

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GABRIELLA CHRISTINA GONÇALVES MANINI
DE PAULA

Produção da proteína recombinante humana TGF- β 1
(Fator do Crescimento Transformante Beta 1)
em células de mamífero.

Versão final corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

20/07/2018

**GABRIELLA CHRISTINA GONÇALVES MANINI
DE PAULA**

**Produção da proteína recombinante humana TGF- β 1
(Fator do Crescimento Transformante Beta 1)
em células de mamífero.**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Química da Universidade de São Paulo
Para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora:
Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

d324p de Paula, Gabriella Christina Gonçalves Manini
Produção da proteína recombinante humana TGF-betal
(Fator do Crescimento Transformante Beta 1) em
células de mamífero / Gabriella Christina Gonçalves
Manini de Paula. - São Paulo, 2018.
93 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: Sogayar, Mari Cleide

1. TGF-betal. 2. Fatores do Crescimento. 3.
Proteína recombinante. 4. Medicina Regenerativa. I.
T. II. Sogayar, Mari Cleide , orientador.

Aos meus pais, biológicos e de coração, bases de todo meu aprendizado;
aos meus avós e irmãos, a melhor parte de mim.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, por ter me dado a oportunidade de estar em um grupo de pesquisa tão rico em conhecimento. E por ter sido muito mais do que uma orientadora acadêmica, estando sempre disposta a ajudar, em qualquer situação.

À Profa. Dra. Ana Cláudia Oliveira Carreira, por ter tido um papel fundamental no desenvolvimento desse projeto. Por todo apoio científico, paciência, por sempre acreditar em mim e muito mais, por ter se tornado uma amiga, sempre preocupada com o meu bem-estar dentro e fora do laboratório.

Ao Dr. Renato Astorino Filho e à Mari, por toda a ajuda nos passos iniciais desse trabalho.

A todo o grupo NUCEL, por ter tornado os dias de pesquisa, e de desespero com experimentos que deram errado, em dias mais leves e alegres. Em especial, ao Túlio e ao Gabriel, pelas companhias nos *deliciosos* almoços no bandejão, por estarem sempre dispostos a ajudar e pelas diversas piadas sem graça que sempre fizeram meus dias melhores. À Thais e ao Adauto, por dividirem comigo todas as aflições da vida acadêmica, pela companhia e pelas cervejas (que mais foram combinadas do que tomadas). À Amanda que, mesmo não estando presente fisicamente até o final do meu mestrado, sempre esteve por perto, com um ouvido amigo e conselhos pertinentes. E à Bruna, por tornar os maçantes experimentos no biotério mais leves e divertidos e por ter desempenhado um papel importante na finalização desse trabalho.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Química e, principalmente, ao Departamento de Bioquímica por proporcionarem um universo de possibilidades.

À todas as agências financiadoras que, de alguma forma, contribuíram para este projeto, especialmente ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

À UFV e aos professores da graduação, por terem me proporcionado alguns dos melhores anos da minha vida e pelo crescimento pessoal e acadêmico, necessários para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos e familiares espalhados pelo mundo, por sempre me apoiarem e se fazerem sempre presentes, não importando onde e quão longe eu esteja.

Aos amigos do “Sucesso”, pelo apoio, pelos vários momentos de descontração e por dividirem comigo as alegrias e desesperos dessa jornada, da graduação à pós. Em especial à Lu e Marcela, companheiras de vida e república, que foram essenciais ao meu processo de adaptação à SP, por serem, além de amigas, minha família. Por estarem sempre comigo, mesmo nos meus momentos de ansiedade e mau humor e por terem me ajudado a passar por todos eles com muito amor.

Ao Pedro, por ter me mostrado a relatividade do tempo. Pelo carinho, diversão, companheirismo, amor e por ter feito mais felizes os meus últimos dias de escrita.

E, principalmente,

à minha mãe, Adriana, e ao Gui, meu “PAldrasto”, pelo exemplo de amor, cumplicidade e união. Por me guiarem durante toda a minha vida acadêmica e por terem sido parte essencial dela. E, acima de tudo, por sempre me ensinarem a ser uma pessoa melhor e a dar o melhor de mim, em qualquer situação;

ao meu pai, pelo exemplo de perseverança, na sua constante luta por dias melhores;

aos meus avós e tios pelo incentivo e apoio incondicionais;

aos meus pequenos grandes irmãos, Carol e Matt, por sempre me encherem de amor e alegria, de onde quer que estejam.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Carl Sagan

RESUMO

de Paula, G.C.G.M. **Produção da proteína recombinante humana TGF- β 1 (Fator do Crescimento Transformante Beta 1) em células de mamífero.** 2018. 93p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O fator de crescimento transformante beta tipo 1, TGF- β 1, é uma proteína extracelular homodimérica secretada por vários tipos celulares, que pode ter ação parácrina ou endócrina. Essa proteína está envolvida em processos celulares de diferenciação, proliferação, mobilidade e formação de matriz extracelular. Além disso, é parte importante dos processos de regeneração tecidual, atuando, de maneira decisiva, no reparo, atraindo macrófagos e fibroblastos para o local da injúria e estimulando a angiogênese. Assim, considerando o papel desse peptídeo no processo regenerativo, o uso de TGF- β 1 como proteína terapêutica na área de Bioengenharia Tecidual é bastante promissor. Apesar disso, a venda dessa proteína, para fins terapêuticos, é inexistente no mercado e a proteína recombinante vendida, que só pode ser utilizada em pesquisas científicas, não é produzida nacionalmente e chega a custar R\$200.000,00/mg. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é desenvolver uma metodologia de produção do fator recombinante TGF- β 1 em células de ovário de hamster chinês (CHO), visando à obtenção de níveis altos de rendimento, e, futuramente, a transferência da tecnologia de produção para a iniciativa privada, tornando possível seu uso na Medicina Regenerativa, sozinho ou em combinação com outros fatores de crescimento. O cDNA de TGF- β 1 foi amplificado a partir de um banco de cDNA humano e clonado no vetor proprietário pNU1 de expressão de mamífero. A construção pNU1/TGF- β 1 foi utilizada para transfectar estavelmente células CHO DG44 e uma estratégia de co-amplificação foi utilizada para selecionar células transfectantes com maior número de cópias da sequência correspondente a TGF- β 1. Estas culturas foram submetidas ao processo de amplificação gênica com concentrações crescentes de metotrexato. Ensaios de Western Blot e ELISA foram realizados utilizando-se o meio condicionado pelas populações selecionadas e por clones superprodutores. Entre os 41

clones obtidos, cinco apresentaram maiores níveis de produção de TGF- β 1, entre 1.000 e 2.000 ng/mL. Estes clones foram selecionados para a realização de testes de atividade *in vitro* utilizando-se células A549, que permitem avaliar a transição epitélio-mesênquima. Um ensaio de cicatrização de feridas em peles do dorso de camundongos foi padronizado e utilizado para avaliar a atividade *in vivo* do clone que apresentou melhor resultado *in vitro*. A proteína TGF- β 1 foi parcialmente purificada por HPLC em uma coluna de afinidade. Portanto, a proteína TGF- β 1 humana recombinante foi produzida, apresentando atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, sendo capaz de reparar eficientemente feridas cutâneas. Essa iniciativa pode oferecer aos pacientes uma alternativa para o tratamento de lesões teciduais, acelerando a cicatrização de feridas e o reparo de tecidos.

Palavras chave: TGF β -1, fatores de crescimento, proteína recombinante, Medicina Regenerativa.

SUMMARY

de Paula, G.C.G.M. **Production of recombinant human protein TGF- β 1 (Transforming Growth Factor Beta 1) in mammalian cells.** 2018. 93p. Master's Degree Dissertation – Post-graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The transforming growth factor beta 1, TGF- β 1, is a homodimeric extracellular protein secreted by several cell types, which may have paracrine or endocrine action. This protein is involved in cellular processes of differentiation, proliferation, mobility and formation of extracellular matrix. In addition, it is an important part of the tissue regeneration processes, acting decisively on repair, attracting macrophages and fibroblasts to the site of injury and stimulating angiogenesis. Therefore, considering the role of this peptide in the regenerative process and the use of TGF- β 1 as a therapeutic protein in the field of Tissue Bioengineering is very promising. Despite this, the sale of this protein for therapeutic purposes is non-existent in the market and the recombinant protein available in the market, which can only be used in scientific research, is not produced nationally and the costs are in the order of R\$ 200,000.00/mg. In this context, the objective of the present work is to develop a methodology for the production of the TGF- β 1 recombinant factor in Chinese hamster ovary (CHO) cells, aiming at obtaining high yields, and, in the future, transferring the production technology to the private initiative, allowing its use in Regenerative Medicine, alone or in combination with other growth factors. The TGF- β 1 cDNA was amplified from a human cDNA library and cloned into the proprietary pNU1 mammalian expression vector. The pNU1/TGF- β 1 construct was used to stably transfect CHO DG44 cells, and a co-amplification strategy was used to select transfectant cells with the largest number of gene copies. These cultures were subjected to the process of gene amplification with methotrexate. Western Blot and ELISA were used to assay the conditioned medium obtained from the selected cell populations and from overproducing cell clones. Among the 41 clones obtained, five presented higher levels of TGF- β 1 production, between 1,000 and 2,000 ng/mL. These clones were selected for *in vitro* activity testing using A549 cells to evaluate the epithelial-mesenchymal transition. A

wound healing assay on mouse dorsal skin was standardized and used to evaluate the *in vivo* activity of the cell clone which displayed the highest result *in vitro*. The TGF- β 1 protein was partially purified by HPLC on an affinity column. Therefore, the recombinant human TGF- β 1 protein was produced and shown to display biological activity both *in vitro* and *in vivo*, being able to efficiently repair cutaneous wounds. This initiative may provide patients with an alternative treatment for tissue damage, accelerating wound healing and tissue repair.

Key words: TGF β -1, growth factors, recombinant protein, Regenerative Medicine.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1 – Fracionamento em gel de agarose do produto da reação de PCR para amplificação de TGF- β 1 a partir de cDNA de rim, próstata e fígado.....	51
Figura 4.2 – Fracionamento em gel de agarose dos produtos das reações de PCR de colônias para triagem de clones bacterianos transformados com a construção pNU1/TGF- β 1.....	52
Figura 4.3 – Fracionamento em gel de agarose dos produtos das reações de restrição da construção pNU1/TGF- β 1 através de digestão com as enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>NheI</i> para a obtenção do cassete de expressão.....	53
Figura 4.4 – Esquema representativo das famílias de populações mistas produtoras de TGF- β 1.....	55
Figura 4.5 – Análise morfológica das células CHO DG44 transfectadas com a construção pNU1/TGF- β 1 submetidas à diferentes concentrações de metotrexato.....	56
Figura 4.6 – Análise da expressão de rhTGF- β 1 por Western blot e ELISA para as famílias de populações mistas B e C, a partir de meios condicionados.....	57
Figura 4.7 – Análise da expressão de rhTGF- β 1 através de Western blot para os clones super-produtores obtidos a partir da população mista mantida na presença de 1.000nM de MTX da família B, a partir de meios condicionados.....	59
Figura 4.8 – Análise da expressão de rhTGF- β 1 presente nos meios condicionados através de ELISA para os clones super-produtores obtidos a partir da população mista da família B mantida na presença de 1.000nM de MTX.....	60
Figura 4.9 – Análise da expressão de rhTGF- β 1 presente nos meios condicionados através de Western blot para os clones super-produtores obtidos a partir da família C da população mista mantida na presença de 500nM de MTX.....	60
Figura 4.10 – Análise da expressão de rhTGF- β 1 presente nos meios condicionados através de ELISA para os clones super-produtores obtidos a partir da população mista da família C mantida a 500nM de MTX.....	61
Figura 4.11 – Níveis de transcrição do mRNA da proteína N-caderina com relação aos níveis de transcrição do mRNA da proteína E-caderina.....	63

Figura 4.12 – Aspecto macroscópico e histológico de animais (camundongos Balb/c) normais (não diabéticos), não tratados com fatores peptídicos de crescimento e diferenciação.....	65
Figura 4.13 – Aspecto macroscópico e histológico de animais (camundongos Balb/c) diabéticos, não tratados com fatores peptídicos de crescimento e diferenciação.....	66
Figura 4.14 – Efeito da proteína rhPDGF-BB em animais (camundongos Balb/c), normais (não diabético)	67
Figura 4.15 – Efeito da proteína rhPDGF-BB em animais (camundongos Balb/c), diabéticos.....	68
Figura 4.16 – Efeito de rhTGF- β 1 em lesões provocadas em animais (camundongos Balb/c) normais (não diabéticos)	69
Figura 4.17 – Efeito de rhTGF- β 1 em lesões provocadas em animais (camundongos Balb/c) diabéticos.....	70
Figura 4.18 – Cromatograma resultante do processo de purificação de rhTGF- β 1 com a coluna HiTrap TM Heparin HP.....	71
Figura 4.19 – Experimentos pós cromatografia para confirmar a presença da proteína rhTGF β 1 nas frações eluídas das diferentes etapas do processo cromatográfico bem como a sua quantificação.....	72
Figura 4.20 – Cromatograma resultante do segundo processo de purificação de rhTGF- β 1 com a coluna HiTrap TM Heparin HP e adição de 6M de ureia ao tampão de eluição.....	73
Figura 4.21 – Experimentos feitos após a segunda cromatografia para confirmar a presença da proteína rhTGF- β 1 nas frações eluídas das diferentes etapas do processo cromatográfico bem como a sua quantificação.....	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Sequência dos primers utilizados para amplificação da sequência codificadora de TGF- β 1.....	32
Tabela 3.2 – Sequências dos <i>primers</i> que pareiam no vetor pNU1.....	35
Tabela 4.1 – Sequência codificadora da proteína TGF- β 1 e correspondente proteico.....	49
Tabela 4.2 – Perfil de EST do gene TGF- β 1.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: Micrograma

BEVS: *Baculovirus Expression Vector System* (Sistema de vetor de expressão de baculovírus)

BMP: *Bone morphogenetic protein* (Proteína morfogenética óssea)

BMSC: *Bone Marrow Stromal Cell* (Célula Estromal da Medula Óssea)

cDNA: DNA codificante

CHO: *Chinese Hamster Ovary* (Ovário de Hamster Chinês)

cm²: Centímetro quadrado

CMV: Citomegalovírus

DHFR: *Dihydrofolate reductase* (Dihidrofolato redutase)

DM: Diabetes Mellitus

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxiribonucléico)

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

E-cad: E-caderina

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (ácido etilenodiaminotriacético)

EGF: *Epidermal growth factor* (Fator de crescimento epitelial)

EGFR: *Epidermal growth factor receptor* (Receptor do fator de crescimento epidérmico)

ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)

EMT: *Epithelial-mesenchymal transition* (Transição epitélio-mesênquima)

EST: *Expressed Sequence Tag* (Marcador de Sequência Genética)

FDA: *Food and Drug Administration* (Administração de Comidas e Drogas)

FGF: *Fibroblast growth factor* (Fator de crescimento fibroblástico)

g: Força da gravidade

GMP: *Good manufacturing practices* (Boas práticas de fabricação)

HGF: *Hepatocyte growth factor* (Fator de crescimento do hepatócito)

HRP: *Horseradish peroxidase*

IGF-1: *Insulin Growth Factor* (Fator de crescimento insulínico)

IRES: *Internal Ribosome Entry Site* (sítio de entrada interna do ribossomo)

kDa: Quilodalton

LAP: *Latency associated peptide* (Peptídeo associado à latência)

LB: Luria-Bertani

LTBP: *Latent TGF β binding protein* (Proteína de ligação ao TGF β latente)

MCS: *Multiple Cloning Site* (sítio múltiplo de clonagem)

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mRNA: RNA mensageiro

MTX: Metotrexato

N-cad: N-caderina

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)

nM: Nanomolar

pb: Pares de base

PBSA: *Phosphate Buffered Saline (Absent)* (solução salina tamponada com fosfato (sem cálcio ou magnésio))

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PDGF: *Platelet-derived growth factor* (Fator de crescimento derivado de plaquetas)

PFA: Paraformaldeído

pg: Picograma

pH: Potencial hidrogeniônico

PRP: Plasma rico em plaquetas

PTM: Padrão de tamanho molecular

qRT-PCR: *Quantitative reverse transcription PCR* (PCR quantitativo de transcrição reversa)

Rh: *Recombinant Human* (Recombinante humano)

RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS)

SFB: Soro fetal bovino

SLC: *Small latent complex* (Complexo pequeno de latência)

STZ: Estreptozotocina

TBS: *Tris-Buffered Saline* (tampão tris salino)

TGF- β : *Transforming growth factor beta* (Fator do crescimento transformante)

TM: Temperatura de *Melting*

TPM: Transcritos por milhão

v/v: Volume em volume

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento do endotélio vascular)

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Regeneração Tecidual	20
1.2. A família TGF- β	21
1.3. TGF- β 1 e seu papel no reparo tecidual	22
1.4. A influência da Diabetes no reparo tecidual	24
1.5. Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	25
1.6. Produção de proteínas terapêuticas recombinantes.....	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo Geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Desenho dos <i>primers</i>	31
3.2. Amplificação e isolamento das sequências codificadoras do gene TGF- β 1.....	31
3.3. Clonagem da sequência codificadora de TGF- β 1 no vetor de expressão pNU1.	33
3.4. Transformação de bactérias <i>Escherichiacoli</i> (cepa XL-1 Blue) com a construção pNU1/TGF- β 1.....	34
3.5. Confirmação de incorporação das construções através de PCR de colônias	35
3.6. Sequenciamento de DNA das sequências codificadoras nas construções pNU1/TGF- β 1 pelo método de terminação de cadeia (Sanger).....	36
3.7. Restrição da construção pNU1/TGF- β 1	37
3.8. Linhagens celulares	37
3.9. Soluções e meios de cultura para as células de mamíferos	38
3.10. Condições de Cultivo	38
3.11. Transfecção de células CHO DG44 com a construção pNU1/TGF- β 1	39
3.12. Amplificação gênica de populações de células CHO DG44 super-produtoras de TGF- β 1.....	39
3.13. Determinação da expressão de TGF- β 1 em amostras de meios condicionados por populações celulares de CHO DG44 super-expressoras da proteína através de ELISA.....	40
3.14. Western Blot	41
3.14.1. Precipitação de proteínas com acetona (preparo das amostras)	41
3.14.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência e ensaio imunoenzimático	41
3.15. Seleção de clones super-produtores através da técnica de diluição limitante	42
3.16. Ensaio de atividade biológica <i>in vitro</i> da proteína TGF- β 1.....	43
3.17. Ensaio de atividade biológica <i>in vivo</i> da proteína TGF- β 1	43
3.17.1. Diabetização dos camundongos por estreptozotocina	44

3.17.2. Incisão em dorso de camundongos	44
3.17.3. Histologia.....	45
3.18. Purificação da proteína TGF- β 1 por cromatografia de afinidade a heparina.....	47
3.19. Dot Blot	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Construção do vetor pNU1/TGF- β 1.....	49
4.2. Transfecção de células CHO DG44 com a construção pNU1/TGF- β 1 e amplificação gênica.....	54
4.3. Avaliação da produção de rhTGF- β 1 por células CHO DG44 superprodutoras através de ELISA e Western Blot	56
4.4. Seleção de clones super-produtores e avaliação da produção de rhTGF- β 1 através de Western Blot e ELISA	58
4.5. Ensaio de atividade biológica <i>in vitro</i> da proteína TGF- β 1.....	62
4.6. Ensaio de atividade biológica <i>in vivo</i> da proteína TGF- β 1	64
4.7. Purificação parcial da proteína TGF- β 1	70
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÃO	85
7. PRÓXIMOS PASSOS.....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
SÚMULA CURRICULAR	92

1. INTRODUÇÃO

1.1. Regeneração Tecidual

A cicatrização de tecidos moles envolve uma série de processos biológicos, sendo dividida em fases, as quais, frequentemente, se sobrepõem, sendo altamente controladas. No momento da injúria, vasos e capilares são rompidos, o que leva à formação de um coágulo sanguíneo, que, num primeiro momento, serve como uma proteção ao local da ferida. Esse coágulo é formado por plaquetas envoltas em uma malha de fibrina, servindo, também, como uma matriz provisória, através da qual as células podem migrar durante o processo de reparo (CHESTER; BROWN, 2017). Num segundo momento, ocorre a migração de macrófagos para o local da injúria, os quais eliminam qualquer partícula estranha e secretam citocinas e fatores de crescimento envolvidos na migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais (PAZYAR et al., 2014). As células epiteliais migram rapidamente, partindo das margens da ferida e indo em direção ao coágulo de fibrina formado inicialmente. Esse coágulo é recoberto pelas células recém-chegadas, que formam uma barreira protetora semelhante ao epitélio original. Finalmente, ocorre o processo de remodelamento, com a maturação da matriz formada, a diminuição do coágulo e a formação da cicatriz madura (GURTNER et al., 2008).

Citocinas e fatores de crescimento estão envolvidos em todas as fases do processo de regeneração tecidual, sendo, portanto, frequentemente examinados quanto ao seu potencial terapêutico. Além disso, estudos revelam a importância dos fatores de crescimento derivados de fibroblastos e células endoteliais na reepitelização (BARRIENTOS et al., 2008). Nesse cenário, uma família de fatores de crescimento se destaca, desempenhando um importante papel durante o reparo de injúrias, a família TGF- β (*Transforming growth factor beta* - Fator do Crescimento Transformante do tipo Beta) (ROUSSELLE; BRAYE; DAYAN, 2018). Três isoformas dessa família de proteínas TGF- β 1, 2, e 3, são responsáveis pela sinalização de eventos como a reepitelização, inflamação, angiogênese e a formação do tecido de granulação (WERNER; GROSE, 2003). A isoforma TGF- β 1, objeto do presente

trabalho, dentre outras funções, controla a homeostase da pele, inibindo a proliferação de queratinócitos e regulando sua diferenciação, bem como contribuindo para que esse desempenhe corretamente sua função durante a fase de reepitelização. A sinalização de TGF- β em feridas agudas, de cicatrização complexa, também está sendo estudada, destacando seu promissor potencial terapêutico regenerativo (RAMIREZ; PATEL; PASTAR, 2014).

1.2. A família TGF- β

Os fatores de crescimento transformantes beta, denominados TGF- β , constituem uma família de citocinas, ou peptídeos multifuncionais, que regulam a proliferação, diferenciação, adesão e migração celular, além de exercer outras funções em diferentes tipos celulares (CHO; HONG; KIM, 2004). Essas proteínas fazem parte de um grupo ainda maior, a Superfamília TGF- β , do qual fazem parte as activinas, miostatinas e BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas) (SEEGER; MUSSO; SOZZANI, 2015). Existem cinco diferentes formas de TGF- β , que são codificadas por, pelo menos, 23 genes diferentes (BURT; LAW, 1994), três das quais expressas em mamíferos: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (QIAN; WAHL, 2009), as quais ocorrem, predominantemente, na conformação de homodímeros (SPORN; ROBERTS, 1990), apesar de poderem, também, formar heterodímeros (CLARK; COKER, 1998). A formação de heterodímeros entre diferentes produtos de genes *TGF- β* , coexpressos em uma mesma célula, pode explicar a complexidade dessa família (MASSAGUÉ, 1990).

O primeiro desses fatores a ser descrito, TGF- β 1, de 25 kDa, foi inicialmente isolado a partir de plaquetas humanas (ASSOIAN et al., 1983), placenta humana e rim de boi (SPORN, 1999), sendo o mais bem caracterizado dos três TGF- β s em questão. Os dois outros, TGF- β 2 e TGF- β 3, foram inicialmente isolados a partir de ossos de boi, células de glioblastoma humano e plaquetas de porco (SEYEDIN et al., 1985; SPORN; ROBERTS, 1990) e através de caracterização dos cDNAs (DERYNCK et al., 1988), respectivamente. Para o TGF- β 3, a sequência de aminoácidos do peptídeo maduro e do seu precursor foram

derivadas a partir de sequências de cDNA provenientes de bancos de cDNA de humanos e de porcos. As sequências de aminoácidos dos três fatores citados são altamente conservadas entre as espécies (CLARK; COKER, 1998).

Há uma forma precursora, comum a todos os indivíduos da família, que pode ser dividida em três partes distintas: uma sequência sinal N-terminal, uma pró-região e um domínio bioativo na porção C-terminal (MASSAGUÉ, 1987). Há três sítios de N-glicosilação na pró-região e nove cisteínas distribuídas entre o domínio ativo da proteína. Os sítios de glicosilação e a distribuição das cisteínas, apesar de conservados, diferem entre as diferentes cadeias peptídicas. A maior parte da similaridade entre os membros da família TGF- β encontra-se em sequências de aminoácidos conservadas na porção C-terminal da forma precursora (MASSAGUÉ, 1990). As proteínas dessa família são muito estáveis em condições ácidas, podendo ter sua atividade mantida até mesmo em ácido acético 1M à 95°C. Dessa maneira, a extração ácido-etanol do TGF- β em alguns tecidos é uma solução prática para seu isolamento. Essa estabilidade se deve à presença dos resíduos de cisteínas anteriormente citados (SPORN et al., 1986).

1.3. TGF- β 1 e seu papel no reparo tecidual

TGF- β 1 é produzido por uma variedade de células normais e malignas, já tendo sido isolado de diversas fontes, tais como: rim, placenta, urina, plaquetas e osso. Também são diversas as fontes que originaram seu cDNA, dentre as quais encontram-se: humanos, murinos e macacos (GENTRY et al., 1987). A produção desse fator utilizando sistemas heterólogos de expressão também é amplamente aplicada, sendo vários os tipos celulares utilizados para esse fim. Apesar disso, formas ativas da proteína apenas podem ser obtidas a partir da utilização de células de mamíferos como sistemas de expressão (ZOU; SUN, 2004).

Originalmente, o fator foi identificado como tendo habilidade de causar um crescimento independente de ancoragem em fibroblastos de rato (ROBERTS et al., 1981). Apesar disso, sabe-se que o polipeptídeo pode exibir um amplo espectro de regulação, a

dependem da célula e do momento da ação. Esse é um fator secretado por diversas células, dentre as quais se encontram plaquetas, osteoblastos, células do estroma da medula óssea (BMSC), condrócitos, células endoteliais, fibroblastos e macrófagos, tendo ações sobre a imunossupressão, angiogênese, estímulo do crescimento e diferenciação celular e sobre a formação da matriz extracelular (DEVESCOVI et al., 2008).

TGF- β 1 é sintetizado nas células como um precursor que contém 390 aminoácidos, sendo composto por um peptídeo líder e uma forma pró-TGF- β 1 (ZOU; SUN, 2004). Após sua síntese, a proteína passa por diversas modificações antes de ser, finalmente, secretada pelas células. Dentre estas modificações, a mais importante parece ser a digestão do precursor, por endopeptidases, clivando a proteína no resíduo 278, originando duas cadeias, que se ligam na forma de dímeros por meio de nove ligações dissulfeto (DUBOIS et al., 1995). Das cadeias geradas, aquela que corresponde à porção N-terminal, com variações entre 65-75 kDa, representa o peptídeo associado à latência (LAP), que possui carboidratos ligados a resíduos de asparagina e aquela correspondente ao C-terminal representa a forma madura do TGF- β 1, apresentando 25 kDa (ZHANG et al., 2015). Essas duas porções, apesar da clivagem do precursor, continuam ligadas não-covalentemente até que o fator seja ativado (DE ARAÚJO FARIAS et al., 2018). O peptídeo associado à latência possui funções definidas, que auxiliam não só na secreção da citocina, mas, também, na manutenção da forma latente da proteína, garantindo que essa não reaja com qualquer receptor celular e permitindo que ela esteja disponível para ativação e utilização quando necessário. O complexo TGF- β 1-LAP ainda encontra-se ligado à outra estrutura, uma glicoproteína de massa molecular variável entre 120 e 240 kDa denominada proteína latente de ligação ao TGF- β 1, a LTBP (DAHMANI; DELISLE, 2018).

O processo de cicatrização de feridas envolve uma série de eventos dinâmicos, mas muito complexos, que culminam no reparo do tecido lesado. Estes eventos são desencadeados pela própria injúria e, apesar de sobrepostos, compõem quatro fases muito bem definidas: homeostase, inflamação, proliferação e remodelamento (ENOCH; GREY; HARDING, 2006). A atividade de vários fatores de crescimento é requerida ao longo de

todas estas etapas, estando o TGF- β 1 envolvido, principalmente, na fase tardia da inflamação. Além disso, feridas com cicatrização prejudicada frequentemente estão associadas a falhas na sinalização desse fator de crescimento (PENN; GROBBELAAR; ROLFE, 2012). Na fase inflamatória, ocorre a chegada, ao local da injúria, de macrófagos e fibroblastos, células que podem tanto produzir, quanto sofrer a ação de fatores de crescimento (MARTIN; NUNAN, 2015).

1.4. A influência da Diabetes no reparo tecidual

O processo de cicatrização de feridas, no qual se envolvem uma ampla gama de células e fatores, se dá em fases altamente integradas e sobrepostas que devem ocorrer em sequência, tempo, duração e intensidade específicos e com funções biológicas definidas. Porém, há uma série de fatores que podem afetar este processo, interferindo de maneira determinante em uma ou mais fases, culminando em um reparo tecidual impróprio ou comprometido (GOSAIN; DIPIETRO, 2004). Dentre muitos, os fatores mais comuns e reconhecidos por causar danos no processo de reparo estão: a oxigenação, infecções, idade e sexo, hormônios, estresse, diabetes, obesidade, alcoolismo, medicamentos, fumo e tipo de nutrição (GUO; DIPIETRO, 2010).

Não há estudos de base populacional em grande escala que avaliem a prevalência e o custo econômico gerado pelas feridas crônicas no Brasil. Porém, tendo em vista a abrangência e a relevância dos fatores citados na população brasileira, acredita-se que esta é uma questão a ser levada em consideração no que diz respeito ao desenvolvimento de novos tratamentos. Além disso, feridas com a cicatrização comprometida podem trazer um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, os quais podem experimentar dores crônicas e complicações, como infecções, limitações funcionais e até mesmo o risco de ocorrerem degenerações malignas (MENKE et al., 2007).

A cicatrização é uma resposta celular à lesão, a qual envolve, dentre muitos fatores, a ativação de queratiócitos, fibroblastos, células endoteliais, plaquetas e macrófagos (BREM; TOMIC-CANIC, 2007). Em indivíduos diabéticos, porém, há diversos fatores que

contribuem para uma deficiência na cicatrização, incluindo uma diminuição na produção de fatores de crescimento, falha na resposta angiogênica, falha na função dos macrófagos, acúmulo de colágeno, problemas na barreira epidérmica, quantidade de tecido de granulação formado, dentre outros (FALANGA, 2005). Além disso, análises moleculares de biópsias de pele de pacientes diabéticos demonstraram que a falha na expressão de alguns fatores está diretamente ligada ao retardo na cicatrização de feridas. Assim, por exemplo, redução e localização anormais de EGFR, migração e diferenciação incorretas de queratinócitos e fibroblastos (STOJADINOVIC et al., 2005).

Nesse contexto, a utilização de fatores peptídicos de crescimento recombinantes para uma terapia guiada de regeneração tecidual seria útil para fornecer aos doentes um tratamento reparador alternativo, acelerando a cicatrização e o reparo de feridas em um movimento claro para a Medicina Regenerativa no Brasil. No entanto, a utilização dessas proteínas recombinantes para fins terapêuticos fica dificultada, devido ao seu alto custo no mercado. Para o TGF- β 1, por exemplo, atualmente, esse valor chega a ultrapassar os R\$ 200.000,00/mg. Tendo em vista esse mercado, nosso grupo padronizou a geração de diferentes linhagens celulares produtoras de alguns fatores peptídicos de crescimento que são essenciais para o processo regenerativo, tais como: PDGF, VEGF e FGF, abrindo caminho para a geração de clones produtores de TGF- β 1, no intuito de, futuramente, combinar todos esses fatores, desenvolvendo um produto (coquetel) que possa ser utilizado na facilitação da cura de feridas crônicas.

1.5. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fração do plasma que apresenta uma concentração de plaquetas acima dos níveis basais, podendo ser obtido de maneira autóloga, não sendo, portanto, imunogênico (MARX, 2001; GLYNN et al., 2018). Após sua ativação, as plaquetas liberam diversos fatores de crescimento importantes durante o processo de cicatrização tecidual: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1),

fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (EPPLEY; WOODDELL; HIGGINS, 2004). Entretanto, a garantia da presença destes fatores não pode ser assegurada para a real efetividade do PRP, já que a quantidade dos fatores pode variar em cada indivíduo e, principalmente, de acordo com o método de preparo.

Atualmente, o plasma rico em plaquetas (PRP), derivado das plaquetas, é muito utilizado em diversas aplicações devido à presença, neste produto, dos diversos fatores peptídicos de crescimento e diferenciação citados anteriormente. O PRP tem sido aplicado a úlceras na perna, venosas e arteriais, úlceras de pés diabéticos, queimaduras de primeiro e segundo grau, injúrias superficiais, cortes, abrasões e feridas cirúrgicas, em cirurgias plásticas, problemas de perda de cabelo, rejuvenescimento facial (tratamento de rugas, danos e manchas), cicatrizes, regeneração periodontal e em áreas de reconstrução oral e maxilofacial, regeneração tendínea e ligamentar, dentre tantos outros (LIAO; MARRA; RUBIN, 2014). Entretanto, este produto não é bem caracterizado quanto à sua composição de fatores de crescimento, não havendo um protocolo padronizado para sua preparação, o que acarreta grande variabilidade, tornando questionável a real efetividade deste produto quanto à quantidade de plaquetas e, conseqüentemente, de fatores de crescimento. São documentados diversos efeitos do tratamento com PRP, como aumentos da expressão gênica (SCHNABEL et al., 2007; DE MOS et al., 2008), do potencial mitogênico (TOHIDNEZHAD et al., 2011), da resistência biomecânica (ASPENBERG; VIRCHENKO, 2004; BOSCH et al., 2011), diminuição da frouxidão ligamentar (FLEMING et al., 2009), melhora funcional e recuperação mais rápida (KURTZ et al., 1999). Entretanto, faltam dados estatísticos sobre o seu real efeito na prática clínica. Estudos randomizados sobre o efeito do PRP no tratamento de lesões ligamentares ou tendíneas ainda não apontam para um consenso, sendo encontrados na literatura resultados contraditórios na utilização deste concentrado de plaquetas.

1.6. Produção de proteínas terapêuticas recombinantes

A produção de proteínas heterólogas a partir da tecnologia do DNA recombinante tem se tornado cada vez mais frequente. Dessa maneira, a busca de conhecimentos a respeito da técnica, bem como maneiras de aperfeiçoá-la, se torna mais presente, o que possibilita, também, um contínuo desenvolvimento de proteínas recombinantes humanas que surgem como alternativas para o tratamento de doenças. A técnica consiste, basicamente, em inserir um gene de interesse em um vetor de clonagem, fragmento de DNA que deve conter sequências regulatórias de controle da expressão (RIGBY, 1983), e introduzir esse vetor recombinante em células capazes de expressá-lo. Dentre essas células, podem estar células procarióticas (bactérias) ou eucarióticas (leveduras, células isoladas de insetos ou de mamíferos), devendo-se considerar, para escolha do sistema de expressão, a proteína de interesse. A maior parte das proteínas de valor terapêutico possui formas muito complexas, conferidas através de modificações pós-traducionais essenciais para a manutenção de sua estrutura e função. Glicosilação, a mais comum das modificações pós-traducionais, é um processo complexo de adição de açúcares, que ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (WALSH; JEFFERIS, 2006), estando, muitas vezes, associada à atividade biológica das proteínas produzidas.

Ambos os sistemas, sejam células procarióticas ou eucarióticas, apresentam características específicas que os fazem ideais (ou não) para a produção dos polipeptídeos. As bactérias são de fácil cultivo e rápida multiplicação, além de apresentarem altos níveis de expressão das proteínas recombinantes. Apesar disso, podem acumular, intracelularmente, as proteínas heterólogas dentro de grânulos de difícil solubilização e, além disso, são produtoras de endotoxinas. O contrário acontece com as leveduras, as quais não são produtoras de endotoxinas e, como eucariotos simples, crescem com relativa rapidez, sendo facilmente adaptáveis à produção em larga escala. Além dessas características, leveduras são capazes de promover glicosilação, porém estas não são complexas como aquelas introduzidas por células de mamíferos, que promovem glicosilações mais específicas, sendo, por esse motivo, mais comumente escolhidas para a produção heteróloga de

proteínas humanas. Entretanto, o custo para a manutenção das células de mamíferos é elevado e a manutenção da cultura não é tão simples quanto aquelas de leveduras, apresentadas anteriormente (BHOPALE; NANDA, 2005).

A introdução da Engenharia Genética, com o que mais tarde seria conhecido como tecnologia do DNA recombinante, nos anos 70, foi um importante passo para a expansão da indústria biotecnológica. Em 1973, cientistas conseguiram inserir um gene exógeno em um plasmídeo bacteriano e o introduziram em células de *Escherichia coli*, as quais foram modificadas geneticamente tornando-se capazes de produzir a proteína exógena (COHEN et al., 1973). Atualmente, diversas proteínas já são produzidas por sistemas heterólogos de expressão e muitas delas já são utilizadas para o tratamento de doenças humanas. Dentre essas, pode-se citar a insulina, para o tratamento de diabetes, interferon, para hepatites virais, os fatores VII, VIII e IX como tratamento para distúrbios de coagulação, dentre vários outros (DINGERMANN, 2008).

A primeira proteína recombinante a entrar no mercado, uma insulina humana produzida em células de *E. coli*, foi licenciada para uso clínico pela FDA (*Food and Drug Administration*) no ano de 1980 e, desde então, esse mercado tem se expandido. Até 2005, mais de 110 companhias espalhadas por todo o Mundo estavam envolvidas na descoberta, desenvolvimento e venda de novos produtos recombinantes (BHOPALE; NANDA, 2005). Essas companhias estavam envolvidas com o desenvolvimento clínico de mais de 80 produtos e possuíam um *portfólio* com 73 proteínas recombinantes (PAVLOU; REICHERT, 2004). Dados da *BioPharm International* de 2014 apontam que, entre os anos de 2008 e 2013, aproximadamente 80 novos produtos foram aprovados pelo FDA. Tendo em vista a relevância da produção e uso das proteínas terapêuticas recombinantes no tratamento de doenças, esse setor é de grande importância para as indústrias da área de Medicina Molecular atualmente, estimando-se que seu faturamento deveria atingir o valor de U\$ 169 bilhões em 2014 (GOODMAN, 2009; KIM; YOO; KANG, 2014).

Embora existam muitas linhagens celulares animais, aplicadas à produção de proteínas terapêuticas, poucas são as que possuem propriedades favoráveis à produção

dos biofármacos e que apresentam completo rastreamento de sua origem. A linhagem celular CHO, derivada de ovário de hamster chinês, destaca-se para essa finalidade, tendo, como características positivas o fato de seu emprego ser seguro, claramente definido para produções industriais e já aprovado como padrão GMP (*Good Manufacturing Practice*), o que faz com que aprovações por órgãos reguladores, como o FDA, para proteínas produzidas por esse sistema seja mais tangível (OMASA; ONITSUKA; KIM, 2010). Além disso, é uma linhagem de fácil manutenção, crescimento rápido, fácil adaptação ao crescimento em suspensão ou aderidas a diferentes substratos e, principalmente, com capacidade de conferir às proteínas produzidas uma eficiente modificação pós-traducional, com padrões de glicosilação compatíveis e com atividade biológica em humanos (KIM; KIM; LEE, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto é produzir o fator TGF- β 1 recombinante humano em células CHO DG44 de mamífero, em condições cGMP, utilizando-se técnicas de Engenharia Genética e desenvolver um modelo animal para testar a eficácia do fator produzido frente à regeneração tecidual.

2.2. Objetivos específicos

- 1 – Amplificar, a partir de um banco de cDNA estabelecido por nosso grupo, a sequência codificadora do gene *TGF- β 1* humano e clonar esta sequência obtida no vetor de clonagem pNU1, também desenvolvido no nosso laboratório;
- 2 – Transformar bactérias *Escherichia coli* eletro-competentes com a construção pNU1/TGF- β 1 e selecionar clones bacterianos positivos para a presença desta construção;
- 3 – Sequenciar as construções obtidas a partir dos clones positivos, garantindo a integridade dos insertos;
- 4 – Transfectar, estavelmente, células CHO DG44 (cGMP) com a construção pNU1/TGF- β 1 gerada e selecionar culturas de células CHO DG44 transfectantes, através de sua capacidade de produzir a enzima DHFR;
- 5 – Isolar clones celulares produtores da enzima DHFR e analisar a expressão da proteína TGF- β 1 nos clones celulares isolados mais produtores;
- 6 – Desenvolver metodologias para testar a atividade biológica da proteína TGF- β 1 produzida *in vitro* e *in vivo* (regeneração tecidual);
- 7 - Purificar a proteína rhTGF- β 1 por cromatografia de afinidade à heparina e caracterizar bioquimicamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho dos *primers*

Antes de ser desenvolvido por mim, o projeto de produção da proteína TGF- β 1 foi iniciado pelo Dr. Renato Astorino Filho, que foi responsável pela parte inicial da clonagem. Os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados para a amplificação das sequências de cDNA foram desenhados baseando-se na sequência codificadora completa do gene *TGF- β 1* encontrada na base de dados de nucleotídeos do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> do National Center for Biotechnology Information, U. S. NLM - U. S. National Library of Medicine, Bethesda, EUA). Para o desenho dos iniciadores, foi utilizado o programa computacional DS Gene (Accelrys Inc.) e todos foram sintetizados pela empresa Life Technologies™. Os primers liofilizados foram reconstituídos em água deionizada (MilliQ), livre de RNase, para as concentrações finais de 100 μ M (solução de estoque) e 10 μ M (solução de uso).

3.2. Amplificação e isolamento das sequências codificadoras do gene *TGF- β 1*

Foi estabelecido, pelo nosso grupo, um Banco de cDNA a partir de amostras de RNA total extraídas de culturas de células humanas e de um painel comercial de RNA total de tecidos humanos (Human Total RNA Master Panel II, Clontech Laboratories Inc., Takara Bio Company, Mountain View, CA, EUA). Como anteriormente descrito (SOGAYAR et al., 2004), este Banco foi testado quanto à ausência de DNA genômico através da amplificação de um fragmento do gene *MHL1* e, através da amplificação de fragmentos dos genes *p53*, *NOTCH2* e *GAPDH*, foi testada, também, a qualidade das amostras de cDNA.

Amostras de cDNA total de próstata, rim e fígado humanos foram utilizados para a amplificação das sequências codificadoras do gene *TGF- β 1*, utilizando-se as sequências dos *primers* listados na Tabela 3.1 abaixo.

Tabela 3.1 – Sequência dos *primers* utilizados para amplificação da sequência codificadora de TGF- β 1

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	TM(°C)
hTGFβ1_NT_EcoRI	GAGAGAATTCATGCCGCCCTCCGGGCTGC	75,2
hTGFβ1_CT_NheI	GAGAGCTAGCTCAGCTGCACTTGCAGGAGCCACG	76,2

Negrito: sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* (*primer forward*) e *NheI* (*primer reverse*)

A enzima Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) foi utilizada para a amplificação da sequência, seguindo-se as orientações do fabricante. A reação foi feita para um volume final de 20 μ L, utilizando-se um volume de 0,5 μ L de cDNA, 0,4 μ L da enzima (2U/ μ L) e 4,0 μ L do seu tampão 5x, 0,4 μ L de dNTP com concentração de 10mM, 1,0 μ L de cada um dos iniciadores, hTGF β 1_NT_EcoRI e hTGF β 1_CT_NheI, com concentração de 10mM e 12,7 μ L de água deionizada (MilliQ). Para a reação em cadeia da polimerase, durante a desnaturação inicial, foi utilizada a temperatura de 98°C por 1min, para a desnaturação das fitas, pareamento e extensão, sendo que esta primeira etapa foi seguida de 35 ciclos de 98°C por 20seg, 60°C por 20seg e 72°C por 1min e, por fim, para a extensão final, a amostra foi submetida à 72°C por 5min.

Os *amplicons* foram detectados através de géis de agarose 1,0% corados com 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo. As amostras obtidas a partir das reações de amplificação a partir dos cDNAs de rim, próstata e fígado e o marcador de peso molecular Gene Ruler 1Kb (Thermo Fisher Scientific) foram aplicadas aos géis. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma diferença de potencial de 90V em tampão de corrida 1x TAE em cuba eletroforética horizontal Midigel 2 (APELEX, Massy, França). Ao final da corrida, o gel foi exposto à luz ultravioleta em um aparelho fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalém, Israel) para a verificação da presença de bandas. As bandas dos tamanhos corretos foram removidas dos géis, com bisturis descartáveis, e o DNA presente nelas foi extraído, utilizando-se o kit QIAquick Gel Extration (QIAGEN), segundo orientações do fabricante.

3.3. Clonagem da sequência codificadora de TGF- β 1 no vetor de expressão pNU1

O vetor pNU1, gerado em nosso laboratório (resultados não publicados) para expressão em células de mamíferos, é um vetor bicistrônico que reúne vários elementos que possibilitam a superexpressão da sequência codificadora de interesse de uma forma eficiente, quando comparado a outros vetores deste tipo. O pNU1 possui um promotor híbrido contendo um elemento enhancer de citomegalovírus (CMV) e o promotor da beta-actina de galinha e, além disso, possui uma sequência interna de ligação do ribossomo, IRES, situado à frente do cDNA da enzima diidrofolato redutase (DHFR). Essa última construção permite a expressão concomitante dos cDNAs de interesse e da enzima DHFR, em um RNA bicistrônico, estratégia que visa à complementação gênica de células CHO DG44 para o gene *dhfr* que, por sua vez, permite a seleção de células expressando altas quantidades do produto de interesse após amplificação gênica, realizada através de tratamento com doses crescentes do inibidor de *dhfr*, Metotrexato (MTX).

Para que a sequência codificadora de TGF- β 1 fosse clonada no vetor de expressão, o vetor pNU1 foi linearizado e o produto da amplificação foi restringido, utilizando, em ambos os casos, as enzimas de restrição *EcoRI* e *NheI*. As duas primeiras reações de restrição foram feitas, cada uma, com a 1 μ L da enzima *NheI* (10U/ μ L, Fermentas), 2 μ L de tampão tango (10x, Fermentas), 2 μ g do produto de PCR para uma reação e 2 μ g do vetor pNU1 para a outra, em ambas, água deionizada (MilliQ) foi adicionada para que o volume final atingisse 20 μ L. As amostras foram deixadas à 37°C por 2h. Em seguida, a reação de restrição com a enzima *EcoRI* foi preparada adicionando-se, a cada uma das reações anteriores, 6 μ L do mesmo tampão Tango, 1 μ L da enzima *EcoRI* (10U/ μ L, Fermentas) e água deionizada (MilliQ) para o volume final de 40 μ L. As amostras foram incubadas novamente à 37°C por mais 2h. Ao término da digestão, o vetor pNU1, linearizado, foi tratado com a enzima FastAP (1U/ μ L, Thermo Fisher Scientific). Essa enzima, uma fosfatase alcalina, catalisa a liberação dos grupamentos fosfato 3' e 5' do DNA, impedindo que o plasmídeo volte a se ligar. À amostra de digestão do pNU1, foram adicionados 0,5 μ L da enzima FastAP e a

reação foi incubada à 37°C por 15min e por mais 15min após uma nova adição de 0,5µL da mesma enzima.

Seguida da reação de linearização do vetor e de restrição do produto de PCR, procedeu-se à ligação/clonagem do inserto no vetor de expressão. Para a reação de ligação, foram utilizados 1,0µL de tampão T4 (10x, Thermo Fisher Scientific), 1,0µL da enzima T4 DNA Ligase (5u/µL, Thermo Fisher Scientific), 5,0µL da solução contendo o inserto e 3,0µL da solução contendo o vetor pNU1. A reação foi deixada a 16°C *overnight* e a 65°C por 10 minutos. A partir daqui este vetor recombinante será chamado pNU1/TGF-β1.

3.4. Transformação de bactérias *Escherichia coli* (cepa XL1-Blue) com a construção pNU1/TGF-β1

Bactérias da espécie *Escherichia coli*, cepa XL1-Blue (genótipo: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)], Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) foram escolhidas para o procedimento de transformação. Para tal, 1,0µL da construção pNU1/TGF-β1, resultado do item 3.3, foi adicionado a 50,0µL de suspensão bacteriana em solução de glicerol 10% de baixa força iônica. O método de transformação escolhido foi eletroporação por pulso elétrico curto de alto voltagem. As misturas foram, então, adicionadas a cubetas para eletroporação de bactérias com espaço de 0,1 cm (Gene Pulser® Cuvetter *E. coli* Pulser® Cuvette, Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) e submetidas a 1,8 kV de diferença de potencial, utilizando-se um eletroporador Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad). Imediatamente após o eletrochoque, as bactérias foram incubadas em 150µL meio de cultura LB (Luria-Bertani/Lysogeny Broth; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EUA) à 37°C por 1,5h. Em seguida, as suspensões de bactérias transformadas foram plaqueadas sobre LB ágar (Select Agar®, Life Technologies™). Depois de plaqueadas, as bactérias foram incubadas à 37°C por 16 h.

3.5. Confirmação de incorporação das construções através de PCR de colônias

Cada colônia bacteriana obtida foi diluída em 100µL de meio LB acrescido do antibiótico ampicilina na concentração final de 100µg/mL. Para verificar as construções que, de fato, possuíam os insertos de tamanhos preditos, cada colônia isolada foi submetida a PCR de colônias com *primers* que pareiam no vetor pNU1, cujas sequências encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 3.2 – Sequências dos *primers* que pareiam no vetor pNU1

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	TM(°C)
pNU1_seq4_F	GCCTTCTTCTTTTCCTACAGC	58,8
pNU1_seq4_R	GAATTGGCCGCCCTAGATGCATGC	68,0

Para esta reação de PCR, foram utilizados 0,4µL de dNTP (10 mM, Thermo Fisher Scientific), 1,5µL de MgCl₂ (25mM, Meridian Life Science® Company), 2,0µL de tampão de reação 10x com NH₄ (Meridian Life Science® Company), 1,0µL do primer pNU1_seq4_F (10 µM, Life Technologies™), 1,0µL do primer pNU1_seq4_R (10µM, Life Technologies™), 0,2µL de enzima Taq DNA polimerase (5U/µL, Fermentas), 1,0µL de suspensões bacterianas e volume de água deionizada (MilliQ) suficiente para completar 20,0µL de volume de reação. As seguintes condições foram utilizadas na reação: 95°C por 10min (desnaturação inicial); 35 ciclos de 85°C por 30seg (desnaturação), 60°C por 30seg (pareamento) e 72°C por 1min e 30seg (extensão); 72°C por 5 min (extensão final). Os amplicons foram detectados através de fracionamento em géis de agarose 1,0% na presença de brometo de etídeo e, para verificar a presença de bandas nos géis, os mesmos foram expostos à luz ultravioleta em um aparelho fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR Bio Imaging Systems). Pela análise do tamanho predito das bandas, foi possível selecionar clones bacterianos, os quais foram submetidos ao sequenciamento de DNA.

3.6. Sequenciamento de DNA das sequências codificadoras nas construções pNU1/TGF- β 1 pelo método de terminação de cadeia (Sanger)

Clones bacterianos transformados com a construção pNU1/TGF- β 1 foram selecionados para serem submetidos a sequenciamento de DNA pelo método de terminação de cadeia, ou método de Sanger. Neste método, uma PCR é montada de forma a conter 2,3-dideoxirribonucleotídeos trifosfatados (ddNTPs) acoplados a diferentes fluoróforos (um fluoróforo distinto marca cada um dos quatro ddNTPs: ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP) além de 2-desoxirribonucleotídeos (dNTPs) não fluorescentes. Os ddNTPs promovem o bloqueio da amplificação das cadeias em extensão pela ausência de um grupo hidroxila (-OH) ligado ao carbono 3' do anel da ribose, gerando cadeias polinucleotídicas de tamanhos variáveis. Uma vez terminada a reação, as amostras são submetidas à eletroforese capilar e determinação da sequência através de detecção do comprimento de onda específico para cada fluoróforo em um sequenciador, gerando cromatogramas. As reações de sequenciamento foram montadas, independentemente, para cada uma das amostras da PCR, cada qual correspondendo a um clone bacteriano distinto. Assim, em uma microplaca para PCR de 96 poços (PCR® Microplate, Axygen Scientific Inc., Union City, EUA), 3,0 μ L de reação de PCR de colônias foram adicionados a 4,0 μ L de tampão 5x de sequenciamento (BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer, Life Technologies™), 0,5 μ L do primer pNU1_seq4_F ou NU1_seq4_R (10 μ M, Life Technologies™), 2,0 μ L de Big Dye Mix (Life Technologies™) e volume de água deionizada (MilliQ) para completar 20,0 μ L de volume de reação. As seguintes condições foram utilizadas: 40 ciclos de 96°C por 10seg (desnaturação), 53°C por 20seg (pareamento) e 60°C por 4min (extensão). Para cada amostra, as reações foram feitas em triplicata com cada primer, independentemente (três reações com o *primer forward* e três reações com o *primer reverse*). Depois da termociclagem, todas as amostras foram submetidas à precipitação. Foram adicionados, a cada poço, 20,0 μ L de água deionizada (MilliQ) seguidos de 60,0 μ L de isopropanol 70%. As amostras foram homogeneizadas por *vortexing* e centrifugadas a 700 \times g. A placa foi então protegida da luz, incubada à temperatura ambiente por 15min e centrifugada a 3.000 \times g a

20°C por 30min. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e centrifugação até 700 × g. 150µL de solução 70% isopropanol foram adicionados por poço, seguido de centrifugação a 3.000 × g a 20°C por 30min e, novamente, a placa é invertida e centrifugada até 700 × g. A placa é então incubada a 37°C por 10min para que todo o isopropanol evapore. Uma vez precipitadas, as amostras são submetidas a eletroforese capilar em um aparelho Abi Prism 3700 DNA Analyzer (Life Technologies™). Através dos cromatogramas originados, foram gerados segmentos de DNA sobrepostos (*contigs*), utilizando-se a ferramenta Phrap, seguido da análise de qualidade pelo programa Phred.

3.7. Restrição da construção pNU1/TGF-β1

As células CHO DG44 transfectadas receberam apenas o cassete de expressão da construção pNU1/TGF-β1. Nesse cassete, estão presentes as sequências codificadoras dos genes *TGF-β1* e diidrofolato redutase (*dhfr*) e os elementos necessários para a transcrição dos mesmos. Para isso, 6µg de três construções pNU1/TGF-β1 foram adicionados, independentemente, a 4µL de tampão Tango (10x, Fermentas), 1µL da enzima de restrição Spel (10U/µL, Fermentas) e água deionizada (MilliQ) suficiente para que o volume final da solução atingisse 40µL. A reação de restrição foi iniciada através da incubação da reação a 37°C por 4h. Os produtos das restrições foram aplicados ao gel de agarose 1,0%, como descrito anteriormente. As bandas dos tamanhos correspondentes aos cassetes de expressão foram removidas dos géis, com bisturis descartáveis, e o DNA presente nelas foi extraído utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), segundo orientações do fabricante.

3.8. Linhagens celulares

Duas linhagens celulares foram utilizadas para a realização deste trabalho, a saber: CHO DG44 *dhfr*^{-/-} (URLAUB e CHASIN, 1980), para a produção do fator recombinante, e células A549 (ATCC CCL-185) para os ensaios de atividade biológica *in vitro*. CHO DG44 é uma variante da linhagem celular CHO (Chinese Hamster Ovary), derivada de ovário de

hamster chinês. Esta linhagem é deficiente para a expressão da enzima diidrofolato redutase (DHFR). As células epiteliais de carcinoma pulmonar humano, A549, sofrem transição epitélio-mesênquima na presença de TGF- β 1 (LIU et al., 2013).

As células foram sempre incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 2% CO₂ / 98% ar. O estoque de células foi mantido através do congelamento em meio de cultura suplementado com 10% DMSO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e armazenamento em nitrogênio líquido.

3.9. Soluções e meios de cultura para as células de mamíferos

Para as culturas celulares, foram utilizados três meios de cultura da Gibco® (Thermo Fisher Scientific). Para o cultivo da linhagem celular A549, foi utilizado o meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell), amplamente utilizado para manutenção de diversas células de mamíferos em cultura. O meio HAM's F12 suplementado com 10% (v/v) de SFB, foi utilizado para o cultivo de células CHO DG44 sem qualquer modificação genética. Para a seleção de células dhfr^{-/-}, foi utilizado o meio Alfa-MEM, Minimum Essential Medium, sem ribonucleosídeos ou desoxiribonucleosídeos, suplementado com 7% (v/v) de SFB dialisado. Foram utilizados também, solução salina PBSA (Phosphate Buffered Saline, sem Ca²⁺ e sem Mg²⁺) tamponada em pH 7,2 composta por 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄, sem cálcio e magnésio e solução 0,1% de tripsina (Gibco®) em PBSA contendo 1mM de EDTA (pH 8,0).

3.10. Condições de Cultivo

As células foram mantidas em frascos T ou placas de cultivo adequadamente tratadas para o cultivo de células em aderência (Thermo Fisher Scientific Inc.; Becton, Dickinson and Company; Corning Inc., Corning, EUA; ou TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 2% CO₂ / 98% ar. O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias. Ao atingirem confluência maior ou igual a 80%,

as células foram subcultivadas, sendo lavadas com solução salina PBSA, seguida de adição de solução de 0,1% tripsina e inativação da mesma com meio de cultivo contendo SFB.

3.11. Transfecção de células CHO DG44 com a construção pNU1/TGF- β 1

Para a geração de clones celulares expressando estavelmente a proteína TGF- β 1, células CHO DG44 cultivadas em placas de seis poços (10cm²/poço) foram transfectadas com o cassete de expressão obtido a partir da construção pNU1/TGF- β 1. A transfecção foi feita por lipofecção, através da utilização de Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific), segundo orientações do fabricante. Em um primeiro momento, duas soluções foram preparadas separadamente, a primeira contendo 100 μ L de DMEM e 10 μ L do reagente Lipofectamine™ 2000 e, a segunda, 100 μ L de DMEM acrescidos da solução contendo o correspondente a 4,0 μ g do cassete de expressão. As duas soluções preparadas foram misturadas e incubadas à temperatura ambiente por 30min, tempo necessário para a formação de micelas. Após esse período, a mistura foi aplicada ao poço contendo as células CHO cultivadas, nesse momento, com meio HAM's F12 contendo 10% de SFB. Após 4h, o meio contendo Lipofectamine™ 2000 foi retirado e substituído por um novo meio HAM's F12 contendo 10% de SFB. Por fim, 48h após esta troca de meio, houve uma nova troca, desta vez, para o meio de seleção α -MEM sem nucleosídeos, acrescido de 7% de SFB dialisado e 2nM de glutamina.

3.12. Amplificação gênica de populações de células CHO DG44 superprodutoras de TGF- β 1

Após 48h do procedimento de transfecção, as células CHO DG44 transfectadas começaram a ser selecionadas, como descrito anteriormente, na presença de meio de cultura sem nucleosídeos. Além disto, foi utilizado um método de seleção, que também, em proporções muito pequenas, leva a um evento de amplificação gênica, através da adição de concentrações crescentes do quimioterápico Metotrexato (MTX). O tratamento foi iniciado com 50nM de MTX adicionado ao meio de cultivo. As células foram cultivadas por

aproximadamente duas semanas, com troca de meio a cada 48h para remoção de células mortas, até que a cultura atingisse 90% de confluência, quando, então, aumentava-se a concentração de MTX. O tratamento seguiu por aproximadamente dois semestres, com aumento gradual da concentração de MTX a cada vez que a cultura atingia 90% de confluência, sendo que cada fase do tratamento durou de duas a três semanas.

3.13. Determinação da expressão de TGF- β 1 em amostras de meios condicionados por populações celulares de CHO DG44 superexpressoras da proteína através de ELISA

Foram plaqueadas 10^6 células das populações de CHO DG44 superprodutores de TGF- β 1 em 2mL de meio de cultura específico para a linhagem, em placas de seis poços. O plaqueamento foi realizado em duplicata e as placas foram mantidas nas condições de cultivo descritas no item 3.10. Após 24h do plaqueamento, o meio de cultura foi descartado, as culturas aderentes foram lavadas com PBSA e receberam meio de cultura fresco. O meio de cada população foi coletado após 72h de condicionamento e utilizado para dosagem de TGF- β 1 através de um ELISA específico (Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA Kit, R&D Systems), seguindo o manual provido pelo fabricante. Foi realizada uma diluição, 1:1.000, de cada meio condicionado coletado, de modo a obter valores de TGF- β 1 dentro da curva de calibração do kit. Após o procedimento, os valores de absorbância foram determinados a 450nm por leitura em um espectrofotômetro de placa (SpectraMax M2 - Molecular Devices). Uma curva padrão, fornecida pelo kit, foi utilizada, como referência, para análise logística de 4-parâmetros, realizada pelo software GraphPad Prisma 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Os valores obtidos para cada população foram considerados na seleção de um candidato para a continuação dos experimentos referentes a este projeto.

3.14. Western Blot

Amostras de meios condicionados coletados para a realização do protocolo de ELISA, como descrito no tópico anterior, também foram utilizadas para a realização do protocolo de western blot.

3.14.1. Precipitação de proteínas com acetona (preparo das amostras)

As amostras dos meios condicionados obtidos foram submetidas a um protocolo de precipitação para que as proteínas neles presentes fossem concentradas, facilitando a detecção por Western Blot. As amostras foram centrifugadas a 8.000 x g por 5min, para a eliminação de possíveis debris celulares. A 400µL dos meios condicionados, foram adicionados 1.600µL de acetona. Essa mistura foi homogeneizada e incubada a -20°C por 20min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15min a uma velocidade de 13.000 x g. Os sobrenadantes foram descartados, por inversão dos tubos, e os *pellets* foram ressuspendidos em 100µL de tampão de amostra redutor para proteínas (50mM Tris-Cl pH 6,8; 2,0% SDS; 10% glicerol; 0,1% azul de bromofenol; 700mM β-mercaptoetanol) (LAEMMLI, 1970), após a completa secagem da acetona. As amostras foram fervidas por 10min antes de serem aplicadas ao gel de poliacrilamida-SDS.

3.14.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência e ensaio imunoenzimático

As amostras obtidas como descrito no tópico acima foram, então, aplicadas A minigéis de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% submergidos em tampão de corrida (0,3% de Tris; 1,44% de glicina; 0,1% de SDS (Sigma-Aldrich Co.) e fracionados por eletroforese em corrente elétrica de 100V, 100W e 350mA por aproximadamente 2h, utilizando-se o sistema MiniProtean III electrophoresis system (BioRad®). O marcador de massa molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) foi utilizado como referência na determinação do tamanho (massa molecular) das bandas encontradas. As proteínas foram então transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond ECL Nitrocellulose (Hybond™-C Extra, GE Healthcare®) utilizando-se o Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad®) por *electroblotting*, aplicando-se uma corrente

elétrica 100V, 100W e 350mA por 2h em cubas contendo tampão de transferência (0,3% de Tris; 1,44% de glicina; 0,1% de SDS e 20% metanol). Todas as incubações e lavagens a seguir foram feitas sob agitação. As membranas foram bloqueadas com solução vegetal (SuperBlock™ (PBS) Blocking Buffer, Thermo Fisher Scientific) em TBS 0,05% Tween® 20 (Sigma-Aldrich Co.) por 4h a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas 5X, por 5min cada, com solução TBS 0,05% e, a seguir, incubadas por 16h a 4°C com anticorpo primário policlonal de coelho anti-TGF-β1 (Sc-146, Santa Cruz Biotechnology), diluído 1:2.000 na mesma solução de bloqueio. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas 5X, por 5 min cada, com solução TBS 0,05% e, a seguir, incubadas por 2h a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho 1:2.000 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA) também diluído na mesma solução de bloqueio. As membranas foram novamente lavadas 5X, por 5 min cada, com solução TBS 0,05%, seguido de uma lavagem de 5min somente com TBS. Em seguida, o reagente Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (EMD Millipore Corporation, Billerica, EUA) foi aplicado para detecção das proteínas.

3.15. Seleção de clones superprodutores através da técnica de diluição limitante

As populações celulares de CHO DG44 superprodutoras de TGF-β1 passaram por um processo de diluição limitante para que clones superprodutores fossem selecionados. As populações celulares contendo o cassete de expressão da construção pNU1/TGF-β1, cultivadas em placas de seis poços, tiveram seu meio de seleção retirado, sendo lavadas com PBSA e, em seguida, as células foram soltas da placa com solução de tripsina. As células foram ressuspensas no meio de seleção com a mesma concentração de MTX em que estavam sendo mantidas. A partir daí, foram divididas em cinco placas, p60, em diferentes diluições: 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 e 1/200. Os meios das placas foram trocados a cada 72h até que colônias isoladas fossem formadas. Depois de formadas, colônias com formato arredondado foram selecionadas, com a ajuda do microscópio EVOS FL Cell

Imaging System (Thermo Fisher Scientific) e transferidas para placas de 48 poços. Quando atingiram confluência de 100%, foram transferidas para placas de 6 poços.

3.16. Ensaio de atividade biológica *in vitro* da proteína TGF- β 1

Células A549, de carcinoma de pulmão humano, foram utilizadas para o teste de atividade biológica do TGF- β 1 produzido, tendo em vista que essa proteína induz alterações morfológicas típicas de EMT (Transição Epitélio-Mesênquima), '*cadherin switching*' e migração celular nessa linhagem (KIM et al., 2007). As células foram cultivadas em placas p60 em meio RPMI suplementado com 10% de SFB até que atingissem 70% de confluência. Nesse ponto, o meio de cultivo era trocado por RPMI suplementado com 5% de SFB e as células eram tratadas, ou não, com TGF- β 1 com concentração final de 5ng/mL. Após 48h, as células foram coletadas e a expressão das proteínas E-caderina e N-caderina foi avaliada através de qRT-PCR.

3.17. Ensaio de atividade biológica *in vivo* da proteína TGF- β 1

O modelo animal, de camundongos portadores de úlceras/feridas provocadas por incisão cirúrgica no dorso (DAVIDSON; YU; OPALENIK, 2013), foi utilizado como modelo para testar a atividade biológica da proteína TGF- β 1 produzida no reparo tecidual de tecidos moles. Além disso, as feridas foram provocadas em dois grupos de camundongos, a saber: diabéticos normais (controle, não diabéticos). Para tanto, utilizou-se um modelo de camundongos diabetizados através da injeção de estreptozotocina, que destrói completamente as células beta-pancreáticas, produtoras de insulina. Este modelo foi previamente estabelecido pelo nosso grupo, uma vez que mimetiza o paciente portador de diabetes do tipo 1, dependente de insulina. Testes preliminares de regeneração tecidual após tratamento com outros fatores de crescimento, também produzidos em nosso laboratório, foram realizados através da aplicação de incisões nas patas de animais normais e diabéticos. Estes testes indicaram completa regeneração, em cinco dias, de forma acelerada, após a aplicação de PDGF-BB tanto em animais normais como nos animais

diabéticos, quando comparados com os respectivos grupos que não receberam o tratamento.

Para tratar animais modelos de reparo tecidual, foram utilizados camundongos Balb/c machos de dois meses de idade, diabetizados com estreptozotocina e normais (não diabetizados). Os animais foram recebidos do Biotério Central (FMUSP) e deixados em quarentena de uma semana, acondicionados em gaiolas de camundongos (até 10 animais por gaiola) com enriquecimento ambiental (objetos acrescentados ao ambiente para promover o bem-estar psicológico dos animais). Em seguida, foram divididos em seis grupos: três grupos com nove animais diabéticos cada um e três grupos com nove animais normais cada, mantidos em gaiolas separadas, submetidos à dieta alimentar e hídrica normais, bem como igual período de sono/vigília (ciclo 12h claro/12h escuro).

3.17.1. Diabetização dos camundongos por estreptozotocina

A Estreptozotocina (STZ) é um agente citotóxico de células beta de ilhotas pancreáticas, altamente seletivo, que, se administrado em doses elevadas, pode causar a necrose das células beta e, conseqüentemente, diabetes (FURMAN, 2015). O protocolo consiste na injeção, intraperitoneal, de 4 μ L por g do animal de uma solução de SZT, na concentração de 50mg/L em tampão citrato, após um jejum de seis horas. Após a injeção, os animais foram deixados em jejum por mais duas horas, voltando a comer normalmente, porém, a água ofertada até o dia seguinte deverá conter glicose. Os animais do procedimento que não diabetizarem e apresentarem glicemia normal poderão ser incluídos para as análises do grupo de animais normais. Para ser considerado diabético, três medidas glicêmicas consecutivas devem estar acima de 300mg de glicose por dL de sangue.

3.17.2. Incisão em dorso de camundongos

Cada grupo experimental foi composto de três animais, os quais foram submetidos às mesmas condições de tratamento. Cada animal recebeu uma injeção intramuscular de Tramal (200 μ L) e, por via subcutânea, Ringer (500 μ L), ambos como tratamento pré-operatório e, em seguida, à anestesia inalatória por isoflurano. Todo o pelo do dorso do animal foi retirado, cuidadosamente, com o auxílio de um aparador de pelos, para não surgirem feridas

adicionais, e então, a pele foi higienizada com iodo e álcool 70%. Em seguida, foram feitas as feridas, de 6mm de diâmetro, com o auxílio de um molde e uma tesoura própria para a cirurgia, uma ao lado da outra com uma distância entre elas de aproximadamente 3mm. Apenas a pele do animal foi retirada durante a realização da ferida, nenhum outro tecido adicional foi danificado.

Os animais diabetizados foram divididos em diferentes grupos contendo três animais cada, n=3, com os seguintes tratamentos:

- Grupo Controle Negativo - não ocorre aplicação de componente algum nas incisões;
- Grupo Sham –no qual são provocadas duas incisões, mas aplica-se apenas solução salina como placebo em uma das incisões e nada na outra incisão contralateral;
- Grupo Controle Positivo - recebe a aplicação de 5µg de rhPDGF em uma das duas incisões e na outra é aplicado o veículo (solução tampão de purificação - 20mM Tris-Cl + 400mM NaCl).
- Grupo Experimental - recebe aplicação de 5µg de rhTGF-β1 em uma das duas incisões e na outra é aplicado o veículo (meio α-MEM condicionado por células CHO DG44 não produtoras de TGF-β1).

Os animais normais são divididos, da mesma maneira, em diferentes grupos contendo três animais por grupo, n=3, com os mesmos tratamentos já citados acima.

Após nove dias de tratamento e avaliação diária, os animais são eutanasiados em câmara de CO₂, os tecidos serão retirados e submetidos à análise da área cicatrizada, avaliando-se a granulação do tecido, e análise histológica para colágeno (Tricômico de Masson) e Hematoxilina/Eosina.

3.17.3. Histologia

As amostras de pele retiradas dos camundongos de todos os grupos citados foram mantidas em paraformaldeído 4% (PFA) até o dia seguinte à coleta, sendo então lavadas

em água corrente por 30min e mantidas em álcool 70% até serem inclusas em parafina. As amostras foram colocadas em cassetes histológicos, devidamente identificados, para serem desidratadas por imersão em soluções de álcool em diferentes concentrações. As amostras ficaram 20 minutos, em agitação, em cada uma das soluções de etanol 80%, 90%, 95% e por 40 minutos em álcool absoluto. Após a desidratação, as amostras ficaram por 40 minutos em Xilol, tendo o Xilol sido substituído por um novo após os primeiros 20min. Os cassetes histológicos contendo as peles foram, então, colocados em parafina, na estufa à 60°C, por 4h e incluídos em blocos de parafina após esse período. Os blocos foram cortados em micrótomo (Leica Biosystems) com uma espessura de 5µM e colocados em lâminas histológicas.

Para a coloração com solução de Tricômico de Masson, as lâminas foram desparafinizadas através da incubação por 2min em cada uma das soluções de etanol 70%, 80%, 90% e mais 2min em etanol 100%, sendo, então, lavadas em água corrente por 5min e, em seguida, coradas em solução de hematoxilina férrica de Weigert (1g de hematoxilina, 100mL de etanol 100%, 4mL de cloreto férrico – FeCl – 29%, 4 mL de água destilada e 1mL de ácido clorídrico – HCl – concentrado) por 10min. O passo seguinte foi lavar, em água corrente, por 10min e, depois, corar em solução aquosa de Biebrich Scarlet a 1% (90mL de solução aquosa Biebrich Scarlet a 1%, 10mL de solução aquosa de fucsina ácida a 1% e 1mL de ácido acético glacial) por 5min. Em seguida, as lâminas foram colocadas na solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (5g de ácido fosfotúngstico, 5g de ácido fosfomolibdico e 200mL de água destilada) por 20min, sendo coradas em solução de azul de anilina (2,5g de azul de anilina, 2mL de ácido acético glacial e 100mL de água destilada) por 20min e incubadas, por 5min, em solução de ácido acético 1%. Por fim, as lâminas foram mergulhadas em etanol 95%, seguido de um mergulho em etanol 100%, deixadas em Xilol por 5min. Após esse tempo, uma gota do meio de montagem, o Entellan, é colocada sob os cortes, delicadamente, de maneira a cobrir toda a extensão desses. O último passo é a colocação da lamínula sob o meio de montagem, formando uma fina película do meio de montagem entre a lâmina e a lamínula.

A coloração com Hematoxilina-Eosina foi feita após a desparafinização das lâminas, como descrito acima, seguida de uma lavagem das mesmas em água corrente por 5 minutos. Após incubação por 2min em solução de hematoxilina (1g de hematoxilina, 1L de água destilada, 0,2g de iodato de sódio, 50g de alúmen de amônia, 1g de ácido cítrico e 50g de hidrato de cloral), as lâminas foram lavadas em água corrente por 5min e coradas em solução de eosina (100mL solução aquosa a 1% de eosina, 10mL de solução aquosa a 1% de floxina, 780mL de etanol 95% e 4mL de ácido acético glacial) por 40 segundos. Por fim, as lâminas foram mergulhadas em etanol 95%, seguido de um mergulho em etanol 100%, incubadas em Xilol por 5min e montadas como descrito para a coloração de Tricômio de Masson.

3.18. Purificação da proteína TGF- β 1 por cromatografia de afinidade a heparina

Para gerar o meio condicionado contendo TGF- β 1, o clone escolhido como superprodutor foi transferido para garrafas de cultivo T-150, depois expandido e cultivado em meio livre de glutamina, suplementado com soro fetal bovino dialisado. Quando a cultura se encontrava com 80% de confluência, as células foram lavadas duas vezes com PBSA e cultivadas com o meio novo. Após três dias, o meio foi coletado. Uma parte do meio retirado foi utilizado para a purificação e o meio restante estocado a 4°C para futuras utilizações. O sistema Äkta Purifier UPC-100 (GE Healthcare), de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), associado a uma coluna HiTrap™ Heparin HP (GE Healthcare) de 5mL, foi utilizado para a purificação da proteína TGF- β 1. O fluxo constante de 2mL/min foi utilizado durante todo o processo. A coluna foi primeiramente equilibrada com 3 VC (volumes de coluna) utilizando o tampão de equilíbrio (50 mM fosfato de sódio, pH 8,0). Em seguida, 50mL de meio condicionado foram aplicados à coluna, seguido de lavagem da coluna (2 VC) com o tampão de equilíbrio. Para a eluição, um gradiente linear de concentração de NaCl foi aplicado, iniciado em 100mM e finalizado em 1M (tamponado com solução 50mM fosfato de sódio, pH 8,0), em um intervalo de 10 VC. As frações de permeado e lavado foram coletadas, bem como dez frações dos eluatos

contendo 1mL cada, e mantidas a 4°C. As frações foram utilizados para análises em géis de poliacrilamida utilizando o corante Coomassie Brilliant Blue e também análises de Dot blot.

3.19. Dot Blot

A técnica de Dot Blot é utilizada para detectar, analisar e identificar proteínas, semelhante à técnica Western Blot, mas diferente dessa, as amostras de proteínas não são separadas eletroforéticamente, mas são imobilizadas, através de moldes circulares, diretamente sobre a membrana. O Dot Blot foi utilizado para analisar a presença do TGF- β 1 nas frações da purificação descrita anteriormente. Para isso, um aparelho, já descontinuado, da empresa Thermo Fisher Scientific foi utilizado para a imobilização das proteínas na membrana de nitrocelulose, segundo orientações do fabricante. A cada poço, foram injetados 100 μ L das amostras provenientes de cada fração obtida na purificação, o meio condicionado e o tampão utilizados na purificação e o meio α -MEM, utilizado para a manutenção das células transfectadas. Após a imobilização das proteínas, o protocolo do ensaio imunoenzimático seguiu como descrito no item 3.14.2, sem a necessidade de bloqueio da membrana.

4. RESULTADOS

4.1. Construção do vetor pNU1/TGF- β 1

Para a produção do TGF- β 1 recombinante, o primeiro passo foi a construção do vetor recombinante pNU1/TGF- β 1. Para tanto, a sequência codificadora completa do gene *TGF- β 1* e suas sequências proteicas correspondentes foram obtidas na base de dados de nucleotídeos do NCBI (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Sequência codificadora da proteína TGF- β 1 e correspondente proteico.

```

1 atgccgccct cgggctgcg gctgctgccg ctgctgctac cgctgctgtg gctactggtg
61 ctgacgcctg gccggccggc cgcgggacta tccacctgca agactatcga catggagctg
121 gtgaagcgga agcgcacgca ggccatccgc ggccagatcc tgtccaagct gcggtctgcc
181 agccccccga gccaggggga ggtgcccggc ggcccgtgca cggaggccgt gctcgccctg
241 tacaacagca cccgcgaccg ggtggccggg gagagtgcag aaccggagcc cgagcctgag
301 gccgactact acgccaagga ggtcaccggc gtgctaattg tggaaacca caacgaaatc
361 tatgacaagt tcaagcagag tacacacagc atatatatgt tcttcaacac atcagagctc
421 cgagaagcgg tacctgaacc cgtgttgctc tcccgggcag agctgcgtct gctgaggctc
481 aagttaaaag tggagcagca cgtggagctg taccagaaat acagcaacia ttctggcga
541 tacctcagca accggctgct ggcaccagc gactcgccag agtgggtatc tttgatgtc
601 accggagttg tgcggcagtg gttgagccgt ggaggggaaa ttgagggctt tgccttagc
661 gccactgct cctgtgacag cagggataac aactgcaag tggacatcaa cgggttact
721 accggccgcc gaggtgacct ggccaccatt catggcatga accggccttt cctgcttctc
781 atggccaccc cgctggagag ggcccagcat ctgcaaagct cccggcaccg ccgagccctg
841 gacaccaact attgcttcag ctccacggag aagaactgct gctgctggca gctgtacatt
901 gacttccgca aggacctcgg ctggaagtgg atccacgagc ccaagggcta ccatgccaac
961 ttctgcctcg ggccctgccc ctacatttgg agcctggaca cgcagtacag caaggtcctg
1021 gccctgtaca accagcataa cccggggcgc tcggcggcgc cgtgctgctg gccgcaggcg
1081 ctggagccgc tgccatcgt gtactacgtg ggccgcaagc ccaaggtgga gcagctgtcc
1141 aacatgatcg tgcgctcctg caagtgcagc tga

```

Intervalo (Nº de pares de bases)	Região proteica correspondente (Nº de resíduos de aminoácidos)
1 – 87 (87)	Peptídeo sinal (29)
88 – 835 (747)	Proteína madura TGF- β 1 (249)
1.170 – 1.173 (3)	Não se aplica – códon de terminação (0)

Para a construção do vetor pNU1/TGF- β 1, levou-se em consideração a análise do perfil de expressão do mRNA do gene *TGF- β 1* (NM-000660) em diferentes tecidos. Para isso, foi utilizado o programa UniGene (NCBI), no qual foi gerado um perfil EST (*Expressed Sequence Tag* – Marcador de Sequência Genética) para esse gene (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Perfil de EST do gene *TGF- β 1*

Tecido	Transcritos por milhão (TPM)	Intensidade do sinal baseado em TPM	Gene EST/Total EST no pool	Tecido	Transcritos por milhão (TPM)	Intensidade do sinal baseado em TPM	Gene EST/Total EST no pool
Tecido adiposo	77		1/12866	Boca	75		5/66150
Glândula adrenal	30		1/32940	Músculo	9		1/106371
Ascites	75		3/39834	Nervo	0		0/15535
Bexiga	0		0/29860	Ovário	9		1/101488
Sangue	302		37/12252	Pâncreas	84		18/213440
Osso	265		19/71618	Paratireóide	0		0/20594
Medula	82		4/48737	Faringe	49		2/40725
Cérebro	27		30/109268 8	Glândula pituitária	60		1/16526
Colo do útero	41		2/48486	Placenta	109		31/283019
Tecido conjuntivo	67		10/149072	Próstata	42		8/189536
Orelha	0		0/16100	Glândula salivar	641		13/20265
Tecido embrionário	46		10/212896	Pele	61		13/210759
Esôfago	0		0/20154	Baço	187		10/53397
Olho	86		18/208840	Estômago	52		5/95679
Coração	22		2/89524	Testículo	13		6/435204
Intestino	38		9/231981	Timo	0		0/79697
Rim	61		13/210778	Tireóide	85		4/46583
Laringe	42		1/23466	Amígdala	235		4/17021
Fígado	73		15/205291	Traqueia	0		0/51780
Pulmão	53		18/334815	Cordão umbilical	145		2/13764
Linfa	90		4/44302	Útero	56		13/232093
Linfonodo	33		3/89748	Vascular	0		0/51649
Glândula mamária	72		11/151230				

Diante da variedade de tecidos abrangida pelo Banco de cDNAs, gerado pelo nosso grupo, e pela análise do perfil de expressão em diferentes órgãos (Tabela 4.2), foram selecionados os cDNA's de próstata, rim e fígado para a amplificação da sequência codificadora do gene *TGF- β 1*. O par de *primers* hTGF β 1_NT_EcoRI e hTGF β 1_CT_NheI

(Tabela 3.1) foi utilizado nas reações de PCR, feitas individualmente a partir de cDNA total dos tecidos selecionados, para amplificação da sequência codificadora e os produtos destas reações foram submetidos a fracionamento em gel de agarose 0,8% por eletroforese. Essa amplificação permitiu a adição dos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *NheI* nas regiões 3' e 5', respectivamente, da região codificadora do gene *TGF-β1*. A análise do fracionamento mostrou que amplicons de tamanhos variados foram obtidos, dentre os quais um que apresentava o tamanho esperado para oTGF-β1, localizado entre as bandas de 1.000 e 1.500 pb do marcador molecular, porém nenhuma amplificação foi obtida utilizando-se cDNA de rim (Figura 4.1).

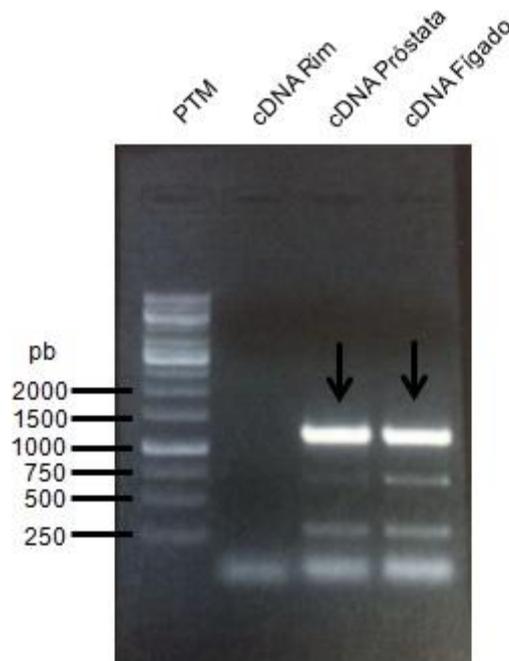


Figura 4.1 – Fracionamento em gel de agarose do produto da reação de PCR para amplificação de rhTGF-β1 a partir de cDNA de rim, próstata e fígado. O par de primers hTGFβ1_NT_ *EcoRI* e hTGFβ1_CT_ *NheI* foi utilizado na reação de amplificação de rhTGF-β1, tendo uma amostra de cDNA total de rim, próstata e fígado como *templates*. Os amplicons correspondentes à isoformas rhTGF-β1 estão indicados com uma seta. PTM: padrão de tamanho molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific Inc.). pb: pares de base.

Optou-se por remover do gel ambas as bandas originadas, obtidas das reações que tiveram como *templates* os cDNAs de próstata e de fígado, tendo em vista que não houve amplificação a partir do cDNA de rim, como podemos observar na figura 4.1. Esses fragmentos, contendo os amplicons, foram digeridos e tiveram o DNA purificado por meio da

utilização do Kit da QIAGEN - QIAquick Gel Extraction. Por questões de quantidade de DNA recuperado a partir dessa purificação, o cDNA gerado após amplificação do cDNA de próstata foi utilizado para o passo seguinte, que consistiu em sua ligação ao vetor de expressão pNU1.

A ligação do amplicon ao vetor de expressão pNU1 gerou a construção pNU1/TGF- β 1, que foi introduzida em bactérias *Escherichia coli* da cepa XL-1 Blue por eletroporação. Após transformadas, as bactérias foram crescidas em meio LB-ágar acrescido do antibiótico ampicilina. Esse antibiótico é capaz de selecionar apenas bactérias capazes de metabolizá-lo, ou seja, aquelas que possuem o cassete AmpR presente no vetor pNU1, utilizado para a transformação bacteriana. Em adição a essa primeira seleção, uma segunda triagem foi feita, através de um PCR de colônia das colônias obtidas anteriormente, já que uma porção dos vetores pode não se ligar aos insertos para formar a construção desejada. Para tanto, foi utilizado o par de *primers* pNU1_seq4_F e pNU1_seq4_R, que flanqueiam a região de inserção da região codificadora do gene *TGF- β 1*. As amostras resultantes dessas reações foram fracionadas em géis de agarose 1,0% para detecção dos amplicons.

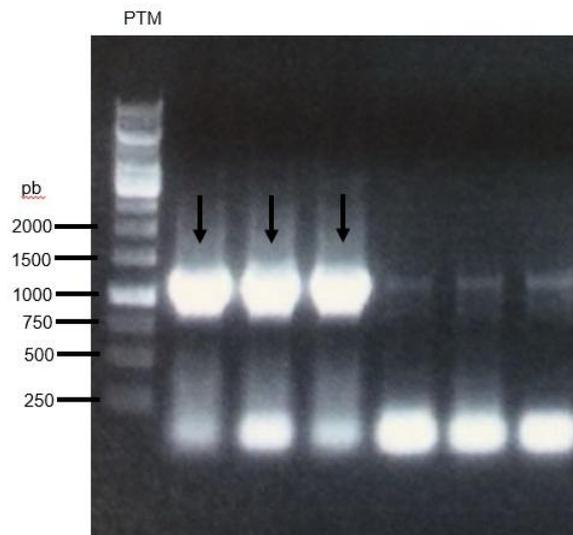


Figura 4.2 – Fracionamento em gel de agarose dos produtos das reações de PCR de colônias para triagem de clones bacterianos transformados com a construção pNU1/TGF- β 1. O par de *primers* pNU1_seq4_F e pNU1_seq4_R foi utilizado nas reações de PCR de colônias, tendo amostras de suspensão dos clones bacterianos transformados como *template*. Cada canaleta se refere a um clone bacteriano obtido. Os amplicons correspondentes à região codificadora de rhTGF- β 1 estão indicados com uma seta PTM: padrão de tamanho molecular GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). pb: pares de base.

As colônias consideradas como sendo positivas para a construção de interesse tiveram esses plasmídeos sequenciados pelo método de Sanger, que confirmou a integridade da sequência codificadora da proteína TGF- β 1 em todas as três construções (dados não mostrados). Antes de seguir com a transfecção das células CHO DG44 com uma das construções pNU1/TGF- β 1 geradas, essas foram restringidas, através de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NheI*, para que, no final, apenas o cassete de expressão fosse inserido nas células hospedeiras. As restrições liberaram um produto final, linearizado, que contém sequências codificadoras dos genes *TGF- β 1* e diidrofolato redutase (*dhfr*) e os elementos necessários para a transcrição dos mesmos. Os produtos dessas reações foram fracionados em géis de agarose 0,8% para detecção das restrições.

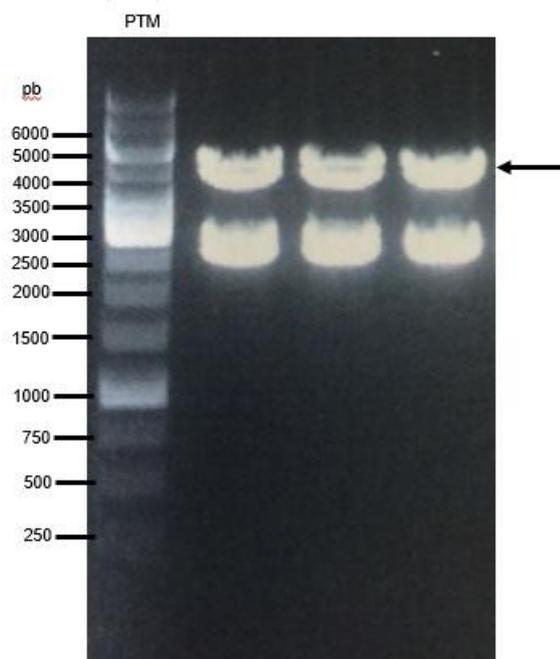


Figura 4.3 – Fracionamento em gel de agarose dos produtos das reações de restrição da construção pNU1/TGF- β 1 através de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NheI* para a obtenção do cassete de expressão. A enzima de restrição *SpeI* foi utilizada para restringir três construções. Cada canaleta se refere a um produto de uma construção restringida. Os cassetes de expressão gerados estão indicados pela seta. PTM: padrão de tamanho molecular GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). pb: pares de base.

As bandas correspondentes aos cassetes de expressão, localizadas entre 4.000 e 5.000pb, foram excisadas do gel e tiveram seu DNA purificado por meio da utilização do Kit

da QIAGEN - QIAquick Gel Extraction. O produto dessa purificação foi utilizado para o próximo passo, ou seja, a transfecção.

4.2. Transfecção de células CHO DG44 com a construção pNU1/ TGF- β 1 e amplificação gênica

Uma vez que a construção pNU1/TGF- β 1 foi confirmada, quatro populações distintas de células CHO DG44 foram transfectadas com essa construção, obtida como descrito anteriormente. Essas quatro populações, passando separadamente pelo processo de amplificação gênica, geraram, então, quatro famílias distintas, todas produtoras da proteína TGF- β 1. Processos de seleção e amplificação foram realizados adicionando-se ao meio de cultura das subpopulações doses crescentes do quimioterápico metotrexato (MTX). Esse meio de cultivo, usado na manutenção das populações celulares de CHO DG44 transfectadas, é deficiente de nucleosídeos, como descrito no item 3.9, assim, a adição de MTX foi responsável pela morte de muitas células a medida que o tratamento era feito. Esse fenômeno de morte celular é explicado pelo fato dessas células possuírem menor resistência ao quimioterápico, possivelmente, por terem uma menor quantidade da enzima diidrofolato redutase (DHFR), cuja sequência codificadora encontra-se no cassete de expressão utilizado para a transfecção, tratando-se, portanto, de uma complementação gênica. A cada etapa de seleção, uma pressão seletiva era exercida, também, sobre as células, induzindo o aumento ou a amplificação não só do número de cópias do gene *dhfr*, mas, também, do número de cópias das regiões codificadoras de TGF- β 1 inseridas através do cassete. Ao atingir 90% de confluência, a população celular era submetida a um aumento da concentração de MTX e, como mostrado no esquema da figura 4.4, o máximo de sua concentração chegou até 2 μ M. Todas as populações celulares obtidas foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido. Os meios condicionados por essas células produtoras de TGF- β 1 foram recolhidos e utilizados, posteriormente, para a avaliação da produção de TGF- β 1 pelas populações celulares geradas, através de Western blot e ELISA. A integridade morfológica das células foi verificada a cada passagem, através da observação

microscópica das mesmas. As culturas foram fotografadas durante a observação e a imagem abaixo é uma representação da morfologia das populações transfectadas (Fig. 4.4).

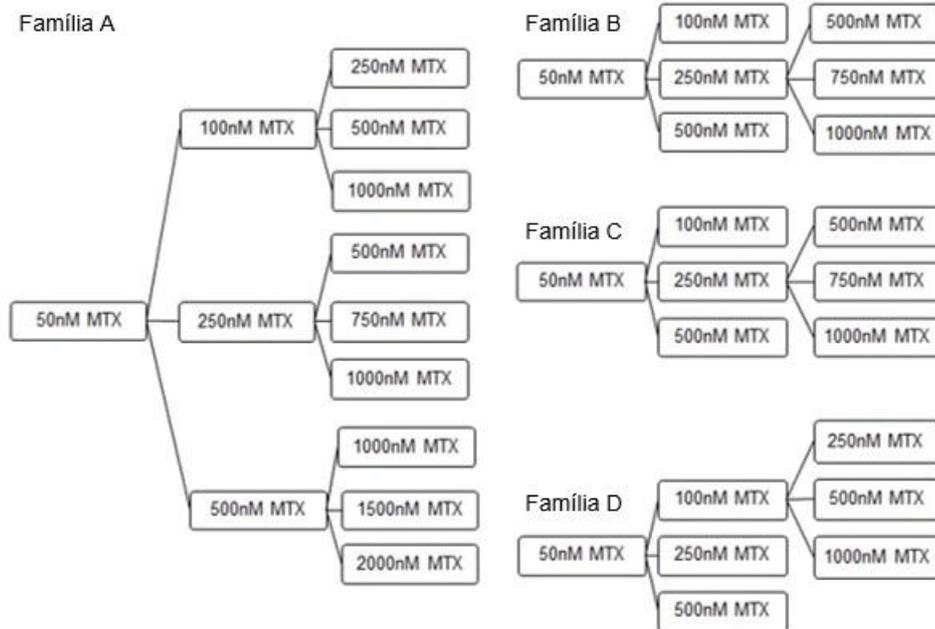


Figura 4.4 – Esquema representativo das famílias de populações mistas produtoras de TGF-β1. Quatro famílias de populações mistas foram geradas a partir de quatro diferentes transfecções iniciais com a construção pNU1/TGF-β1.

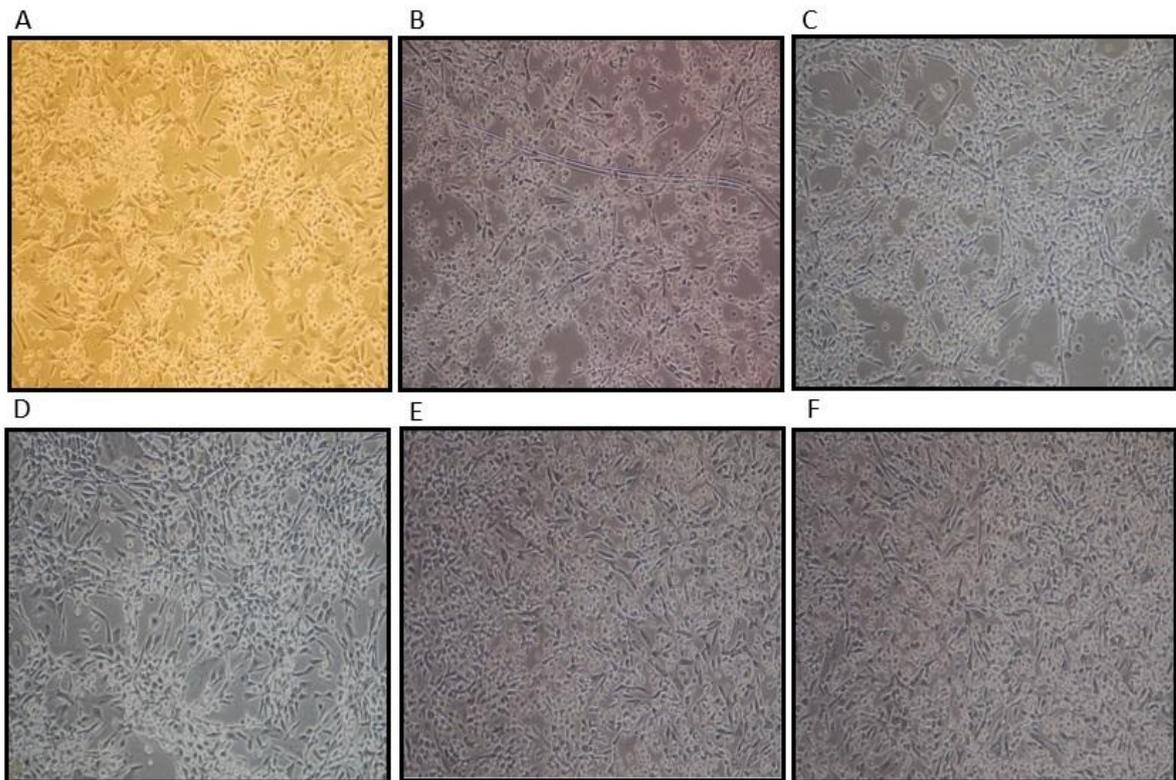


Figura 4.5 – Análise morfológica das células CHO DG44 transfectadas com a construção pNU1/rhTGF- β 1 submetidas à diferentes concentrações de metotrexato. (A) 50 nM MTX; (B) 100 nM MTX; (C) 250 nM MTX; (D) 500 nM MTX; (E) 750 nM MTX and (F) 1000 nM MTX. É possível observar a integridade celular, mesmo em altas concentrações de MTX. Aumento 40X.

4.3. Avaliação da produção de rhTGF- β 1 por células CHO DG44 superprodutoras através de ELISA e Western Blot

As proteínas TGF- β 1, produzidas de maneira recombinante, possuem um peptídeo sinal, portanto, espera-se que sejam secretadas pelas células para o meio de cultura, que se denomina “meio condicionado”. Os meios condicionados por todas populações mistas geradas foram coletados e processados como descrito nos itens 3.13 e 3.14 para ensaios de ELISA e Western blot. Para ELISA, foi utilizado um kit específico (Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA Kit, R&D Systems) e para o Western blot, um anticorpo primário policlonal (Sc-146, Santa Cruz Biotechnology) que reconhece as proteínas TGF- β 1 e - β 2. Amostras de meio condicionado por células CHO DG44 não transfectadas, obtidos de maneira semelhante aos meios condicionados pelas populações produtoras da proteína de interesse, foram utilizadas como controle negativo em nos experimentos de ELISA e Western blot.

Os resultados obtidos indicam que algumas populações celulares foram capazes de expressar uma quantidade maior de TGF- β 1. Duas famílias celulares, em especial, as famílias B e C da fig. 4.4, foram identificadas como contendo as populações mais produtoras, sendo selecionadas para seguir com os experimentos. Os resultados das demais famílias, A e D, que são menos produtoras, não foram mostrados. Para a realização do ELISA, é necessário que as proteínas estejam em seu estado ativo, mas são produzidas pelas células em seu estado latente, ligada ao LAP, sendo necessária uma clivagem ácida antes do início do ensaio. A primeira etapa do experimento de Western blot foi feita em gel desnaturante, sendo detectado o monômero correspondente ao estado maduro da proteína (peso molecular de aproximadamente 12 kDa).

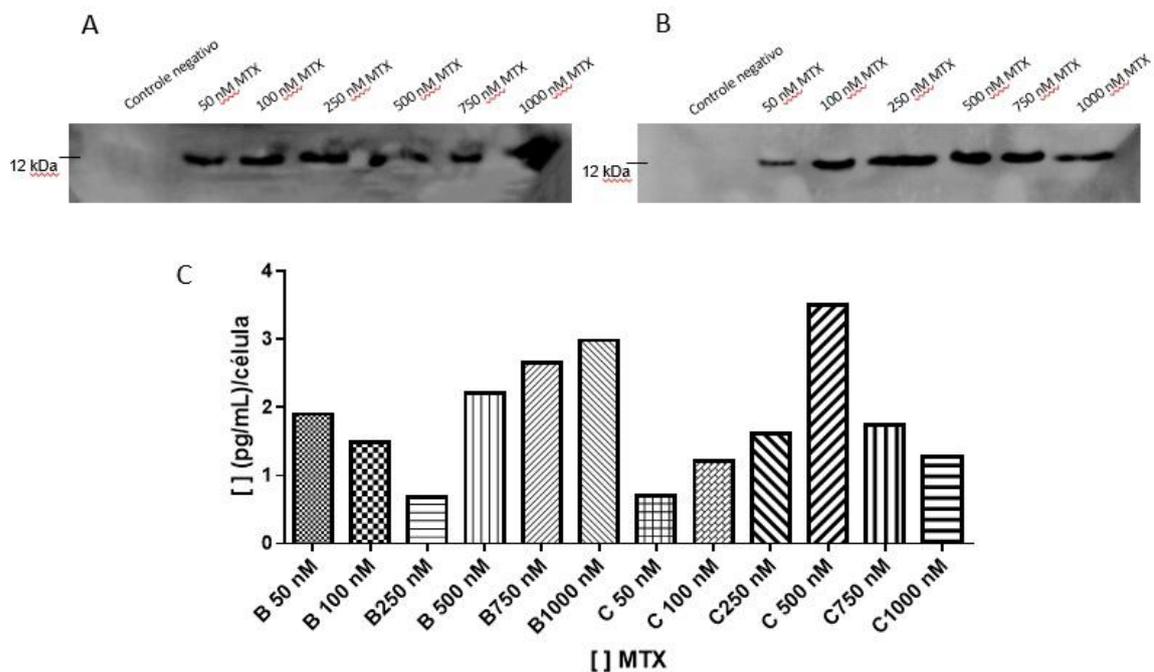


Figura 4.6 – Análise da expressão de rhTGF- β 1 por Western blot e ELISA para as famílias de populações mistas B e C, a partir de meios condicionados. Os meios condicionados pelas populações mistas das famílias B e C foram coletados após 72h de condicionamento e estocados a -20°C , as células produtoras foram lavadas com PBS e contadas após serem soltas da placa. (A) Família B e (B) Família C - Uma vez descongelados, os meios tiveram as proteínas precipitadas utilizando-se acetona. Em seguida, as proteínas foram ressuspendidas em tampão de amostra e aplicadas em geis SDS-PAGE 12% (condição redutora) para fracionamento por eletroforese. Uma vez fracionadas, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram então incubadas com uma solução de anticorpo policlonal anti-TGF- β 1, reveladas por quimiluminescência e documentadas. Controle negativo: meio condicionado por células CHO DG44 não transfectadas. Padrão de massa molecular: BenchMarkTM Pre-Stained Protein Ladder. kDa: quilodaltons. (C) - Os mesmos meios foram utilizados para a realização do ensaio de ELISA com o kit específico Human TGF-beta 1 DuoSet - R&D Systems. A

produção foi normalizada dividindo-se a quantidade de proteína gerada por cada população mista pela quantidade de células presentes naquela população.

4.4. Seleção de clones superprodutores e avaliação da produção de rhTGF- β 1 através de Western Blot e ELISA

Através da análise dos resultados gerados através de Western blot e ELISA dos meios condicionados pelas populações mistas, duas populações foram selecionadas para a geração de clones superprodutores, ou seja, as populações selecionadas na presença de 1.000nM de MTX da família B e 500nM de MTX da família C. O MTX é um composto conhecido por gerar mutações pontuais, dessa maneira, para maior segurança de que as funções celulares e as regiões codificadoras da proteína TGF- β 1 continuassem intactas, a partir desse momento, os meios de cultivo já não foram mais suplementados com esse quimioterápico. Para tanto, as duas populações mistas escolhidas das famílias B e C, pararam de receber o tratamento com MTX e foram submetidas a quatro passagens, antes de prosseguir com a geração de clones. O processo de seleção de clones superprodutores foi feito através da técnica de diluição limitante, colocando-se, em placas p60 (21,2cm² de área e 52mm de diâmetro), suspensões celulares diluídas nas razões de 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 e 1/200. Após alguns dias de cultivo, formaram-se colônias e aquelas de bordas arredondadas, indício de que apenas uma célula deu origem a cada colônia, foram selecionadas com o auxílio microscópico e transferidas para placas de 48 poços (0,84cm² de área de crescimento/poço), sendo novamente transferidas, quando alcançaram 100% de confluência, para placas de seis poços (9,60cm² de área de crescimento/poço). A partir da população da família celular B, mantida na presença de 500nM de MTX, foram gerados 17 clones superprodutores e da população celular da família C, selecionada em 1.000nM, 24 clones.

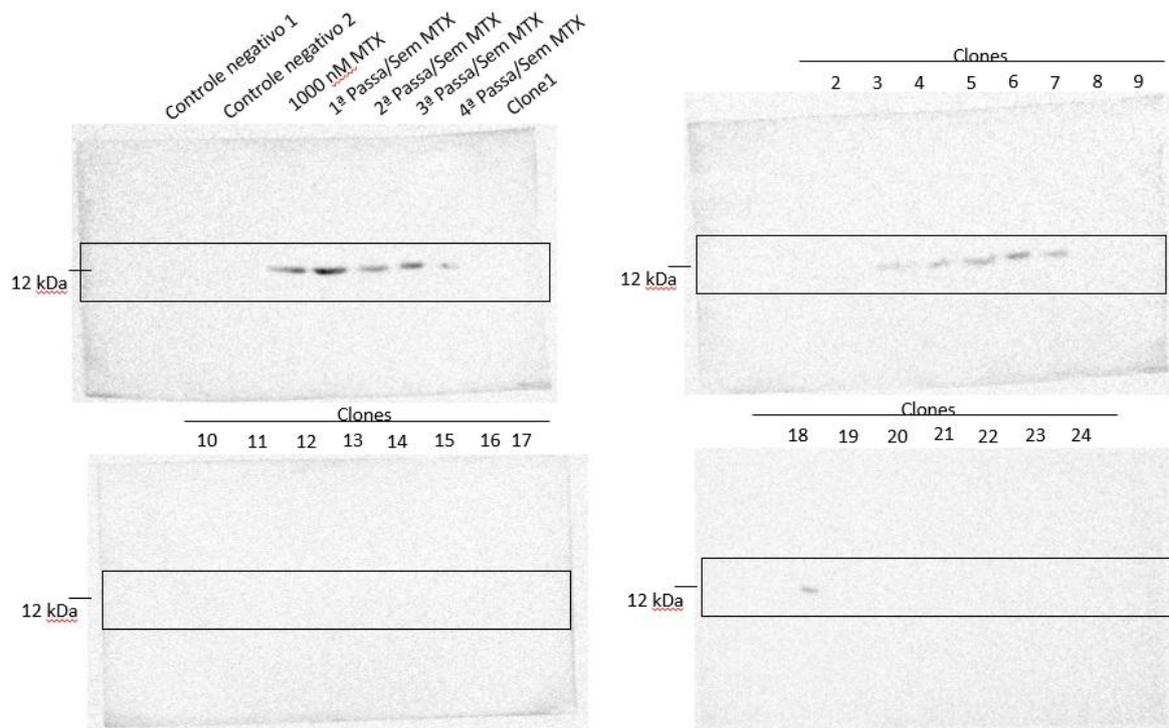


Figura 4.7 – Análise da expressão de rhTGF- β 1 através de Western blot para os clones superprodutores obtidos a partir da população mista mantida na presença de 1.000nM de MTX da família B, a partir de meios condicionados. Os meios condicionados pelos clones superprodutores gerados foram coletados após 72h de condicionamento, sem MTX, e estocados a -20°C, as células produtoras foram lavadas com PBSA e contadas após serem soltas da placa. Uma vez descongelados, amostras dos meios condicionados tiveram suas proteínas precipitadas utilizando-se acetona. Em seguida, as proteínas foram ressuspendidas em tampão de amostra e aplicadas em geis SDS-PAGE 12% (condição redutora) para fracionamento por eletroforese. Uma vez fracionadas, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram então incubadas com uma solução de anticorpo policlonal anti-TGF- β 1, reveladas por quimiluminescência e documentadas. Controle negativo 1: meio condicionado por células CHO DG44 não transfectadas. Controle negativo 2: meio de cultivo Alfa-MEM. Padrão de massa molecular: BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder. kDa: quilodaltons.

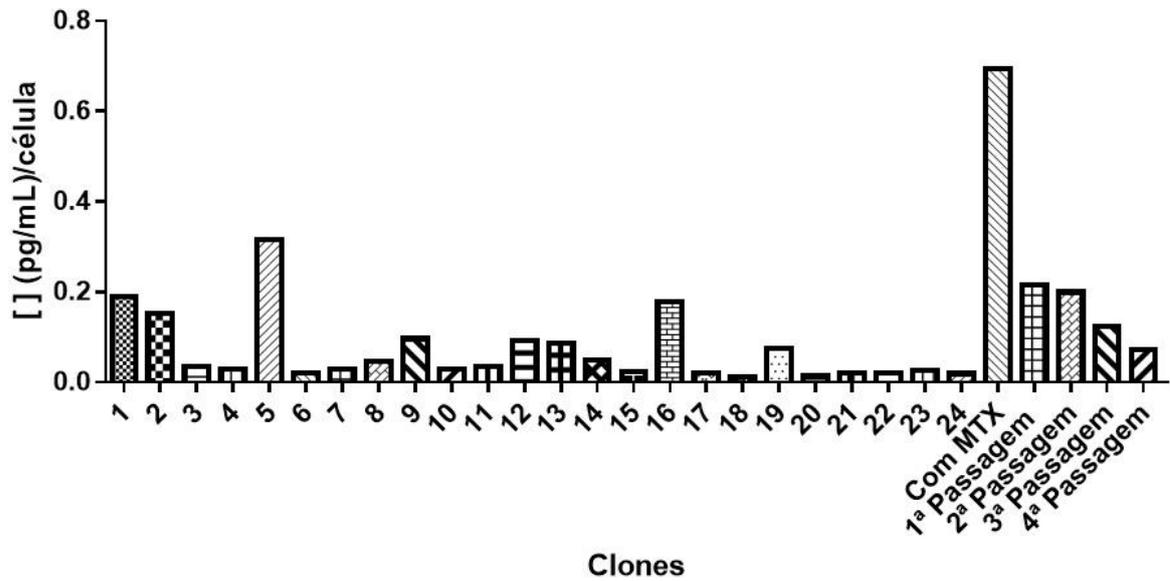


Figura 4.8 – Análise da expressão de rhTGF-β1 presente nos meios condicionados através de ELISA para os clones superprodutores obtidos a partir da população mista da família B mantida na presença de 1.000nM de MTX. Os meios condicionados pelos clones superprodutores gerados foram coletados após 72h de condicionamento, sem MTX, e estocados a -20°C, as células produtoras foram lavadas com PBS e contadas após serem soltas da placa. Uma vez descongelados, os meios foram utilizados para a realização do ensaio de ELISA com o kit específico Human TGF-beta 1 DuoSet - R&D Systems. Com MTX representa, no gráfico, a população mista mantida na presença de 1.000nM de MTX e as passagens, de 1 a 4, os cultivos dessa população mista na ausência de MTX, antes do processo de seleção clonal. A produção foi normalizada dividindo-se a quantidade de proteína gerada por cada clone pela quantidade de células presentes naquela população. [] – Quantidade, em pg, de TGF-β1 por mL de meio coletado.

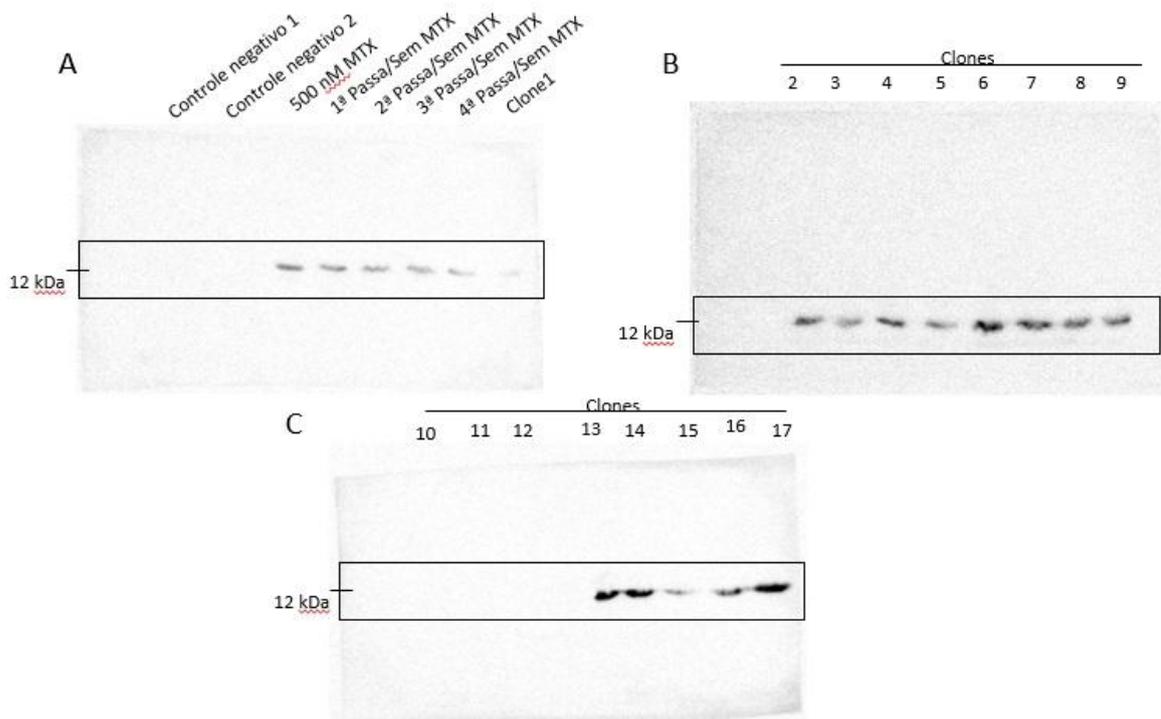


Figura 4.9 – Análise da expressão de rhTGF-β1 presente nos meios condicionados

através de Western blot para os clones superprodutores obtidos a partir da família C da população mista mantida na presença de 500nM de MTX. Os meios condicionados pelos clones superprodutores gerados foram coletados após 72h de condicionamento, na ausência de MTX, e estocados a -20°C . As células superprodutoras foram lavadas com PBS e contadas após serem soltas da placa. Uma vez descongelados, os meios condicionados tiveram as proteínas precipitadas utilizando-se acetona. Em seguida, as proteínas foram ressuspensas em tampão de amostra e aplicadas em geis SDS-PAGE 12% (condição redutora) para fracionamento por eletroforese. Uma vez fracionadas, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram então incubadas com uma solução de anticorpo policlonal anti-TGF- β 1, reveladas por quimiluminescência e documentadas. Controle negativo 1: meio condicionado por células CHO DG44 não transfectadas. Controle negativo 2: meio de cultivo Alfa-MEM. Padrão de massa molecular: BenchMarkTM Pre-Stained Protein Ladder. kDa: quilodaltons.

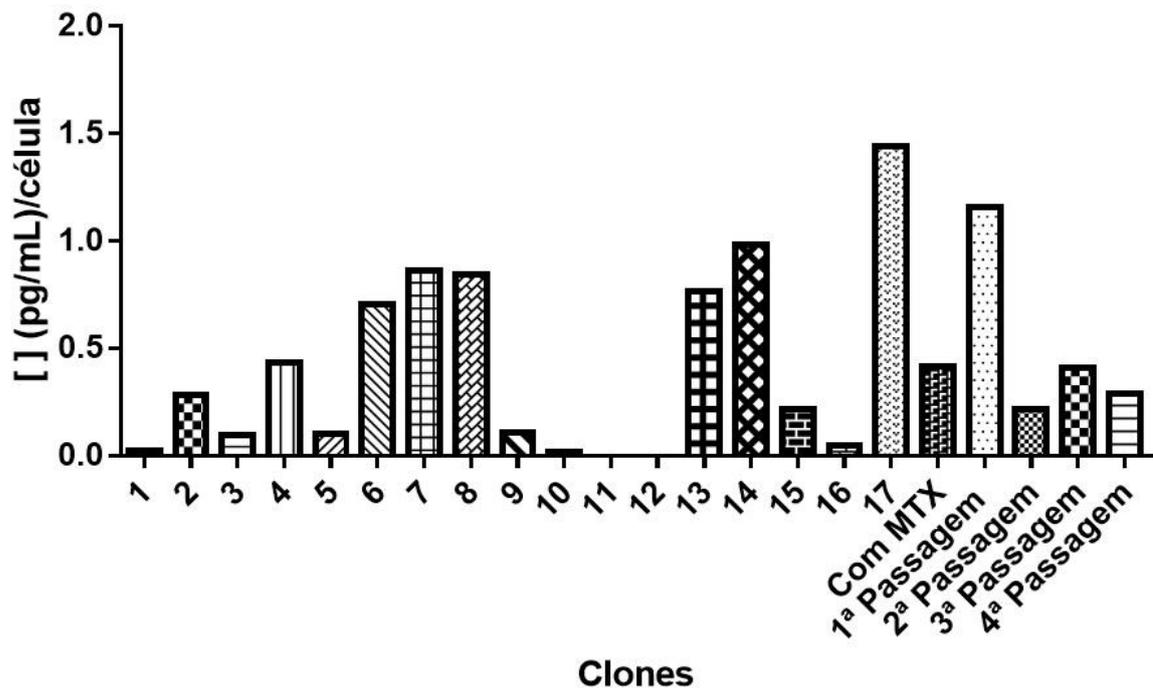


Figura 4.10 – Análise da expressão de rhTGF- β 1 presente nos meios condicionados através deELISA para os clones superprodutores obtidos a partir da população mista da família C mantida a 500nM de MTX. Os meios condicionados pelos clones superprodutores gerados foram coletados após 72h de condicionamento, na ausência de MTX, e estocados a -20°C . As células superprodutoras foram lavadas com PBS e contadas após serem soltas da placa. Uma vez descongelados, os meios foram utilizados para a realização do ensaio de ELISA com o kit específico Human TGF-beta 1 DuoSet - R&D Systems. Com MTX representa, no gráfico, a população mista mantida na presença de 1.000nM de MTX e as passagens, de 1 a 4, os cultivos dessa população mista na ausência de MTX, antes do processo de seleção clonal. A produção foi normalizada dividindo-se a quantidade de proteína gerada por cada clone pela quantidade de células presentes naquela população. [] – Quantidade, em pg, de TGF- β 1 por mL de meio coletado.

Pode-se observar a perda de expressão por meio das duas populações mistas escolhidas, quando comparamos os dados de ELISA antes e depois da seleção clonal. Porém, quando comparamos a expressão dos clones gerados, a família C parece muito mais promissora, com células apresentando maior expressão da proteína recombinante

TGF- β 1. Dessa maneira, os clones 6, 7, 8, 14 e 17 foram selecionados para as próximas etapas. Para decidir qual deles, de fato, teria o meio condicionado utilizado para a purificação da proteína e para os ensaios *in vivo*, um ensaio de atividade biológica *in vitro* foi realizado, utilizando-se células A549, de carcinoma de pulmão.

4.5. Ensaio de atividade biológica *in vitro* da proteína TGF- β 1

Células da linhagem A549 de carcinoma de pulmão humano foram utilizadas para testar a atividade biológica da proteína rhTGF- β 1 presente nos meios condicionados pelos seis clones selecionados. Como descrito no item 3.18, essas células passam por um processo de transição epitélio-mesênquima quando tratadas com TGF- β 1. Os meios coletados anteriormente, conforme descrito no item 4.4, foram utilizados também para esse ensaio e a quantidade de proteína presente nos meios, determinada por ELISA, apresentada nesse mesmo item, foi utilizada para calcular o volume de meio necessário para o tratamento das células cancerígenas. As células A549 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, em placas p60 até atingirem confluência de 70%, quando então, tiveram seus meios trocados para RPMI suplementado com 5% de SFB e volumes suficientes de meios condicionados pelos clones 6, 7, 8, 14 e 17 para uma concentração final de 5ng/mL de TGF- β 1. As culturas foram lavadas com PBS e as células foram coletadas 48h após o tratamento para a realização do PCR em tempo real. O soro fetal bovino (SFB) é utilizado como suplementação de meios para auxiliar no crescimento das células, dessa maneira, como se espera que a proteína de interesse promova, não só uma mudança morfológica nas células de carcinoma, mas também uma proliferação das mesmas, a concentração do soro foi diminuída, para que não houvesse influência deste no resultado do experimento. Células que passam pela transição epitélio-mesênquima ganham maior mobilidade, ao sofrerem modificações na expressão de algumas proteínas de adesão celular. Nesse experimento, analisamos, através de PCR quantitativo em tempo real, a expressão de dois marcadores importantes para essa transição, a saber: E-caderina, um marcador epitelial e N-caderina, um marcador mesenquimal. Esperava-se, então, que os

níveis de expressão *E-caderina* diminuíssem, enquanto houvesse um aumento de *N-caderina* nas células tratadas com TGF- β 1. A expressão do gene *GAPDH* foi utilizada como referência e os ensaios foram feitos em triplicata, biológicas e técnicas.

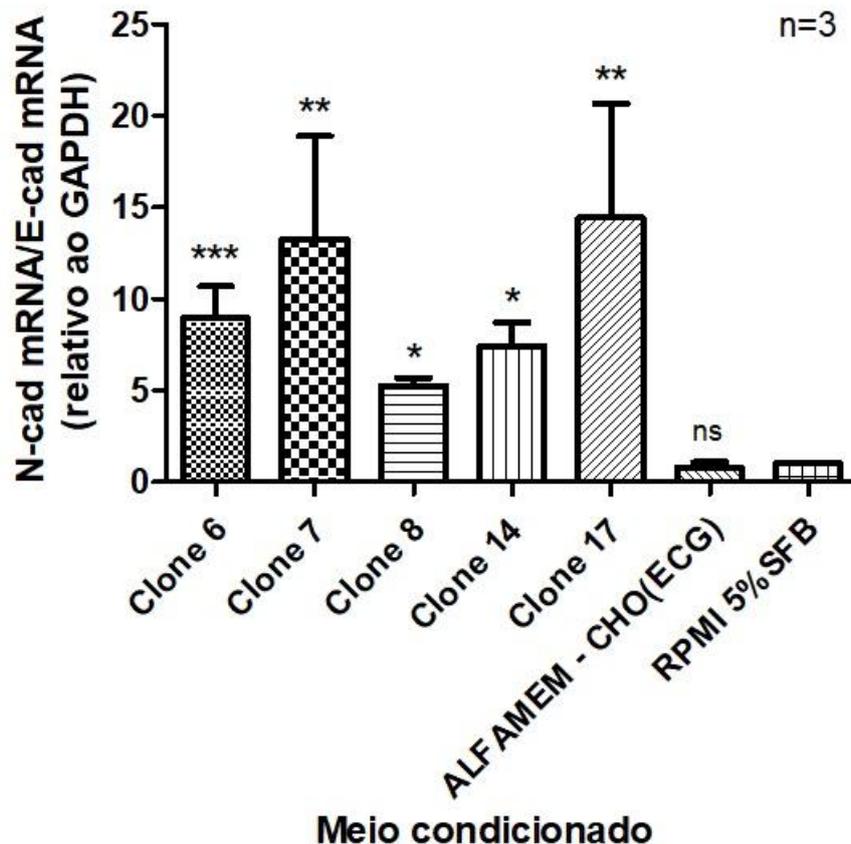


Figura 4.11 – Níveis de transcrição do mRNA da proteína N-caderina com relação aos níveis de transcrição do mRNA da proteína E-caderina. TGF- β 1 induz a Transição Epitélio-Mesênquima, associada a alterações em células A549. Alterações na expressão dos mRNAs de *E-cad* e *N-cad* em células A549, após a exposição ao TGF- β 1 presente nos meios condicionados pelos clones selecionados, avaliados por PCR em tempo real. O tratamento com TGF- β 1 reduz os níveis de expressão de *E-cad*, enquanto aumenta os níveis de expressão de *N-cad*. O meio Alfa-MEM condicionado por células CHO DG44 produtoras da proteína eCG foi utilizado como controle negativo, utilizando-se um volume correspondente ao maior volume utilizado de meio condicionado pelos clones. A barra referente ao meio RPMI 5% SFB representa as células A549 que não receberam tratamentos. Estatística feita com o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. $p < 0,05$.

Como, após o tratamento com TGF- β 1, os níveis de expressão de *E-cad* são reduzidos, enquanto aumentam-se os níveis de expressão de *N-cad*, quanto maiores os valores da relação *N-cad* mRNA/*E-cad* mRNA pode-se dizer que maiores quantidades de células sofreram a transição epitélio-mesênquima. Sendo assim, as proteínas dos meios

condicionados que apresentaram, nesse ensaio, a maior capacidade de modificar as células de pulmão, gerando um alto valor dessa relação, são aquelas com maior atividade biológica. A partir da análise do gráfico, gerado por PCR quantitativo em tempo real (Figura 4.11), temos o indício de dois clones produzindo TGF- β 1 com maiores níveis de atividade biológica, os clones 7 e 17. Levando em consideração os resultados obtidos no ensaio de ELISA, representado pela figura 4.10, os níveis de produção de TGF- β 1 são maiores no clone 17 do que no clone 7. Este resultado, juntamente com o ensaio de atividade biológica *in vitro*, nos levou a escolher o clone 17 para a produção da proteína a ser purificada e utilizada para a execução do ensaio de atividade biológica *in vivo*.

4.6. Ensaio de atividade biológica *in vivo* da proteína TGF- β 1

Foram realizados três ensaios independentes, em triplicata experimental, para determinar a atividade biológica *in vivo* do rhTGF- β 1 produzido por células superprodutoras do clone 17, como descrito no item 3.19. Foram feitas duas feridas no dorso de camundongos Balb/c machos de dois meses de idade, tornados diabéticos através do tratamento com o antibiótico estreptozotocina, que leva à destruição das células beta produtoras de insulina, ou não-tratados (controle). Essas feridas foram tratadas com 5 μ g de rhTGF- β 1 para testar a capacidade de regeneração tecidual dessa proteína. Como controle positivo, foi utilizada a proteína rhPDGF produzida e purificada previamente pelo nosso grupo, e que já teve sua atividade biológica testada em ensaios anteriores. Cada animal com uma ferida tratada com as proteínas de interesse teve a ferida do lado contralateral como controle negativo, sendo aplicado nessa o veículo no qual as respectivas proteínas são solubilizadas.

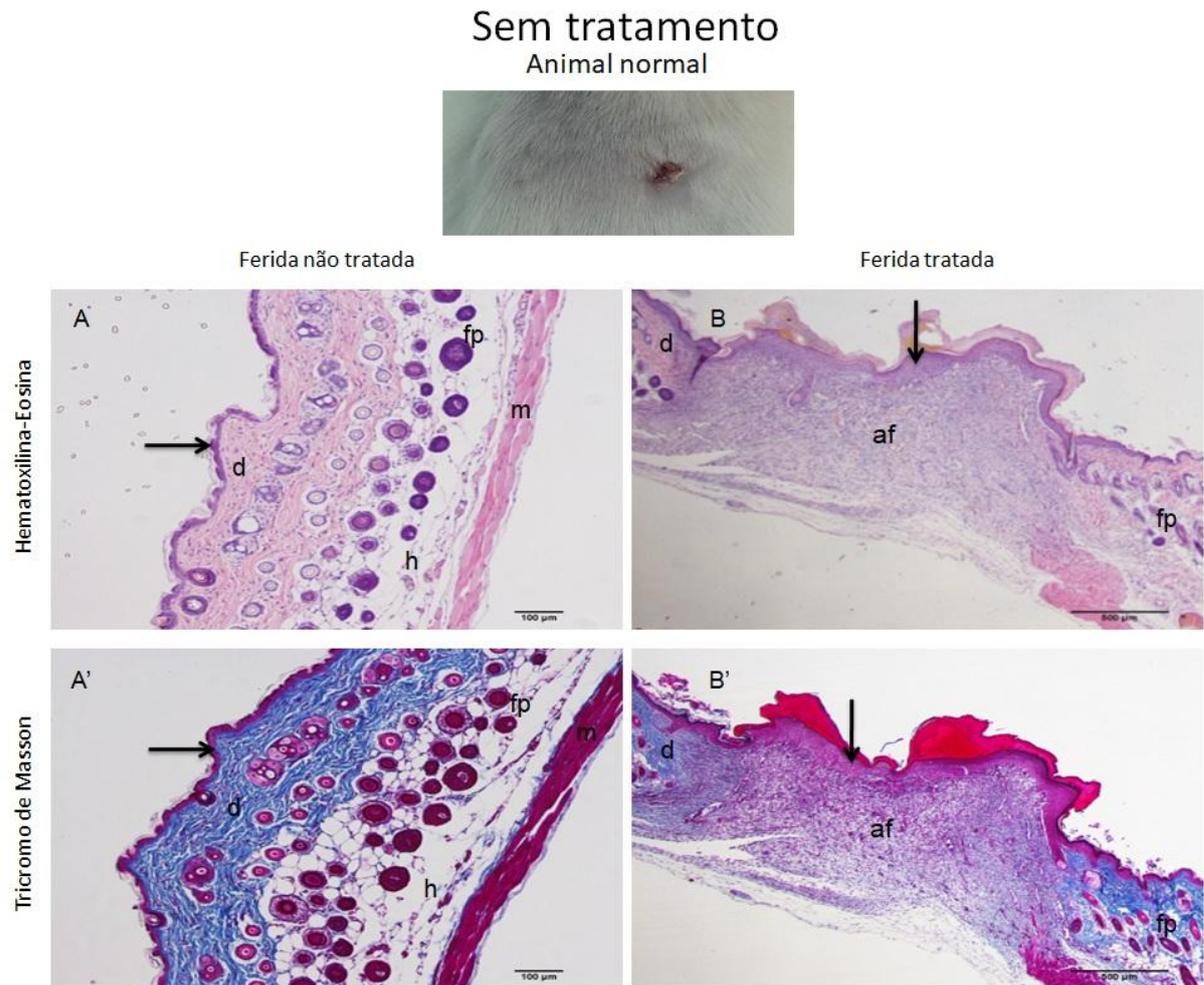


Figura 4.12 – Aspecto macroscópico e histológico de animais (camundongos Balb/c) normais (não diabéticos), não tratados com fatores peptídicos de crescimento e diferenciação. Foi provocada uma lesão, com a ajuda de um *punch* de biópsia no animal. Em todos os animais desse grupo, a lesão não recebeu tratamento algum, para que fosse um controle da pele lesada. Os animais foram mantidos por nove dias após o tratamento, sendo o dia 1 considerado como o dia em que as lesões foram provocadas. Após esse período, os animais foram eutanasiados, as lesões foram fotografadas e coletadas para fixação e inclusão em parafina. A pele ao lado da ferida não tratada também foi coletada para ser utilizada como controle da histologia da pele não lesada. Cortes histológicos (de 5 μ m de espessura) foram obtidos a partir dos blocos de parafina com o auxílio de um micrótomo. Esses cortes foram colocados em lâminas para posterior coloração com Hemaossilina-Eosina e Tricrômio de Masson. Pele normal controle corada com Hematoxilina-Eosina (1-A) e Tricrômio de Masson (1-A') exibindo a epiderme (seta), derme (d), folículo piloso (fp), hipoderme (h) e músculo (m). Pele normal com ferida sem tratamento, corada com Hematoxilina-Eosina (2-B) e Tricrômio de Masson (2-B') mostrando área da ferida (af). Aumento 10X. Tamanho da barra = 500 μ M.

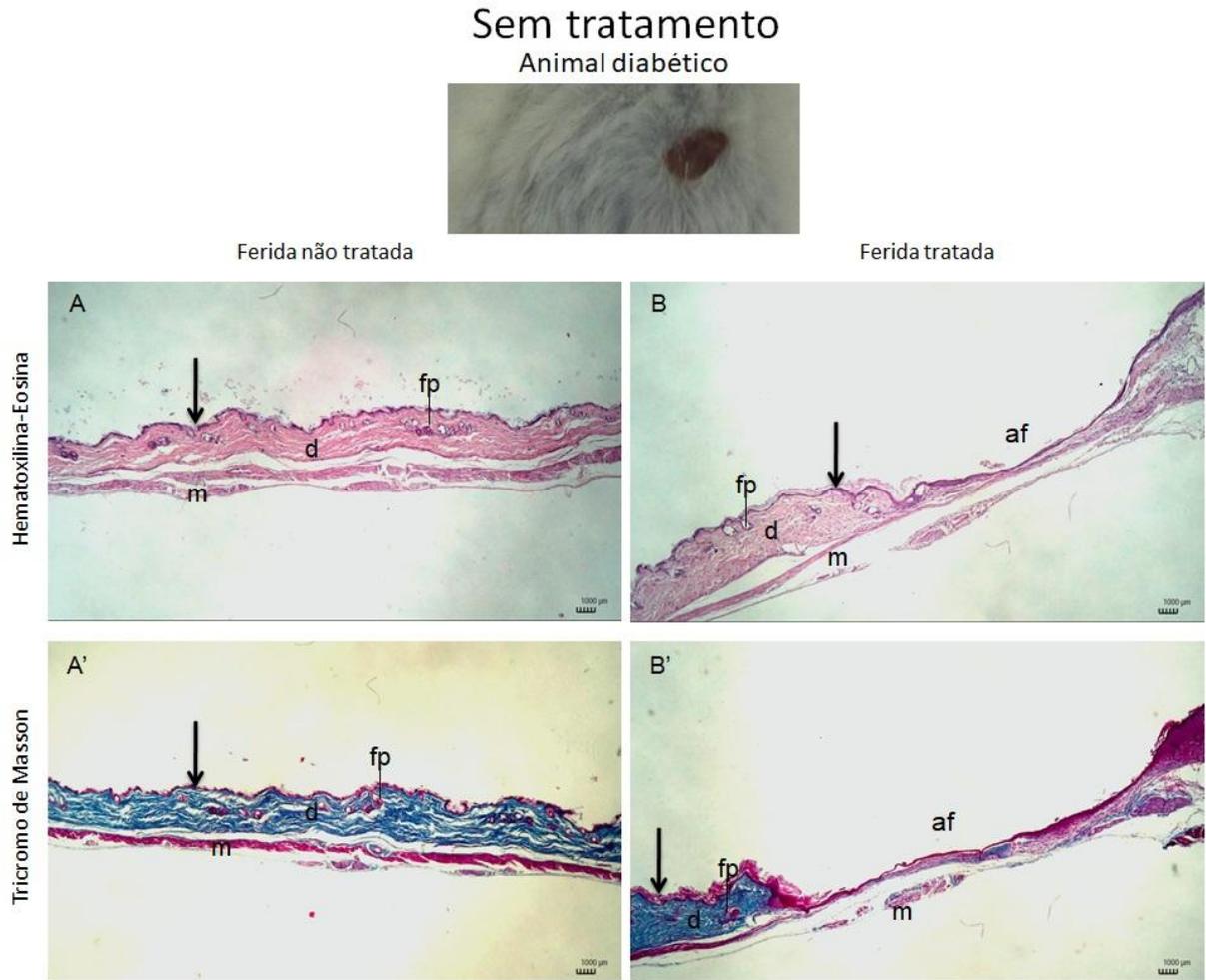


Figura 4.13 – Aspecto macroscópico e histológico de animais (camundongos Balb/c) diabéticos, não tratados com fatores peptídicos de crescimento e diferenciação. Foi provocada uma lesão, com a ajuda de um *punch* de biópsia no animal. Em todos os animais desse grupo, a lesão não recebeu tratamento algum, para que fosse um controle da pele lesada. Os animais foram mantidos por nove dias após o tratamento, sendo o dia 1 considerado como o dia em que as lesões foram provocadas. Após esse período, os animais foram eutanasiados, as lesões foram fotografadas e coletadas para fixação e inclusão em parafina. A pele ao lado da ferida não tratada também foi coletada para ser utilizada como controle da histologia da pele não lesada. Cortes histológicos (de 5 μ m de espessura) foram obtidos a partir dos blocos de parafina com o auxílio de um micrótomo. Esses cortes foram colocados em lâminas para posterior coloração com Hemaossilina-Eosina e Tricômio de Masson. Pele diabética controle corada com Hematoxilina-Eosina (1-A) e Tricômio de Masson (1-A') exibindo a epiderme (seta), derme (d), folículo piloso (fp) e músculo (m). Pele diabética com ferida sem tratamento, corada com Hematoxilina-Eosina (2-B) e Tricômio de Masson (2-B') mostrando a área da ferida (af). Aumento 10X. Tamanho da barra = 500 μ M.

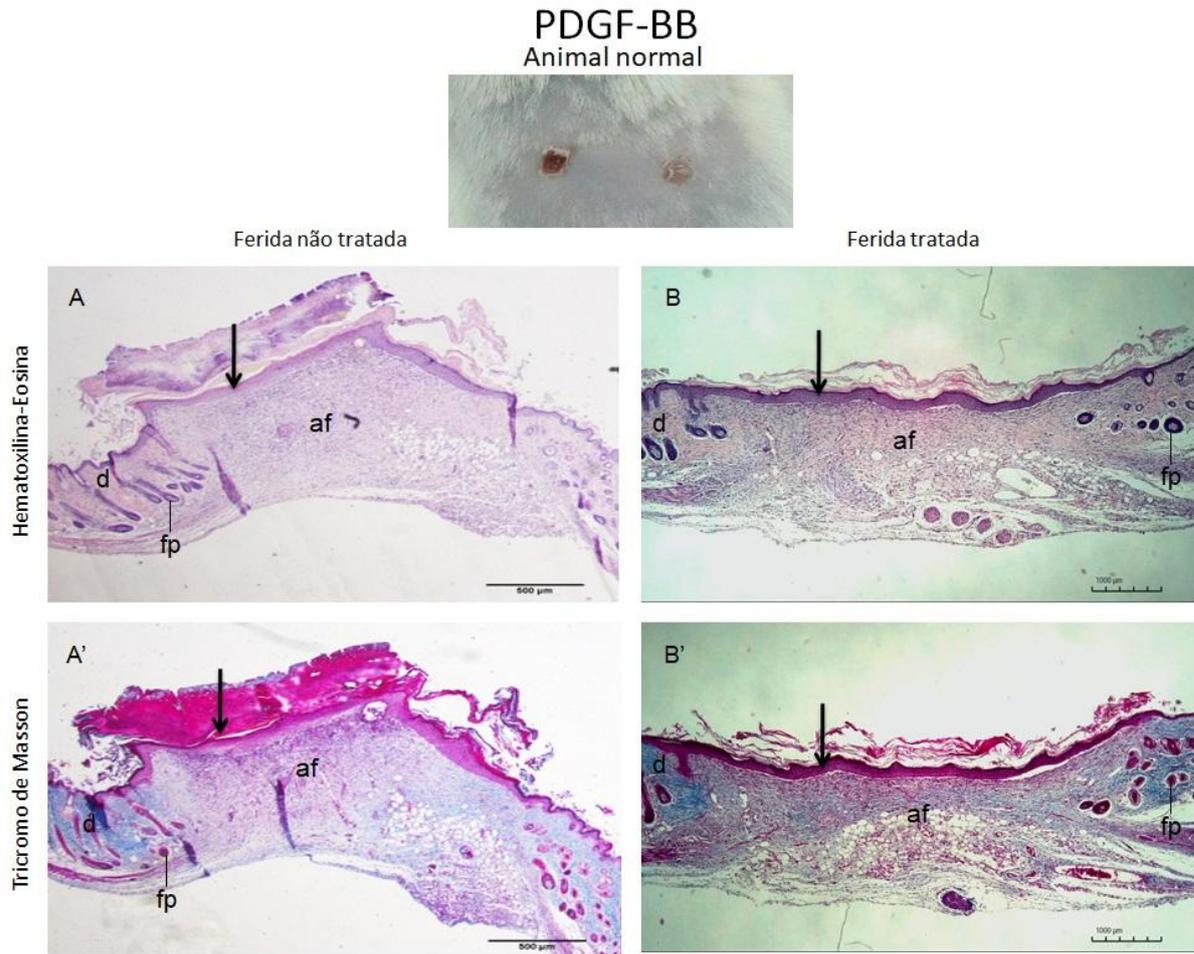


Figura 4.14 – Efeito da proteína rhPDGF-BB em animais (camundongos Balb/c), normais (não diabético). Em cada animal, duas lesões foram provocadas, com a ajuda de um *punch* de biópsia. Em todos os animais desse grupo, a lesão da direita recebeu o tratamento com a proteína rhPDGF-BB enquanto a lesão da esquerda recebeu apenas a solução tampão de purificação (20mM Tris-Cl + 400mM NaCl). Os animais foram mantidos por nove dias após o tratamento, sendo o dia 1 considerado como o dia em que as lesões foram provocadas. Após esse período, os animais foram eutanasiados, as lesões foram fotografadas e coletadas para fixação e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados com o auxílio de um micrótomo e os cortes (de 5µm de espessura) foram colocados em lâminas para posterior coloração com Hemaossilina-Eosina e Tricômio de Masson. Pele de animal normal controle, ferida tratada com solução tampão corada com Hematoxilina-Eosina (1-A) e Tricrômio de Masson (1-A') exibindo a epiderme (seta), derme (d), folículo piloso (fp) e área da ferida (af). Pele normal com ferida tratada com 5ug de rhPDGF-BB, corada com Hematoxilina-Eosina (2-B) e Tricrômio de Masson (2-B') mostrando área da ferida (af). Aumento 10X. Tamanho da barra = 500µM.

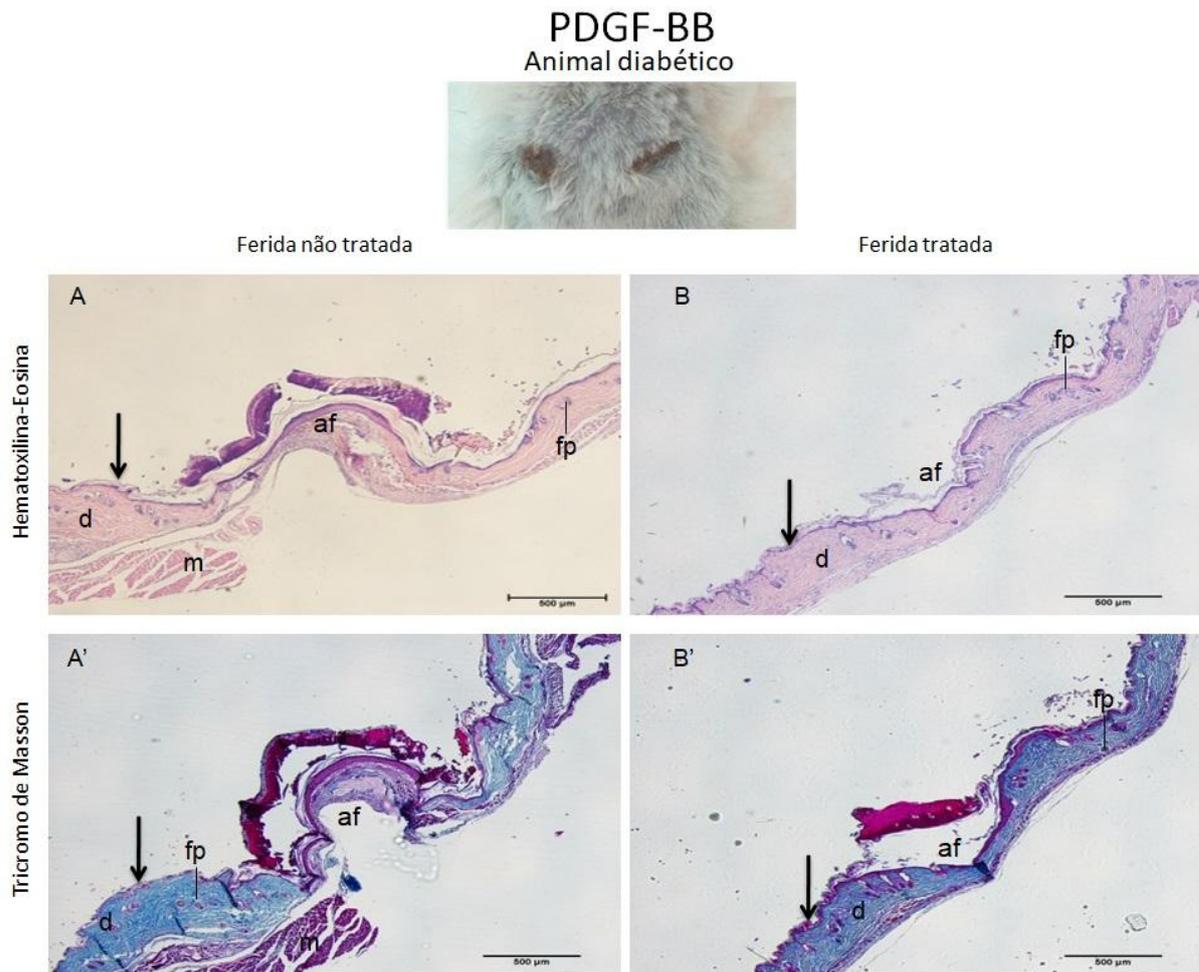


Figura 4.15 – Efeito da proteína rhPDGF-BB em animais (camundongos Balb/c), diabéticos. Em cada animal, duas lesões as foram provocadas, com a ajuda de um *punch* de biópsia. Em todos os animais desse grupo, a lesão da direita recebeu o tratamento com a proteína rhPDGF-BB enquanto a lesão da esquerda recebeu apenas a solução tampão de purificação (20mM Tris-Cl + 400mM NaCl). Os animais foram mantidos por nove dias após o tratamento, sendo o dia 1 considerado como o dia em que as lesões foram provocadas. Após esse período, os animais foram eutanasiados, as lesões foram fotografadas e coletadas para fixação e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados com o auxílio de um micrótomo e os cortes (de 5µm de espessura) foram colocados em lâminas para posterior coloração com Hemaóxilina-Eosina e Tricômio de Masson. Pele de animal diabético, ferida tratada com solução tampão corada com Hematoxilina-Eosina (1-A) e Tricrômio de Masson (1-A') exibindo a epiderme (seta), derme (d), folículo piloso (fp) e área da ferida (af). Pele normal com ferida tratada com 5ug de rhPDGF-BB, corada com Hematoxilina-Eosina (2-B) e Tricrômio de Masson (2-B') mostrando área da ferida (af). Aumento 10X. Tamanho da barra = 500µM.

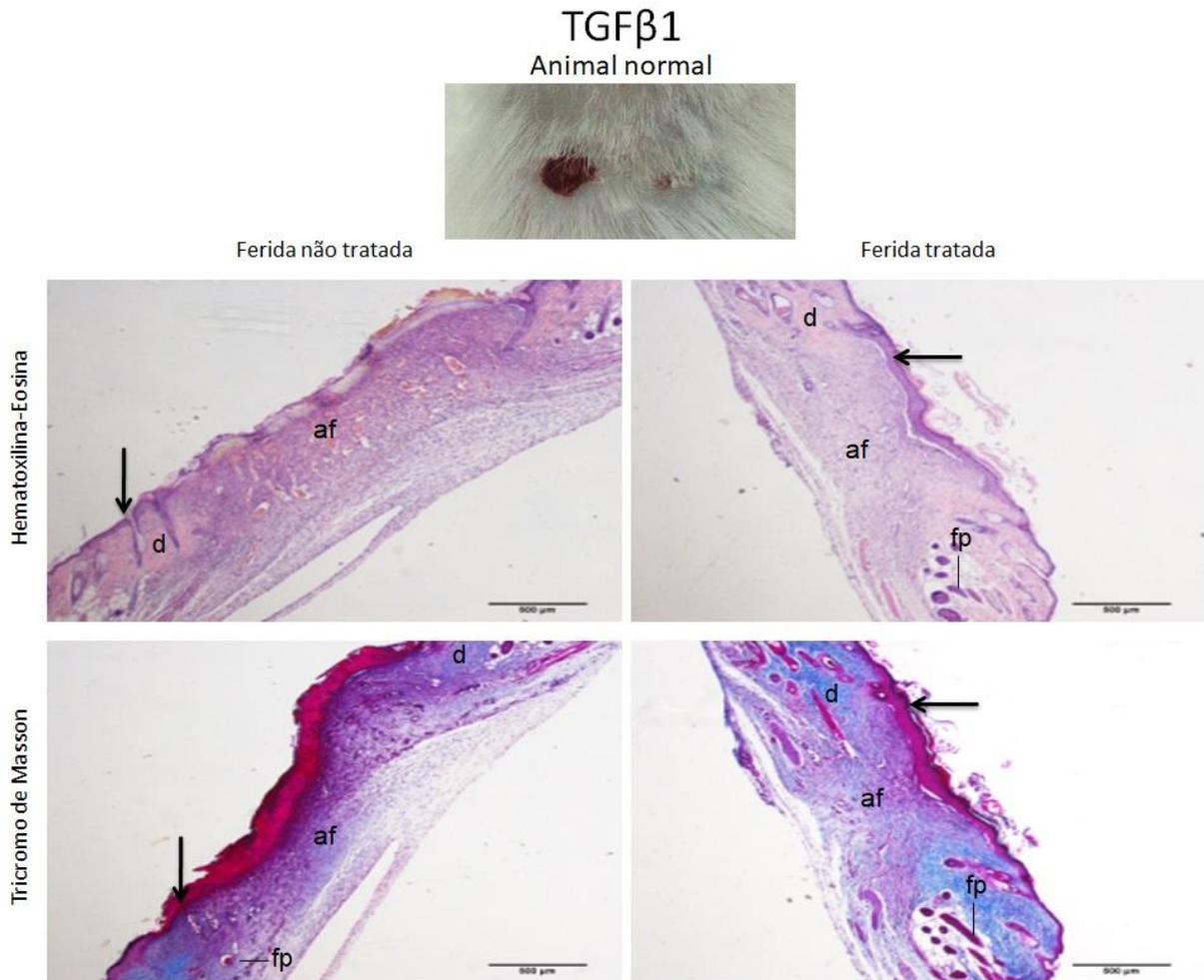


Figura 4.16 – Efeito de rhTGF-β1 em lesões provocadas em animais (camundongos Balb/c) normais (não diabéticos). Em cada animal, foram feitas duas lesões, com a ajuda de um *punch* de biópsia. Em todos os animais desse grupo, a lesão do lado direito recebeu o tratamento com a proteína rhTGF-β1, enquanto a lesão do lado esquerdo recebeu meio α-MEM condicionado por células CHO DG44 não-produtoras de TGF-β1. Os animais foram mantidos por nove dias após o tratamento, sendo o dia 1 considerado como o dia em que as lesões foram provocadas. Após esse período, os animais foram eutanasiados, as feridas foram fotografadas e coletadas para fixação e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados com o auxílio de um micrótomo e os cortes (de 5μm de espessura) foram colocados em lâminas para posterior coloração com Hemaossilina-Eosina e Tricômio de Masson. Pele de animal normal controle, ferida tratada com meio α-MEM condicionado por células CHO DG44 não-produtoras de TGF-β1 corada com Hematoxilina-Eosina (1-A) e Tricômio de Masson (1-A') exibindo a epiderme (seta), derme (d), folículo piloso (fp) e área da ferida (af). Pele de animal normal com ferida tratada com 5ug de rhTGF-β1, corada com Hematoxilina-Eosina (2-B) e Tricômio de Masson (2-B') mostrando a área da ferida (af). Aumento 10X. Tamanho da barra = 500μM.

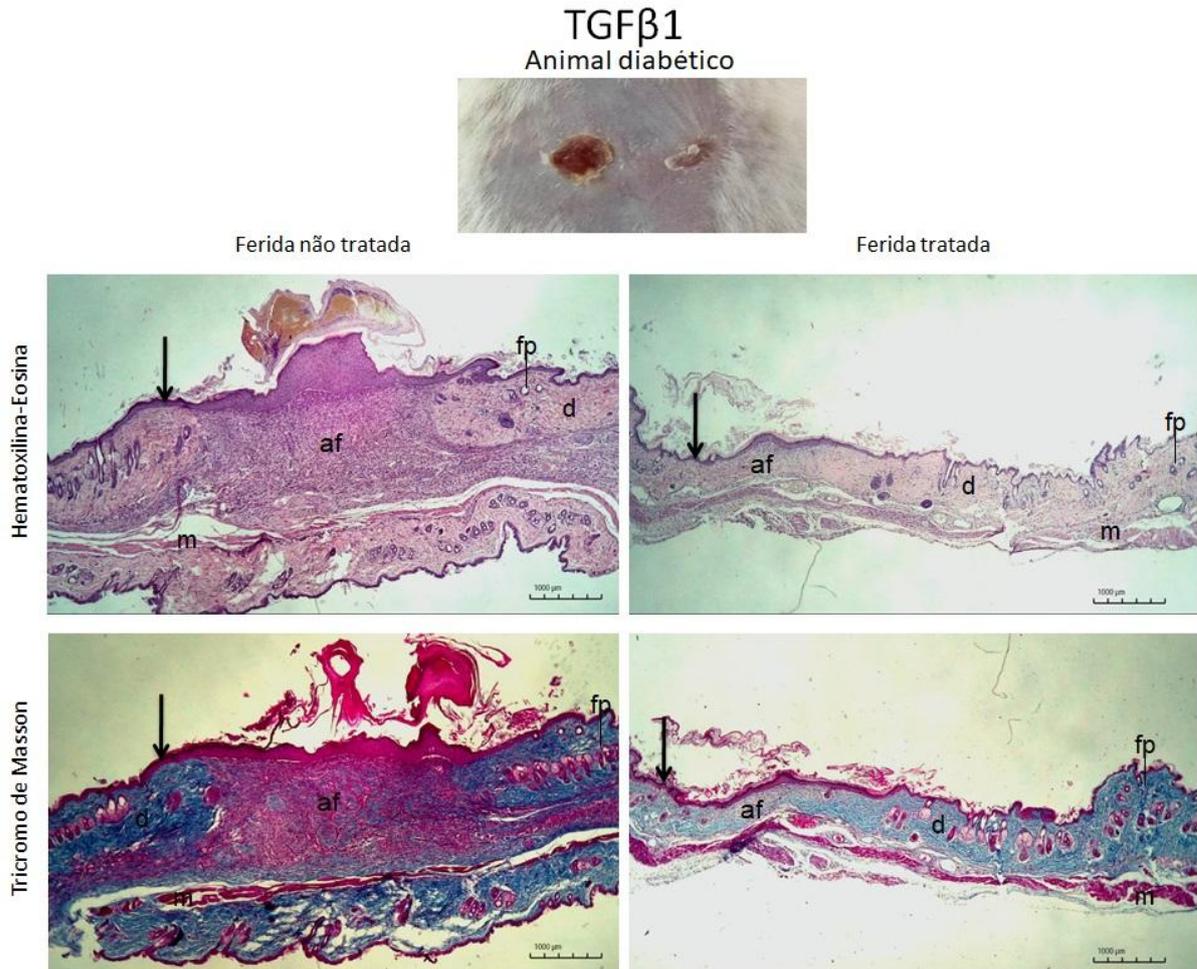


Figura 4.17 – Efeito de rhTGF-β1 em lesões provocadas em animais (camundongos Balb/c) diabéticos. Em cada animal, foram feitas duas lesões, com a ajuda de um *punch* de biópsia. Em todos os animais desse grupo, a lesão do lado direito recebeu o tratamento com a proteína rhTGF-β1, enquanto a lesão do lado esquerdo recebeu meio α-MEM condicionado por células CHO DG44 não-produtoras de TGF-β1. Os animais foram mantidos por nove dias após o tratamento, sendo o dia 1 considerado como o dia em que as lesões foram provocadas. Após esse período, os animais foram eutanasiados, as feridas foram fotografadas e coletadas para fixação e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados com o auxílio de um micrótomo e os cortes (de 5μm de espessura) foram colocados em lâminas para posterior coloração com Hemaossilina-Eosina e Tricômio de Masson. Pele de animal diabético, ferida tratada com meio α-MEM condicionado por células CHO DG44 não-produtoras de TGF-β1 corada com Hematoxilina-Eosina (1-A) e Tricrômio de Masson (1-A') exibindo a epiderme (seta), derme (d), folículo piloso (fp) e área da ferida (af). Pele de animal diabético com ferida tratada com 5ug de rhTGF-β1, corada com Hematoxilina-Eosina (2-B) e Tricrômio de Masson (2-B') mostrando a área da ferida (af). Aumento 10X. Tamanho da barra = 500μM.

4.7. Purificação parcial da proteína TGF-β1

A purificação parcial da proteína produzida foi realizada levando em consideração uma característica presente em todas as proteínas da família TGF-β, um domínio de ligação à heparina. Para tanto, utilizamos uma estratégia de purificação por afinidade, com uma coluna de heparina, como descrito no item 3.18. A proteína foi eluída após a lavagem da

coluna com um gradiente salino. O cromatograma resultante desse experimento encontra-se abaixo:

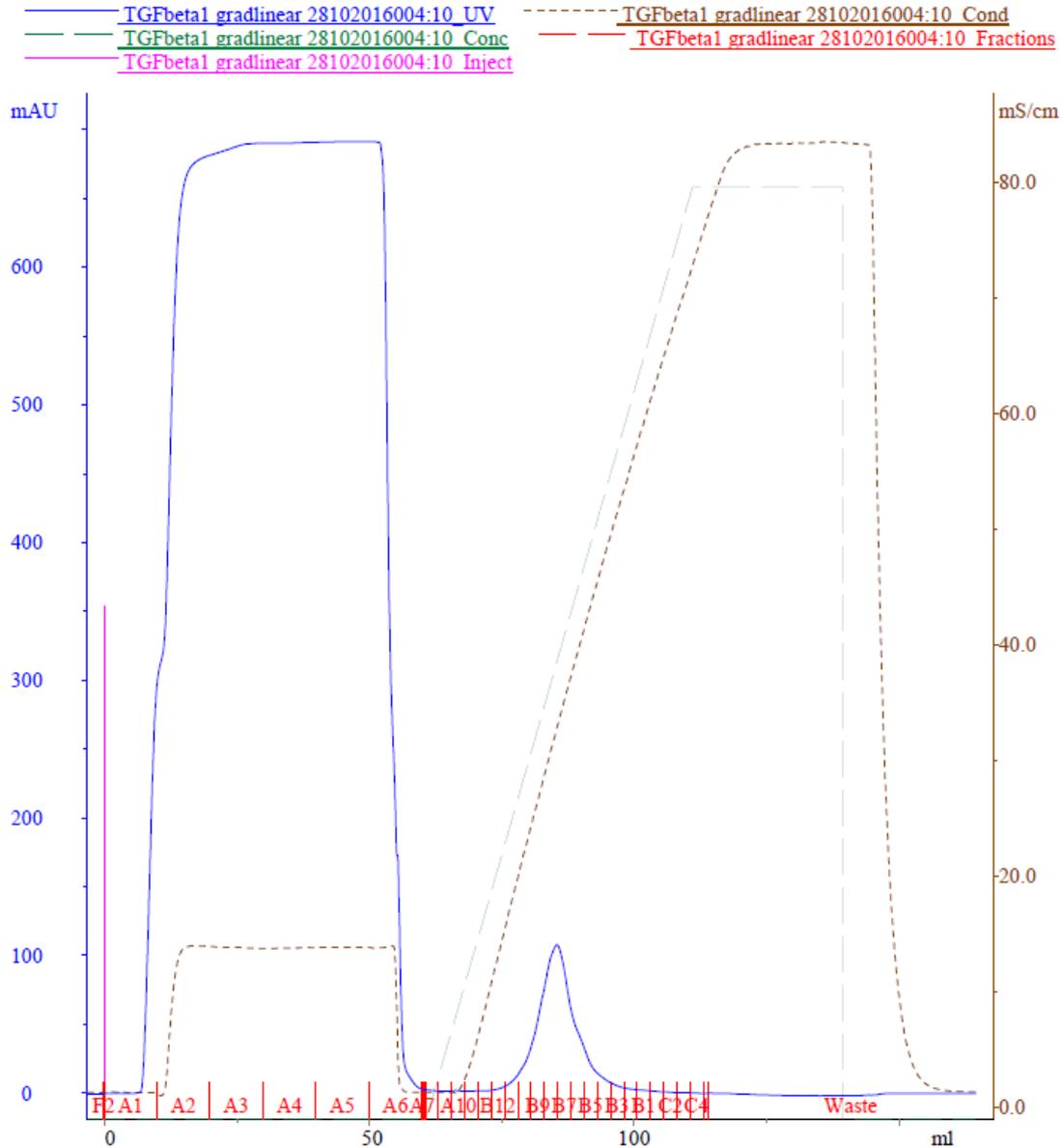


Figura 4.18 – Cromatograma resultante do processo de purificação de rhTGF- β 1 com a coluna HiTrap™ Heparin HP. O eixo da abscissa representa as frações eluídas na cromatografia e o eixo da ordenada, a absorvância, à 280nm, dessas frações (em mAU). A condutividade do sal (em mS/cm) utilizado na eluição, o NaCl, é representada pela linha pontilhada marrom.

Após o processo cromatográfico, as frações resultantes foram coletadas e processadas para confirmar da presença da proteína e seu tamanho por meio de dot e western blots e para a sua quantificação por ELISA específico. Um outro gel SDS-PAGE,

com amostras semelhantes às aplicadas para o experimento de western blot, foi gerado e corado com *Coomassie Brilliant Blue*, para checar a pureza das amostras. Um gráfico representativo foi gerado, com as quantidades de rhTG- β 1 liberadas a cada fração e no meio condicionado injetado, inicialmente, na coluna cromatográfica. Os resultados dessas análises estão representados abaixo, na figura 4.16.

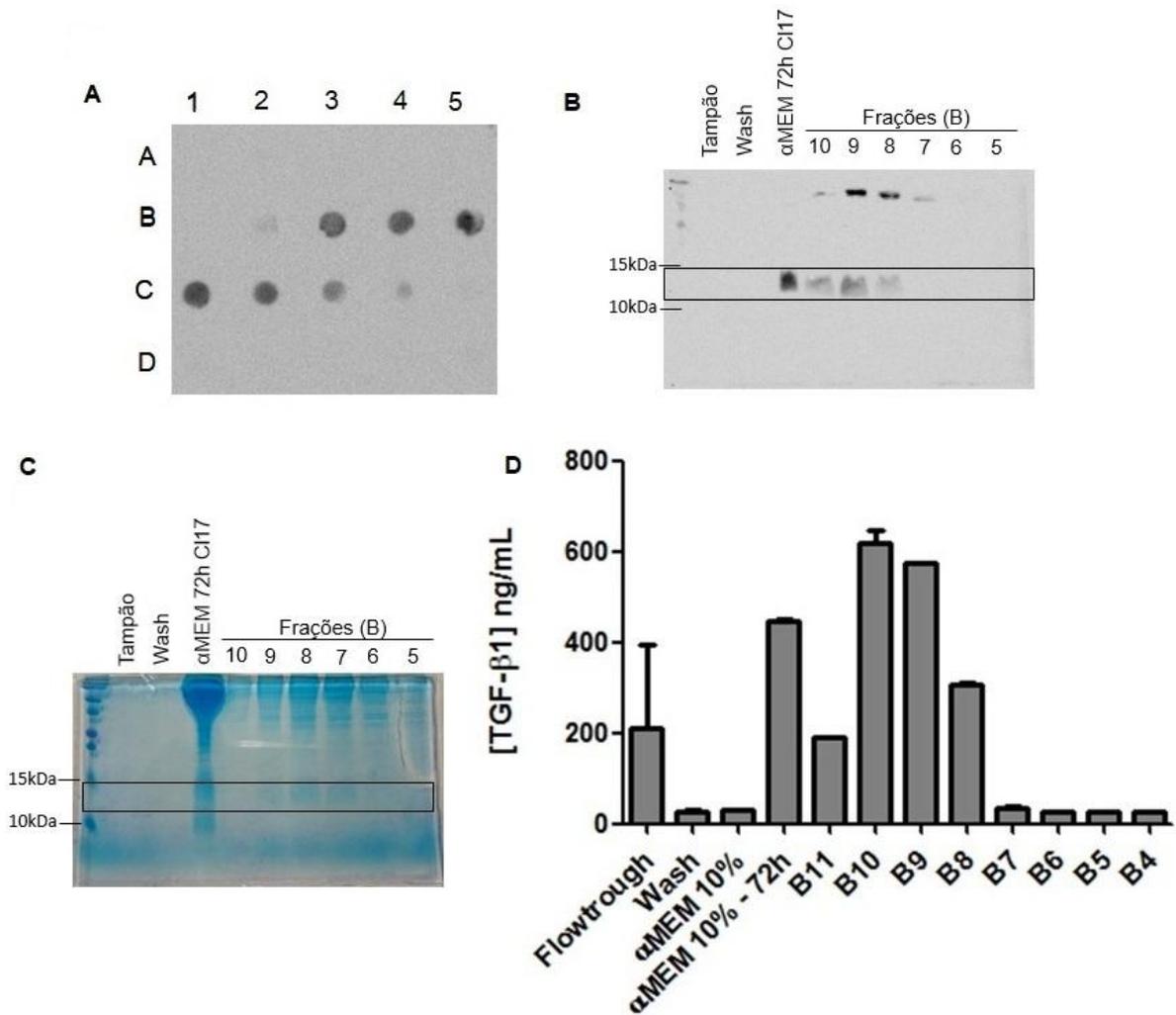


Figura 4.19 – Experimentos pós cromatografia para confirmar a presença da proteína rhTGF- β 1 nas frações eluídas das diferentes etapas do processo cromatográfico bem como a sua quantificação. Os eluatos obtidos na purificação de rhTGF- β 1 através do sistema de HPLC foram utilizados para experimento de dot blot (A) e aplicados em géis de poliacrilamida e submetidos a fracionamento em géis SDS-PAGE, como descrito no item 3.14.2. Esses foram, então, corados com Coomassie Brilliant Blue (C) ou tiveram as proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose para experimentos de western blot (B). Padrão de massa molecular: BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder. kDa: quilodaltons. Os eluatos também foram avaliados quanto à quantidade de rhTGF- β 1 presente por meio de um ELISA específico (C), que é representada no gráfico em ng/mL de cada fração coletada. Para o experimento de dot blot foram aplicados à membrana de nitrocelulose 20 amostras, do poço A1 até D5 em ordem: tampão de eluição utilizado na purificação; flowthrough; wash (correspondente à fração A7); frações A9 e A10; frações A11 e A12; frações de

B12 até B2; frações B1 e C1; frações C2 e C3; frações C4 e C5 e o meio condicionado utilizado na purificação, α MEM 72h – Clone 17.

As análises dos resultados obtidos nessa primeira purificação indicaram que as proteínas estavam se agregando. Esse fato nos levou a preparar mais um experimento de purificação, dessa vez, adicionando, ao tampão de eluição, 6M de Ureia, um agente caotrópico. O cromatograma desse experimento encontra-se abaixo:

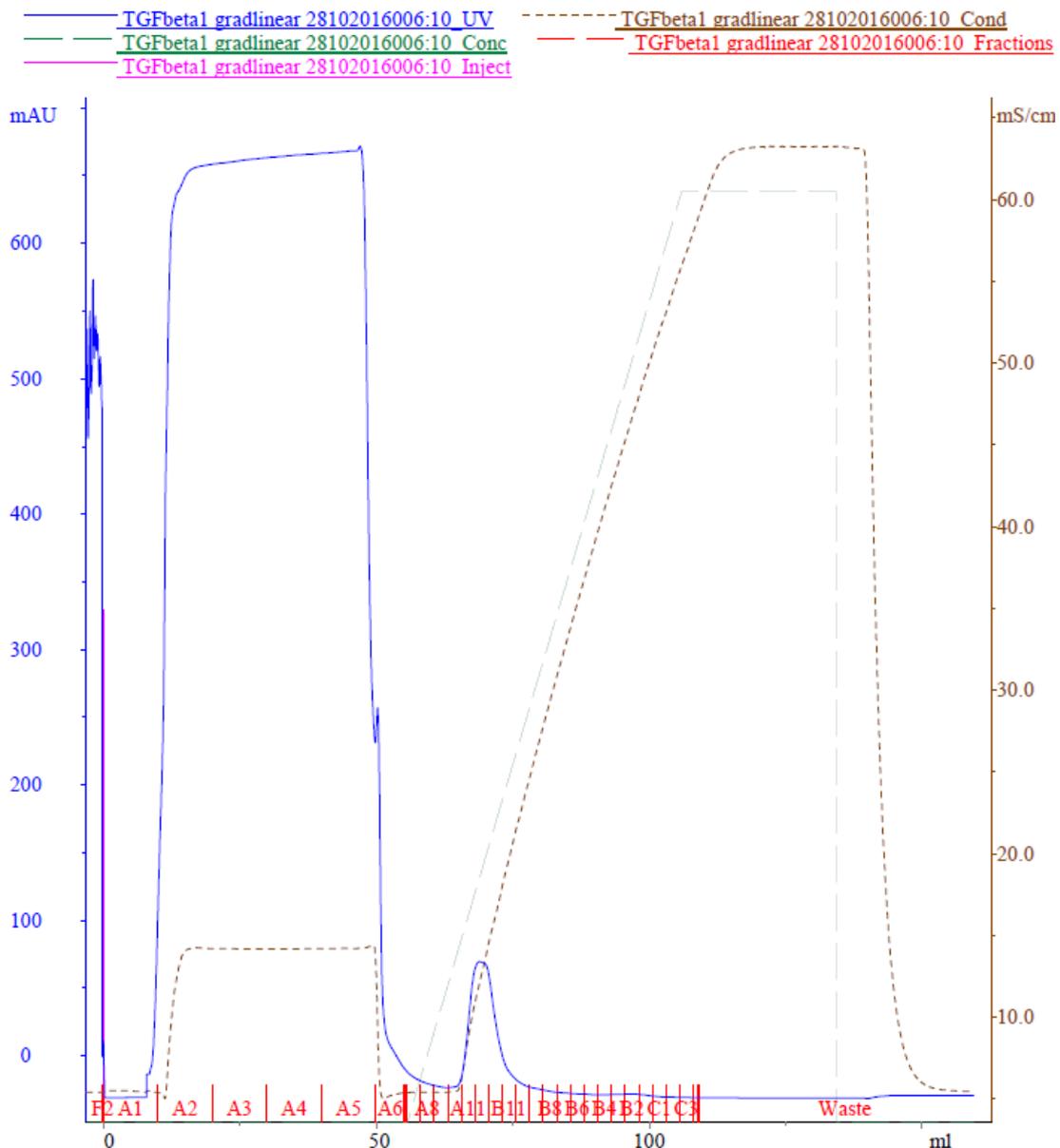


Figura 4.20 – Cromatograma resultante do segundo processo de purificação de rhTGF- β 1 com a coluna HiTrapTM Heparin HP e adição de 6M de ureia ao tampão de eluição. O eixo das abscissas representa as frações eluídas na cromatografia e o eixo das ordenadas, a absorbância, a 280nm, dessas frações (em mAU). A condutividade do sal (em mS/cm) utilizado na eluição, o NaCl, é representada pela linha pontilhada marrom.

Após esse segundo processo cromatográfico as frações resultantes foram novamente coletadas e processadas para confirmar da presença da proteína nos eluatos por meio de dot e para a sua quantificação por ELISA específico.

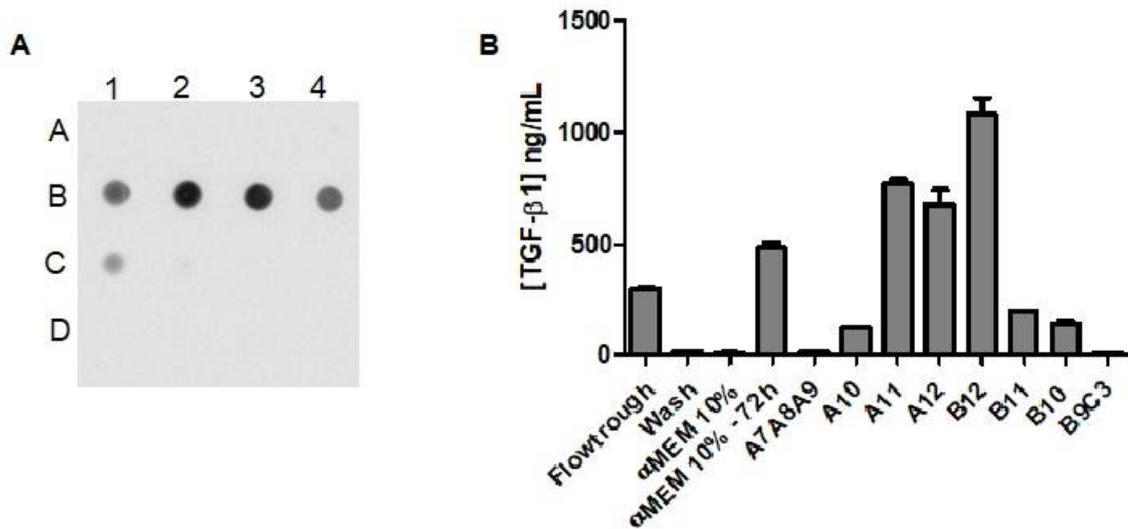


Figura 4.21 – Experimentos feitos após a segunda cromatografia para confirmar a presença da proteína rhTGF-β1 nas frações eluídas das diferentes etapas do processo cromatográfico bem como a sua quantificação. Os eluatos obtidos na purificação de rhTGF-β1 através do sistema de HPLC foram utilizados para experimento de dot blot (A). Foram aplicados à membrana de nitrocelulose 14 amostras, do poço A1 até D2 em ordem: tampão de eluição utilizado na purificação; flowthrough; wash (correspondente à fração A7); frações de A11 até B10; frações B9 até B6 (em um único poço); frações B5 até B3 (em um único poço); frações C1 até C3 (em um único poço) e o meio condicionado utilizado na purificação, αMEM 72h – Clone 17. Os eluatos também foram avaliados quanto a quantidade de rhTGF-β1 presente por meio de um ELISA específico (C), que é representada no gráfico em ng/mL de cada fração coletada.

5. DISCUSSÃO

Os tecidos do corpo sofrem lesões constantemente, lesões essas que causam a destruição de componentes extracelulares, morte de células, perda da integridade de vasos sanguíneos, dentre outros. Mas, esse processo de injúria também é responsável pelo desencadeamento de uma cascata de eventos que culminam na promoção da regeneração e no reparo tecidual (MARTIN; LEIBOVICH, 2005). Esses eventos envolvem uma série de mecanismos, que se sobrepõem ao longo do processo de regeneração, sendo regulados pela ação equilibrada de fatores de crescimento, citocinas e proteases, os quais levam à migração, proliferação e diferenciação das células envolvidas, bem como à formação de uma nova matriz extracelular (TAKEO; LEE; ITO, 2015). Entretanto, em alguns casos, esse processo é prejudicado, não ocorrendo de maneira coordenada e bem definida, aumentando, consideravelmente, a duração da fase inflamatória, o que prejudica a restauração da anatomia e da integridade funcional desse tecido ou órgão. Nesse caso, a ferida é denominada como sendo crônica. Apesar do exato mecanismo que leva à patogênese e o surgimento dessas feridas ainda não estar completamente esclarecido, fatores fisiopatológicos de risco, como a hipóxia, alteração do pH e infecções bacterianas, são bem conhecidos (SCHREML et al., 2010). O Diabetes Mellitus (DM) pode levar a problemas na cicatrização (escaras, úlceras de difícil cicatrização e o chamado pé diabético), afetando um ou mais mecanismos biológicos desse processo. Esse dano pode ser desencadeado por inúmeros fatores, dentre os quais os mais comuns são a hiperglicemia, inflamações crônicas, disfunções macro- e microcirculatórias, hipóxia e sinalização neuropeptídica prejudicada (BALTZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014).

O aumento da incidência de DM e da obesidade na população, juntamente com seu crescente envelhecimento, são fatores prejudiciais à regeneração, levando à necessidade do desenvolvimento de terapias específicas para a Regeneração Tecidual (SEN et al., 2009). A maior parte dos medicamentos desenvolvidos para esse fim consistem na terapia com fatores peptídicos de crescimento e diferenciação celular, que cresceu 3,4% no

mercado global em 2013, estimando-se que deverá crescer ainda mais, a uma taxa superior a 25% até o ano de 2021. Alguns medicamentos, ainda em fase de desenvolvimento, têm como princípio ativo fatores peptídicos como: PDGF-BB (*Platelet-Derived Groth Factor*) - *BioChaperone PDGF-BB*, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor* - Fator de crescimento vascular endotelial) - *Amnion-derived Cellular Cytokine Solution*, HGF (*Hepatocyte Growth Factor* - Fator de crescimento do hepatócito) - *ChronSeal*. Além desses, muitos outros fatores tem sido utilizados, com uma enorme variedade de indicações e, em sua maioria, de uso tópico, visando à melhoria no tempo de reparo e no reparo em si (ZIELINS et al., 2015).

Visando esse mercado em ascensão, nosso grupo possui uma sólida linha de pesquisa na produção de proteínas recombinantes (COLIN et al., 2008), muitas das quais são fatores peptídicos de crescimento/diferenciação, de interesse terapêutico e biotecnológico para uso na Terapia Molecular de doenças humanas e de animais e na Engenharia de Tecidos moles e ósseos. Utilizando diferentes sistemas de expressão heteróloga (bactérias, baculovírus/células de inseto (BEVS) e células de mamíferos) já foram produzidos rhFGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2* – Fator de crescimento do Fibroblasto 2), rhPDGF-BB, rhVEGF, rhBMPs (*Bone Morphogenetic Proteins* – Proteínas morfogenéticas de osso) e rhTGF- β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*) ou estão em fase de produção, como é o caso do rhTGF- β 3. Estes fatores peptídicos são essenciais no reparo de tecidos moles, com exceção das BMPs, encontradas apenas no processo regenerativo de ossos, podendo ser combinados em um único coquetel a ser aplicado em feridas crônicas, facilitando e diminuindo o tempo do fechamento das mesmas. Assim, a produção da proteína de interesse para o presente trabalho (rhTGF- β 1), pode fazer parte de um projeto maior de combinação desses fatores, na forma de um coquetel, para uma terapia de Regeneração Tecidual guiada, sendo utilizado como biofármaco.

A sequência codificadora completa da proteína TGF- β 1 foi obtida no Banco de Dados de nucleotídeos do NCBI, para o correto desenho do par de *primers* a ser utilizado na reação de amplificação por PCR. Os *primers* foram desenhados de forma a conter os sítios de restrição desejados (5'-*EcoRI* e 3'-*NheI*) em suas extremidades e acrescentar a

sequência de Kozak. A região amplificada contém sítios do peptídeo sinal, do TGF- β 1 maduro, a parte do peptídeo que vai, efetivamente, se ligar aos receptores de membrana, gerando a cascata de sinais, e a região do peptídeo associado à latência (LAP – *latency-associated peptide*). O peptídeo sinal é responsável pelo endereçamento da proteína para o retículo endoplasmático, onde é clivado, já o LAP é essencial para a manutenção da latência da proteína no meio extracelular. Essa associação da proteína madura ao LAP é chamada Complexo Pequeno de Latência (SLC – *Small Latency Complex*) (WILBERS et al., 2016). Além disso, a presença do LAP, também chamado de pró-região, facilita o dobramento correto do peptídeo maduro e a secreção do complexo pequeno de latência (FAIRLIE et al., 2001).

A escolha do vetor de expressão (pNU1) se deu pelo fato da presença, nesse vetor, de alguns elementos importantes para a expressão da proteína de interesse e para facilitar a seleção de células transfectadas com a construção pNU1/TGF- β 1, facilitando a geração de clones superprodutores. A funcionalidade desses elementos é explorada em momentos diferentes da geração dos clones. Na etapa de transformação de bactérias com a construção pNU1/TGF- β 1, a presença de uma sequência AmpR, com replicação independente associada à presença de uma sequência Ori – origem de replicação, confere resistência ao antibiótico ampicilina, sendo importante para a seleção daquelas bactérias que receberam o vetor. Há, também, uma sequência interna de ligação do ribossomo, IRES, situado à frente do cDNA da enzima DHFR, permitindo a expressão concomitante do cDNA de interesse (rhTGF- β 1), com o cDNA de seleção (DHFR) em um RNA bicistrônico. Ambos os cDNAs estão sob controle do promotor híbrido CAG, que combina um elemento *enhancer* de citomegalovírus (CMV) e o promotor da beta-actina de galinha. A utilização de promotores fortes como o de CMV, utilizado para construir o vetor de expressão pNU1, já foi descrita como estratégia promissora para aumentar os níveis de transcrição do RNA mensageiro (DEER; ALLISON, 2004).

A enzima diidrofolato redutase (DHFR) catalisa a redução de diidrofolato a tetraidrofolato e, em níveis menos significativos, de ácido fólico a diidrofolato. Estes

subprodutos são vitais para as células, participando de diferentes vias biossintéticas, incluindo a síntese de purinas (CARIO et al., 2011). As células CHO DG44, utilizadas no presente trabalho, para a expressão de TGF- β 1, são deficientes para a produção de DHFR, o que possibilita a seleção de clones produtores por meio de um sistema de complementação gênica, uma vez que a sequência codificadora de DHFR se encontra no vetor pNU1. Na ausência dessa enzima, essas células não são capazes de sobreviver quando mantidas em meios sem nucleosídeos, como aquele utilizado para a manutenção das populações transfectadas com a construção pNU1/TGF- β 1, conforme descrito no item 3.9. O MTX é um inibidor competitivo da enzima DHFR, diminuindo os níveis dos principais doadores de grupos metil durante a síntese de timidilato e, como consequência, de purinas. Essa inibição causa, portanto, danos na síntese e no reparo do DNA, bem como na replicação celular (CHIBBER et al., 2011). Assim, na presença de MTX, crescem apenas aquelas células que possuem essa construção, com a sequência gênica correspondente à enzima DHFR. Como o cassete de expressão de *dhfr* e do sítio múltiplo de clonagem (MCS) do vetor, onde se encontra a sequência de TGF- β 1, estão sob o controle transcricional do mesmo promotor, o produto de interesse, clonado no MCS, é expresso na mesma proporção, quando comparado à *dhfr*. Além de selecionar células com maior número de cópias do cassete de expressão, o tratamento com concentrações crescentes de MTX pode promover a amplificação gênica desse vetor, o que potencializa o processo de seleção daquelas células produtoras de maiores quantidades de DHFR e, conseqüentemente, da proteína TGF- β 1 de interesse (LUCAS et al., 1996).

As células de mamíferos, como a CHO DG44, são capazes de sintetizar proteínas com grande similaridade às aquelas produzidas em humanos no que diz respeito a propriedades bioquímicas e estruturas moleculares. Por esse motivo, em 2011, já eram mais de 50% as proteínas terapêuticas recombinantes aprovadas e distribuídas no mercado, produzidas através da utilização de células de mamíferos como plataforma de expressão (ZHU, 2012). Além disso, o uso de marcadores seletivos como a enzima DHFR, por meio da estratégia de complementação gênica, tem sido explorado para maior eficiência e rapidez na

obtenção de proteínas terapêuticas (CACCIATORE; CHASIN; LEONARD, 2010). Nesse cenário, a células de ovário de hamster chinês (CHO - Chinese hamster ovary) são amplamente utilizadas para a obtenção de proteínas recombinantes por apresentarem uma série de vantagens. Ao longo de décadas, essa linhagem celular tem se mostrado um hospedeiro seguro para a produção de biofármacos, o que facilita a aprovação desses produtos pelos órgãos regulatórios, para sua liberação ao mercado. As células CHO também são capazes de adicionar, eficientemente, modificações pós traducionais, como glicosilação, nas proteínas produzidas, o que as torna mais compatíveis com aquelas produzidas naturalmente, bem como mais ativas biologicamente. Apesar de todas as vantagens, as células de mamíferos são conhecidas pela baixa capacidade de produção das proteínas de interesse, o que, no caso da CHO, pode, facilmente, ser contornada pela utilização da estratégia de complementação gênica já esclarecida (KIM; KIM; LEE, 2012). Assim, tendo em vista as vantagens citadas, as células utilizadas no presente trabalho, CHO DG44, são modificadas, em relação à linhagem parental CHO, por não apresentarem o gene *dhfr* funcional, foram escolhidas para se alcançar maiores níveis de produção da proteína rhTGF- β 1. É importante ressaltar, também, a importante escolha de utilização do vetor de expressão pNU1, construído pelo nosso grupo, já que esse complementa a escolha do hospedeiro selecionado, além de adicionar vantagens extras para o sucesso da produção.

As populações mistas resistentes às doses crescentes do quimioterápico MTX foram testadas quanto ao seu nível de produção de rhTGF- β 1 através de um ELISA específico para essa proteína. Através dessa análise, foram selecionadas duas famílias, denominadas B e C, de populações mistas com maiores níveis de expressão. Dentre essas famílias, as populações mistas submetidas às concentrações de 1.000 e 500nM de MTX, das famílias B e C respectivamente, se mostraram mais produtoras, atingindo níveis de 1,54 μ g/mL para a população da família B e 1,35 μ g/mL para a da família C. Essas populações, utilizadas então para a seleção de clones superprodutores, foram, antes do início do processo, submetidas à retirada da pressão seletiva imposta pelo metotrexato. A partir desse momento, foi observada uma diminuição de aproximadamente 6 e 2,3 vezes no nível de produção das

populações de B e C, respectivamente. Logo, a família B, que teve maiores quedas na produção, não foi, por esse motivo, utilizada para seguir com os experimentos. Essa diminuição, deve-se, provavelmente, ao fato de que nem todos os cassetes de expressão se integraram na célula hospedeira de forma estável. Apesar disso, a produção dos clones superprodutores gerados superou esses valores, o que pode ser explicado pelo fato de que a produção das populações mistas é considerada uma média da produção de cada clone pertencente à essa população. Dos cinco clones escolhidos para seguir com os experimentos, ou seja, os clones 6, 7, 8, 14 e 17, o mais produtor atingiu uma concentração de 2,28mg/L da proteína de interesse. Essa concentração final mostrou-se semelhante a alguns resultados encontrados na literatura para a produção dessa mesma proteína em sistemas semelhantes de expressão. Níveis de rendimento variando entre menos de 1,0mg/L, em produções que utilizaram o cDNA de TGF- β 1 sem qualquer alteração, até 30mg/L, em sistemas de superexpressão, foram reportados (ZOU; SUN, 2004). Portanto, pode-se dizer que a produção da proteína de interesse obtida nesse trabalho, atingiu níveis compatíveis com aqueles previamente descritos, porém, essa produção ainda pode ser melhorada.

Avaliar a atividade biológica da proteína recombinante por meio de ensaios *in vitro* é um passo essencial para evitar o uso direto de animais de experimentação, evitando o desperdício de vidas. No caso do TGF- β 1, sabe-se que a proteína é responsável por causar, em células de carcinoma de pulmão A549, uma transição epitélio-mesênquima (LU et al., 2018). Nessa transição, ocorre a mudança nos níveis de expressão de algumas proteínas envolvidas no mecanismo de adesão célula-célula, duas das quais são E-caderina e N-caderina. Assim, os níveis de mRNA dessas duas proteínas foram medidos, por meio de RT-PCR em tempo real, após o tratamento com os meios condicionados pelos cinco clones selecionados, como descrito por Liu e colaboradores (LIU et al., 2013). Foi possível observar que a proteína produzida (rhTGF- β 1) possui atividade biológica, tendo sido capaz de induzir a transição epitélio-mesênquima nas células A549. Apesar das grandes barras de erro observadas no gráfico apresentado no item 4.5, consideramos que a proteína produzida

pelo clone 17, escolhido para seguir com o ensaio *in vivo*, demonstrou atividade biológica satisfatória, tendo sido escolhido por ser o clone que apresentava células com melhor morfologia, quando comparadas aos outros clones. Até aqui, os resultados obtidos indicam que a proteína foi produzida em níveis satisfatórios e que possui atividade biológica *in vitro*, sendo plausível sua utilização para teste *in vivo*.

Para avaliação da atividade biológica *in vivo*, foi utilizado um modelo de incisão em dorso de camundongos, como descrito em 3.19, sendo que as feridas foram provocadas tanto em camundongos sadios como diabetizados. Sabe-se que a cicatrização em indivíduos diabéticos é comprometida, sendo mais demorada do que em indivíduos sadios, motivo que nos levou à utilização de animais com essa condição para os testes de atividade biológica do TGF- β 1 produzido pelo clone 17. A proteína rhPDGF-BB foi utilizada como um controle positivo da regeneração, já que, como o TGF- β 1, já foi descrita como um fator de aceleração do fechamento das feridas (EVROVA; BUSCHMANN, 2017). Além disso, como foi produzida pelo nosso grupo, sua atividade biológica já havia sido comprovada em estudos anteriores. As imagens histológicas e macroscópicas das feridas dos camundongos utilizados nesse trabalho são demonstrativas, estando de acordo com os resultados obtidos para os outros animais de todos os grupos descritos para esse experimento. Pudemos observar, tanto nas imagens das feridas, quando na análise histológica, que houve uma melhora na cicatrização das feridas tratadas com rhTGF- β 1 e com rhPDGF-BB. Em ambos os casos, foi possível observar a formação de uma quantidade maior de tecido de granulação e uma maior presença de fibras colagênicas, demonstradas pela coloração com tricômio de masson, quando comparado às feridas não tratadas.

Para o grupo controle do experimento de atividade biológica de rhTGF- β 1 *in vivo*, foi realizada histologia da pele de camundongos normais e diabetizados bem como da ferida gerada não tratada, o que permitiu observar e descrever as estruturas que compõem a pele destes animais em condições normais e cicatrizadas ao final de 9 dias. Na figura 4.12 - A observa-se o tecido normal corado com Hematoxilina-Eosina destacando as camadas da pele como a epiderme (seta) camada mais superficial composta por tecido epitelial

estratificado queratinizado, logo abaixo apresenta-se a derme (d) que é composta de tecido conjuntivo onde se inserem os anexos da pele como folículos pilosos (fp) e, mais profundamente, ainda é possível observar a hipoderme (hd) camada composta por tecido adiposo e conectivo, seguida pela camada de músculo liso (m). Na figura 4.12 - A' observa-se a pele normal em coloração com Tricrômio de Masson onde se destaca o tecido conjuntivo da derme, tendo corado em azul, as fibras colágenas. Ao analisar a lesão na pele normal após 9 dias é possível identificar a área da ferida em processo de reparo (Figura 4.12 - B e B'), com alta deposição de fibroblastos (af), a epiderme (seta) e no tecido adjacente é possível observar as estruturas não lesadas como a derme (d) e folículos pilosos (fp). Quando comparado a um animal normal, o tecido não lesado do animal diabético (Figura 4.13 - A e A') apresentou as camadas e estruturas normais da pele, entretanto, ao analisar o tecido diabético lesado não tratado após 9 dias (Figura 4.13 - B e B'), foi possível observar a presença da epiderme e menor proliferação de fibroblastos na área lesada.

Ao analisar o grupo de animais normais que tiveram a lesão (direita) tratada com o fator de crescimento rhPDGF-BB (Figura 4.14 - B e B') macroscopicamente foi possível observar melhora na cicatrização, tanto quanto analisado a nível histológico. A ferida apresentou menor região reparada com a presença de fibroblastos e tecido adjacente não lesado com as estruturas bem definidas em comparação à lesão que foi tratada apenas com solução tampão (Figura 4.14 - A e A'). O mesmo ocorreu para os animais diabéticos que receberam tratamento com o fator de crescimento (Figura 4.15 B e B'). Após 9 dias, esses animais apresentaram feridas macroscopicamente menores e, microscopicamente, um tecido reparado com presença de fibroblastos na área lesada, e maior presença de colágeno marcado pela coloração de Tricrômio de Masson.

A análise do grupo de animais normais que tiveram a lesão (direita) tratada com o fator de crescimento rhTGF- β 1 (Figura 4.16 B e B') permitiu, macroscopicamente, que fosse possível observar uma maior e melhor cicatrização ao final de 9 dias. A nível histológico, esse resultado permaneceu, sendo observada uma menor região reparada com a presença

de fibroblastos e tecido adjacente não lesado com as estruturas bem definidas em comparação à lesão que foi tratada apenas com solução tampão (Figura 4.16 A e A'). O mesmo pode ser observado nos animais diabéticos tratados com o fator de crescimento (Figura 4.17 B e B'). Após 9 dias, o tratamento foi eficaz e os animais apresentaram, macroscopicamente, menor ferida e, microscopicamente, um tecido reparado com presença de fibroblastos na área e maior quantidade de colágeno marcado pela coloração de Tricrômio de Masson. Também, apresentou menor área de tecido cicatrizado quando comparado ao controle negativo (Figura 4.17 A e A').

Esses resultados corroboram a literatura (MUSTOE et al., 1991; PIERCE et al., 1992), que mostra a eficiência desses fatores em acelerar a cicatrização de feridas cutâneas. Dessa maneira, os testes *in vivo* confirmaram que a proteína rhTGF- β 1 produzida no presente trabalho possui atividade biológica *in vivo*, sendo capaz de acelerar a regeneração tecidual, tendo, portanto, grande potencial de uso como biofármaco na área de Regeneração Tecidual.

Os resultados obtidos com o primeiro protocolo de purificação estabelecido revelaram que as proteínas estavam se agregando ao passarem pela coluna cromatográfica. Podemos observar, na figura 4.19 B, que houve uma marcação, no western blot, de uma proteína com tamanho muito superior ao apresentado pelo monômero de rhTGF- β 1 marcado em todos os experimentos anteriores desse tipo. Além disso, a quantificação pelo ELISA não condiz com os resultados obtidos no experimento de dot blot com os eluatos provenientes da purificação. Além de uma concentração maior de proteínas ter sido encontrada nas frações quando comparadas ao meio utilizado para a purificação, as frações com maiores concentrações de rhTGF- β 1 detectadas pelo ELISA não condizem com o pico de absorvância apresentado no cromatograma gerado (Figura 4.18). Por esse motivo, resolvemos estabelecer um novo protocolo de purificação, utilizando um agente caotrópico, a ureia, com a intensão de que essas proteínas não mais formassem aglomerados, sendo possível sua correta quantificação. Ainda assim, a quantificação das proteínas presentes nas frações eluídas, assim como com o primeiro protocolo de purificação, apresentou

discrepâncias quanto ao valor inicial de concentração do meio inicialmente carregado na coluna cromatográfica. Bem como encontramos dados que não corroboravam com o resultado obtido no experimento de dot blot para essas frações. Esse, por sua vez, ia ao encontro dos resultados apresentados pelo cromatograma, tendo pontos com coloração mais forte compatíveis com o pico de absorvância gerado (Figuras 4.20 e 4.21). O gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue representado na figura 4.19 C mostra que a proteína não foi completamente purificada, apresentando quase a mesma quantidade de bandas proteicas nas frações eluídas quando comparadas ao que vemos na canaleta em que foi carregado o meio utilizado na purificação. Todos esses pontos, nos levam à conclusão de que o processo de purificação ainda precisa ser melhor elaborado, pensando em estratégias que acabem com a agregação das proteínas durante o HPLC com coluna de afinidade e pensando em processos adicionais, que sejam capazes de purificar ainda mais a proteína.

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista o Objetivo Geral deste projeto, pode-se concluir que o fator TGF- β 1 recombinante humano foi satisfatoriamente produzido em células CHO DG44 de mamífero. Além disso, foi desenvolvido um modelo animal para testar a eficácia do fator produzido frente à Regeneração Tecidual.

A proteína rhTGF- β 1 produzida apresenta atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, sendo capaz de acelerar a regeneração de feridas tratadas, quando comparadas àquelas não tratadas, sendo, portanto, um fator de grande potencial para a aplicação em terapias guiadas de regeneração tecidual e Bioengenharia.

7. PRÓXIMOS PASSOS

Alguns protocolos foram testados para a purificação da proteína rhTGF- β 1 produzida, porém, com baixa eficiência. Portanto, faz-se necessário, em um momento futuro, que a purificação seja otimizada e padronizada, utilizando-se abordagens complementares.

Além disso, após a completa purificação da proteína, será necessário utilizar novos testes *in vitro* e *in vivo* para a confirmação de que a proteína rhTGF- β 1 purificada continua apresentando resultados positivos nestes ensaios.

A utilização desse fator, no laboratório, em combinação com outros fatores de crescimento produzidos também é um passo importante para o futuro. Aliado à produção GMP da proteína recombinante.

É de interesse, também, a transferência da tecnologia de produção de rhTGF- β 1 para empresas privadas, para que essa possa ser produzida de maneira mais controlada e em maior escala, nos aproximando ainda mais do objetivo de utilização desse fator na Medicina Regenerativa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 75, n. 1, p. 93–99, 2004.
- ASSOIAN, R. K. et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **The Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 11, p. 7155–7160, 1983.
- BALTZIS, D.; ELEFTHERIADOU, I.; VEVES, A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. **Advances in Therapy**, v. 31, n. 8, p. 817–836, 2014.
- BARRIENTOS, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585–601, 2008.
- BHOPALE, G. M.; NANDA, R. K. Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. **Current Science**, v. 89, n. 4, p. 614–622, 2005.
- BOSCH, G. et al. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 21, n. 4, p. 554–61, 2011.
- BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1219–1222, 2007.
- BURT, D. W.; LAW, A. S. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. **Progress in growth factor research**, v. 5, n. 1, p. 99–118, 1994.
- CACCIATORE, J. J.; CHASIN, L. A.; LEONARD, E. F. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 673–681, 2010.
- CARIO, H. et al. Dihydrofolate Reductase Deficiency Due to a Homozygous DHFR Mutation Causes Megaloblastic Anemia and Cerebral Folate Deficiency Leading to Severe Neurologic Disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 88, n. 2, p. 226–231, 2011.
- CHESTER, D.; BROWN, A. C. The role of biophysical properties of provisional matrix proteins in wound repair. **Matrix Biology**, v. 60–61, n. 7, p. 124–140, 2017.
- CHIBBER, S. et al. In vitro pro-oxidant action of Methotrexate in presence of white light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, n. 3, p. 387–393, 2011.
- CHO, H. R.; HONG, S. B.; KIM, Y. I. Differential Expression of TGF β Isoforms During Differentiation of HaCaT Human Keratinocyte Cells: Implication for the Separate Role in Epidermal Differentiation. **Journal of Korean Medical Science**, v. 19, n. 6, p. 853–8, 2004.
- CLARK, D.; COKER, R. Transforming growth factor-beta (TGF- β). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 30, n. 3, p. 293–298, 1998.
- COHEN, S. N. et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 11, p. 3240–3244, 1973.
- COLIN, C. et al. NUCEL (Cell and Molecular Therapy Center): a multidisciplinary center for translational research in Brazil. **Molecular Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 89–95, 2008.

- DAHMANI, A.; DELISLE, J.-S. TGF- β in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 10, n. 6, p. 1–21, 2018.
- DAVIDSON, J. M.; YU, F.; OPALENIK, S. R. Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models. **Advances in wound care**, v. 2, n. 4, p. 142–148, 2013.
- DE ARAÚJO FARIAS, V. et al. **TGF- β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer** *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2018. .
- DE MOS, M. et al. Can Platelet-Rich Plasma Enhance Tendon Repair? **The American Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 6, p. 1171–1178, 2008.
- DEER, J. R.; ALLISON, D. S. High-Level Expression of Proteins in Mammalian Cells Using Transcription Regulatory Sequences from the Chinese Hamster EF-1 α Gene. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 880–889, 2004.
- DERYNCK, R. et al. A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3. **The EMBO journal**, v. 7, n. 12, p. 3737–3743, 1988.
- DEVESCOVI, V. et al. Growth factors in bone repair. **La Chirurgia degli organi di movimento**, v. 92, n. 3, p. 161–168, 2008.
- DINGERMANN, T. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 90–97, 2008.
- DUBOIS, C. M. et al. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 18, p. 10618-24 1995.
- ENOCH, S.; GREY, J. E.; HARDING, K. G. Recent advances and emerging treatments. **British Medical Journal**, v. 332, n. 7547, p. 962–5, 2006.
- EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 114, n. 6, p. 1502–8, 2004.
- EVROVA, O.; BUSCHMANN, J. In vitro and in vivo effects of PDGF-BB delivery strategies on tendon healing: a review. **European Cells and Materials**, v. 34, n. 7, p. 15–39, 2017.
- FAIRLIE, W. D. et al. The Propeptide of the Transforming Growth Factor-Superfamily Member, Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1), Is a Multifunctional Domain That Can Facilitate Protein Folding and Secretion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16911–8, 2001.
- FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **The Lancet**, v. 366, n. 9498, p. 1736–1743, 2005.
- FLEMING, B. C. et al. Collagen-platelet composites improve the biomechanical properties of healing anterior cruciate ligament grafts in a porcine model. **The American journal of sports medicine**, v. 37, n. 8, p. 1554–63, 2009.
- FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. In: **Current Protocols in Pharmacology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 5.47.1-5.47.20.
- GENTRY, L. E. et al. Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. **Molecular and cellular biology**, v. 7, n. 10, p. 3418–3427, 1987.

- GLYNN, L. G. et al. Platelet-rich plasma (PRP) therapy for knee arthritis: a feasibility study in primary care. **BioMed Central**, v. 93, n. 4, p. 1–7, 2018.
- GOODMAN, M. Market watch: Sales of biologics to show robust growth through to 2013. **Nature reviews - Drug discovery**, v. 8, n. 11, p. 837, 2009.
- GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. Aging and Wound Healing. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 3, p. 321–326, 2004.
- GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219–229, 2010.
- GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 15 maio 2008.
- KIM, H.; YOO, S. J.; KANG, H. A. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2014.
- KIM, J. H. et al. Transforming Growth Factor β 1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of A549 Cells. **Journal of Korean Medical Science**, v. 22, n. 5, p. 898, 2007.
- KIM, J. Y.; KIM, Y. G.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 917–930, 2012.
- KURTZ, C. A. et al. Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. **The American journal of sports medicine**, v. 27, n. 3, p. 363–9, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.
- LIAO, H.-T.; MARRA, K. G.; RUBIN, J. P. Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 20, n. 4, p. 267–76, 2014.
- LIU, J. et al. Suppression of SCARA5 by Snail1 is essential for EMT-associated cell migration of A549 cells. **Oncogenesis**, v. 2, n. 9, p. 1–10, 2013.
- LU, X. et al. CTEN induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis in non small cell lung cancer cells. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–9, 2018.
- LUCAS, B. K. et al. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 9, p. 1774–9, 1996.
- MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 11, p. 599–607, 2005.
- MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 370–378, 2015.
- MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? **Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225–8, 2001.
- MASSAGUÉ, J. The TGF- β family of growth and differentiation factors. **Cell**, v. 49, n. 4, p. 437–438, 1987.
- MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor- β family. **Annual Review of Cell and**

Developmental Biology, v. 6, p. 597–641, 1990.

MENKE, N. B. et al. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 19–25, 2007.

MUSTOE, T. A. et al. Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 2, p. 694–703, 1991.

OMASA, T.; ONITSUKA, M.; KIM, W.-D. Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 233–240, 2010.

PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. Recombinant protein therapeutics--success rates, market trends and values to 2010. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1513–1519, 2004.

PAZYAR, N. et al. Skin Wound Healing and Phytomedicine: A Review. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 6, p. 303–310, 2014.

PENN, J. W.; GROBBELAAR, A. O.; ROLFE, K. J. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. **International journal of burns and trauma**, v. 2, n. 1, p. 18–28, 2012.

PIERCE, G. F. et al. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. **The American journal of pathology**, v. 140, n. 6, p. 1375–1388, 1992.

QIAN, B.-F.; WAHL, S. M. TGF- β can leave you breathless. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 454–461, 2009.

RAMIREZ, H.; PATEL, S. B.; PASTAR, I. The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 482–491, 2014.

RIGBY, P. W. J. Cloning vectors derived from animal viruses. **Journal of General Virology**, v. 64, n. 2, p. 255–266, 1983.

ROBERTS, A. B. et al. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 9, p. 5339–5343, 1981.

ROUSSELLE, P.; BRAYE, F.; DAYAN, G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2018.

SCHNABEL, L. V et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 25, n. 2, p. 230–40, 2007.

SCHREML, S. et al. Wound healing in the 21st century. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 866–881, 2010.

SEEGER, P.; MUSSO, T.; SOZZANI, S. The TGF- β superfamily in dendritic cell biology. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 6, p. 647–657, 2015.

SEN, C. K. et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound repair and regeneration**, v. 17, n. 6, p. 763–71, 2009.

SEYEDIN, S. M. et al. Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, v. 82, n. 8, p. 2267–2271, 1985.

SOGAYAR, M. C. et al. A Transcript Finishing Initiative for Closing Gaps in the Human Transcriptome. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1413–1423, 2004.

SPORN, M. B. et al. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. **Science (New York, N.Y.)**, v. 233, n. 4763, p. 532–534, 1986.

SPORN, M. B. TGF- β : 20 years and counting. **Microbes and infection**, v. 1, n. 15, p. 1251–1253, 1999.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. TGF- β : problems and prospects. **Cell Regulation**, v. 1, n. 12, p. 875–882, 1990.

STOJADINOVIC, O. et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 1, p. 59–69, 2005.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound Healing and Skin Regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2015.

TOHIDNEZHAD, M. et al. Platelet-released growth factors can accelerate tenocyte proliferation and activate the anti-oxidant response element. **Histochemistry and cell biology**, v. 135, n. 5, p. 453–60, 2011.

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

WALSH, G.; JEFFERIS, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1241–1252, 2006.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **American Journal of Physiology**, v. 83, n. 3, p. 835–870, 2003.

WILBERS, R. H. P. et al. Co-expression of the protease furin in *Nicotiana benthamiana* leads to efficient processing of latent transforming growth factor-b1 into a biologically active protein. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 8, p. 1695–704, 2016.

ZHANG, B. et al. HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. **STEM CELLS**, v. 33, n. 7, p. 2158–2168, 2015.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1158–1170, 2012.

ZIELINS, E. R. et al. Emerging drugs for the treatment of wound healing. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 20, n. 2, p. 235–246, 2015.

ZOU, Z.; SUN, P. D. Overexpression of human transforming growth factor- β 1 using a recombinant CHO cell expression system. **Protein Expression and Purification**, v. 37, n. 2, p. 265–272, 2004.

SÚMULA CURRICULAR

1. Dados Pessoais

Gabriella Christina Gonçalves Manini de Paula

Belo Horizonte, 20 de setembro de 1990

2. Educação

Instituto Educacional Gabriela Leopoldina, IEGL, Belo Horizonte – MG, 2008.

Ensino médio

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa – MG, 2014.

Bacharel em Bioquímica

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo – SP, 2018 (em andamento).

Mestra em Ciências Biológicas (Bioquímica)

3. Formação complementar

1 - Bioquímica Forense. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2013.

2 - II Jornada de Bioquímica e Biologia Molecular. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2012.

3 - Quantificação da Carga Viral por RealTime. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2011.

4 - Fermentação Alcoólica. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2010.

5 - Aplicação RMN em estudos sobre química medicinal. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2010.

6 - Nanovacinas. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2010.

7 - Química computacional: pesquisa química. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2010.

4. Resumos publicados em anais de eventos

1 - de PAULA, G. C. G. M.; CARREIRA, A. C. O.; ASTORINO FILHO, R.; SOGAYAR, M. C.. Production of Transforming Growth Factor beta 1 and 3 using a recombinant CHO cell expression system. XVIII Congresso SBBC, São Paulo, São Paulo, Brasil, 2016.

2 - de PAULA, G. C. G. M.; ASTORINO FILHO, R.; CARREIRA, A. C. O.; SOGAYAR, M. C.. Production of human recombinant TGF beta 1 and TGF beta 3 in mammalian cells. 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2015.

3 - de PAULA, G. C. G. M.; FIETTO, L. G.; PEREIRA, M. F.; BAZZOLLI, D. M. S.; RIBON, A. O. B.. In vivo virulence of *Staphylococcus aureus* in an invertebrate model. XLIII Reunião

Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2014.

4 - de PAULA, G. C. G. M.; PRATA, I. O.; SOUSA, B. L.; BARROS, G. C.; PEREIRA, P. H. S.; BAETA, J. V. P. B.; RABELO, I. L. A.; QUEIROZ, J. H.. Characterization of an endoglucanase from *Aspergillus niger* sp..II Simpósio Internacional de Microbiologia e Biotecnologia – SIMB, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2013.

5. Participação em eventos científicos

1 - XVIII Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology (SBBC). 2016.

2 - XXIII International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and XLIV Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2015

3 - 43th Annual Meeting of the SBBq. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2014.

4 - II International Symposium on Microbiology and Biotechnology. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2013.

5 - IV Semana Acadêmica de Bioquímica da UFV. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2013.

6 - IV Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2013.

7 - I International Symposium on Microbiology and Biotechnology. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2012.

8 - 3ª Semana Acadêmica de Bioquímica da UFV. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2011.

9 - 8º Encontro de Genética e Melhoramento e 3º Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2011.

10 - 2ª Semana Acadêmica de Bioquímica da UFV. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2010.

11 - II Jornada de Inverno de Química da UFMG. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2010.

6. Ocupação

Bolsista de Mestrado, CNPq, Ago/2014 a Set/2016.

Pesquisadora Científica, Scheme Lab, Ago/2017 até o presente.