mM Tris-HCl, pH 8,6, 1 M NaCl. Um volume de 500µl foi aplicado na coluna Mono-Q. Após a purificação parcial no HPLC foi feito ensaio de imunodeteção com as frações coletadas correspondentes aos picos obtidos no cromatograma. Alíquotas de aproximadamente 5mL de cada fração foram liofilizadas em Speed Vac e ressuspendidas em 100µl de água ultrapura e aplicadas em membrana de nitrocelulose, pelo mesmo sistema de imunodeteção já descrito no item 3.3.6.

### 3.3.8 Purificação da proteína em meio DMEM contendo 10% de FBS.

Visando a remoção da interferência causada pela albumina, amostras de meio DMEM contendo 10% de FBS foram previamente concentradas pelo sistema já descrito anteriormente e aplicadas em cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Blue 5mL. O sobrenadante foi dialisado contra tampão 50mM fosfato de potássio, pH 7,4, seguido por centrifugação a 13.000rpm por 5min. a 4°C. O sobrenadante referente a um volume de 2mL diluído de 1:1 com 50mM fosfato de potássio, pH 7,4, foi adicionado em uma coluna de cromatografia de



afinidade, equilibrada pelo mesmo tampão. A coluna foi exaustivamente lavada com o tampão e eluída em 50mM fosfato de potássio, pH 7,4, 1,5 M KCl. Posteriormente foi feito ensaio de imunodeteccção com as frações correspondentes aos picos obtidos no perfil cromatográfico pelo mesmo sistema de imunodeteccção já descrito no item 3.3.6.

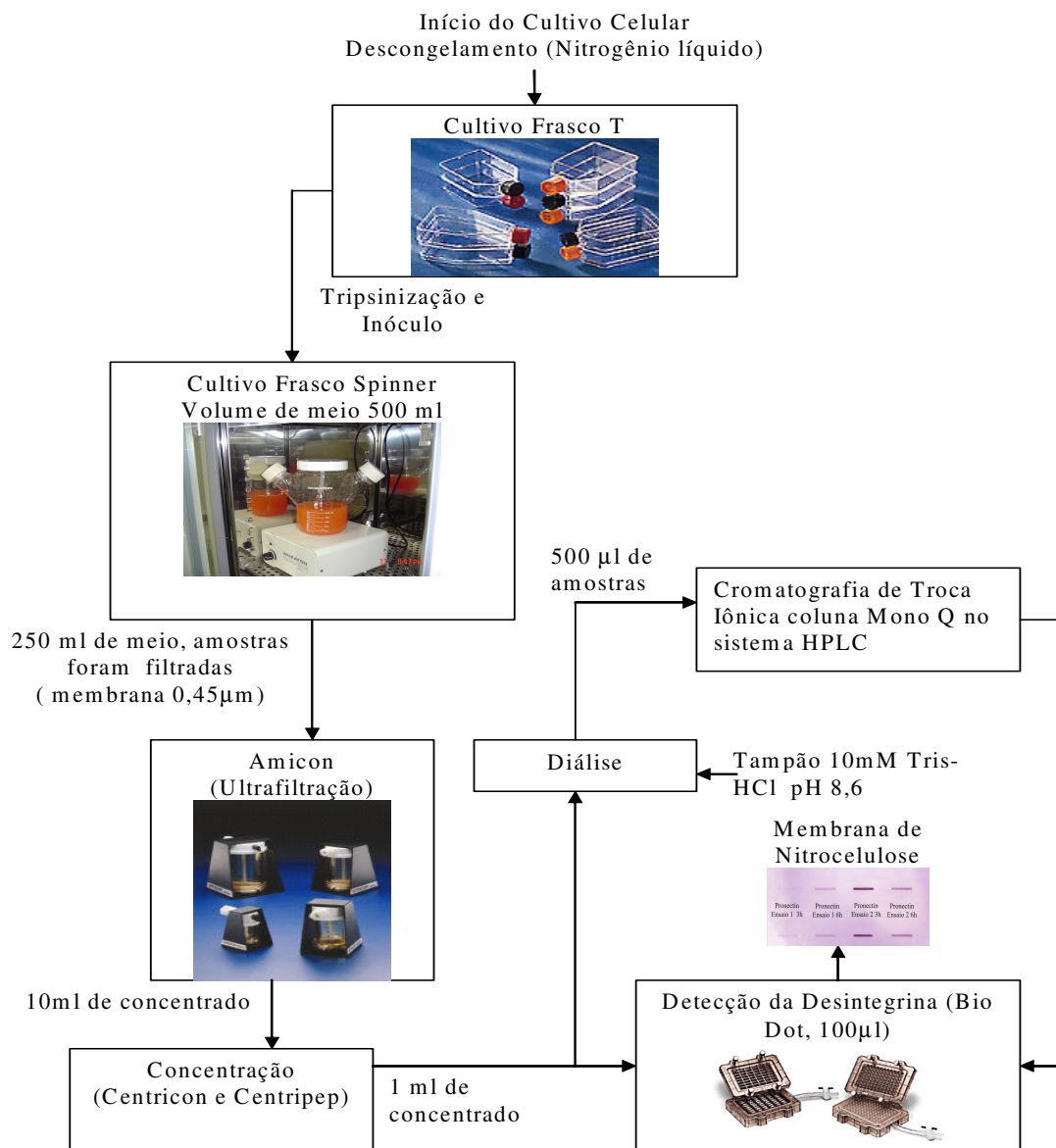


Figura 14. Representação esquemática da metodologia empregada para tratamento das amostras obtidas em cultivos de células CHOZMD em Frasco Spinner para a produção de desintegrina.

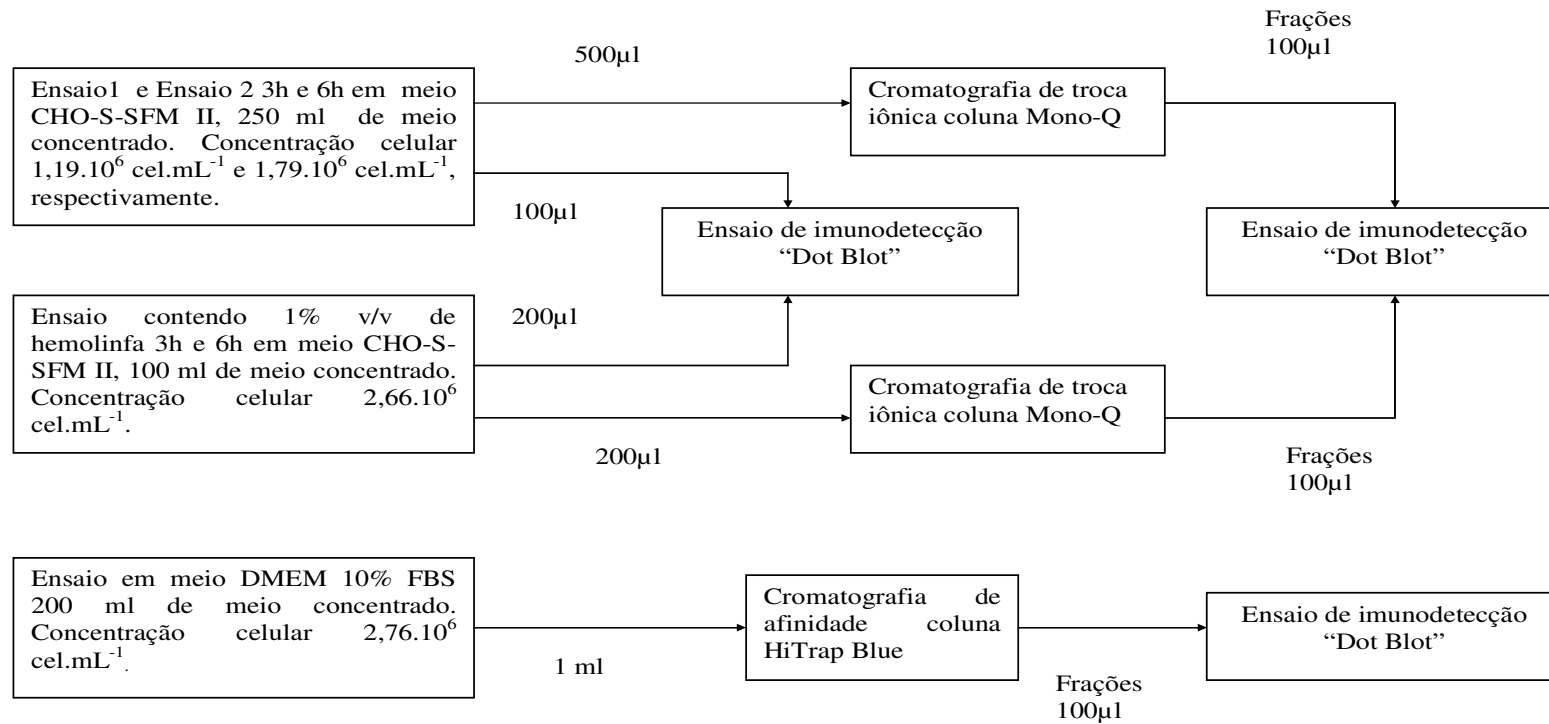


Figura 15. Representação esquemática do tratamento aplicado às amostras obtidas em cultivos em frasco spinner de células CHOZMD para produção de desintegrina, para realização de ensaio de imunodeteção e purificação em HPLC.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Detecção da proteína - ensaios preliminares

A detecção da proteína desintegrina foi tentada inicialmente utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida. As amostras aplicadas foram obtidas em cultivo de célula CHOZMD com o microcarregador Cytodex 1 em meio DMEM com 1% de soro, realizado por SWIECH (2003). As amostras (~30mL) retiradas em intervalos de 3h, 6h, 9h, 12h e 24h após a última troca de meio foram primeiramente concentradas e separadas inicialmente por eletroforese em gel contendo 15% de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE, LAEMMIL, 1970) para verificar a expressão (Figura 16). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana nitrocelulose (Amersham Life Science).

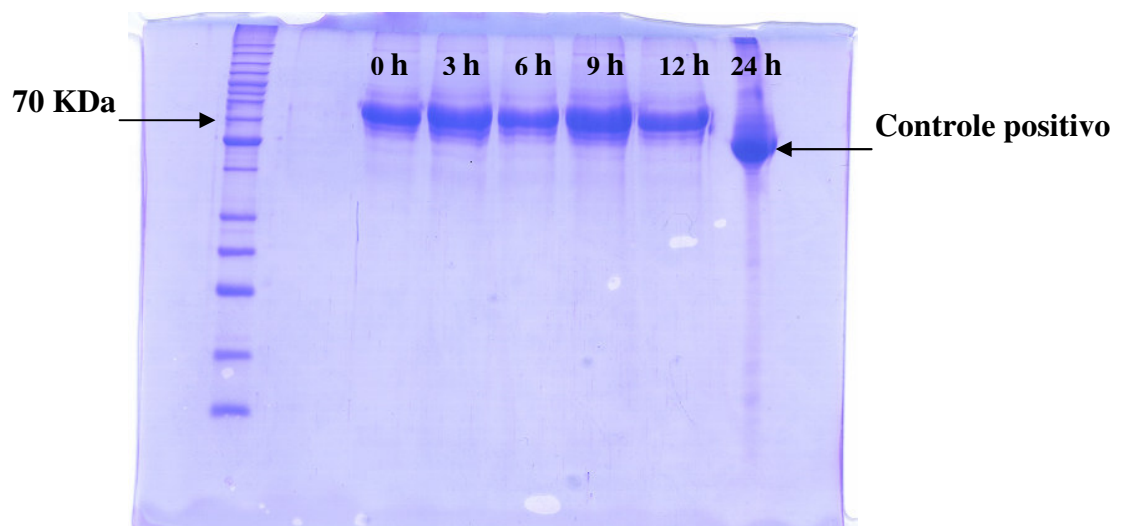


Figura 16. Amostras do cultivo de célula CHOZMD com o microcarregador Cytodex 1 em meio DMEM com 1% de soro, analisadas por eletroforese em gel poliacrilamida 15% para detecção de desintegrina.

Na Figura 16, a intensidade e largura das bandas obtidas na eletroforese para as amostras correspondentes aos tempos de 3, 6, 9, 12 e 24 indicam a presença de uma grande quantidade de proteína e de contaminantes com peso molecular de aproximadamente 70KDa. Sabe-se que o peso molecular da albumina é de 69KDa e o da proteína desintegrina, 70KDa. Como o meio ainda não havia sido suplementado com soro no início do cultivo (tempo de 0 h), a amostra correspondente não apresentou nenhuma banda no gel. Para confirmar que as bandas obtidas na eletroforese eram resultado da presença de albumina, as amostras foram submetidas a imunodeteção pelo método sanduíche de anticorpos (Antibodies, 1988). Conforme já era esperado, não houve reação com o anticorpo específico para detecção de desintegrina e conseqüentemente, não houve formação de nenhuma banda.

Para uma suplementação do meio de cultivo com 10% de soro, os níveis de proteína provenientes do soro chegam a atingir 5 mg/mL. Isso pode introduzir problemas na detecção das proteínas produzidas pela célula, que se encontram em quantidades significativamente menores (na ordem de µg/mL) já que as proteínas residuais podem ser antigênicas, diminuindo o rendimento do anticorpo devido à neutralização do mesmo (Gibco).

As análises por eletroforese em gel de poliacrilamida indicaram que a presença da albumina do soro afetou a detecção da proteína de interesse. Procurando diminuir a interferência devido à presença de proteínas no meio de cultivo, SWIECH (2003) realizou um cultivo com o mesmo microcarregador, entretanto utilizando na etapa de síntese da proteína o meio livre de soro CHO-S-

SFM II. Novamente as amostras foram concentradas e aplicadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente, entretanto o resultado foi o mesmo. Após inúmeras tentativas, concluiu-se que a eletroforese mostrava-se inadequada para a detecção da proteína.

De acordo com IEMMA (2002), o processo de imunodeteção por “dot blot” se mostra eficiente na detecção de baixas concentrações da proteína. Sendo assim, decidiu-se fazer uma imunodeteção aplicando o método "dot blot" em equipamento Bio-Dot. A Figura 17 mostra os resultados obtidos (em duplicata), confirmando a presença da desintegrina nas amostras retiradas do cultivo utilizando microcarregador Cytodex 1 em meio sem soro.

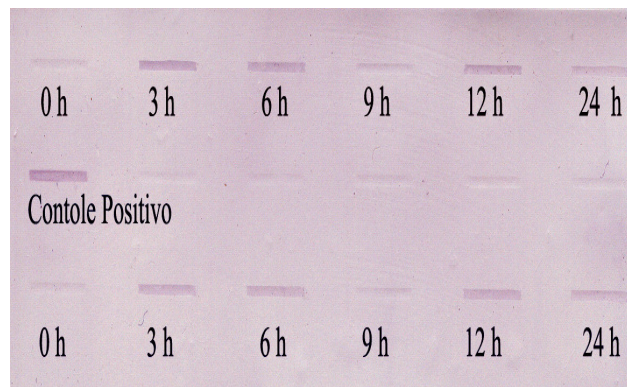


Figura 17. Detecção da proteína obtida em cultivo da célula CHOZMD, utilizando o microcarregador Cytodex 1 em meio sem soro CHO-S-SFM II, por “dot blot”.

Pela intensidade das bandas nota-se que a maior quantidade de proteína estava presente nas amostras coletadas em 3h e 6h após a última troca do meio. A detecção da proteína por "dot-blot" foi então realizada com outras amostras concentradas obtidas em cultivos utilizando outros tipos de microcarregadores.

Somente as amostras retiradas 3h após a última troca de meio foram aplicadas, já que este tempo correspondia à maior produção de proteína. Os cultivos utilizando os microcarregadores Cytodex 1 e Imobasil FS foram realizados com o meio CHO-S-SFM II, o qual foi adicionado somente no final do cultivo, na fase de síntese do produto, sendo que os mesmos apresentaram concentração celular máxima de  $1,47 \cdot 10^6$  e  $3,84 \cdot 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$  respectivamente.

Já os cultivos com os microcarregadores Cultispher S e Pronectin F foram realizados com meio DMEM contendo 1% de soro fetal bovino em tempo de 3 horas de cultivo após troca total do meio, com uma concentração celular máxima de  $1,34 \cdot 10^6$  e  $2,76 \cdot 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ . Uma amostra de 196 horas de cultivo com o microcarregador Pronectin F em meio DMEM contendo 10% FBS também foi aplicada para comparação (Figura 18).

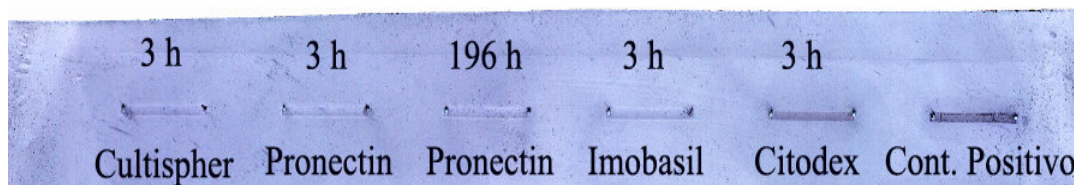


Figura 18. Detecção da desintegrina produzida em cultivos da célula CHOZMD utilizando microcarregadores e meios de cultivo diferentes.

Os resultados da reação de imunodeteção representados na Figura 19 não acusam a presença de desintegrina nas amostras dos cultivos realizados com o microcarregador Pronectin F, o qual possui moléculas com a seqüência adesiva RGD e que apresentou uma alta produtividade celular. No entanto, a aparente ausência de desintegrina nas referidas amostras pode ser, mais uma vez,

conseqüência da interferência da albumina presente no soro fetal bovino. A presença mais acentuada de desintegrina ocorreu no cultivo realizado com o microcarregador Cytodex 1, embora este tenha apresentado menor concentração final de células. É importante lembrar que no final do cultivo com o microcarregador Cytodex 1 (fase de síntese de desintegrina), o meio DMEM suplementado com soro foi substituído meio CHO-S-SFM II. Desta forma, a diminuição da quantidade de proteínas contaminantes pode ter contribuído para viabilizar a detecção da desintegrina. De acordo com os resultados apresentados na Figura 18, não foi detectada a presença de desintegrina nos cultivos realizados com os microcarregadores Cultispher S e Immobasil. Embora no final do cultivo com o microcarregador tenha sido utilizado o meio isento de soro, a ausência de desintegrina no meio pode ser atribuída à baixa concentração final de células atingida neste cultivo.

#### 4.2 Cultivos com o microcarregador Pronectin F em meio livre de soro

Os resultados obtidos nos testes preliminares para desenvolvimento da metodologia de detecção da proteína recombinante produzida pela célula CHOZMD mostraram que a presença da albumina proveniente da adição do soro fetal bovino causou interferência tanto na detecção por eletroforese como na imunodetecção. Sendo assim, optou-se por realizar cultivos das células CHOZMD em meio CHO-S-SFM II, que não contém soro, de forma que a metodologia para a detecção e a quantificação da desintegrina possa ser desenvolvida, aplicada e

avaliada adequadamente. De acordo com Cruz e colaboradores (1998), a proliferação de células em meio livre de soro normalmente é alcançado por adaptação gradual. Desta forma, para a realização dos cultivos em meio sem soro promoveu-se uma adaptação, substituindo-se gradualmente o meio DMEM pelo meio CHO-S-SFM II ao longo do cultivo. O microcarregador utilizado nos ensaios sem soro foi o Pronectin F, o qual proporcionou melhor crescimento celular nos cultivos realizados por SWIECH (2003).

#### 4.2.1 Primeiro Ensaio

Na Figura 19 são apresentados os resultados do primeiro cultivo de células CHOZMD com substituição gradual do meio DMEM pelo o meio CHO-S-SFM II. O cultivo foi iniciado com meio DMEM contendo 10% de soro e a cada troca aumentou-se a proporção do meio livre de soro CHO-S-SFM II.

Os pontos assinalados como "M" no gráfico indicam os instantes em que ocorreram as trocas de meio, as quais foram determinadas pela queda no valor do pH do meio de cultivo. Uma das razões para as muitas trocas de meio realizadas durante o ensaio está relacionada à perda dos efeitos positivos do soro, que também atua como tampão. Assim, na ausência do soro, o meio se acidificava muito rapidamente, afetando o bom desenvolvimento celular. Nas trocas M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub> foi substituído um volume de 250mL de meio, sendo adicionado 10% de CHO-S-SFM II para um volume total de 500mL. Nas trocas M<sub>5</sub> e M<sub>6</sub>, a percentagem de meio CHO-S-SFM II equivalia a 25% do volume total. Nas trocas



M<sub>7</sub> e M<sub>8</sub>, a proporção de meio sem soro foi de 42,5 % e nas trocas M<sub>9</sub> e M<sub>10</sub>, foi de 61,25%. Na troca M<sub>11</sub> o meio foi totalmente substituído pelo meio sem soro.

A proporção do meio CHO-S-SFM II nos meios adicionados a cada troca para um volume total de meio de cultivo de 500mL está detalhada na Tabela 15.

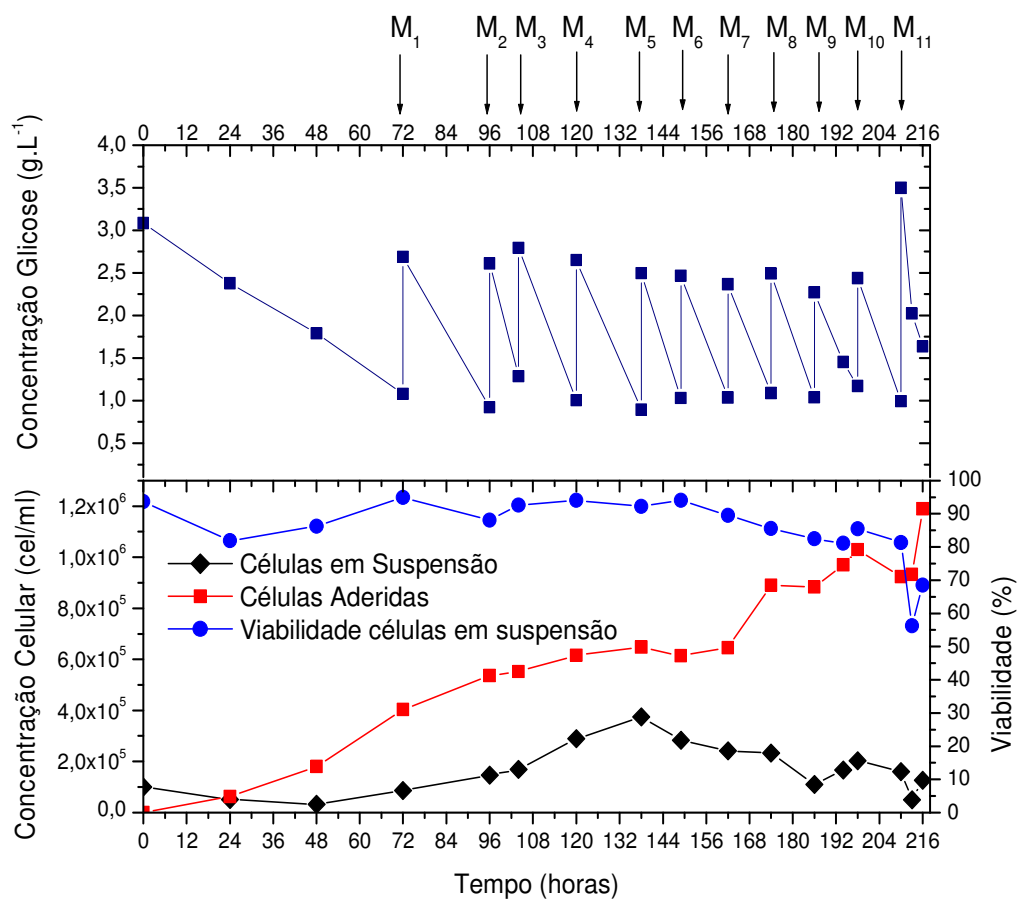


Figura 19. Crescimento celular, viabilidade e consumo de glicose durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 1). Trocas de meio realizadas nos instantes indicados por M. Composição do meio a cada troca descrita na Tabela 15. Os valores experimentais encontram-se no Apêndice A.

Tabela 15. Quantidade adicionada de meio DMEM e CHO-S-SFM II referentes às trocas realizadas no primeiro ensaio em Frasco Spinner.

Trocas	Volume Meio DMEM (mL)	Volume Meio CHO-S-SFM II (mL)	Porcentagem de meio livre de soro CHO-S-SFM II )
M <sub>1</sub>	250	n.c.*	n.c.*
M <sub>2</sub>	200	50	10%
M <sub>3</sub>	200	50	10%
M <sub>4</sub>	200	50	10%
M <sub>5</sub>	150	100	25%
M <sub>6</sub>	150	100	25%
M <sub>7</sub>	100	150	42,5%
M <sub>8</sub>	100	150	42,5%
M <sub>9</sub>	50	200	61,25%
M <sub>10</sub>	50	200	61,25%
M <sub>11</sub>	n.c.*	500	100%

\*n.c. nada consta

#### 4.2.2 Segundo Ensaio

O cultivo foi iniciado com meio DMEM contendo 10% de soro e 5% de meio CHO-S-SFM II em um volume de 500mL (Figura 20). Para o segundo ensaio foi feita uma adaptação diferente, de forma que as células já fossem inoculadas em meio contendo uma porcentagem significativa de meio livre de soro. A proporção do meio CHO-S-SFM II nos meios adicionados a cada troca para um volume total de meio de cultivo de 500mL está detalhada na Tabela 16.

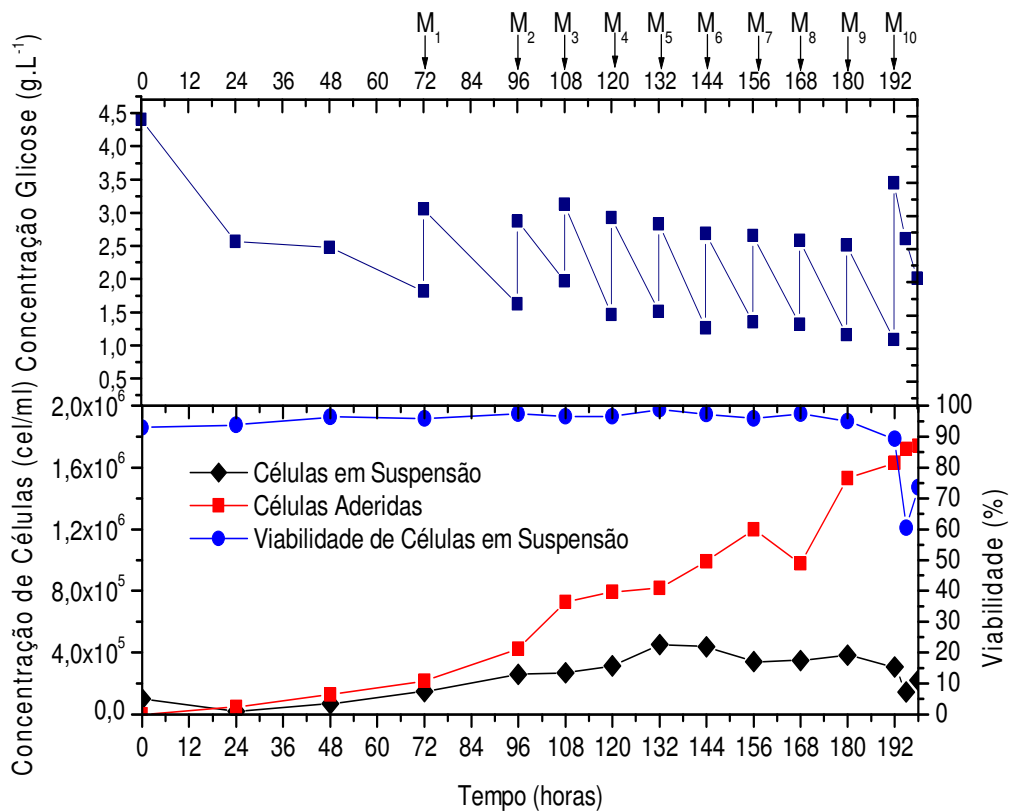


Figura 20. Crescimento celular, viabilidade e consumo de glicose durante cultivo da célula CHO-K1 com microcarregador Pronectin F em frasco spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 2). Trocas de meio realizadas nos instantes indicados por M. Composição do meio a cada troca descrita na Tabela 16. Os valores experimentais encontram-se no Apêndice A.

Para comparação, os resultados obtidos por Swiech (2003) no cultivo de células CHOZMD em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, também utilizando o microcarregador Pronectin F, estão reproduzidos na Figura 22. Observa-se que uma concentração de cerca de  $2,76 \cdot 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$  foi alcançada com a utilização do meio DMEM contendo 10% de soro. Nos cultivos 1 e 2,

realizados com a adaptação gradual da célula ao novo meio com baixo teor de proteínas, a concentração celular máxima atingida foi de  $1,19.10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> (ensaio 1) e  $1,74.10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> (ensaio 2). A diminuição da concentração celular nos cultivos realizados em meio isento de soro já era esperada, uma vez que no cultivo de células dependentes de ancoramento, é essencial a presença dos fatores que promovem o crescimento e a adesão celular contidos no soro.

Por outro lado, a viabilidade manteve-se em valores mais baixos no cultivo empregando o meio DMEM suplementado com soro do que no cultivo realizado com o meio isento de soro CHO-S-SFM II. Uma possível explicação para a viabilidade nos cultivos em meio isento de soro ter se mantido em um patamar mais alto foi a grande formação de agregados de células na suspensão (Figura 21), o que está associado a uma menor taxa específica de adesão (NG *et al.* 1995, CRUZ *et al.*, 1998; SWIECH, 2003) A formação de agregados ocorre pois há uma competição entre a adesão da célula ao microcarregador e a adesão de uma célula a outra, visto que uma adesão mais lenta ao microcarregador favorece a formação de agregados. Por sua vez, a menor adesão ao microcarregador está associada à diminuição da concentração de soro.

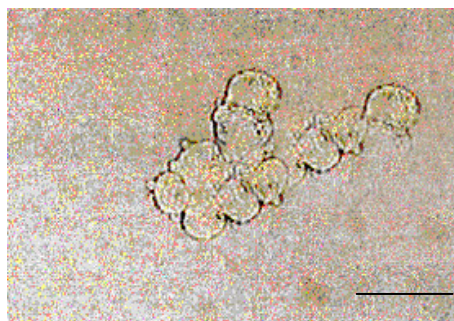


Figura 21. Formação de agregados de células viáveis em suspensão. (200x Escala=50µm)

Tabela 16. Quantidade adicionada de meio DMEM e CHO-S-SFM II referentes às trocas realizadas no segundo ensaio em Frasco Spinner.

<b>Trocas</b>	<b>Volume Meio DMEM (mL)</b>	<b>Volume Meio CHO-S-SFM II (mL)</b>	<b>Porcentagem de meio livre de soro CHO-S-SFM II</b>
M <sub>1</sub>	215	35	10%
M <sub>2</sub>	212	38	12,5%
M <sub>3</sub>	206	44	15%
M <sub>4</sub>	187	63	20%
M <sub>5</sub>	175	75	25%
M <sub>6</sub>	162	88	30%
M <sub>7</sub>	125	125	40%
M <sub>8</sub>	100	150	50%
M <sub>9</sub>	100	150	50%
M <sub>10</sub>	n.c.*	500	100%

\* n.c. nada consta

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 19 e 20, calculou-se os valores para o rendimento global de células em função do substrato consumido ( $Y_{X/S}$ ), obtendo-se para o primeiro ensaio  $5,0 \cdot 10^7$  cel.  $g^{-1}$  glicose e para o segundo ensaio  $7,0 \cdot 10^7$  cel.  $g^{-1}$  glicose. Em cultivo realizado por SWIECH em 2003, utilizando o microcarregador Pronectin F e meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino, foi obtido um valor de  $3,3 \cdot 10^8$  cel.  $g^{-1}$  glicose para  $Y_{X/S}$ .

Na Figura 24, o crescimento celular é apresentado em termos de número de células por partícula de microcarregador. Na Figura 23 uma foto do microcarregador Pronectin F com células aderidas na sua superfície. O cálculo foi efetuado

considerando-se que o microcarregador Pronectin F apresenta  $3,9 \cdot 10^5$  partículas por grama.

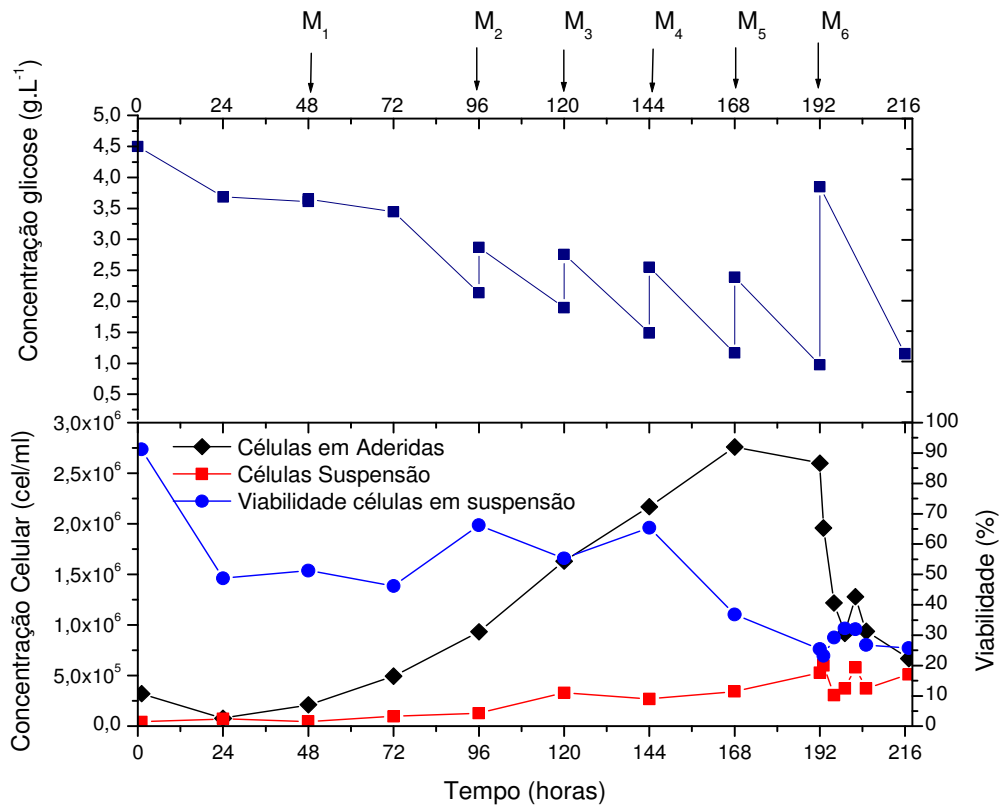


Figura 22. Crescimento celular, viabilidade e consumo de glicose durante cultivo da célula CHO-K1 com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 300mL de meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. As setas indicam os momentos de troca de meio (SWIECH, 2003).

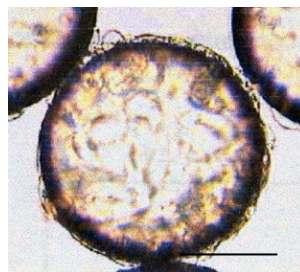


Figura 23. Células CHOZMD aderidas a uma partícula do microcarregador Pronectin F (200x, Escala=50µm).

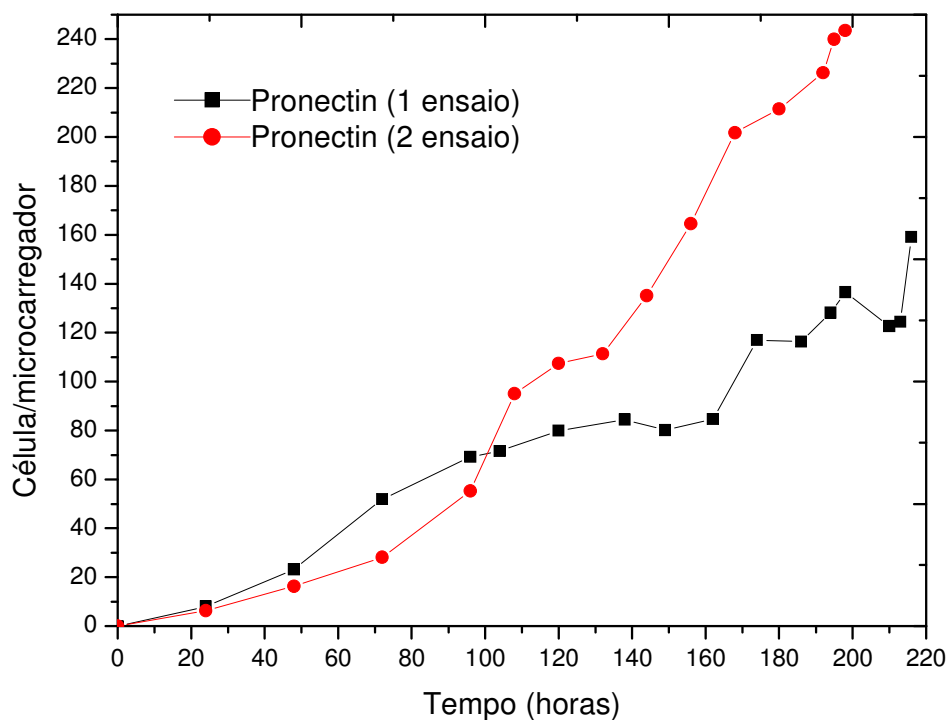


Figura 24. Relação do número de células por partícula de microcarregador referente aos cultivos realizados em frasco spinner com um volume de trabalho de 500mL, considerando que o Pronectin F apresenta  $3,9 \cdot 10^5$  partículas/g de microcarregador. Os valores experimentais se encontram no Apêndice A.

### 4.3 Detecção e quantificação da desintegrina – Estudos Complementares

#### 4.3.1. Detecção e quantificação por “dot blot”.

A detecção da proteína recombinante desintegrina produzida nos cultivos das células CHOZMD em meio isento de soro foi feita inicialmente por meio de uma imunodeteção. As células foram cultivadas nos ensaios 1 e 2 até atingirem a concentração celular máxima (correspondente ao maior acúmulo de produto no

meio) e mantidas neste meio durante 6h com amostragens de 3 e 6h. As amostras retiradas ao final do cultivo foram previamente concentradas e então submetidas ao ensaio de imunodeteccção. A deteccção da desintegrina foi feita por "dot blot", aplicando-se 100µl de cada amostra concentrada em membrana de nitrocelulose incubada com anticorpos específcos.

A Figura 25 mostra que ocorreu formaçção da desintegrina recombinante nos ensaios 1 e 2. No primeiro ensaio, no qual a concentraçção celular atingiu um valor inferior ao do segundo ensaio, também se observa que a produçção da desintegrina no meio foi menor pela intensidade da coloraçção da banda na membrana de nitrocelulose.

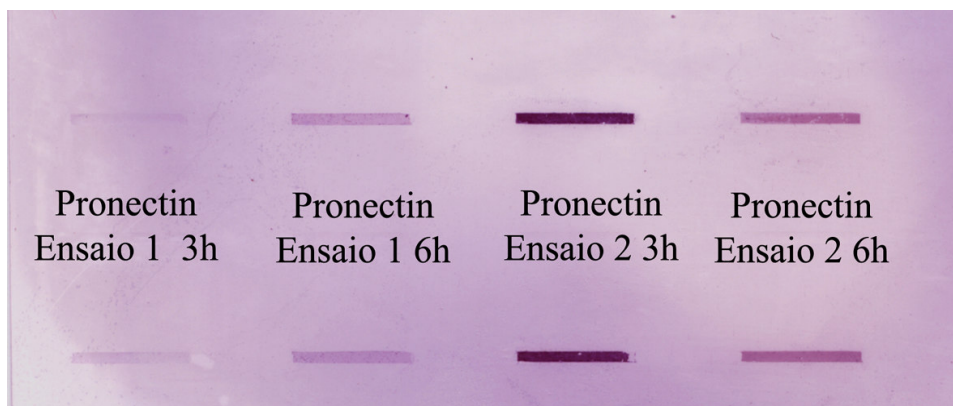


Figura 25. Identificaçção da proteína desintegrina em duplicata. Amostras retiradas ao final dos cultivos 1 e 2, realizados em meio isento de soro.

Pensou-se inicialmente em tentar quantificar a proteína detectada na membrana de nitrocelulose medindo a intensidade da coloraçção da banda presente na membrana de nitrocelulose (método da densitometria) utilizando software da Kodak Digital Science 1D™. Para tanto, foi necessário construir uma curva



padrão, tendo a proteína Alternagina-C como proteína padrão homóloga a proteína de interesse (ACLD). A referida proteína padrão foi obtida através do isolamento e purificação do veneno da *Bothrops alternatus*. A determinação da curva padrão foi realizada em triplicata utilizando soluções de alternagina-C nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,2 e 1 mg/mL. As amostras foram ressuspensas em TBS com um volume final de 100µl e aplicadas em membrana de nitrocelulose juntamente com as amostras obtidas dos cultivos, contendo a proteína de interesse (Figura 26).

Este método mostrou-se inadequado, devido à dificuldade de se obter reprodutibilidade na detecção das soluções da curva padrão e das amostras aplicadas. Desta forma, decidiu-se testar a cromatografia de troca iônica para isolar a proteína de interesse, detectá-la por “dot blot” e posteriormente quantificá-la.

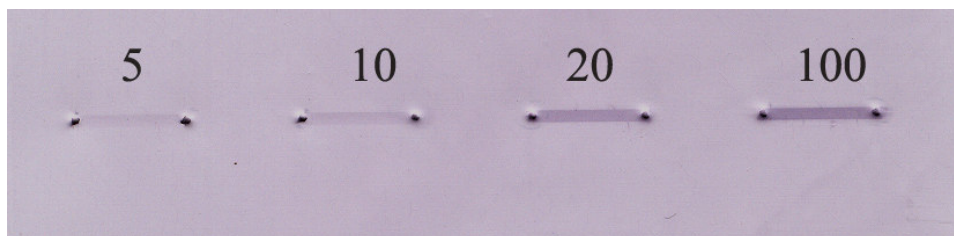


Figura 26. Construção da curva padrão utilizando como padrão proteína Alternagin-C aplicando 100µl de cada amostra em membrana de nitrocelulose. As amostras foram eluídas em TBS-1X contendo Tween 20. Os valores descritos na figura equivalem a quantidade em massa µg.

4.3.2. Purificação parcial da desintegrina por cromatografia por troca iônica.

Após confirmação da presença de desintegrina nas amostras retiradas nos dois ensaios realizados com o meio isento de soro, as amostras concentradas obtidas no final dos referidos ensaios foram submetidas a fracionamento por troca

iônica no HPLC (Figuras 27, 29, 30 e 31). O objetivo do fracionamento era isolar a proteína de interesse, que poderia ser recolhida em alguma(s) fração(ões) liberada(s) pela coluna, já separada dos contaminantes, que poderiam interferir na quantificação. As amostras concentradas coletadas ao final dos ensaios 1 e 2 foram primeiramente dialisadas contra TrisHCl 10mM pH 8,6 e então submetidas a fracionamento por cromatografia de troca iônica, utilizando coluna Mono-Q no sistema HPLC da Shimadzu, eluídas em TrisHCl 10mM pH 8,6, com gradiente linear de 0 a 1M de NaCl e perfil de eluição descrito na Tabela 17. As frações coletadas no HPLC (volume entre 5mL a 100µl), correspondentes aos picos que foram obtidos no perfil cromatográfico, foram liofilizadas em equipamento Speed Vac e algumas amostras foram ressuspendidas com 100µl de água ultrapura.

Tabela 17. Perfil de eluição do gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl aplicados em cromatógrafo das amostras condicionadas e concentradas referente ao cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Tampão TrisHCl 10mM pH8,6 (%)</b>	<b>Tampão TrisHCl 10mM pH8,6 . 1M NaCl (%)</b>
0	100	0
10	80	20
20	75	25
30	60	40
40	0	100

Em seguida as frações eluídas da cromatografia foram analisadas em membrana de nitrocelulose para a imunodeteção da proteína recombinante, como mostra a Figura 28.

As frações recolhidas foram enumeradas conforme indicado nas Figuras 27, 29, 30 e 31 de acordo com a posição do pico aonde se detectou a proteína de interesse. A purificação por cromatografia de troca iônica acusou a presença da proteína ZMD nos picos 4-, 5- e 8- do segundo ensaio, na última amostra retirada ao final do cultivo (Figura 28). Observa-se que as frações recolhidas durante fracionamento cromatográfico da amostra de tempo 3 horas do segundo ensaio, quando aplicadas na membrana de nitrocelulose, não apresentaram a desintegrina (Figura 28). Entretanto, em aplicação direta da mesma amostra em teste de imunodeteção realizado anteriormente (Figura 25), a presença da proteína ZMD foi detectada com forte intensidade de coloração da banda. A diferença entre os resultados obtidos imunodeteção para a aplicação direta da amostra ou das suas frações eluídas por cromatografia pode estar relacionada à ocorrência de degradação da proteína, pelo fato da mesma ter sido armazenada na forma de solução congelada no período compreendido entre as duas análises.

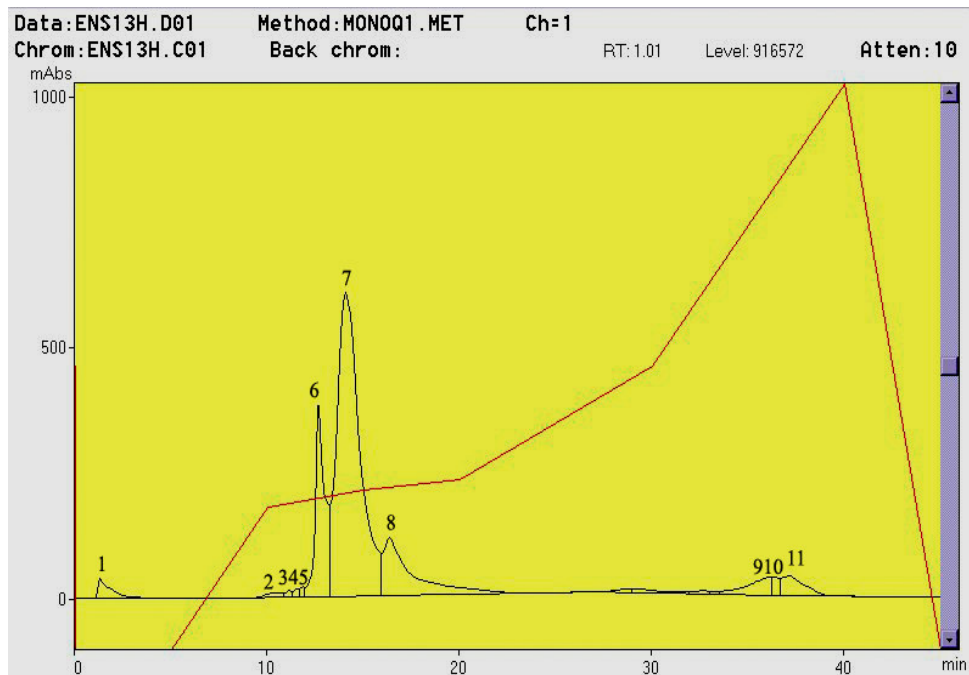
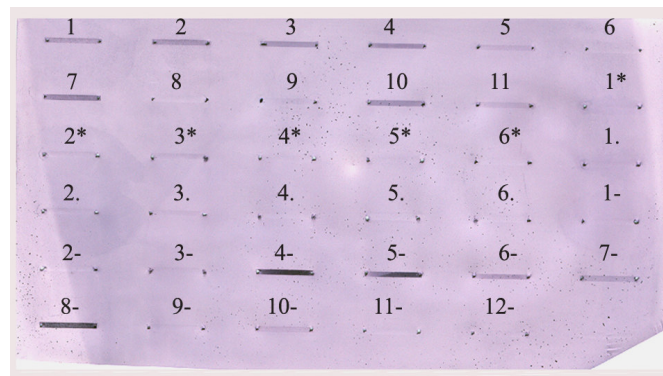


Figura 27. Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do primeiro ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 3 horas. Volume aplicado 500 $\mu$ l, HPLC Shimadzu.



A

Figura 28. Imunodeteção das frações coletadas após fracionamento das amostras dos ensaios 1 e 2. Anticorpos: anti-MD recombinante (1:500) e anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (1:5000). Volume aplicado: 100 $\mu$ l de cada fração, HPLC Shimadzu. Bandas 1 a 11  $\rightarrow$  Frações coletadas durante fracionamento da amostra de 3h Ensaio 1. Bandas 1\*a 6\*  $\rightarrow$  Frações coletadas durante fracionamento da amostra de 6h Ensaio 1. Bandas 1. a 6.  $\rightarrow$  Frações coletadas durante fracionamento da amostra de 3h Ensaio 2. Bandas 1- a 12-  $\rightarrow$  Frações coletadas durante fracionamento da amostra de 6h Ensaio 2.

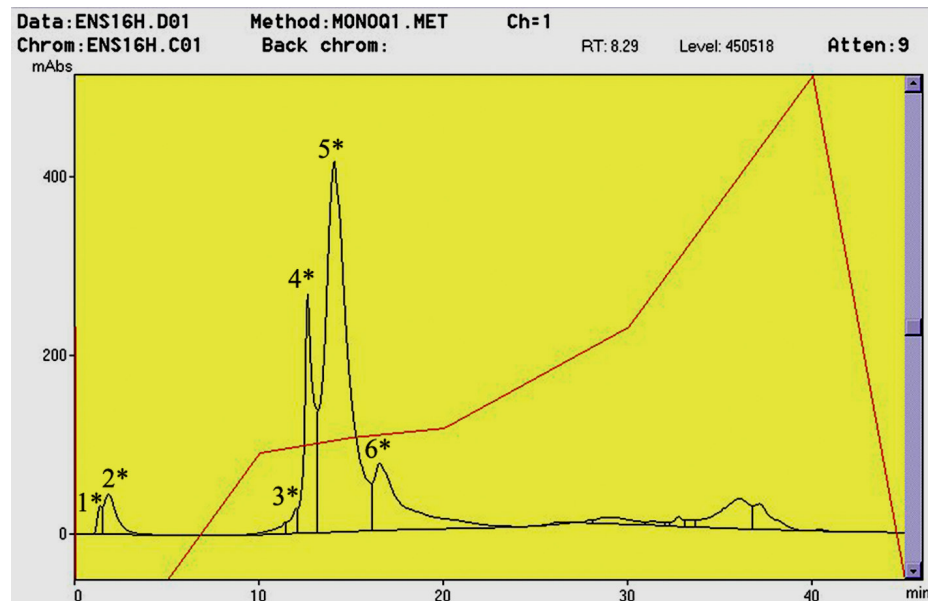


Figura 29. Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do primeiro ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 6 horas. Volume aplicado 500µl, HPLC Shimadzu.

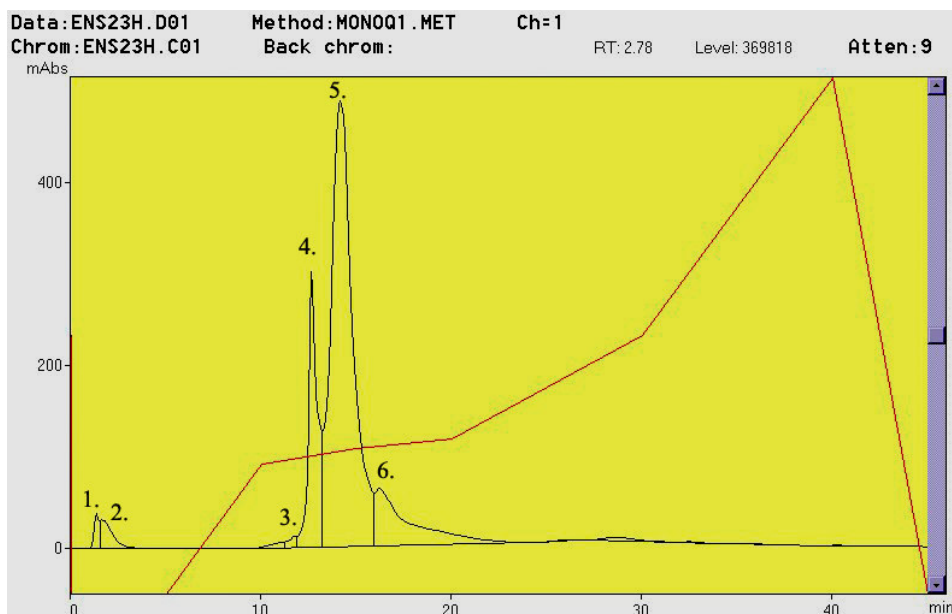


Figura 30. Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do segundo ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 3 horas. Volume aplicado 500µl, HPLC Shimadzu.

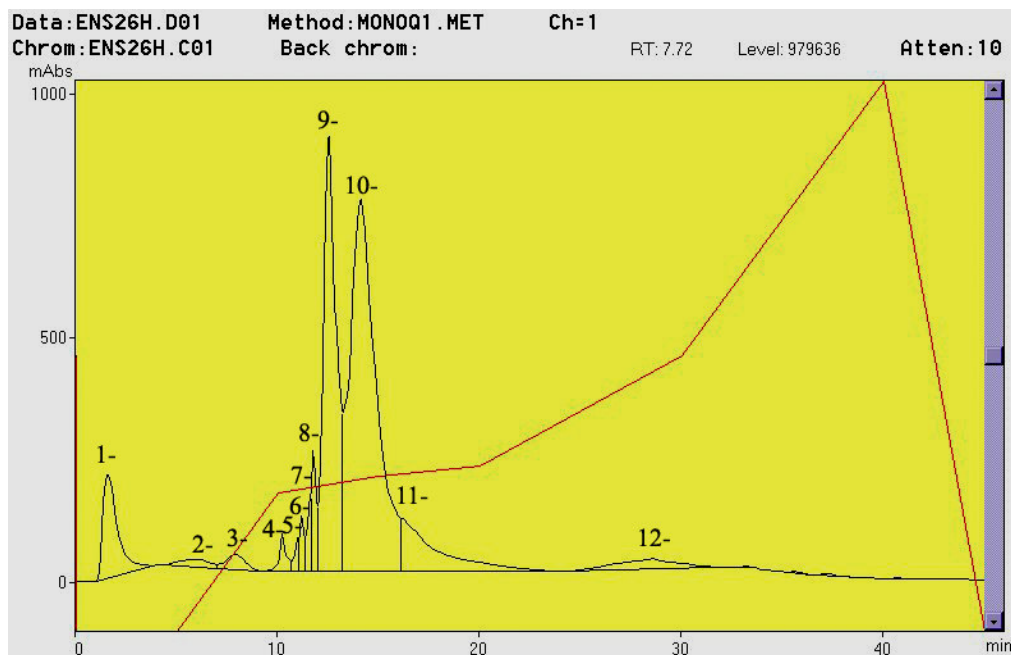


Figura 31. Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do segundo ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 6 horas. Volume aplicado 500 $\mu$ l, HPLC Shimadzu.

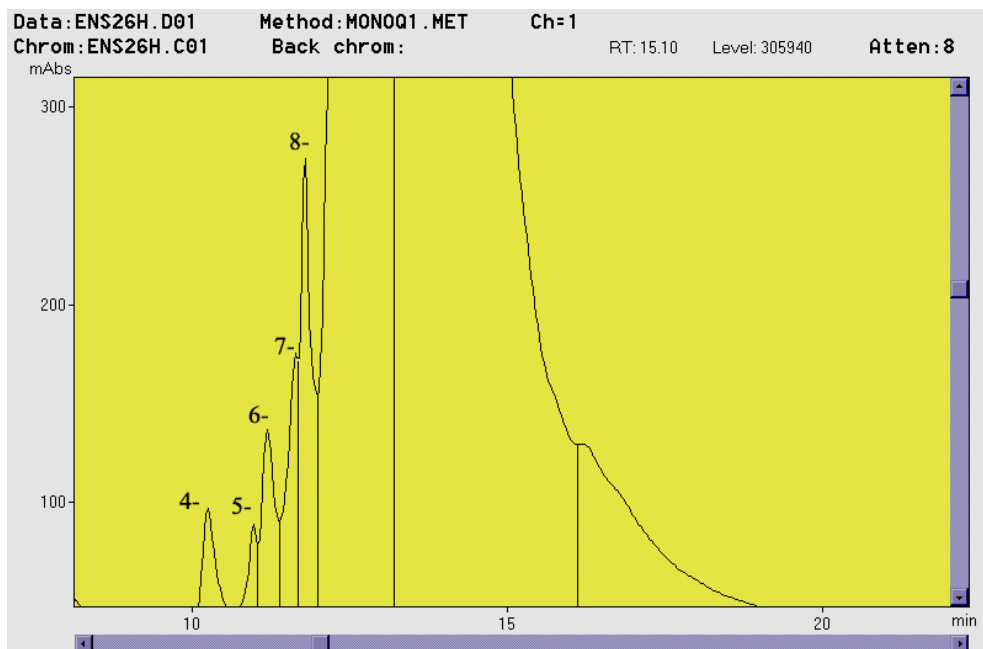


Figura 32. Ampliação da região da Figura 30 onde estão localizados os picos nos quais foi detectada a desintegrina.

Com a intenção de melhorar a separação, a amostra do tempo 6 horas do segundo cultivo em meio livre de soro foi aplicada novamente no HPLC, adotando-se um gradiente mais suave do que o empregado no fracionamento anterior da mesma amostra, cujo cromatograma está representado na Figura 31. A Figura 33 mostra o perfil cromatográfico obtido com o gradiente mais suave de acordo Tabela 18. Observa-se que não houve melhoria na separação, apenas um aumento de aproximadamente 14 minutos no tempo de retenção.

Tabela 18. Perfil de eluição do gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl aplicados em cromatógrafo das amostras condicionadas e concentradas referente ao cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina procurando adicionar um gradiente mais suave em relação ao da Tabela 17.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Tampão TrisHCl 10mM pH8,6 (%)</b>	<b>Tampão TrisHCl 10mM pH8,6 . 1M NaCl (%)</b>
0	100	0
10	90	10
15	85	15
20	80	20
25	70	30
30	60	40
40	0	100

Tendo em vista que as metodologias de detecção testadas (imunodeteção de amostra concentrada ou fracionamento da amostra concentrada em coluna troca iônica, seguido por imunodeteção das frações) foram relativamente efetivas na identificação da desintegrina nos cultivos utilizando meio isento de soro, resolveu-

se verificar a validade das referidas metodologias em meios com diferentes composições. Os resultados obtidos nos casos estudados (meio contendo hemolinfa e meio contendo soro fetal bovino) são apresentados a seguir.

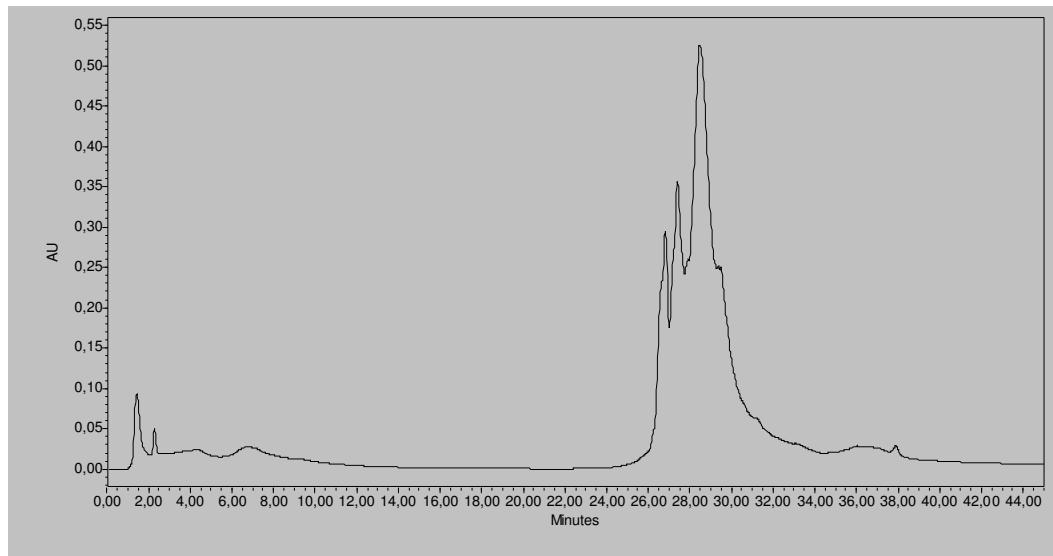


Figura 33. Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada do segundo ensaio com adaptação ao meio livre de soro, tempo de 6 horas. Volume aplicado 200µl, com gradiente mais suave, HPLC Shimadzu.

4.3.3. Detecção de desintegrina produzida com suplementação de hemolinfa ao meio de cultivo.

O uso de soro fetal bovino como fora dito implica em dificuldades como alto custo do soro, inerente variabilidade de diferentes lotes de soro, possibilidade de contaminação (vírus, micoplasma, bactéria, fungos e endoxinas) e complicações na separação do produto devido à presença de altas quantidades de proteínas provenientes do soro.



A hemolinfa é o líquido que se encontra no sistema circulatório de certos invertebrados, sendo uma matéria prima de menor custo, se comparada ao custo do soro fetal bovino, que representa 90% do custo total do meio quando é adicionado na proporção de 10% v/v (MUHAMED, 1998). Estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de reduzir a concentração do soro fetal bovino no meio por meio de sua substituição gradual por um suplemento de hemolinfa. (RHEE, KIM & PARK, 2002). Além da redução do custo, a suplementação com hemolinfa pode trazer benefícios adicionais ao cultivo, considerando-se que há evidências que a mesma inibe a apoptose tanto em células de inseto quanto em células animais (HA *et al.* 1997; CHOI *et al.*, 2002).

Um suplemento com estas características se adicionado aos meios comerciais, atualmente utilizados em bioprocessos com célula animal, poderá contribuir significativamente com melhoras na eficiência produtiva e no custo final do produto, sendo de fundamental importância avaliar a metodologia testada para detecção da desintegrina em meios contendo hemolinfa.

O crescimento de células CHOZMD em meio suplementado com hemolinfa foi estudado por Raffoul (2004). O ensaio foi realizado em frasco spinner, com volume de trabalho de 200 mL, inoculado com  $1.10^5$  cel/mL e teve duração de 151 horas. O meio de cultivo empregado consistiu em meio DMEM suplementado com 1%v/v de extrato de hemolinfa e 4,5g/l de glicose. A Figura 34 apresenta os excelentes resultados obtidos em termos de concentração de células aderidas.

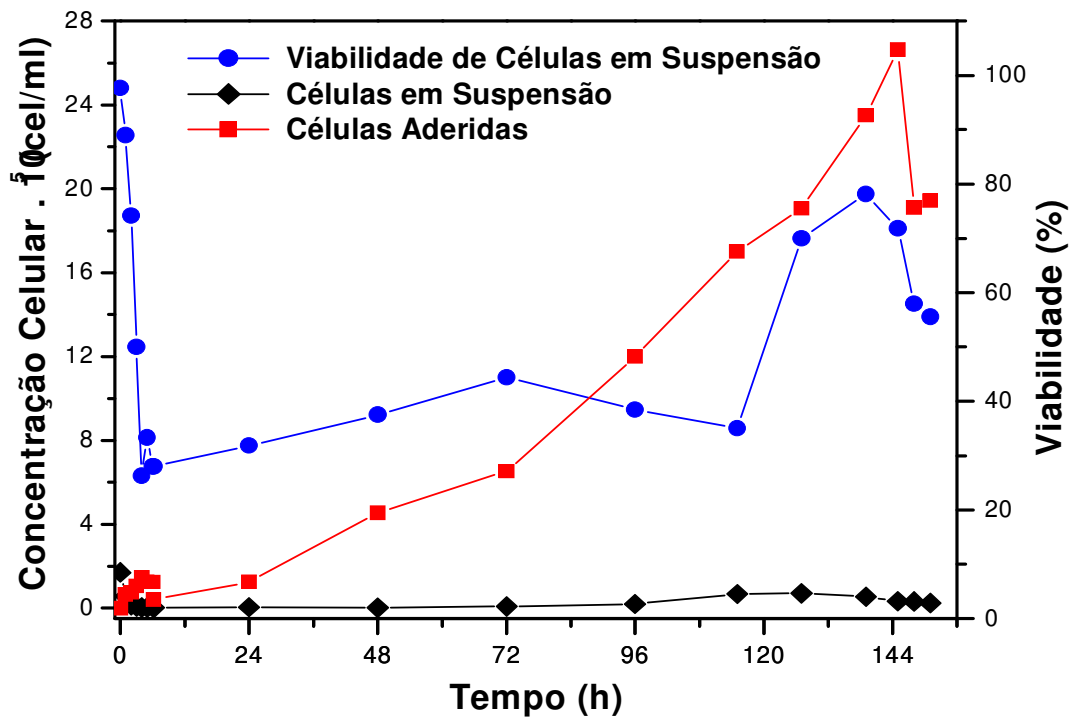


Figura 34. Cultivo de célula CHOZMD em meio DMEM suplementado com 1%v/v de hemolinfa e 10% de FBS com um volume de trabalho de 200mL, utilizando o microcarregador Cytodex 1 (RAFFOUL, 2004). Os valores experimentais encontram-se no Apêndice A.

As amostras cedidas por Raffoul foram retiradas no final do cultivo, tendo sido coletadas em tempos de 3 e 6 h após a última troca de meio. Estas amostras foram submetidas a tratamento semelhante ao adotado para as amostras dos cultivos realizados em meio livre de soro e submetidas a imunodeteção. A Figura 35 mostra uma expressiva produção de desintegrina no cultivo realizado por Raffoul, sendo que a presença de hemolinfa, diferentemente do soro, não causou nenhuma interferência na imunodeteção.

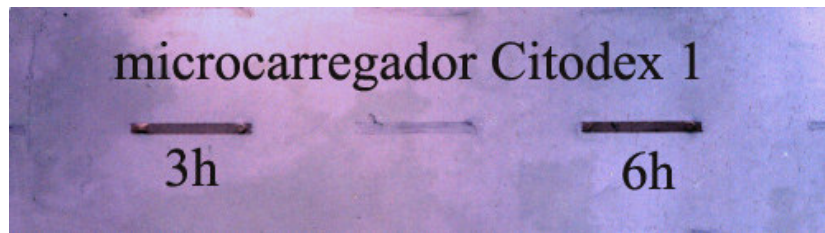


Figura 35. Identificação da proteína desintegrina por imunodeteção em amostras concentradas obtidas no final do cultivo de célula CHOZMD em meio suplementado com 1% v/v de hemolinfa. Volume aplicado: 200  $\mu$ l.

As amostras cedidas por Raffoul foram ainda submetidas a fracionamento em coluna de troca iônica (Figuras 36 e 37). Observa-se que os cromatogramas representando o fracionamento das amostras dos cultivos com hemolinfa contém uma quantidade muito menor de contaminantes do que os cromatogramas das amostras obtidas nos cultivos com meio livre de soro (Figuras 27, 29, 30 e 31).

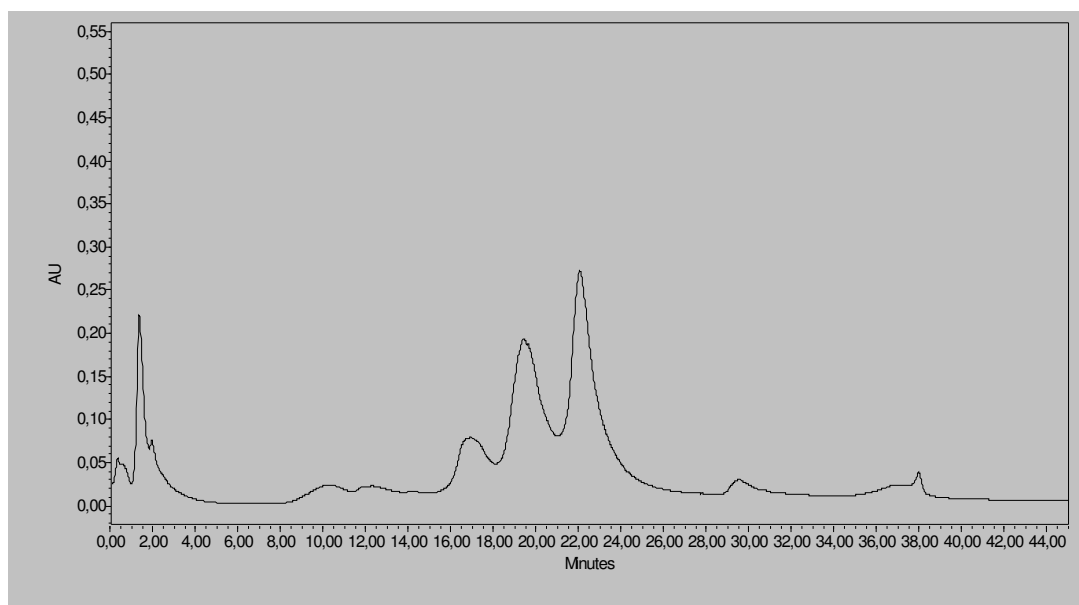


Figura 36. Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada de cultivo com meio DMEM suplementado com 1% de hemolinfa e 10% de soro, tempo de 3 horas, em meio CHO-S-SFM. Volume aplicado 200  $\mu$ l, HPLC Shimadzu.

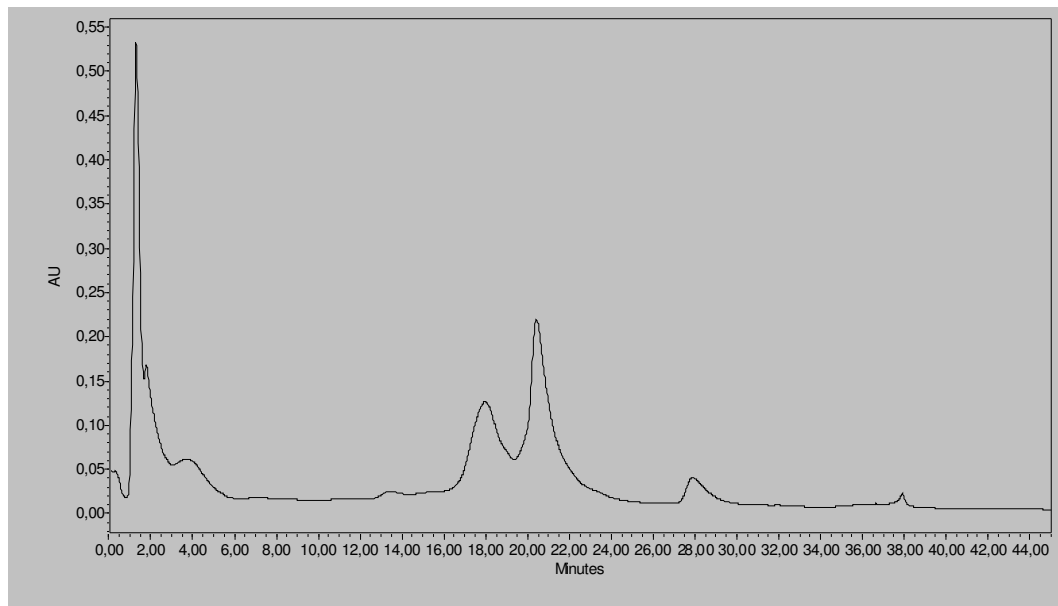


Figura 37. Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada de cultivo com meio DMEM suplementado com 1% de hemolinfa e 10% de soro, tempo de 6 horas, em meio CHO-S-SFM. Volume aplicado 200 $\mu$ l, HPLC Shimadzu.

As frações obtidas por separação cromatográfica das amostras concentradas do cultivo suplementado com hemolinfa foram coletadas e submetidas à teste de imunodeteção para isolamento da proteína de interesse. Apesar da intensa coloração da banda obtida no “dot blot” das amostras concentradas (Figura 35), não foi detectada presença de desintegrina em nenhuma das frações eluídas na cromatografia. Conforme discutido anteriormente, a dificuldade em detectar a proteína de interesse nas frações produzidas na cromatografia pode estar relacionada à degradação da mesma. Outro fator que pode estar contribuindo para a perda de proteína é a retenção de amostra na coluna, que é especialmente preocupante quando o volume de amostra injetado é pequeno, como é o caso (200  $\mu$ L).

4.3.4. Detecção de desintegrina produzida com suplementação de soro fetal bovino ao meio de cultivo.

Diante da impossibilidade de detectar a desintegrina presente em amostras concentradas de cultivos suplementados com soro fetal bovino (4.1) diretamente por imunodetecção, decidiu-se aplicar uma metodologia de purificação similar à proposta por Shimokawa e colaboradores em 1996, que consiste no uso de uma coluna de afinidade para remover a albumina.

Desta forma, uma amostra concentrada obtida em cultivo das células CHOZMD em meio DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino (realizado por Swiech, 2003) foi aplicada em coluna de afinidade e o resultado do fracionamento é apresentado na Figura 38. A albumina foi efetivamente isolada do meio de cultivo (pico em torno de 20 minutos). Porém, além da albumina, outras substâncias presentes na amostra foram eluídas da coluna em um único pico com tempo de retenção entre 9 e 18 minutos.

Todas as frações coletadas foram aplicadas em membrana nitrocelulose para realização de “dot blot”, entretanto nenhuma banda foi formada, o que significa que a proteína não foi reconhecida pelo anticorpo policlonal.

Pela amplitude e intensidade do primeiro pico exibido na Figura 38, pode-se concluir que o soro contém uma grande quantidade de outras substâncias que podem interferir na imunodetecção da desintegrina, e que, portanto, a albumina não é a única fonte de interferência. Fica assim, mais fortemente evidenciado que o meio suplementado com soro não é adequado para o desenvolvimento de

estudos para detecção de desintegrina.

UNICORN V3.00  
Run by: bel 24/03/04 15:07:28  
Result file: c:\bel\dilson\marina01  
Method file: marina

Variable settings for run

Chromatogram Questions

No 1: Sample volume and type:  
dmem+fbs

No 2: Column:  
HiTrap Blue 5 mL

No 3: Start Eluent (A1):  
Tampao fosfato de potássio 50 mM pH 7,4

No 4: Eluent 1 (B1):  
Tampao fosfato de potássio 50 mM pH 7,4 + 1,5 M KCl

— marina01:1\_UV1\_280nm    - - - marina01:1\_Cond    - - - marina01:1\_Conc  
- - - marina01:1\_pH    - - - marina01:1\_Fractions

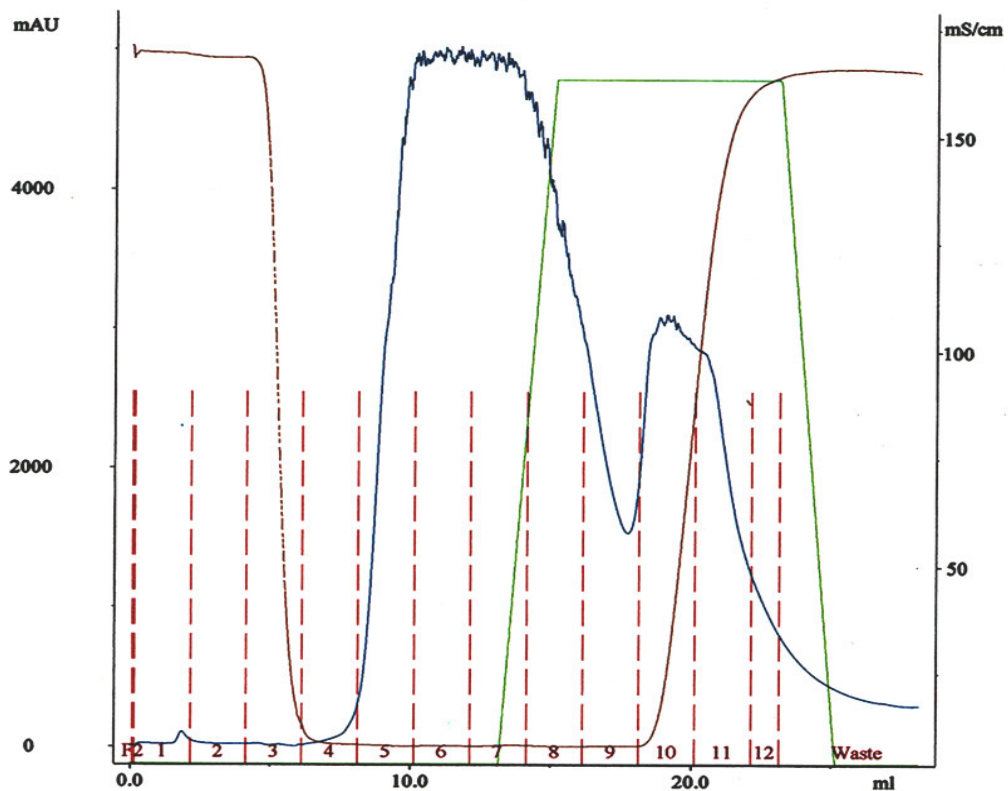


Figura 38. Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina. Amostra retirada após 144 horas de cultivo em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, utilizando microcarregador Pronectin F. Volume aplicado: 2mL; coluna Affi-Blue.

#### 4.4 Comparação entre as análises das amostras aplicadas.

Para uma melhor análise dos resultados obtidos, buscou-se associar a produção da desintegrina, avaliada em termos qualitativos por meio dos testes de imunodeteção, com outros fatores importantes como a concentração celular obtida nos cultivos, o volume inicial de amostra utilizado para concentração, volume de amostra injetado na coluna e volume de amostra concentrada aplicado na membrana de nitrocelulose. Os parâmetros selecionados para a análise são mostrados nas Tabela 19 e 20.

Tabela 19. Concentração celular, volume inicial de amostra e intensidade da coloração da banda para as diferentes amostras concentradas submetidas ao ensaio de imunodeteção. Volume final da amostra concentrada: 1 a 1,5 mL.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração Celular (células. mL<sup>-1</sup>. 10<sup>6</sup>)</b>	<b>Volume inicial da amostra a ser concentrada (mL)</b>	<b>Volume aplicado DOT (µL)</b>	<b>Intensidade da banda no DOT</b>
Ensaio 1-3h	0,93	250	100	Inexistente
Ensaio 1-6h	1,19	250	100	Fraco
Ensaio 2-3h	1,72	250	100	Forte
Ensaio 2-6h	1,74	250	100	Médio
Hemolinfa 3h	1,91	100	200	Intenso
Hemolinfa 6h	1,94	100	200	Intenso

De acordo com os valores apresentados na Tabela 19, percebe-se a existência de uma relação coerente entre a concentração celular e a intensidade de

coloração da banda. Nota-se que as bandas com coloração mais intensa foram produzidas no teste de imunodeteção das amostras do cultivo suplementado com hemolinfa, o qual apresentou crescimento celular ligeiramente superior. Por outro lado, o volume inicial de amostra submetido à concentração foi 2,5 vezes menor para as amostras dos cultivos com hemolinfa, enquanto a fração aplicada no dot foi equivalente ao dobro, indicando que ocorreu a produção significativa da proteína no cultivo suplementado com hemolinfa.

Tabela 20. Frações de maior volume obtidas na separação cromatográfica das amostras coletadas nos cultivos realizados em meio livre de soro e em meio suplementado com hemolinfa (Figuras 27, 29, 30, 31, 36 e 37) e a análise da intensidade de coloração da banda quando aplicadas ao teste de imunodeteção (Figuras 28 e 35). Valores da medida da absorvância dos picos obtidos (UA), volume da fração injetado na coluna Mono-Q com os respectivos tempo de retenção e volume das frações aplicado na membrana de nitrocelulose.

<b>Frações eluídas de amostras aplicadas</b>	<b>UA</b>	<b>Volume injetado (µl)</b>	<b>Volume aplicado no Dot (µl)</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Intensidade da banda no Dot</b>
Ensaio1-3h (Pico 7)	0,590	500	100	13,79	Médio
Ensaio1-6h (Pico 5*)	0,420	500	100	13,01	Inexistente
Ensaio2-3h (Pico 5.)	0,510	500	100	13,44	Inexistente
Ensaio2-6h (Pico 9-)	0,970	500	100	13,10	Inexistente
Ensaio2-6h (Pico 4-)	0,096	500	100	9,66	Forte
Ensaio2-6h (Pico 5-)	0,081	500	100	10,69	Forte
Ensaio2-6h (Pico 8-)	0,287	500	100	11,72	Forte
Hemolinfa 3h	0,280	200	200	21,00	Inexistente
Hemolinfa 6h	0,230	200	200	19,30	Inexistente



Pelos valores apresentados na Tabela 20, observa-se que as frações que apresentaram formação de banda na membrana de nitrocelulose correspondem aos picos menores obtidos no cromatograma da amostra de 6h do ensaio 2 (Figura 31), com tempo de retenção foi em torno de ~10 a 12 minutos. Para comparação, na Figura 39 é mostrado o cromatograma obtido por Iemma (2002) ao submeter amostra de cultivo de células CHOZMD a fracionamento cromatográfico em coluna Mono-Q. De acordo com a autora, por aplicação das frações eluídas em testes de imunodeteção, a proteína desintegrina foi detectada no pico 5, cujo tempo de retenção de é de aproximadamente 12 minutos. Desta forma, pode-se afirmar que os resultados apresentados na Tabela 20 para as frações da amostra do ensaio 2 (6 h) contendo desintegrina estão de acordo com os resultados obtidos por Iemma (2002) em termos de tempo de retenção. No entanto, Iemma identificou a proteína em um único pico, enquanto que no presente trabalho a proteína se distribuiu em 3 picos próximos. Este fato pode ser atribuído a alguma forma de degradação da proteína de interesse. Convém ainda destacar que Iemma conseguiu isolar a desintegrina por cromatografia de troca iônica e detectá-la por imunodeteção removendo a suplementação do meio com soro fetal bovino durante as últimas 48 horas de cultivo.

Os resultados referentes a Tabela 20 demonstram que as frações das amostras de hemolinfa que foram aplicadas na coluna Mono-Q não apresentaram sinal na membrana de nitrocelulose, embora na Tabela 18 tenham sido as amostras que apresentaram sinal mais intenso. Um dos motivos deste resultado pode ser atribuído ao volume injetado na coluna, visto que somente 200µl foram injetados

para o fracionamento das amostras dos cultivos suplementados com hemolinfa, enquanto que para a amostra do ensaio 2 (6 h) foi injetado um volume de 500µl. Como a coluna de troca iônica pode reter uma parcela da amostra aplicada, o ideal seria que fosse injetado o maior volume possível, para que a quantidade retida na coluna não interferisse no resultado do “dot”.

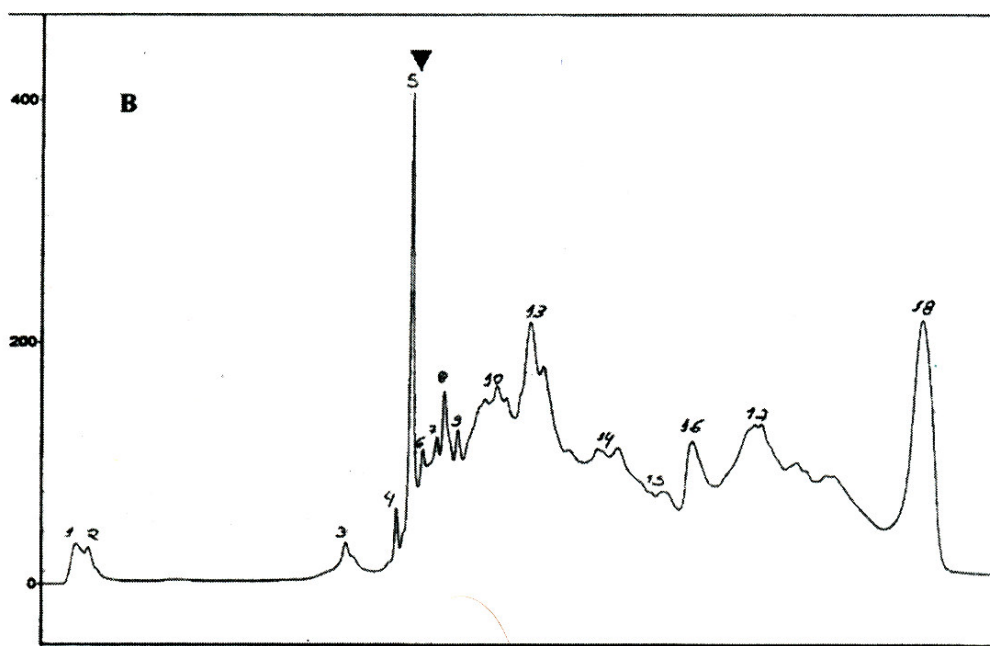


Figura 39. Perfil cromatográfico de amostra condicionada e concentrada do cultivo de células CHOZMD para produção de desintegrina, realizado em frasco T contendo meio DMEM suplementado 10% de soro. Adição de soro interrompida 48 horas antes de retirada da última amostra. Volume aplicado ao HPLC: 500 µl, coluna Mono-Q (IEMMA, 2002).

Com relação à análise de dosagem de proteínas totais (Tabela 21) verifica-se que há uma grande quantidade de proteínas contidas no meio, tanto para o meio livre de soro como para o meio suplementado com hemolinfa. Em termos de atividade proteolítica, observa-se que os valores mais expressivos foram calculados para as amostras concentradas dos cultivos realizados com hemolinfa,

as quais também apresentaram maior intensidade de coloração da banda no teste de imunodeteção.

Tabela 21. Atividade proteolítica, dosagem de proteínas totais e atividade específica das amostras concentradas obtidas ao final dos cultivos da célula CHOZMD.

<b>Amostras</b>	<b>Atividade proteolítica (UA) 25µl de amostra</b>	<b>Dosagem de Proteínas (Bradford) (mg/mL)</b>	<b>Atividade Específica (UA/mg)</b>
Ensaio1-3h	0,033	9,096	0,00362
Ensaio1-6h	0,001	7,270	0,00014
Ensaio2-3h	0,002	8,571	0,00023
Ensaio2-6h	0,009	10,000	0,00090
Hemolinfa 3h	0,044	9,341	0,00471
Hemolinfa 6h	0,032	9,062	0,00353

Os baixos valores para a atividade proteolítica das amostras dos ensaios realizados em meio livre de soro podem estar relacionados ao maior tempo de manutenção das amostras sob refrigeração assim como às quantidades de vezes em que as mesmas foram descongeladas, fatores que podem levar à degradação da proteína.

Para esclarecer a questão da ocorrência de degradação da desintegrina em função do tempo de armazenamento da amostra ou de manutenção em temperatura ambiente durante a realização das análises cromatográficas foi realizado um estudo específico, cujos resultados são apresentados a seguir.

#### 4.5 Análise da ocorrência de degradação da proteína recombinante.

A ocorrência de degradação de proteína sintetizada em cultivos de células CHO foi relatada por Harmut *et al.* (1997) para o caso da produção de apolipoproteína humana A-I recombinante, tendo sido verificado que, para uma produção de 80 µg/mL, a proteína expressa nesses níveis apresentou um alto grau de degradação.

Essas proteínas secretadas por células animais, em sua grande maioria, são glicoproteínas, que possuem cadeias laterais de carboidratos que geralmente influenciam as suas propriedades biológicas e bioquímicas, tais como conformação, secreção, proteção contra degradação proteolítica, desnaturação térmica, atividade específica, antigenicidade e tempo de meia vida *in vivo* (BOLLATI-FOGOLÍN, 2002; GOOCHE E MONICA, 1990).

O primeiro estudo de degradação foi realizado com o controle positivo utilizado nos experimentos, o qual foi obtido da transfecção de células que crescem em suspensão (células K562- erytroleukemia cells) (IEMMA, 2002). Estas células foram mantidas nas mesmas condições das células CHOZMD. A Figura 40 mostra o dot-blot de uma aplicação de 5 µl do controle positivo, realizada em 22/04/2003. Já na Figura 41 são mostradas 3 aplicações de 100 µl do controle positivo realizadas praticamente 1 ano depois. Embora o controle tenha sido armazenado a baixa temperatura, a ocorrência de degradação é evidente quando se compara a intensidade de coloração das bandas reproduzidas na Figura

40 e na Figura 41 (0 horas). Analisando apenas as bandas reproduzidas na Figura 41, nota-se que houve redução na intensidade de coloração da banda para as amostras mantidas por 4 e 12 horas a temperatura ambiente, em comparação com a coloração da banda formada pela amostra aplicada imediatamente após o descongelamento.

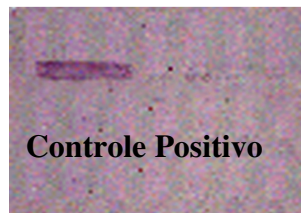


Figura 40. Identificação da proteína desintegrina em um volume de 5  $\mu$ l de controle positivo obtido no cultivo de células K562- (erytroleukemia cells) em frasco T de 150cm<sup>2</sup> para produção de desintegrina em meio DMEM. O meio foi armazenado a uma temperatura de - 20°C e a fração de 5 $\mu$ l de controle positivo foi aplicada na data de 22/04/2003.

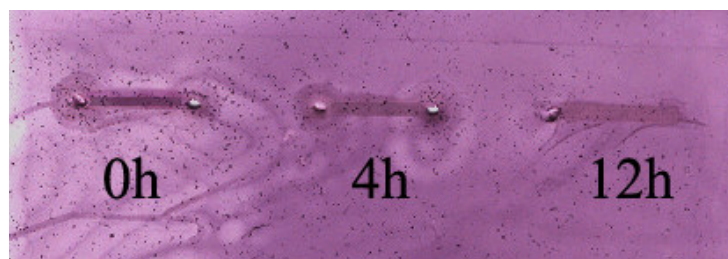


Figura 41. Identificação da proteína desintegrina em um volume de 100  $\mu$ l de controle positivo. A alíquota de 100  $\mu$ l foi aplicada na data de 20/05/2004 após o descongelamento (tempo 0 h) e após períodos de permanência à temperatura ambiente de 4 e de 12 horas.

Resultados semelhantes foram verificados em estudo de degradação utilizando amostras concentradas do cultivo suplementado com hemolinfa. Na Figura 42 estão reproduzidas as bandas obtidas quando as amostras de 3 e 6 h

foram descongeladas e aplicadas imediatamente. Já na Figura 43 são exibidas as bandas obtidas na aplicação das mesmas amostras, só que após a manutenção destas à temperatura ambiente por 48 horas. Mais uma vez, a comparação da intensidade de coloração das bandas reproduzidas nas Figuras 41 e 42 indica a ocorrência de degradação.

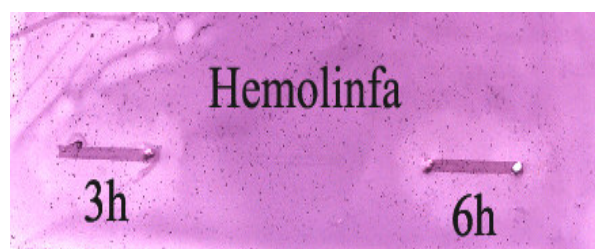


Figura 42. Identificação da proteína desintegrina em um volume de 100 $\mu$ l de amostras concentradas retiradas ao final do cultivo em meio suplementado com 1%v/v de hemolinfa, após 3 meses de armazenamento a uma temperatura de -20°C.

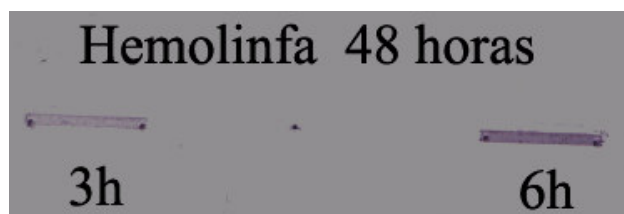


Figura 43. Identificação da proteína desintegrina em um volume de 200 $\mu$ l de amostras concentradas retiradas ao final do cultivo em meio suplementado com 1%v/v de hemolinfa, após 3 meses armazenamento a temperatura -20°C, mantidas por 48 horas à temperatura ambiente.

Embora para a construção da linhagem CHOZMD a forma de produção de zimogênio da ACLD, a ZMD, tenha sido escolhida a fim de se evitar a autodegradação (IEMMA, 2002), os resultados apresentados nas Figuras 40, 41, 42 e 43 revelam indícios de que a proteína recombinante degradou gradativamente

ao longo do tempo, a baixas temperaturas ou em períodos de tempo mais curtos, quando deixada à temperatura ambiente.

## 5. CONCLUSÕES

- Apesar da importância do soro fetal bovino como promotor no crescimento e adesão celular, a metodologia empregada para adaptar as células ao meio CHO-S-SFM II foi bem sucedida e as células apresentaram crescimento satisfatório no meio isento de soro.

- O cultivo de células em microcarregador em meio com baixo teor de proteína permitiu a detecção da desintegrina, a qual é impossibilitada em meio contendo suplemento de soro fetal bovino devido à interferência das proteínas presentes no mesmo. O método de imunodeteção mostrou-se bastante eficaz na detecção da desintegrina em meio livre de soro, confirmando a secreção da proteína no meio de cultura.

- Além disso pode se verificar a expressão da proteína utilizando meio livre de soro CHO-S-SFM II, mesmo sabendo que o promotor vetor pCDNA3 é induzível pelos fatores de crescimento contidos no soro fetal bovino que suplementa o meio de cultivo.

- A implementação de uma metodologia de detecção e quantificação iniciada neste trabalho é de fundamental importância para os trabalhos em andamento e os futuros estudos relacionados a desintegrina ZMD. O cultivo das células CHOZMD em meio isento de soro permitiu que uma metodologia para a detecção, nestas condições, fosse desenvolvida. Esta metodologia consiste no tratamento das amostras do cultivo por diálise e concentração, aplicação das



amostras tratadas em coluna de troca iônica, coleta das frações e aplicação das mesmas em ensaio de imunodeteção. Outra importante contribuição do presente trabalho refere-se aos cuidados necessários na conservação das amostras retiradas do cultivo e das frações separadas por cromatografia, tendo em vista a facilidade com que a degradação da proteína pode ocorrer. Procedimentos que envolvam o descongelamento e congelamento das amostras para a realização das análises devem ser evitados. Por outro lado, a manutenção das amostras contendo a proteína de interesse na forma liofilizada parece não ser a maneira mais segura de minimizar a degradação, necessitando desta forma de se adicionar ao meio inibidores de protease que evitem a degradação da proteína durante os processos posteriores ao cultivo.

- Quanto ao desenvolvimento de uma metodologia para quantificar a desintegrina, as alternativas investigadas até o momento não apresentaram resultados satisfatórios. A medida da intensidade da coloração das bandas das amostras aplicadas em membranas de nitrocelulose e a sua correlação com a concentração de proteína por meio de uma curva padrão não apresentou resultados reproduzíveis. O fato da desintegrina estar presente predominantemente nas menores frações separadas por cromatografia inviabiliza o uso da área do pico como parâmetro para a estimativa da concentração. Uma alternativa mais viável para estimar a produção de desintegrina talvez seja a dosagem da proteína por Bradford nas frações obtidas por cromatografia que apresentem formação de banda no teste de imunodeteção. No entanto, para que este método possa ser aplicado, é necessário que um volume significativo de amostra (de 1 a 2 mL)

possa ser injetado no cromatógrafo e que sejam encontradas soluções para manter a estabilidade da proteína durante o armazenamento e as análises.

## 6. SUGESTÕES

Para os futuros trabalhos que venham a ser desenvolvidos sobre a quantificação e detecção de desintegrina são propostas as seguintes sugestões:

- Reavaliar a metodologia de detecção proposta após introduzir as seguintes modificações: i) processar as etapas de concentração das amostras a baixa temperatura e no tempo mais curto possível; ii) manter a amostra concentrada congelada pelo menor tempo possível; iii) não congelar novamente a mesma amostra após descongelamento; iv) aplicar a amostra concentrada em dot-blot para verificar a presença de desintegrina; v) fracionar amostra concentrada por cromatografia de troca iônica, injetando um volume de 1 a 2 mL; vi) aplicar as frações coletadas em dot-blot, juntamente com a amostra concentrada original e vii) fazer dosagem de proteínas totais nas frações eluídas da coluna.

- Realização de novos cultivos, visando manter por mais tempo a célula CHOZMD em meio totalmente livre de soro, a fim de se obter uma maior concentração celular e conseqüentemente altas produtividades de desintegrina recombinante.

- Evitar a degradação da proteína recombinante suplementando o meio de cultivo na etapa final do processo com a utilização de inibidores de proteases específicos.

- Estudar a influência da adição ao meio de cultivo de substâncias como o extrato de levedura na manutenção da estabilidade da proteína

- Desenvolver uma coluna que consiste no preparo de uma matriz com o anticorpo policlonal por cromatografia de afinidade na qual a proteína de interesse se ligará reversivelmente ao suporte.

- Quantificação da proteína por avaliação da sua atividade biológica, desenvolvendo metodologia para análise da adesão celular.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, O.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.O. *Molecular Biology of The CELL.*, 3th ed. New York, Garland Publishing Inc., 1994.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Principles of catalysis In: *Biochemical Engineering*. New York: Editora Marcel Dekker, 1997. 702p.
- BUTLER, M., *Mammalian Cell biotechnology*. Oxford University Press, 1991.
- CHASE, H. A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. *Journal of chromatography*, vol. 297, p. 179 - 202, 1984.
- CHASE, H. A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded bed. *Trends in Biotechnology* vol. 12, p. 296 - 303, 1994.
- CARTWRIGHT, T. *Animal cells as bioreactors*. U.S.A., Cambridge University Press, 1994.
- CHOI, S.S.; RHEE, W.J.; PARK, T.H.. Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. *Biotechnology progress*, v.18, p. 874-979, 2002.
- CRUZ, H. J.; MOREIRA, J.L.; STACEY, G.; DIAS, E. M.; HAYES K.; LOOBY, D.; GRIFFITHS, B. & CARRONDO, M. J. T. Adaptation of BHK cells producing a recombinant protein to serum-free media and protein-free medium. *Cytotechnology* 26: 59–64, 1998.
- DOYLE, A. & GRIFFITHS, J.B. *Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology*. John Wiley & Sons, 1998.
- ELLIOTT, P.; HOHMANN, A.; SPANOS J., Protease expression in the supernatant of Chinese Hamster Ovary cells grown in serum-free culture. *Biotechnology Letters* 25: 1949–1952, 2003.
- FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J. M.; Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 38 (2000): 63-77.
- FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Wiley-Liss, 1994.

- GASMI, A., SRAIRI, N., GUERMAZI, S., DKHIL, H., KAROUI, H., AYEB, M.E. Amino acid structure and characterization of a heterodimeric disintegrin from *Vipera lebetina* venom. *Biochim. Biophys. Acta.* 1547:51-56, 2001.
- GOMES, R. *Oncologia Básica*. Rio de Janeiro: Revinter, 1997. 404 p.
- HA, S. H.; PARK, T. H.; KIM, S. E. Silkworm hemolymph as a substrate for fetal bovine serum in insect cell culture. *Biotechnology Techniques*, v.10, p.401-406, 1996.
- HA, S. H. & PARK, T. H. Efficient production of recombinant protein in *Spodoptera frugiperda* AcNPV system utilizing silkworm hemolymph. *Biotechnology Letters*, v. 19, p.1087-1091, 1997.
- HAMILTON, W. G.; HAM, R. G. Clonal growth of chinese hamster ovary cell lines in protein-free media. *In Vitro* 1977, 13, 537-547.
- HITE, L. A. *et al.*, cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: Structure, Classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 308:182-191, 1994.
- HO, P.L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D.M.O.; SILVA; A.R.B.P.; RAMOS, C.R.R.; NASCIMENTO, A.L.T.O. A arte de purificar proteínas: Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. *Biotecnologia*, 13, 24-26 (2000).
- HYNES, R. O. Integrins: a family of cell adhesion receptors. *Cell* 48, 549-554, 1992.
- IEMMA, M.R.C. Estudo das atividades biológicas de uma metaloproteinase/desintegrina de veneno de serpente. Trabalho de dissertação de Mestrado da UFSCar, São Carlos, 2002.
- Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. <http://www.inca.org.br>. Acesso em: 2002.
- JANSON, J.-C. e RYDÉN, L., em *Biotechnology*, vol. 3, Rehm, H.-J. e Reed, G. (eds.), 617-642, 1993.
- JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON J. B.; FOX, J.W. Inhibition of Platelet Aggregation by Recombinant Cysteine-Rich Domain of the Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinase, Atrolysin A (1999). *Biochem Biophys.*, Vol 373, p. 281-286.
- KANG, C.; KWANG, H. C.; LEE, S. J.; YUN, Y.; MOON, H.; KIM, D. S., 1998 Purification and Molecular Cloning of a Platelet Aggregation Inhibitor

- from the Snake (*Agkistrodon halys brevicaudus*) Venom. *Thrombosis Research* 91 (1998): p.65-73.
- KAMIGUTI, A. S., HAY, C. R. M. e ZUZEL, M. (1996) Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of  $\alpha 2\beta 1$ - integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem J.* 320: p.635-641.
- KASZUBSKA, W., ZHANG, H., PATTERSON, R.L., SUHAR, T.S., UCHIC, M.E., DICKINSON, R.W., SCHAEFER, V.G., HAASCH, D., JANIS, R.S., DEVRIES, P.J., OKASINSKI, G.F., MEUTH, J.L. (2000) Expression and purification and characterization of tie., recombinant thrombopoietin in chinese hamster ovary cells. *Protein Express.Purif.*,18: p.213-220.
- KUMAR, S., WITTMANN, C., HEINZLE, E. (2004) Minibioreactors. *Biochemical Engineering Institute, Saarland University, 66123 Saarbruecken, Germany. Biotechnology Letters* 26: 1–10, 2004.
- LIU, J. W.; DU, X. Y.; LIU, P.; CHEN, X.; XU, J. M.; WU, X. F.; ZHOU, Y. C.(2000) Purificação, Characterization, and cADN Sequence of Halysetin, a Disintegrin-like/Cysteine-Rich Protein from the Venom of *Agkistrodon halys Pallas*. *Biochem Biophys.*, 278, 112-118.
- LODISH, *Molecular cell biology. Media Connected*,1999.
- LOSTER, K. e HORSTKORTE, R. Enzymatic quantification of cell–matrix and cell–cell adhesion. *Micron* 31 (2000) 41–53.
- LOWE, C. R.; BURTON, S. T.; BURTON, N. P.; ALDERTON, W. K.;PITTS, J. M.;THOMAS, J. A. Designer dyes: "biomimetic" ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, vol. 10, p. 442 - 448, 1992.
- MATHER, J. P.; TSAO, M. Expression of cloned proteins in mammalian cells: regulation of cell-associated parameters. In: LUBINIECKI, A.S. *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*. Pensilvânia: Editora Marcel Dekker, 1990. cap.6, p. 161-177.
- MURHAMMER, D.W., GOOCHEE, C.F.. Scale-up of insect cell cultures: Prospective effects of Pluronal F-68. *Bio/Technol.*, v.4, p. 1411-1418, 1988.
- NICHOLL, Desmond S. T. (1994) - *An Introduction To Genetic Engineering*, Cambridge University Press, United Kingdom.

- NG, Y.C.; BERRY, J. M.; BUTLER, M. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. *Cytotechnology*, v.50, p.627-635, 1996.
- OHLSON, S.; BRANSCOMB, J.; NILSSON, K. Bead to bead transfer of Chinese hamster ovary cells using macroporous microcarriers. *Cytotechnology*, v. 14, p. 67- 80, 1994.
- PHARMACIA, *Microcarrier cell culture: Principles and methods*, 1981.
- SANTIAGO, P. A.- Comunicação Pessoal, 2004.
- QUERINO, M. V.- Comunicação Pessoal, 2004.
- RAFFOUL, T.- Desempenho do cultivo de célula CHOZMD em microcarregador Cytodex 1 em meio de cultura suplementado com hemolinfa. Iniciação Científica Fapesp na área de Engenharia bioquímica no Departamento de Engenharia Química da UFSCar, 2004.
- RAMOS, O. H. P.- Produção de uma pró-metaloproteinase recombinante em bactéria, ativação *in vitro* e modelagem molecular. Tese de Dissertação de Mestrado da UFSCar, São Carlos, 2001.
- RHEE, W.J., KIM, E.J.; PARK, T.H.. Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 295, p.779-783, 2002.
- RUOSLATHI, E.- How Cancer Spreads. *Scientific American*. v.275, n.3, p.42-47, 1996.
- SCIENCE EXPRESS, “Descoberta estrutura da proteína-chave envolvida na metástase e angiogenese do tumor”, <http://www.emedix.com.br/not2002/mar2002.shtml> , acesso 07/03/2002.
- SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; SOUZA, D.H.F. OWNBY, C.L. (1997) Analysis of a cADN sequence encoding a novel member of the snake venom metalloproteinase, disintegrin-like, cysteine-rich (MDC) protein family from *Agkistrodom contortrix laticinctus*. *Biochem. Biophys. Acta*. 1342:109-115
- SCHUTT C.; FURLL B.; STELTER F.; JACK R.S.; WITT S. CHO transfectants produce large amounts of recombinant protein in suspension culture. *Immunol Methods* 1997 May 12; 204(1):99-102.
- SHIMOKAWA, K., JIA, L., WANG, X., FOX, J.W. (1996) Expression, Activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, Pro-Atrolysin E. *Arch. Biochem. Biophys.* 335:283-294.



- SHIMOKAWA, K.; SHANNON, J.D.; LI-GUO, J.; FOX, J.W. (1997) Sequence and Biological, activity of Catrocollastatin-C: A desintegrin-like/cysteine-rich two -domain protein from *Crotalus atrox* venom. Arch. Biochem. and Biophys. s, 343:35-43.
- SHIMOKAWA, K., JIA., L., SHANNON, J.D., FOS, J.W. (1998) Isolation, Sequence analysis, and biological activity of Atrolysin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. Arch. Biochem. And Biophys., 354:239-246.
- SWIECH, K. Aumento de escala de frasco T para frasco spinner do cultivo da célula CHO-K1 para a produção de uma proteína recombinante. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- SWIECH, K.; SILVA, G. M. C.; ZANGIROLAMI, T. C.; ARAÚJO, H. S. S.; SUAZO, C. A. T.; Comparação do Desempenho de Vários Tipos de Microcarregadores no Cultivo de Célula Animal CHO-K1, Anais XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis- SC, 2003.
- SUNG, Y. H.; LIM, S. W.; CHUNG, J. Y.; LEE, G. M., Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. Appl Microbiol Biotechnol (2004) 63:527–536.
- WALSH, G. e HEADON, D.R., "Protein Biotechnology", John Wiley and Sons, New York, 1994.
- STEDRONSKY, E.R.; CAPPELLO, J.; DAVID, S.; DONOFRIO, D.M.; MCARTHUR, T.; MCGRATH, K.; PANARO, M.A.; PUTNAM, D.; SPENCER, W.- "Injection molding of ProNectin(R) dispersed in polystyrene for the fabrication of plastic ware activated towards attachment of mammalian cells: biomolecular materials by design." Mat Res Soc Symp Proc USA 1994. p. 330.

## APÊNDICE A

Valores experimentais referentes aos cultivos realizados.

Tabela A1. Valores dos dados experimentais das células em suspensão, células aderidas e viabilidade durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 1).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Células Suspensão. 10<sup>5</sup> (cel.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Células Aderidas 10<sup>5</sup> (cel.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
0	01,00	00,00	93,63
24	00,52	00,63	81,93
48	00,32	01,81	86,27
72	00,87	04,03	94,96
96	01,47	05,36	88,09
104	01,69	05,52	92,59
120	02,89	06,15	94,04
138	03,75	06,48	92,25
149	02,84	06,14	94,06
162	02,41	06,46	89,50
174	02,33	08,90	85,52
186	01,10	08,83	82,47
194	01,66	09,70	81,13
198	02,03	10,30	85,50
210	01,60	09,23	81,32
213	00,50	09,33	56,25
216	01,27	11,90	68,47

Tabela A2. Valores dos dados experimentais do consumo da glicose durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 1).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Glicose (g. L<sup>-1</sup>)</b>
0	3,08
24	2,38
48	1,79
72	1,08
72	2,69
96	0,92
96	2,61
104	1,28
104	2,79
120	1,00
120	2,65
138	0,89
138	2,49
149	1,03
149	2,46
162	1,03
162	2,36
174	1,08
174	2,49
186	1,04
186	2,27
194	1,45
198	1,17
198	2,43
210	0,99
210	3,50
213	2,02
216	1,63

Tabela A3. Valores dos dados experimentais das células em suspensão, células aderidas e viabilidade durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 2).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Células Suspensão. 10<sup>5</sup> (cel.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Células Aderidas 10<sup>5</sup> (cel.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
0	1,00	00,00	93,00
24	0,20	00,49	93,75
48	0,68	01,27	96,33
72	1,49	02,18	95,82
96	2,59	04,26	97,35
108	2,68	07,30	96,50
120	3,13	07,93	96,61
132	4,54	08,19	98,76
144	4,38	09,90	97,29
156	3,43	12,00	95,80
168	3,48	09,77	97,49
180	3,85	15,53	94,99
192	3,09	16,30	89,29
195	1,44	17,22	60,43
198	2,20	17,40	73,58

Tabela A4. Valores dos dados experimentais do consumo da glicose durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Pronectin F em frasco Spinner com um volume de 500mL de meio de cultura (Ensaio 2).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0	4,45
24	2,61
48	2,52
72	1,86
72	3,11
96	1,67
96	2,91
108	2,02
108	3,17
120	1,51
120	2,97
132	1,56
132	2,88
144	1,31
144	2,73
156	1,40
156	2,70
168	1,36
168	2,63
180	1,21
180	2,55
192	1,13
192	3,50
195	2,65

Tabela A5. Valores dos dados experimentais das células em suspensão, células aderidas e viabilidade durante cultivo da célula CHOZMD com microcarregador Citodex 1 em Frasco Spinner com um volume de 200mL de meio de cultura DMEM suplementado com 1% v/v hemolinfa (RAFFOUL, 2004).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Células Suspensão. 10<sup>5</sup>(cel.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Células Aderidas 10<sup>5</sup> (cel.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
0	1,000	0,00	97,70
1	0,556	0,64	89,00
2	0,150	0,74	74,20
3	0,057	1,06	50,00
4	0,031	1,46	26,31
5	0,025	1,25	33,33
6	0,047	1,24	28,00
6,2	0,015	0,41	28,00
24	0,044	1,26	31,82
48	0,019	4,55	37,50
72	0,075	6,53	44,44
96	0,188	11,99	38,46
115	0,680	17,01	35,00
127	0,700	19,06	70,00
139	0,538	23,50	78,18
145	0,329	26,62	71,83
148	0,318	19,11	57,95
151	0,250	19,43	55,55

Tabela A6. Relação do número de células por partícula de microcarregador referente ao cultivo realizado em Frasco Spinner considerando que o Pronectin F apresenta  $3,9.10^5$  partículas/g de microcarregador (Ensaio 1).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Célula/microcarregador</b>
0	0,00
24	8,04
48	23,24
72	51,92
96	69,21
104	71,55
120	79,93
138	84,39
149	80,17
162	84,62
174	116,91
186	116,33
194	128,16
198	136,49
210	122,66
213	124,35
216	159,07

Tabela A7. Relação do número de células por partícula de microcarregador referente ao cultivo realizado em Frasco Spinner considerando que o Pronectin F apresenta  $3,9.10^5$  partículas/g de microcarregador (Ensaio 2).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Célula/microcarregador</b>
0	0,00
24	6,29
48	16,34
72	28,16
96	55,23
108	95,02
120	107,37
132	111,33
144	135,14
156	164,47
168	201,69
180	211,43
192	226,18
195	239,89
198	243,45



