



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica

ESTABELECIMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

rhPDGF-BB PRODUZIDA EM CÉLULAS HEK 293T

CATERINA LUZ GIOIA

Orientadora: Profa. Dra. Talita Souza Carmo

Brasília

2019

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica

**ESTABELECIMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA
rhPDGF-BB PRODUZIDA EM CÉLULAS HEK 293T**

Caterina Luz Gioia

Orientadora: Profa. Dra. Talita Souza Carmo

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília
2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) Caterina Luz Gioia, matrícula nº 17/0090329, intitulada “*Estabelecimento do processo de purificação da proteína rhPDGF-BB produzida em células HEK 293T*”, apresentada no (a) Sala de Reuniões Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 26 de junho de 2019.

Prof.^a Dra. Talita Souza Camargo
Presidente de Banca

Prof.^a Dra. Janice Lisboa de Marco
Membro Titular

Prof. Dr. João Ricardo Pereira de Almeida
Membro Titular

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva
Membro Suplente

Em 26 de junho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus e à Nossa Senhora, que me mantiveram em pé e firme em todos os momentos da vida e principalmente durante essa jornada acadêmica.

Quero agradecer ao meu pai e à minha mãe por terem me ensinado que o conhecimento é a única coisa que nunca perderei e que devo correr atrás dos meus sonhos. O apoio de vocês foi essencial, desde os cafés nas manhãs corridas até as conversas sobre coisas da vida. Agradeço também ao Bidu, que mesmo sem entender me distraiu nos momentos de tensão e me enche de carinho sem pedir nada em troca. Amo muito vocês e sou muito grata por todo o caminho percorrido. Obrigada por minha família como um todo, tios e tias, primos e primas, especialmente para minha tia Socorro, tio Otoniel, Pri e Arthur, que sempre se fazem presentes e são uma extensão da minha casa em todos os momentos, por muitas vezes me dando suporte na vida pessoal e assim, me ajudando também na vida acadêmica.

Agradeço também à Láysa, que me apoiou e me escutou em vários momentos nessa caminhada, sempre me lembrando que eu nunca estava sozinha e deixando todo o caminho mais leve. Foram infinitas as caronas, as ajudas no computador, os almoços e jantares e as séries para distrair (e o carinho da Tarja, claro). Muito obrigada por todo o carinho, cuidado e apoio!

Não posso deixar de agradecer também todos os meus amigos que de alguma forma se fizeram presentes. Em especial, gostaria de agradecer à Gabi que me ajudou não só nos experimentos e com opiniões sobre o trabalho, mas sempre estava ali para me escutar e rir nas horas vagas, assim como a Carol.

Em especial, gostaria de agradecer minha orientadora, Talita, que se tornou uma amiga durante o processo, mas nunca deixou de exigir o melhor no trabalho. Obrigada pela paciência, pelo tempo para conversas, pelos cafés e pelos ensinamentos!

Ainda gostaria de agradecer todas as pessoas que fizeram parte desse processo de alguma forma, fosse discutindo resultados, ajudando em ensaios ou dividindo conhecimento. Aos laboratórios que cederam equipamentos ou insumos. Um muito obrigado à professora Janice, que foi uma verdadeira guia no uso do equipamento ÄKTA, com muita paciência, demandou tempo para me ajudar e discutir resultados comigo. Um agradecimento também à aluna Rosana, que cedeu os meios condicionados de sua produção para que pudessem ser purificados.

Agradeço à Universidade de Brasília por ter feito parte da minha história e por se manter tão forte perante as adversidades. Gostaria de agradecer imensamente a banca por ter aceito o convite de compor minha avaliação e de aprimorar minha pesquisa e meu conhecimento não só sobre esse tema, mas com pesquisa em geral.

Por fim, agradeço ao órgão de fomento CAPES que viabilizou financeiramente o curso e a execução do projeto.

RESUMO

As úlceras nas extremidades dos membros de pacientes diabéticos são complicações comuns que atingem cerca de 15% dos pacientes e que podem levar à graves consequências como a amputação de membros. O Becaplermin (Regranex®), produzido em *Saccharomyces cerevisiae*, é um fármaco comercializado e utilizado para o tratamento de tais feridas, através da atuação do homodímero da subunidade B do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF-BB). A proteína recombinante humana (rh) PDGF-BB atua nos processos de cicatrização por sua ação quimiotática, ativando mecanismos celulares, como angiogênese e mitogênese; pode ser utilizada também na regeneração óssea e periodontal. Entretanto, efeitos adversos como erupção bolhosa, queimação no local de aplicação e hipertrofia da pele são relatados com o uso do Becaplermin. Tais relatos podem ser atribuídos ao sistema de expressão, que promove modificações pós-traducionais não expressadas em humanos, levando a uma resposta imune no organismo. A produção de proteínas recombinantes por células de mamífero (HEK 293T, por exemplo) gera moléculas que apresentam menor risco de efeitos colaterais quando comparadas a outros sistemas de expressão, pois possuem as modificações pós-traducionais que se assemelham às produzidas em humanos, bem como secretam a maioria das proteínas no meio de cultura, facilitando sua recuperação sem necessidade do rompimento celular. Esse trabalho teve como objetivo o estudo do estabelecimento do processo de purificação da proteína rhPDGF-BB produzida em células HEK 293T para duas colunas (HiTrap Heparin HP e HiTrap Phenyl FF), assim como a validação de testes colorimétricos para monitoramento de glicose, lactato, glutamina e ureia durante o cultivo celular e estudo do metabolismo. Os testes colorimétricos elaborados apresentaram valores subestimados para lactato e superestimados para glicose quando comparado aos resultados obtidos por HPLC, porém as curvas nos gráficos possuem perfil similar, indicando que podem ser utilizados como guias para entender a metabolização celular no meio de cultivo durante o processo de produção, possibilitando a tomada de decisões de forma rápida. A purificação do rhPDGF-BB na coluna HiTrap Heparin HP já é conhecida e gerou picos únicos e

centralizados na eluição, mas a constatação da presença da proteína de interesse no pico purificado não foi possível devido à problemas com equipamentos. A coluna HiTrap Phenyl FF (High Sub) possui menor custo de compra e por isso se apresentou como uma boa alternativa à coluna de heparina, realizando testes de purificação da proteína para ela. O estabelecimento da purificação com esta coluna não foi estabelecido, pois o pico obtido estava deslocado para o final da eluição e não se encontrou molaridade adequada do sal utilizado para centralizar o pico de purificação. Entretanto, apresentou pico com altura similar à altura alcançada na coluna de heparina, apresentando-se como uma alternativa promissora para a continuação de estudos para outros sais e molaridades.

Palavras-chave: biofármacos; purificação de proteínas; células de mamífero; fator de crescimento.

ABSTRACT

Ulcers at the extremities of the limbs of diabetic patients are common complications which affects about 15% of patients and can lead to serious consequences such as limb amputation. Becaplermin (Regranex®), produced in *Saccharomyces cerevisiae*, is a drug marketed and used for the treatment of such wounds, through the action of the B subunit homodimer of Platelet Derived Growth Factor (PDGF-BB). The human recombinant (rh) PDGF-BB acts in the cicatrization through its chemotactic action, promoting cellular mechanisms such as angiogenesis and mitogenesis, and can be used for other treatments such as bone and periodontal regeneration. However, side effects such as bullous eruption, burning at the site of application and hypertrophy of the skin are reported with the use of Becaplermin and can be attributed to the expression system, which promotes post translational modifications not expressed in humans, which may lead to an immune response in the human body. The production of recombinant proteins by mammalian cells (HEK 293T, for example) generates molecules that present less risk of side effects when compared to other expression systems, since they have the post translational modifications that resemble those produced in humans, as well as secrete most of the proteins in the medium, facilitating their recovery without the need for cellular disruption. The aim of this study was to establish the purification process of the rhPDGF-BB protein produced in HEK 293T cells for two different columns (HiTrap Heparin HP and HiTrap Phenyl FF), as well as the validation of colorimetric tests for glucose, lactate, glutamine and urea during cell culture and metabolism study. The colorimetric tests presented values that were underestimated and overestimated for the analyzes when compared to the results obtained by HPLC. However, they had a similar curve profile in the graph and could be used as a guide to understand the cellular situation in the culture medium in a rapidly manner. Purification of rhPDGF-BB on the HiTrap Heparin HP column is already known and generated single and centered elution peaks, but the proofing of the presence of the protein of interest in the purified peak was not possible due to equipment problems. The HiTrap Phenyl FF (High Sub) column has a lower cost of purchase and therefore presented itself as a good alternative to the heparin column, being performs

purifications tests of the protein for it. The process optimization was not established because the obtained peak was displaced towards the end of the elution and no adequate molarity of the salt used to centralize the purification peak was found. However, it presented a peak with similar height to the height reached in the heparin column, being presented as a promising alternative worthy of the continuation of studies for other salts and molarities.

Keywords: biopharmaceutics; protein purification; mammalian cell; growth factor.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. DIABETES	20
1.2. FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)	21
1.2.1 Tratamentos de feridas do pé diabético e seus efeitos adversos	25
1.3. Células de mamífero como sistema de expressão de proteínas recombinantes. 27	
1.3.1 Os sistemas de cultivo para células de mamífero.....	29
1.4. METABOLIZAÇÃO CELULAR	33
1.5. PURIFICAÇÃO.....	35
1.5.1 Colunas de Purificação.....	36
1.6. JUSTIFICATIVA	38
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. OBJETIVO GERAL	39
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. OBTENÇÃO DE CLONES DE CÉLULAS HEK 293T SUPERPRODUTORES DE rhPDGF-BB.....	40
3.2. AMOSTRAS.....	41
3.3. DETECÇÃO DE GLICOSE, LACTATO E URÉIA.....	42
3.3.1 Espectrofotômetro	42
3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para detecção de glicose e metabólitos.	44
3.4. PURIFICAÇÃO EM ÄKTA <i>PURE</i>	45
3.4.1 Coluna HiTrap Heparin HP	47
3.4.2 Coluna HiTrap Phenyl FF (High Sub)	48
3.5. MÉTODO DE BRADFORD	49
3.6. MÉTODO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA.....	50
3.7. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS (SDS-PAGE).....	50
3.8. CONCENTRAÇÃO E DIÁLISE DAS AMOSTRAS	53
3.9. Detecção por HPLC após purificação	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

4.1. DETECÇÃO DE GLICOSE, LACTATO, UREIA E GLUTAMINA E VALIDAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO RÁPIDO	55
4.2. TESTES DE PURIFICAÇÃO NO ÄKTA <i>PURE</i>	64
4.2.1 Coluna HiTrap Heparin HP	64
4.2.2 Coluna HiTrap Phenyl FF (High Sub)	83
5. CONCLUSÃO	94
5.1. VALIDAÇÃO DOS TESTES COLORIMÉTRICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE E LACTATO	94
5.2. PURIFICAÇÃO NA COLUNA HITRAP HEPARIN HP	94
5.3. PURIFICAÇÃO NA COLUNA HITRAP PHENYL FF (HIGH SUB).....	94
6. BIBLIOGRAFIA.....	95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo de cicatrização em indivíduos saudáveis, ilustrando os grupos celulares envolvidos em cada etapa: as plaquetas na etapa de coagulação, macrófagos, neutrófilos e monócitos na inflamação e fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais na revascularização do tecido afetado (adaptado de PAPANAS; MALTEZOS, 2008)...21
- Figura 2.** Interações entre PDGF e seu receptor PDGFR. Os dímeros PDGF-DD e PDGF-CC foram suprimidos da imagem (adaptado de SARWAR et al., 2015).22
- Figura 3.** Imagem tridimensional da proteína PDGF-BB, onde a diferença de coloração na estrutura representa as duas subunidades B da proteína, apresentadas de forma espelhada. (Fonte: BioMimetic Pharmaceuticals).23
- Figura 4.** Aplicações clínicas do PDGF (nos círculos verdes) e as ações do PDGF no organismo (nos círculos rosas) (GÖKŞEN; BALABANLI; COŞKUN-CEVHER,2017; YAMAMOTO et al., 2008; HEASLEY; JOHNSON, 1992).....24
- Figura 5.** Exemplos de sistemas de produção de proteínas em células de mamífero: a) Garrafa, b) *Spinner*, c) *Wave*, d) *Air lift reactor* (Appleton Woods LTD; Spectrum Chemical MFG Corp; GE Healthcare Life Sciences; Bioreactor Sciences; Knbs).30
- Figura 6.** Esquematização do funcionamento do FibraStage® (Fonte: Knbs). ...31
- Figura 7.** Esquematização do metabolismo de Glicose e Lactato em células de mamífero. Em azul, está representada a via glutaminolítica e em vermelho, a via glicolítica (Fonte: Ramos, 2014).34
- Figura 8.** Representação do ciclo da ureia (Fonte: ROCHA et al., 2016).....35
- Figura 9.** Fluxograma dos processos desde o meio condicionado até a verificação *in vitro* da atividade biológica da proteína rhPDGF-BB obtida através de cultivos celulares no laboratório.40
- Figura 10.** Esquematização da obtenção dos clones de HEK293T produtores de rhPDGF-BB realizada pelo NUCEL.....41
- Figura 11.** Fluxograma do processo executado nas amostras antes da aplicação no equipamento ÄKTA47
- Figura 12.** Marcador de peso molecular utilizado para todos os géis: *Precision Plus Protein™ All Blue Standarts* da BIO RAD.52

Figura 13. Análise dos perfis de concentração de glicose e metabólitos durante a adaptação celular. A) Concentração em g/L de glicose por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. B) Concentração de lactato em g/L por amostra detectados por HPLC e por colorimetria. C) Concentração de glutamina em g/L detectado por HPLC. D) Concentração de ureia em g/L detectado por colorimetria.58

Figura 14. Análise dos perfis de concentração de glicose e metabólitos durante o cultivo celular em garrafas. A) Concentração em g/L de glicose por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. B) Concentração de lactato em g/L por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. C) Concentração de glutamina em g/L detectado por HPLC. D) Concentração de ureia em g/L detectado por colorimetria.59

Figura 15. Análise dos perfis de concentração de glicose e metabólitos durante o primeiro cultivo em Fibra Stage. A) Concentração em g/L de glicose por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. B) Concentração de lactato em g/L por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. C) Concentração de glutamina em g/L detectado por HPLC.....60

Figura 16. Análise dos perfis de concentração de glicose e metabólitos durante o cultivo celular em garrafas após o Fibra Stage. A) Concentração em g/L de glicose por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. B) Concentração de lactato em g/L por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. C) Concentração de glutamina em g/L detectado por HPLC.....61

Figura 17. Perfil de purificação da amostra 1 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição66

Figura 18. Perfil de purificação da amostra 2 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.67

Figura 19. Perfil de purificação da amostra 3 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.68

Figura 20. Perfil de purificação da amostra 4 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.69

Figura 21. Perfil de purificação da amostra 5 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.70

Figura 22. Perfil de purificação da amostra 6 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.71

Figura 23. Perfil de purificação da amostra 7 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.72

Figura 24. Perfil de purificação da amostra 8 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.73

Figura 25. Perfil de purificação da amostra 9 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.74

Figura 26. Géis corados com Coomassie Blue para todas as amostras purificadas na coluna de heparina, quase não havendo coloração devido à baixa concentração de proteína por banda. O marcador de peso molecular é dado em kDa e as amostras estão na seguinte ordem no primeiro gel: marcados de peso molecular, fração 3 da amostra 1, fração 4 da amostra 1, fração 3 da amostra 2, fração 4 da amostra 2, fração 3 da amostra 3, fração 4 da amostra 3, fração 3 da amostra 4, fração 4 da amostra 4 e fração 3 da amostra 5. No segundo gel estão: marcador de peso molecular, fração 4 da amostra 5, fração 3 da amostra 6, fração 4 da amostra 6, fração 3 da amostra 7, fração 4 da amostra 7, fração 3 da amostra 8, fração 4 da amostra 8, fração 3 da amostra 9 e fração 4 da amostra 9.76

Figura 27. Géis corados com nitrato de prata para todas as amostras purificadas na coluna de heparina. O marcador de peso molecular é dado em kDa e as amostras estão na seguinte ordem no primeiro gel: marcados de peso molecular, fração 3 da amostra 1, fração 4 da amostra 1, fração 3 da amostra 2, fração 4 da amostra 2, fração 3 da amostra 3, fração 4 da amostra 3, fração 3 da amostra 4, fração 4 da amostra 4 e fração 3 da amostra 5. No segundo gel estão: marcador de peso molecular, fração 4 da amostra 5, fração 3 da amostra 6, fração 4 da amostra 6, fração 3 da amostra 7, fração 4 da amostra 7, fração 3 da amostra 8, fração 4 da amostra 8, fração 3 da amostra 9 e fração 4 da amostra 9.77

Figura 28. Perfil de purificação do soro fetal bovino puro no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.78

Figura 29. Perfil de purificação do meio DMEM não condicionado puro no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a

absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.....79

Figura 30. Perfil de purificação do meio DMEM não condicionado com 10% de soro fetal bovino no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.....80

Figura 31. Cromatograma obtido em HPLC do padrão de rhPDGF-BB e gerado pelo próprio software do equipamento. O eixo X indica o tempo (min) e o eixo Y a detecção pela luz UV. Os círculos representam os picos obtidos.....82

Figura 32. Perfil de purificação da amostra 2 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Phenyl FF (high sub)*, solução com molaridade de 1,5 M. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica os picos obtidos no processo de purificação durante a eluição.....84

Figura 33. Resultado do gel de SDS-PAGE da amostra teste purificada no ÄKTA, pipetados na sequência: marcador molecular (dado em kDa), pico maior gerado no ÄKTA e pico menor. O pico maior acabou vazando para os lados devido ao excesso de amostra pipetado para o tamanho do poço, cerca de 30L.85

Figura 34. Perfil de purificação da amostra 6 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Phenyl FF (high sub)*, solução com molaridade de 1M, não obtendo pico. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.....87

Figura 35. Perfil de purificação da amostra 7 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Phenyl FF (high sub)*, solução com molaridade de 1M, não obtendo pico. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha

azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.....88

Figura 36. Perfil de purificação da amostra 2 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Phenyl FF (high sub), solução com molaridade de 1,3 M, com pico no extremo final da corrida. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.....90

Figura 37. Perfil de purificação da amostra 6 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Phenyl FF (high sub), solução com molaridade de 1,3 M, com pico no extremo final da corrida. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.....91

Figura 38. Perfil de purificação da amostra 6 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Phenyl FF (high sub), com troca de solução para a contendo Tris e NaCl, sem a presença de pico. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.....92

Figura 39. Ânions e Cations que podem ser utilizados para aumentar o efeito “*salting-out*” ou “*salting-in*” (Adaptado de GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, 2018). 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Funcionalidades do PDGF e suas formas de ação no organismo (CAPLAN; CORREA, 2011; MENZEL-SEVERING, 2012; RAY et al., 2003; SCHNEIDER; HAUGH, 2006; XIAO et al., 2007; YU et al., 2003)	25
Tabela 2. Células de mamíferos (CHO e linhagens celulares humanas) usadas para produção de biofármacos já aprovados nos Estados Unidos (FDA) e/ou na Europa (EMA) (Fonte: Adaptado de DUMONT et al., 2015)	28
Tabela 3. Quantidade de amostra, padrão e reagente para detecção colorimétrica de glicose a partir do branco, do teste e do padrão.	42
Tabela 4. Quantidade de amostra, padrão, água e reagente para detecção colorimétrica de lactato a partir do branco, do teste e do padrão.....	43
Tabela 5. Concentrações dos 10 pontos dos padrões utilizados de glicose, lactato e glutamina para detecção em HPLC.....	44
Tabela 6. Amostras selecionadas para purificação no ÄKTA Pure.	46
Tabela 7. Amostras coletadas de meio condicionado agrupadas quanto ao sistema de cultivo celular, apresentando nome, data de coleta do meio e o tempo de cultivo em horas no momento da coleta.	57
Tabela 8. Concentrações de proteína obtidas pelo método ultravioleta para cada uma das amostras nas frações 3 e 4 coletadas da purificação no ÄKTA.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: Por cento

®: Marca registrada

™: Marca comercial

°C: Graus Celsius

ATP: Adenosina trifosfato

Da: Dalton

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

IDF: *International Diabetes Federation*

IgG: Imunoglobulina G

kDa: Kilodalton

mAU: Mili unidade de absorbância

pH: Potencial hidrogeniônico

rpm: Rotação por minuto

R\$: Real

V: Volts

Δ: Delta (variação)

1. INTRODUÇÃO

1.1. DIABETES

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica que causa hiperglicemia decorrente da deficiência da secreção de insulina, de sua ação ou de ambos (ADA, 2010) e que acomete aproximadamente 9% da população brasileira (o equivalente a 12.465.800 de habitantes). Tornou-se uma epidemia mundial e estima-se que em 2045, o número de acometidos pela doença alcançará 20 milhões de brasileiros (IDF, 2017). A DM apresenta um custo considerável para o Sistema Único de Saúde (SUS), onde o valor total dos gastos no ano de 2017 foi de 24 bilhões de dólares para o governo brasileiro (IDF, 2017).

A Diabetes tem como consequência uma série de complicações, tais como as úlceras nos pés (comumente chamadas por “feridas do pé diabético”), estimando-se que 15% dos pacientes sofrem do problema em algum momento da vida (YAZDANPANA; NASIRI; ADARVISHI, 2015). O controle glicêmico ineficiente junto a outros fatores, como: o tabagismo, presença de deformidades nos pés e neuropatia periférica favorecem o aparecimento de feridas, aumentando a probabilidade de amputações de membros e é a principal causa de morbidade e mortalidade nas pessoas acometidas pela doença (ADA, 2019). É importante ressaltar que a maior causa do aparecimento de úlceras é a neuropatia periférica, com uma prevalência que varia de 16% a 66% nos pacientes diagnosticados com diabetes ao redor do mundo, segundo o IDF, 2017. As úlceras se tornam um problema importante nos pacientes, pois esses indivíduos possuem deficiência de cicatrização significativa, consequente de fatores fisiológicos, como: baixa produção ou produção prejudicada de fatores de crescimento, resposta angiogênica, funções do macrófago, acúmulo de colágeno, migração de fibroblastos e sua proliferação, entre outros (SAMUEL et al., 2016).

1.2. FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

Alguns tratamentos são adotados para úlceras decorrentes de Diabetes Mellitus (DM) e um deles é o uso de fatores de crescimento para processos de reparo e cicatrização das feridas, auxiliando no recrutamento de células inflamatórias, fibroplasia e angiogênese (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é da classe das citocinas e é produzido endogenamente em humanos, sendo usado comercialmente para o tratamento dessas feridas (BALDO, 2014). É produzido atualmente via *Saccharomyces cerevisiae*, para uso farmacológico (PAPANAS; MALTEZOS, 2008) e recebe o nome comercial de Becaplermin (Regranex®).

Para entender a importância do PDGF para os pacientes com DM, é necessário esclarecer o processo de cicatrização - que envolve três etapas - conhecido como cascata de cicatrização (PAPANAS; MALTEZOS, 2008), cuja exemplificação do processo encontra-se na Figura 1. Simplificadamente, a primeira fase do processo após a lesão é a coagulação, onde as plaquetas são requeridas para cessar o sangramento. A fase seguinte é caracterizada pela ação dos leucócitos causando a inflamação, destruindo patógenos que podem ter entrado em contato com a ferida. A terceira fase é a maturação, onde os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos são responsáveis pela formação de novos vasos e produção de tecido fibroso (PAPANAS; MALTEZOS, 2008).

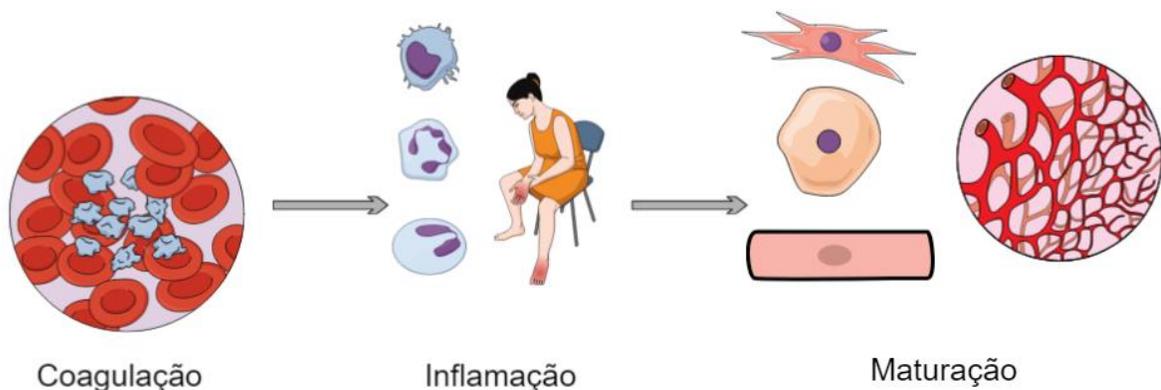


Figura 1. Processo de cicatrização em indivíduos saudáveis, ilustrando os grupos celulares envolvidos em cada etapa: as plaquetas na etapa de coagulação, macrófagos, neutrófilos e monócitos na inflamação e fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais na revascularização do tecido afetado (adaptado de PAPANAS; MALTEZOS, 2008)

O fator de crescimento derivado de plaquetas é uma glicoproteína expressa no corpo humano por plaquetas, osteoblastos, neurônios, fibroblastos, macrófagos, dentre outros. É uma molécula com ação mitogênica, angiogênica e é um agente quimiotático (atuando na divisão celular, no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e no recrutamento de diversos tipos celulares através do estímulo químico, respectivamente), tendo como função já bem estabelecida de iniciador prematuro de cicatrização de feridas e de regeneração de ossos (DIGIOVANNI; PETRICEK, 2010). No âmbito da cicatrização, sua função é essencial para o processo demonstrado na Figura 1, ajudando a recrutar células para a defesa do organismo e sua cicatrização.

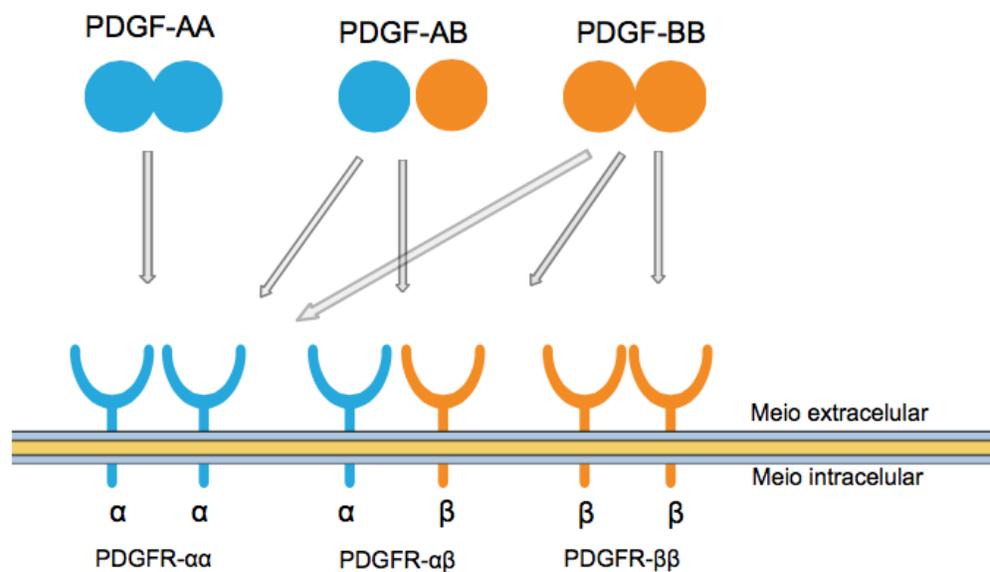


Figura 2. Interações entre PDGF e seu receptor PDGFR. Os dímeros PDGF-DD e PDGF-CC foram suprimidos da imagem (adaptado de SARWAR et al., 2015).

Alguns dados como peso molecular, ponto isoelétrico teórico, sequência peptídica, coeficiente de extinção e alguns outros podem ser determinados através do ProtParam, uma ferramenta online que pode ser utilizada inserindo a sequência conhecida da proteína ou utilizando o número de acesso da base de dados UniProt (que usa como base o Swiss-Prot/TrEMBL) correspondente ao da proteína de interesse (GASTEIGER et al., 2005). O código do PDGFB humano (correspondente a uma cadeia B do PDGF) é:

P01127. O Protoparam fornece o peso molecular equivalente a aproximadamente 25 kDa, com 218 aminoácidos e coeficiente de extinção igual a 12.000. Para ter funcionalidade no organismo, o PDGF precisa estar em forma de dímero, agrupando-se em homodímeros (AA, BB, CC, DD) e heterodímero (AB). Seus receptores (PDGFR, nas formas α e β) encontram-se na superfície celular (Figura 2).

O PDGF-BB, representando tridimensionalmente na Figura 3, é o único dímero que é capaz de se ligar a qualquer um dos receptores conhecidos; é assim considerada a forma universal da molécula e a melhor escolha para formulações e desenvolvimentos de fármacos para fins terapêuticos (DIGIOVANNI; PETRICEK, 2010). A Figura 4 exemplifica as funcionalidades da proteína no organismo humano e suas aplicabilidades clínicas.

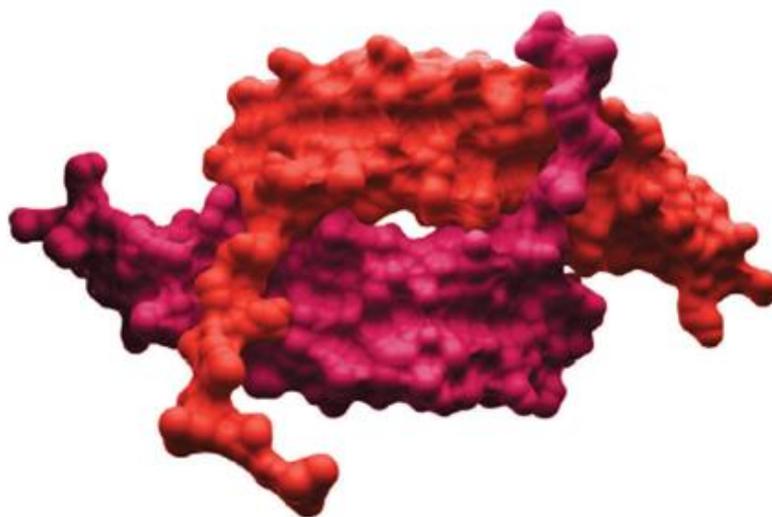


Figura 3. Imagem tridimensional da proteína PDGF-BB, onde a diferença de coloração na estrutura representa as duas subunidades B da proteína, apresentadas de forma espelhada. (Fonte: BioMimetic Pharmaceuticals).



Figura 4. Aplicações clínicas do PDGF (nos círculos verdes) e as ações do PDGF no organismo (nos círculos rosas) (GÖKŞEN; BALABANLI; COŞKUN-CEVHER, 2017; YAMAMOTO et al., 2008; HEASLEY; JOHNSON, 1992).

O PDGF-BB apresenta diversas funções, como está representado na Figura 4. A participação da proteína na regeneração de cartilagens e ossos se dá através do recrutamento de pericitos, estimulando a mitose, contribuindo para a cascata da regeneração óssea através do recrutamento de osteoblastos (CAPLAN; CORREA, 2011); atua na neovascularização ocular, pela atração de células progenitoras de pericitos, atuando na estabilização de vasos (MENZEL-SEVERING, 2012); na regeneração periodontal, atua na migração e proliferação de células periodontais através da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK-p38) e outras vias (RAY et al., 2003); na regeneração tecidual, o PDGF age no recrutamento de fibroblastos, componentes essenciais para a recuperação tecidual (SCHNEIDER; HAUGH, 2006). A diferenciação celular aparenta ser mediada por uma cascata de sinalização mediada pela ativação do receptor β do PDGF, que é ativado pelo PDGF-BB, como é possível visualizar no esquema da Figura 2 (XIAO et al., 2007). A proliferação de células de músculo liso se

dá por uma cascata de indução de proliferação mediada pelo PDGF, incluindo a expressão de TRPC6 (membro da família de receptores transientes de potencial, levando à regulação da recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e da concentração de cálcio livre no citosol, gerando um balanço para a proliferação celular (YU et al., 2003). Um breve resumo das formas de ação do PDGF apresentadas neste parágrafo encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Funcionalidades do PDGF e suas formas de ação no organismo (CAPLAN; CORREA, 2011; MENZEL-SEVERING, 2012; RAY et al., 2003; SCHNEIDER; HAUGH, 2006; XIAO et al., 2007; YU et al., 2003)

FUNCIONALIDADE	FORMA DE AÇÃO
Regeneração Periodontal	Estimulação da migração e proliferação de células periodontais
Regeneração Tecidual	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos
Neovascularização Ocular	Estabilização de vasos através da atração de células progenitoras de pericitos
Proliferação de Células de Músculo Liso	Cascata de proliferação induzida pelo PDGF
Diferenciação Celular	Cascata de sinalização mediada por PDGFR β
Regeneração de Cartilagens e Ossos	Recrutamento de pericitos e sua mitose

1.2.1 Tratamentos de feridas do pé diabético e seus efeitos adversos

Ainda não existe um tratamento ideal para as úlceras de pacientes diabéticos e com neuropatia. O manual do pé diabético, elaborado pelo Ministério da Saúde (2016), orienta o tratamento de acordo com a gravidade das úlceras, mas indica a instrução do paciente para a higiene regular, com sua secagem cuidadosa e corte de unhas em linha reta, elaboração de curativos no local, aplicação de substâncias como alginato de cálcio e sódio para auxiliar na cicatrização, além de antibióticos, caso haja infecção. Outros

tratamentos, além dos curativos, mostram eficácia e devem ser analisados para o melhor tratamento desses pacientes, evitando uma futura amputação de membros, tais como a utilização do Apligraf®, o Regranex® e câmaras hiperbáricas. (BRASIL, 2016).

O Apligraf® - que simula a pele (composto de fibroblastos e colágeno bovino do tipo I) - também é uma alternativa existente para o tratamento de tais feridas, mas possui custo extremamente elevado, onde um disco de 7,5 cm que serve para uma única aplicação custa em torno de 1000 dólares, e até cinco aplicações são necessárias para completa cicatrização (HAN; CEILLEY, 2017; ZAULYANOV; KIRSNER, 2007). O uso de câmaras hiperbáricas também apresenta uma alternativa para a cicatrização, partindo do pressuposto que promovem a proliferação de fibroblastos, estimulando a angiogênese e melhorando as respostas imunes, porém podem levar a efeitos adversos, como convulsões causadas por intoxicação cerebral por oxigênio e aparenta só ter efeitos positivos em pacientes que apresentam feridas com hipóxia (HAN; CEILLEY, 2017).

O Regranex® (Becaplermin), já citado anteriormente, é uma das alternativas de tratamento, porém apresenta efeitos adversos. Baldo (2014) relata os quão sensíveis as citocinas são em relação à substituição na sequência de aminoácidos, enovelamento, interações entre proteínas e níveis de glicosilação. O becaplermin é apresentado em forma de gel e apresenta em sua caixa um aviso sobre o surgimento de células malignas longe do local de aplicação e o aumento da taxa de mortalidade em usuários que utilizaram mais de três tubos do medicamento (BALDO, 2014). Entretanto, Martí-Carvajal et al. (2015) salientam que mais dados de qualidade são necessários para avaliar essa conclusão, considerando que um estudo observacional realizado por ZIYADEH et al. (2011) relatou não parecer haver aumento de risco de desenvolver câncer ou aumento de mortalidade pela doença provocada pela substância. Ainda assim, outros efeitos adversos são apresentados como: erupção cutânea eritematosa, queimação no local de aplicação, erupção bolhosa, hipertrofia da pele, infecção, ulceração da pele, osteomielite, infecção do trato respiratório superior e celulite (BALDO, 2014).

A produção da proteína rhPDGF-BB em células HEK 293T surge como uma possibilidade de processo que oferece menor geração de riscos ou efeitos colaterais por ser uma linhagem celular humana, sendo o mais semelhante possível da molécula

produzida endogenamente, excluindo as modificações não expressadas em humanos (DUMONT et al., 2015).

1.3. Células de mamífero como sistema de expressão de proteínas recombinantes.

Alguns sistemas de expressão têm sido utilizados para a produção de proteínas recombinantes e a escolha de cada sistema depende de características da proteína de interesse, como as modificações pós-traducionais (DUMONT et al., 2015). As células de mamífero são uma escolha recorrente de sistema de produção para biofármacos, pois são as que mais se assemelham nas modificações pós-traducionais produzidas em humanos e a maioria das proteínas são secretadas para o meio, não sendo necessário o rompimento celular, nem desnaturação da proteína (DUMONT et al., 2015). A célula de ovário de hamster chinês (CHO), a célula de rim de filhote de hamster (BHK21) e células de mieloma murino (NS0 e Sp2/0) são as mais utilizadas para produção de proteínas terapêuticas (Estes; Melville, 2013). Como desvantagem, essas células possuem modificações pós-traducionais não expressadas em humanos (galactose- α 1,3- galactose e ácido N-glicolineuramínico), que são reconhecidas por anticorpos humanos, sendo necessário um processo de seleção de clones que possuam perfis de N-glicanos aceitáveis (Ghaderi et al., 2010). Como solução, as linhagens celulares humanas são as que produzem proteínas que mais se assemelham com as produzidas naturalmente nos seres humanos. As células embrionárias de rim humano 293 (HEK 293) e as células de fibrosarcoma (HT- 1080) são as mais amplamente utilizadas e já possuem biofármacos aprovados para uso, descritos na Tabela 2. Também nesta tabela é notável a diferença no número de fármacos aprovados para o uso humano elaborados em células de mamíferos não humanas e células humanas. A ainda baixa produção de fármacos em linhagens celulares humanas pode ser explicada pela menor experiência clínica quando comparada com outros tipos celulares e a susceptibilidade à contaminação por vírus humanos (DUMONT et al., 2015).

Tabela 2. Células de mamíferos (CHO e linhagens celulares humanas) usadas para produção de biofármacos já aprovados nos Estados Unidos (FDA) e/ou na Europa (EMA) (Fonte: Adaptado de DUMONT et al., 2015)

Linhagem Celular	Produto	Status FDA	Status EMA
CHO	Citocinas		
	Darbepoetin alfa	Aprovado	Aprovado
	Interferon beta-1a	Aprovado	Aprovado
	Epoetin alfa	Aprovado	Aprovado
	Epoetin theta	Não aprovado	Aprovado
	Anticorpos monoclonais		
	Adalimumabe	Aprovado	Aprovado
	Alentuzumabe	Aprovado	Não Aprovado
	Bevacizumabe	Aprovado	Aprovado
	Brentuximabe vedotina	Aprovado	Aprovado
	Desonumabe	Aprovado	Aprovado
	Golimumabe	Aprovado	Aprovado
	Ibritumomabe tiuxetana	Aprovado	Aprovado
	Ipilimumabe	Aprovado	Aprovado
	Obinutuzumabe	Aprovado	Aprovado
	Omalizumabe	Aprovado	Aprovado
	Panitumumabe	Aprovado	Aprovado
	Pertuzumabe	Aprovado	Aprovado
	Rituximabe	Aprovado	Aprovado
	Siltuximabe	Aprovado	Aprovado
	Tocilizumabe	Aprovado	Aprovado
	Trastuzumabe	Aprovado	Aprovado
	Vedolizumabe	Aprovado	Aprovado
	Ado-trastuzumabe	Aprovado	Aprovado
	entansina		
	Ustequinumabe	Aprovado	Aprovado
	Enzimas		
	Beta-agalsidase	Aprovado	Aprovado
	Alfa-alglicosidase	Aprovado	Aprovado
	Alteplase	Aprovado	Aprovado
	Alfaelosulfase	Aprovado	Não aprovado
	GalNAc-4 sulfatase	Aprovado	Não aprovado
	DNase humana	Aprovado	Aprovado
	Hialuronidase	Aprovado	Não aprovado
	Imiglucerase	Aprovado	Não aprovado
	Laronidase	Aprovado	Não aprovado
	Tenecteplase	Aprovado	Aprovado
	Proteínas de fusão Fc		
	Abatacepte	Aprovado	Aprovado
	Aflibercepte	Aprovado	Aprovado
	Alefacepte	Aprovado	Aprovado
Belatacepte	Aprovado	Aprovado	
Etanercepte	Aprovado	Não aprovado	

HEK 293	Riloncept	Aprovado	Aprovado
	Ziv-aflibercepte	Aprovado	Aprovado
	Hormônios		
	Coriogonadotropina alfa	Aprovado	Não aprovado
	Folitropina alfa	Aprovado	Aprovado
	Folitropina beta	Aprovado	Aprovado
	Hormônio luteinizante	Aprovado	Aprovado
	Proteína osteogênica-1	Aprovado	Aprovado
	Tirotropina alfa	Aprovado	Aprovado
	Fatores de coagulação		
	Fator VIII	Aprovado	Aprovado
	Fator IX	Aprovado	Aprovado
	rFVIII Fc	Aprovado (2014)	Submetido (2014)
	rFIX Fc	Aprovado (2014)	Não aprovado
Dulaglutida	Aprovado (2014)	Submetido (2014)	
rhFVIII humano	Submetido	Aprovado (2014)	
HT-1080	Alfa-algasidase	Não aprovado	Aprovado (2001)
	Idursulfase	Aprovado (2006)	Aprovado (2007)
	Alfavelaglicerase	Aprovado (2010)	Aprovado (2010)
PER.C6	CL 184	Submetido	Não aprovado
	Mor 103	Fase clínica	Fase clínica

FDA, Food and Drug Administration, órgão dos Estados Unidos responsável pelo controle de alimentos e fármacos; EMA, European Medicines Agency, responsável pela proteção da saúde pública e animal dos países da União Européia; CHO, Célula de ovário de hamster; HEK, Célula de rim embrionário humano; rFVIII Fc, proteína de fusão Fc recombinante do fator VIII; rFIX Fc, proteína de fusão Fc recombinante do fator IX; rhFVIII, fator VIII recombinante humano.

As células HEK 293 possuem linhagens, que diferem entre si em características. Por exemplo, a HEK 293H e 293F se desenvolvem rápido em meio sem soro fetal bovino, alta produção de proteína e fácil transfecção e transdução, já a HEK 293T expressa o antígeno T do vírus símio 40, expressando grandes títulos de genes virais usados em terapia gênica (DUMONT et al., 2015; GHADERI et al., 2010).

1.3.1 Os sistemas de cultivo para células de mamífero

A produção de proteínas em células de mamíferos pode acontecer em sistemas, exemplificados na Figura 5. É importante estar atento se a célula produtora é aderente

ou não aderente, para proporcionar a forma adequada para seu crescimento (como uma superfície aderente no sistema de cultivo para as células aderentes), e consequente produção do alvo de interesse.

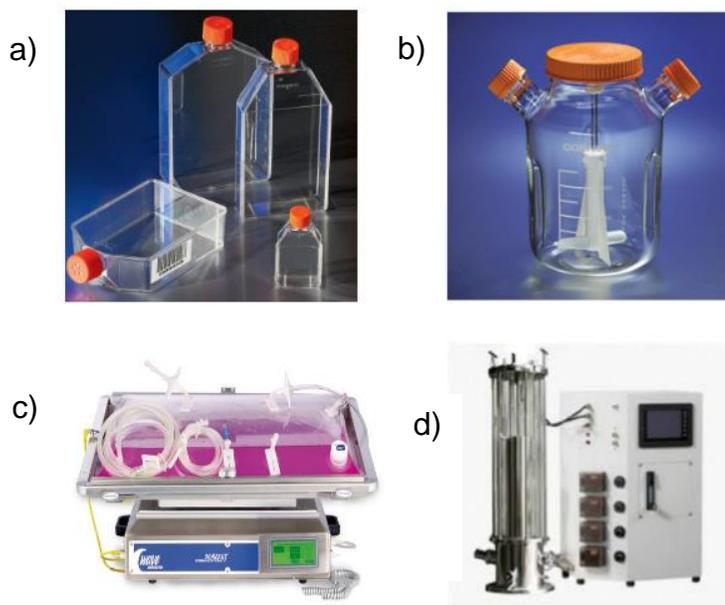


Figura 5. Exemplos de sistemas de produção de proteínas em células de mamífero: a) Garrafa, b) *Spinner*, c) *Wave*, d) *Air lift reactor* (Appleton Woods LTD; Spectrum Chemical MFG Corp; GE Healthcare Life Sciences; Bioreactor Sciences; Knbs).

A garrafa é a primeira forma de cultivo das células, representado na Figura 5 no item A, com baixo volume e de fácil manejo devido ao seu tamanho pequeno, importante para a adaptação celular e é recomendada quando se é necessário um grande volume das células para etapas posteriores (PHELAN; MAY, 2015; STEPHANO, 2015). Os frascos variam entre 25 cm² e 225 cm² e são feitos de poliestireno, possuindo tampa com filtro que possibilita a troca gasosa, suportam variação de temperatura entre -20 °C a 50 °C e possuem superfície tratada para crescimento celular (KASVI, 2019). Conhecidos por frasco T, possuem como desvantagem a impossibilidade de produzir grandes volumes da molécula de interesse (STEPHANO, 2015). Camillo (2009) utiliza essa forma de cultivo em seu estudo para cultivar células de mamífero e avaliar sua susceptibilidade à um agente infeccioso de bovinos.

O FibraStage® da New Brunswick Scientific possui uma plataforma fixa que abriga cerca de 4 frascos de 500 mL cada (GLASER, 2005). Os frascos se comprimem e expandem lentamente, onde na compressão o meio flui para as células aderidas a discos (chamados de discos FibraCell®, da mesma empresa), levando o aporte de nutrientes e removendo os metabólitos indesejados e, na expansão, o meio de cultura retorna para a garrafa, permitindo que ocorra a troca gasosa (MIZUKAMI, 2013). A visualização desse sistema para melhor entendimento encontra-se na Figura 6. Mizukami e Swiech (2018) usaram esse sistema para a produção de células estromais mesenquimais humanas e constataram um aumento na produção celular na ordem de 7, comparado a quantidade celular do inoculo após 7 dias.

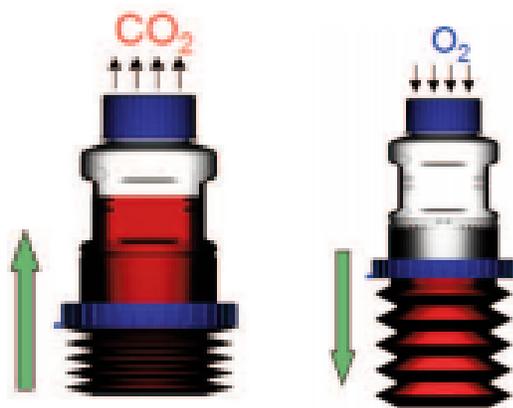


Figura 6. Esquemática do funcionamento do FibraStage® (Fonte: Knbs).

A produção pelo *spinner*, representado na Figura 5 no item B, é executada sob agitação, seja de um impelidor já existente no frasco ou por um agitador magnético, colocado sobre uma superfície que possa fornecer agitação ao sistema, garantido que as células, tenham acesso aos nutrientes do meio, tendo sempre cuidado para que a agitação não lise as células (MCLIMANS et al., 1957). Possui capacidade de volume que varia entre 100mL e 36 L, sendo um passo intermediário no processo de escalonamento antes de iniciar em fermentadores (DAVIS, 2007). No caso de células aderentes, para sistemas de cultivo de volumes mais amplos, microcarreadores podem ser utilizados para que as células se fixem a eles e circulem no meio, visando evitar aglomerados celulares que possam prejudicar a produção (GUPTA et al., 2014). Liu, Liu e Wu (2018) utilizaram

o *spinner* como uma das formas de cultivo para testes de escalonamento na utilização de um novo meio livre de s erum para a produ o de anticorpos contra IgG humano.

O sistema de produ o *wave*, representado na Figura 5 no item C, simula a agita o em ondas, como o próprio nome sugere. Uma bolsa plástica estéril (*bag*)   parcialmente preenchida de meio de cultura e células e repousa sobre uma plataforma de balanço. O espaço remanescente da bolsa   preenchido com ar. O movimento ondulatório garante a aera o eficiente e a mistura do meio sem danos celulares (CARVALHO et al., 2017; SINGH, 1999).   um sistema com capacidade entre 1 e 500 L, que não exige etapas de esteriliza o, diminui os danos celulares por cisalhamento por não utilizar agitadores mecânicos e promove uma transferência de massa mais eficiente devido ao aumento da área líquido-ar, principalmente quando a densidade celular se encontra mais alta, como $1,04 \times 10^8$ células/mL, (WANG et al., 2012; DECARLI et al., 2018). Por essas características, Decarli (2018) utilizou esse método como primeiro estágio de escalonamento em seu estudo da produ o da glicoproteína do vírus da raiva e cita que sua escolha por essa forma de produ o se deu pela representa o de uma abordagem nova no cultivo celular, mais econ mica que formas usuais.

Para uma produ o em larga escala, o reator representado na Figura 5 no item D que   do tipo *airlift* surge como alternativa, sendo relatado escalonamento de até 5.000 L para o cultivo de células de mamífero (PORTNER, 2015).   um reator com agita o pneumática (sem agita o mecânica) que inclui um tubo de conexão que permite criar um *looping* interno ou externo, promovendo uma boa agita o do meio tendo uma opera o mais ampla que colunas de bolhas, por exemplo (P RTNER, 2015; WERNER, 2018). Porém, Varley e Birch (1999), P rtner (2015) e Werner (2018) ressaltaram que quando o reator atinge uma alta densidade celular (maior que 20 gL^{-1}), a mistura eficiente fica comprometida além da velocidade de fluxo ficar, na maioria das vezes, acima daquela tolerada por células de mamífero (a velocidade de fluxo tolerada varia dependendo do tipo celular, mas a tolerabilidade   em torno de 1 ms^{-1}).

1.4. METABOLIZAÇÃO CELULAR

A compreensão do metabolismo celular na produção de um produto para fins comerciais é de extrema importância, principalmente quando o sistema de expressão utilizado é uma célula de mamífero, que demanda a utilização de meios com um balanço de aminoácidos, vitaminas, fontes de carbono para produção de energia (carboidratos na maioria das vezes), sais, e algumas vezes a utilização de soro fetal, o que o tornam mais caros que meios utilizados para outros sistemas de expressão (EAGLE, 1955). Eagle (1955) ainda afirma que a falta de algum desses componentes citados pode levar à morte celular prematura. A avaliação das fontes de energia e de metabólitos do meio fornece a informação do “estado celular”, ou seja, se possui fonte de energia e se a célula está consumindo-a, se a produção do produto de interesse não está sendo inibida por algum metabólito ou se há a presença de algum metabólito tóxico. As principais fontes de energia utilizadas em células de mamífero são a glicose e a glutamina (BIAGGIO, 2014). Os metabólitos mais comumente produzidos através desses dois substratos são o lactato e a amônia, e seus níveis devem ser monitorados pois possuem efeito inibitório, diminuindo a biomassa celular e o rendimento de produto (LEE et al., 2003). O lactato inibe o crescimento e o metabolismo celular através da acidificação do meio de cultura e de alteração em sua osmolaridade, já a ureia apresenta ser o principal metabólito inibitório, tendo como consequência de seu acúmulo a dificuldade em manter o gradiente eletroquímico celular e a indução da acidificação do citoplasma, aumentando o consumo de ATP para manter o pH em homeostase, podendo levar a célula a apoptose celular (OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992; CRUZ et al., 2000; RYLL; VALLEY; WAGNER, 1994).

A Figura 7 apresenta a via metabólica em células de mamífero tanto para a glicose quanto para a glutamina, mostrando como o lactato e a amônia são formados. De forma resumida, o lactato provém do piruvato, que é gerado tanto na via glicolítica quanto no ciclo dos ácidos tricarboxílicos; já a amônia (NH_4^+) é produto do metabolismo da glutamina e sua conexão com a ureia será explicada a seguir (RAMOS, 2014).

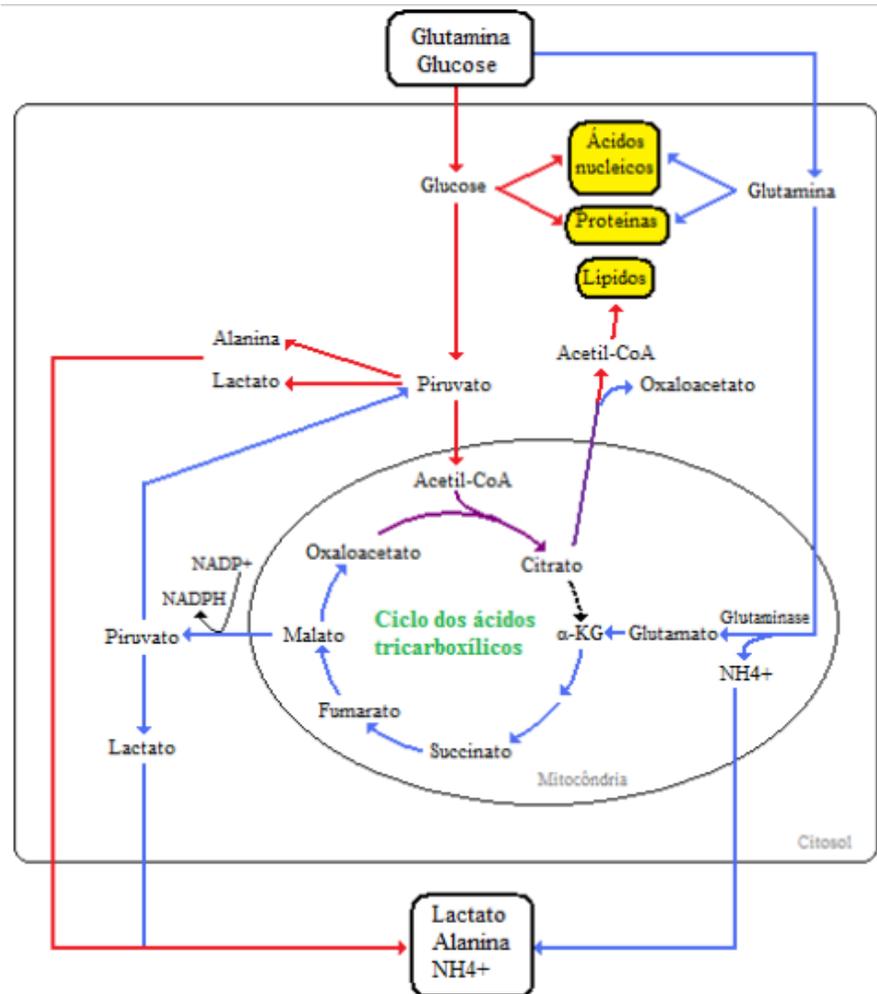
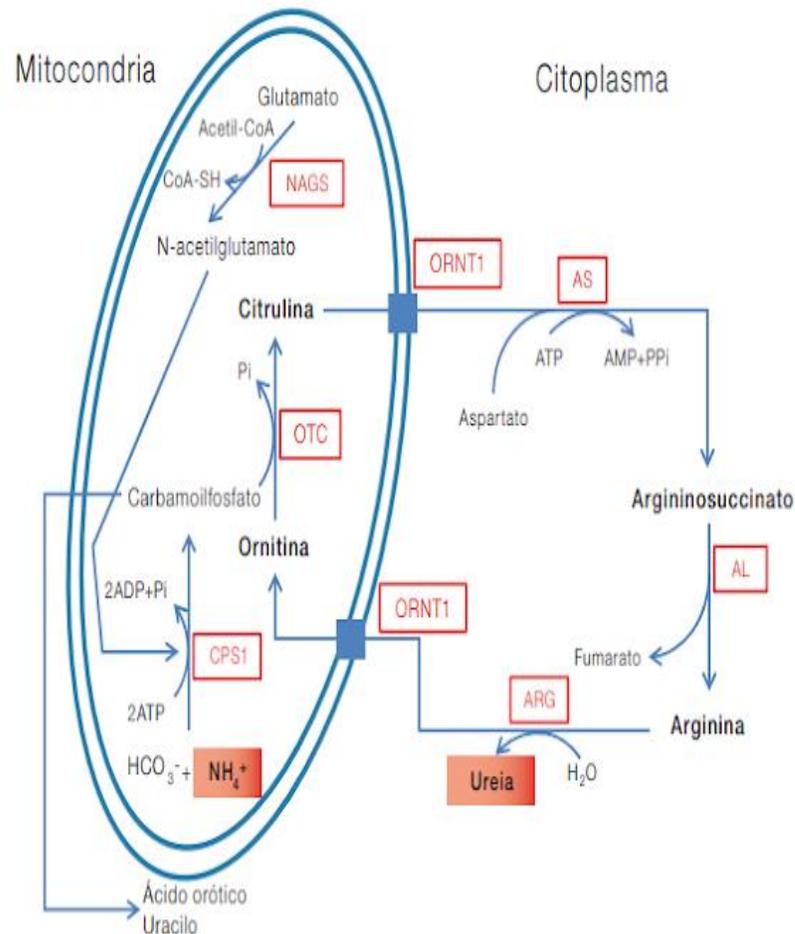


Figura 7. Esquematização do metabolismo de Glicose e Lactato em células de mamífero. Em azul, está representada a via glutaminolítica e em vermelho, a via glicolítica (Fonte: Ramos, 2014).

No corpo humano, a amônia é incorporada pelos astrócitos na estrutura conhecida como glutamina, um aminoácido responsável pelo transporte dessa substância de forma segura no organismo; atua na gliconeogênese e no desenvolvimento celular (ALBRECHT; NORENBORG, 2006; CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009). O ciclo da ureia, representado na Figura 8, ocorre majoritariamente no fígado (parte dentro da mitocôndria da célula e parte no citosol) e é responsável por produzir a ureia, que é a forma de excreção da amônia do organismo, através da urina (KATUNUMA; OKADA; NISHII, 1966; HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 2000). Logo, é possível entender como a

ureia é produzida a partir da glutamina, pois quando a célula a hidrolisa, libera amônia que é convertida em ureia para excreção.



NAGS - N-acetilglutamato sintetase; CPS1 - carbamoilfosfato sintetase 1; AS - argininosuccinato sintetase; AL - argininosuccinato ilase; ARG - arginase; OTC-ornitina transcarbamilase; ORNT1 - transportador mitocondrial da ornitina/citrulina.

Figura 8. Representação do ciclo da ureia (Fonte: ROCHA et al., 2016).

1.5. PURIFICAÇÃO

A purificação é uma etapa crucial em qualquer bioprocessamento, principalmente quando se trata de um produto para uso em humanos. A parte do processo conhecida

como *downstream* consiste em obter uma forma farmacologicamente apta (que tenha função no corpo humano e que tenha dose terapêutica segura) para utilização a partir de um meio de produção, na maior quantidade e com a menor perda possível durante o processo (BERTHOLD; WALTER, 1994). Não existe um método único de purificação para todas as proteínas, pois diferem entre si em relação à sequência de aminoácidos, peso molecular, características de interações hidrofóbicas e hidrofílicas, afinidade com outras moléculas, entre outros, evidenciando a necessidade de um método específico para cada proteína (GRÄSLUND et al., 2008).

Além de garantir que a perda de proteína seja a mínima possível durante o processo, é necessário assegurar que se tenha atividade biológica e seja duradouro para que o fármaco tenha uma vida de prateleira viável, que não forneça riscos à saúde humana e que tenha uma comercialização rápida (NFOR et al., 2009).

1.5.1 Colunas de Purificação

As colunas de purificação são parte essencial do processo e interferem diretamente na pureza e na recuperação proteica. A coluna de níquel é uma coluna de afinidade que purifica proteínas que possuam grupos de histidina expostos (BABAVALIAN ET AL., 2016; CHOI ET AL., 2011).

Babavalian et al. (2016) utilizaram a coluna de afinidade por níquel Ni-NTA na purificação do PDGF-BB produzido pela levedura *Pichia pink*, uma coluna de alta performance recomendada para purificações em uma etapa, obtendo a proteína com estrutura ativa após a purificação. Choi et al. (2011) utilizaram a mesma coluna Ni-NTA para a purificação da mesma proteína produzida, dessa vez, em *Pleurotus eryngii*, obtendo um homodímero com tamanho de 32 kDA e atividade biológica similar ao do padrão, constatado pela promoção da proliferação de células NIH-3T3 através do PDGF-BB produzido

As colunas de troca iônica utilizam as diferenças de cargas elétricas entre as moléculas para promover sua separação e são utilizadas para proteínas que não possuem marcadores (*tags*) ou proteínas em sua forma nativa, necessitando de testes

entre as diferentes opções para a escolha do melhor perfil de purificação (GE HEALTHCARE, 2018). Para purificar os monômeros de PDGF-B produzidos por *Escherichia coli* para posterior processo de dimerização, Karumuri et al. (2007) utilizaram cromatografia por fase reversa (coluna Source-30 com matriz de poliestireno/divinilbenzeno), que tem como princípio a forte troca iônica de cátions, e um gradiente de acetonitrila para eluição. Seis picos principais foram escolhidos e selecionados somente os picos que se encontraram entre 30% e 40% de acetonitrila, como tendo o monômero com aproximadamente 85% de pureza. Outro estudo, porém, utilizou uma coluna de Sepharose-CM que também é de troca iônica mas com fraca troca catiônica, para purificar PDGF-BB produzido em *Saccharomyces cerevisiae*, seguido de Sephadex G-75, uma resina de filtração em gel que de-saliniza e promove troca de tampões, tendo como recuperação cerca de 20,28% de proteína e esclarecendo que o processo necessita ser melhorado para aumentar a recuperação após o processo, estimando que 50% da proteína foi perdida durante o processo de dessalinização (WANG et al., 2009).

A coluna de afinidade por heparina é uma ferramenta por muitas vezes utilizada para purificação, especialmente de fatores de crescimento e proteínas plasmáticas, que possuem regulação por heparina e seus derivados no corpo humano, possuindo assim afinidade natural à heparina (HAO et al., 2019). O PDGF, por exemplo, é uma proteína hidrofóbica, resistente ao calor e à desnaturação química, pertencente à família das proteínas ligantes à heparina e tais características servem como guia para a escolha da coluna para purificação da proteína (COOL; NURCOMBE, 2018; STROOBANT; WATERFIELD, 1984). Bustos-Valenzuela et al. (2010) utilizaram células 293T humanas para a produção da proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7), que é um fator de crescimento multifuncional secretado. Para sua purificação, utilizaram da afinidade dos fatores de crescimento por heparina e o processo ocorre em apenas uma etapa com a coluna HiTrap™ Heparin HP, com eluição sequencial de 300 mM de NaCl e 500mM de NaCl no mesmo tampão Tris 20 mM, com percentual de recuperação de 25,4% com 300mM e 54,6% com 500mM, tendo um total então de recuperação de 80%. Chen et al. (2018) purificaram PDGF-BB produzido em bicho-da-seda através de uma eluição com alta concentração de NaCl também na coluna de afinidade a heparina, com recuperação

em torno de 50,2% e pureza de 82%. A recuperação pode não ter sido maior devido à ligação de proteínas endógenas do sistema de expressão que também possuíam afinidade à heparina.

Visto as diversas possibilidades de colunas e processos existentes para a purificação, um equipamento foi desenvolvido com a finalidade de atender a demanda por esse processo, o ÄKTA da GE Healthcare., que se tornou um dos equipamentos mais utilizados para as etapas de purificação de biofármacos. Tal sistema permite obter purificados com maior pureza da proteína (ou seja, menor quantidade de contaminantes por amostra purificada), levando-se em consideração alguns pontos, tais como: a escolha da coluna e seu tamanho, baixa afinidade dos contaminantes pela coluna e a quantidade de proteína aplicada para o processo de purificação, para que não exceda a capacidade de ligação da coluna e se perca proteína durante o processo (GRÄSLUND et al., 2008). Para a purificação de proteínas ligantes ao fator de crescimento humano semelhante à insulina produzidas em células HEK293, Wanscher et al. (2015) utilizaram o ÄKTA com a coluna StrepTactin, com teores de recuperação em torno de 40-70% (onde sua produção girava em torno de 12 mg/L).

1.6. JUSTIFICATIVA

A busca pela otimização do processo de purificação que reúna a obtenção da proteína com baixo teor de contaminantes, com bons índices de recuperação e com o menor custo possível é constante, e as metodologias abordadas por diferentes trabalhos também podem servir de guias para a purificação do PDGF-BB. É importante o estudo da purificação em escala de bancada, para garantir que esse processo possa ser escalonado, garantindo as mesmas características obtidas em laboratório. Nfor et al. (2009) ainda afirmam que a demanda no mercado por proteínas para uso medicinal tem crescido, mas permanecem com um custo de produção alto, sendo entre 50 a 80% desse custo constituído pelo processo *downstream*, tornando-se necessário transformar essa etapa do processo mais viável economicamente.

Portanto, esse trabalho possui como foco o estudo de colunas para a purificação da proteína rhPDGF-BB produzidas em células HEK 293T, buscando alternativas para ampliar percentuais de recuperação e diminuir os custos operacionais com o processo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer o processo de purificação do fator de crescimento recombinante humano derivado de plaquetas (rhPDGF-BB) produzido em célula de mamífero do tipo HEK 293T.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar glicose, lactato e glutamina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para estudo do metabolismo celular e possível intervenção, se necessário, no processo de produção da proteína de interesse;
- Validar o teste colorimétrico para análise de glicose, lactato e ureia de forma rápida e eficaz, frente aos resultados em HPLC.
- Utilizar duas colunas de purificação e avaliar processos envolvidos (como diálise, quando necessário) após purificação e definir a opção mais viável levando em consideração os custos e os níveis alcançados de purificação;
- Executar testes qualitativos e quantitativos após purificação para constatar a presença e a concentração da proteína na amostra, assim como testar a atividade biológica por teste *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Um fluxograma com todas as etapas realizadas neste trabalho está representado na Figura 9.

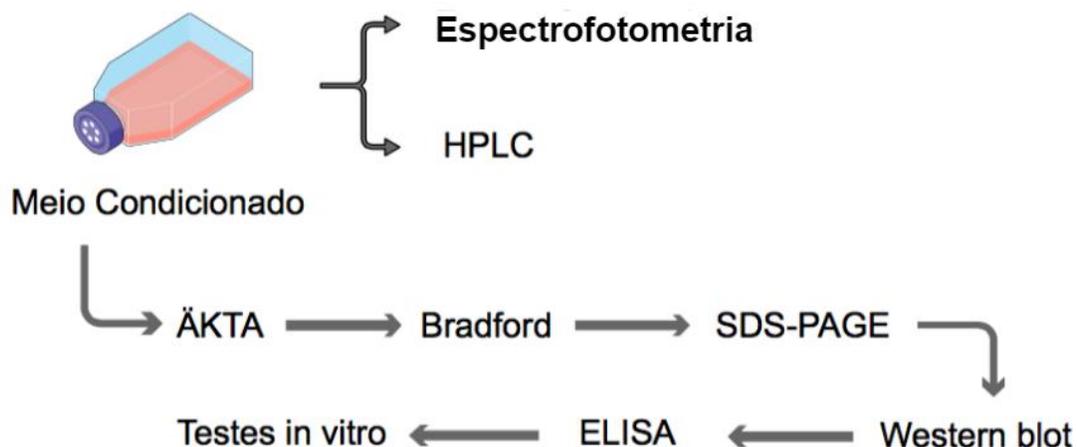


Figura 9. Fluxograma dos processos desde o meio condicionado até a verificação *in vitro* da atividade biológica da proteína rhPDGF-BB obtida através de cultivos celulares no laboratório.

3.1. OBTENÇÃO DE CLONES DE CÉLULAS HEK 293T SUPERPRODUTORES DE rhPDGF-BB

As células utilizadas nesse trabalho foram cedidas pelo Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), que compõe a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). A clonagem foi elaborada através de um vetor lentiviral contendo o cDNA de PDGF-BB obtido a partir de fibroblastos ou megacariócitos, clonado no vetor pNU-0. O sequenciamento de DNA foi realizado afim de comprovar a integridade da sequência do PDGF-BB inserida. A Figura 10 mostra a esquematização da produção dos clones produtores de rhPDGF-BB.

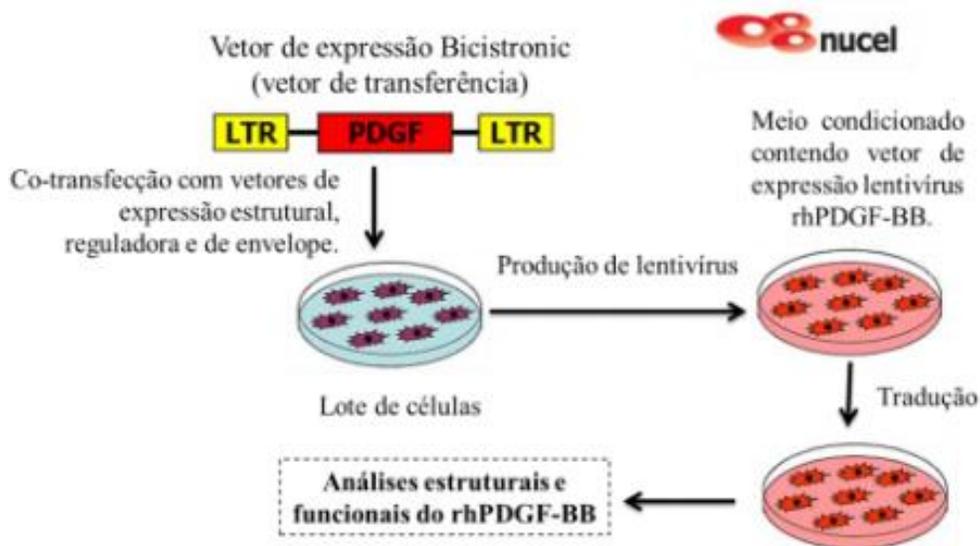


Figura 10. Esquematização da obtenção dos clones de HEK293T produtores de rhPDGF-BB realizada pelo NUCEL.

3.2. AMOSTRAS

As amostras foram obtidas através do cultivo de células HEK 293T produtoras de rhPDGF-BB. Esta etapa foi realizada por Rosana Cavalcante, mestrande e componente do mesmo grupo de trabalho, que teve como proposta o estudo e aprimoramento *upstream* da produção da proteína. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, ref.: 12100-046) da marca GIBCO com 10% de soro fetal bovino também da empresa GIBCO (ref.: 12657-029), na incubadora da marca Panasonic (modelo MCO-18ACL) a 37 °C com 5% de CO₂ saturado em umidade. O meio resultante desse cultivo celular, denominado de “meio condicionado”, foi o material utilizado para os processos de análise, purificação e estabelecimento deste trabalho.

3.3. DETECÇÃO DE GLICOSE, LACTATO E URÉIA

3.3.1 Espectrofotômetro

O espectrofotômetro utilizado foi o *Softmax M3*, utilizando o programa *Softmax Pro 6* para análise com o método de ponto final. Três kits colorimétricos foram utilizados para a detecção de glicose, lactato e ureia de amostras advindas de cultivos com células HEK 293T produtoras de rhPDGF-BB: kit glicose liquiform da Labtest (ref.: 133), kit lactato enzimático (ref.:138) da Labtest e kit uréia UV – liquiform da Labtest (ref.:104), respectivamente. As quantificações de glicose e lactato foram feitas com o uso da microplaca *96 well standard clrbtm* e a de uréia foi feita utilizando cubeta. Todos os testes seguiram os protocolos disponibilizados pelo fornecedor – Labtest, descritos resumidamente a seguir:

- Glicose

Para a detecção de glicose, misturou-se vigorosamente os itens pipetados relacionados na Tabela 3 e ficaram em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. A absorbância foi detectada em 505 nm, considerando o branco como zero (0). Os volumes necessários de amostra, padrão e reagente para obtenção do branco, do teste e do padrão também estão descritas na Tabela 3. Os resultados foram obtidos através do cálculo da absorbância do teste dividida pela absorbância do padrão, multiplicado por 100. O resultado é dado em mg/dL.

Tabela 3. Quantidade de amostra, padrão e reagente para detecção colorimétrica de glicose a partir do branco, do teste e do padrão.

	Branco	Teste	Padrão
Amostra (mL)	0	0,01	0
Padrão (mL)	0	0	0,01
Reagente (mL)	1,0	1,0	1,0

- Lactato

Para a detecção de lactato, os itens pipetados relacionados na Tabela 4 foram homogeneizados e colocados em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. A absorbância foi determinada a 550 nm, considerando o branco como zero (0). Os volumes necessários de cada componente para determinação do branco, do teste e do padrão estão na Tabela 4. O resultado é dado em mg/dL e foi obtido pela divisão da absorbância do teste pela absorbância do padrão, multiplicado por 40.

Tabela 4. Quantidade de amostra, padrão, água e reagente para detecção colorimétrica de lactato a partir do branco, do teste e do padrão.

	Branco	Teste	Padrão
Amostra (mL)	0	0,01	0
Padrão (mL)	0	0	0,01
Água (mL)	0,01	0	0
Reagente de trabalho (mL)	1,0	1,0	1,0

- Ureia

Para a detecção de ureia, ajustou-se a temperatura do fotômetro para 37 °C e o comprimento de onda para 340 nm. O zero foi acertado com água deionizada. Em um eppendorf, adicionou-se 1,0 mL do reagente de trabalho à temperatura de trabalho por 1 minuto. Adicionou-se 0,01 mL de amostra, sendo homogeneizado e transferido imediatamente para cubeta termostatizada a 37 °C, medindo a absorbância aos 30 segundos e aos 90 segundos. Para obtenção do padrão, realizou-se a leitura sem misturar a amostra. O resultado foi obtido em duas etapas:

- O ΔA foi encontrado, sendo obtido pela subtração da absorbância aos 30 segundos da absorbância aos 90 segundos, tanto do padrão quanto das amostras.
- A concentração de ureia foi calculada com a equação a seguir:

$$\text{Uréia} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\Delta \text{Ateste}}{\Delta \text{Apadrão}} \times 70$$

3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para detecção de glicose e metabólitos.

O HPLC da marca *PerkinElmer*, modelo Flexar foi cedido pela Central Analítica de Química da UnB (CAIQ). A coluna utilizada para detecção foi a Shim-pack SCR-101H, da marca SHIMADZU, uma coluna de exclusão iônica. Neste equipamento foram analisadas as concentrações de glicose, lactato e glutamina de amostras advindas de cultivos com células HEK 293T produtoras de rhPDGF-BB. Ureia não foi analisada, pois não foram constatadas mudanças significativas de concentração nos testes colorimétricos. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 5 mM, o fluxo foi de 0,6 mL/min e a temperatura fixada em 40 °C. Para a corrida no HPLC, foram preparados 10 pontos de padrões, do mais diluído (água) até o mais concentrado, seguindo as concentrações da Tabela 5. A glicose foi detectada por índice de refração (RI) e o lactato e glutamina, detectados por luz ultravioleta (UV).

Tabela 5. Concentrações dos 10 pontos dos padrões utilizados de glicose, lactato e glutamina para detecção em HPLC.

	Glicose (g/L)	Lactato (g/L)	Glutamina (g/L)
Mais diluído	0	0	0
	0,0625	0,0156	0,0125
	0,125	0,03125	0,025
	0,25	0,0625	0,05
	0,5	0,125	0,1
	1	0,25	0,2
	2	0,5	0,4
	4	1	0,8
	8	2	1,6
Menos diluído	10	2,5	2

O equipamento utilizado não fornecia um software para o tratamento dos dados, nos sendo fornecido somente uma tabela que indicava tempo de corrida em segundos X absorvância. Assim, se fez necessário o tratamento dos dados manualmente, através do software OriginPro8, indicado pelo técnico responsável pelo equipamento. Todas as 40 amostras foram analisadas manualmente e individualmente para o índice de refração (RI) e a luz ultravioleta (UV). Para determinação dos picos, foi plotado para a leitura da UV o padrão mais concentrado, o meio e duas amostras para determinação dos picos. O primeiro pico da UV foi determinado como ácido láctico pois no padrão existia um grande pico, no meio era praticamente nulo e nas amostras os picos apareciam, porém menores que no padrão. O pico da glutamina foi detectado pois foi decaindo do padrão, meio e amostra. O pico de glicose era o único com padrão no RI. Sendo assim, o pico de glicose, detectado pelo RI, apareceu com tempo de retenção aproximado de 8 minutos, o pico de lactato, detectado pela UV, com 10 minutos e o da glutamina, detectado na UV, com 15 minutos. Com a determinação dos picos, a área sob a curva foi calculada para determinar a concentração de cada composto em cada amostra. O equipamento havia passado por problemas técnicos pouco tempo antes da realização das leituras, e em algumas amostras a detecção não foi realizada ou não pode ser analisada devido à baixa definição dos picos e presença de picos interferentes.

3.4. PURIFICAÇÃO EM ÄKTA *PURE*

O ÄKTA *pure* (GE Healthcare) é um sistema de cromatografia para purificação de proteínas. O software de controle é o *Unicorn*, desenvolvido pela mesma empresa. As soluções necessárias para cada uma das colunas foram indicadas de acordo com o fabricante das colunas cromatográficas utilizadas neste trabalho. Para todas as soluções foi imprescindível a filtração em membrana GS em éster de celulose com 0,22 µm de poro e 47 mm de diâmetro, branca e lisa, da marca Millipore, e a de-aeração por 20 minutos antes do uso no equipamento, para evitar qualquer bloqueio por resíduos ou bolhas de ar, tanto na coluna como no equipamento, que poderiam levar a erros na leitura ou danificar tanto a coluna quanto a célula da luz UV.

As amostras foram selecionadas com o propósito de estabelecer a produção em diferentes fases do cultivo celular: quando as células chegaram e durante os dois processos em Fibra-Stage executados. As amostras selecionadas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Amostras selecionadas para purificação no ÄKTA Pure.

Amostra	Data de coleta da amostra	Tempo de Cultivo (horas)	Processo
1	21/08/2017	72	Garrafa
2	09/03/2018	43,5	Inoculo <i>Fibra Stage 1</i>
3	12/03/2018	72	<i>Fibra Stage 1</i>
4	14/03/2018	120	<i>Fibra Stage 1</i>
5	16/03/2018	147	<i>Fibra Stage 1</i>
6	19/03/2018	243	<i>Fibra Stage 1</i>
7	25/07/2018	624	<i>Fibra Stage 2</i>
8	22/03/2019	—	Garrafa
9	22/03/2019	—	Subcultivo de Garrafa

É importante ressaltar que a amostra 1 é do primeiro mês de cultivo celular depois que as células produtoras chegaram ao laboratório (advindas do Núcleo de Terapia Celular e Molecular - NETCEM/FMUSP, em agosto de 2017), a amostra 2 é o inoculo do primeiro Fibra-Stage e as amostras 3, 4, 5 e 6 foram coletadas durante o processo, sendo a amostra 6 o final do mesmo experimento. A amostra 7 foi coletada de um segundo Fibra-Stage, realizado no mês de julho de 2018, e tem como propósito verificar se a produção da proteína continuou similar. As amostras 8 e 9 são de garrafas cultivadas em março de 2019 e foram analisadas para verificar a estabilidade das células, observando sua aderência e detectando a proteína no meio metabolizado, se ainda possuem as modificações feitas e são produtoras. Não foi possível realizar o sequenciamento genético das células para comprovar a estabilidade das alterações feitas em seu genoma,

então a detecção da produção do rhPDGF-BB através de purificações no ÄKTA e SDS-PAGE foram as formas utilizadas para essa avaliação.

Para todas as amostras, independente da coluna de purificação utilizada, o seguinte processo foi executado: as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro 0,20 µm e só então as amostras foram aplicadas para purificação no ÄKTA. Um fluxograma das etapas está representado na Figura 11. O ÄKTA possui um fracionador, onde as amostras foram coletadas após a eluição da coluna. Tubos foram usados para coletar cada fração, para posterior análise das frações que abrangem o pico de interesse.

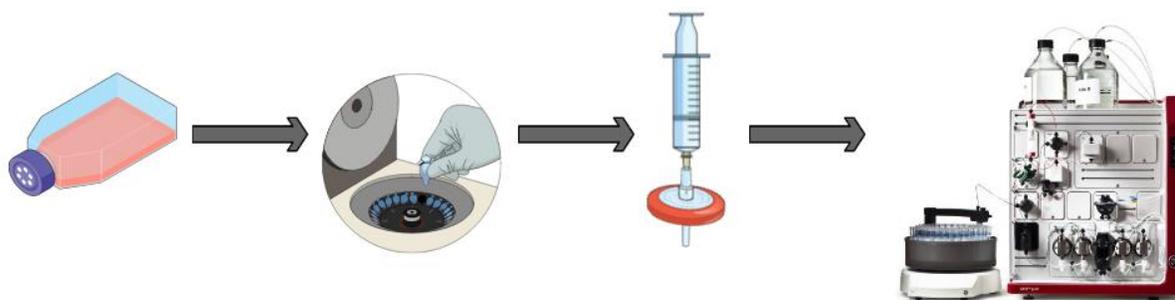


Figura 11. Fluxograma do processo executado nas amostras antes da aplicação no equipamento ÄKTA

3.4.1 Coluna HiTrap Heparin HP

A coluna *HiTrap Heparin HP* (capacidade de 1 mL) da GE Healthcare é uma coluna de afinidade por heparina indicada para purificação de proteínas. Para sua utilização, dois tampões foram elaborados:

- *Binding Buffer*, pH 7
Fosfato de sódio 10 mM
- *Elution Buffer*, pH 7
Fosfato de sódio 10 mM

NaCl 1-2 M*

*Utilizamos 1 M

Após problemas com os tampões discutidos nos resultados, os colaboradores da Universidade de São Paulo (USP) que já usam a coluna para a purificação da proteína foram contatados, nos sendo indicado as seguintes soluções:

- *Binding Buffer*, pH 7,2 – 7,4
Tris 20-50 mM*
- *Elution Buffer*, pH 7,2 – 7,4
Tris 20-50 mM*
NaCl 1 M

*Utilizamos 20 mM, pH 7,4.

As corridas foram executadas com velocidade de 1 mL/min. A coluna foi lavada com água Mili-Q para retirar o álcool de seu interior por 20 minutos. A coluna foi equilibrada com *Binding Buffer* por mais 15 minutos. Após a amostra ser aplicada na coluna, a etapa de lavagem com o *Binding Buffer* é recomendada pelo fabricante e durou 10 minutos. A eluição foi feita com a *Elution Buffer* e durou 10 minutos. A coluna foi lavada com *Binding Buffer* e reequilibrada para outras amostras. Após o final do seu uso, foi armazenada em etanol 20%.

3.4.2 Coluna HiTrap Phenyl FF (High Sub)

A segunda coluna utilizada foi a coluna de interação hidrofóbica *HiTrap Phenyl FF (high sub)* da GE Healthcare com capacidade de 5 mL. Para essa coluna, dois tampões foram necessários para a purificação das amostras:

- *Start Buffer*, pH 7,0
Fosfato de sódio 50 mM
Sulfato de amônia 1 M

- *Elution Buffer*, pH 7,0

Fosfato de sódio 50 mM

O primeiro processo feito no ÄKTA foi feito com a *Start Buffer* com molaridade diferente da apresentada acima (sulfato de amônia a 1,5 M ao invés de 1 M, a explicação para a mudança encontra-se nos resultados).

A velocidade utilizada para essa coluna foi de 2 mL/min. A coluna foi lavada com água Mili-Q para retirar o álcool de seu interior por 40 minutos. A coluna foi equilibrada com *Start Buffer* por mais 50 minutos. Após a amostra ser aplicada na coluna, a etapa de lavagem com *Start Buffer* é recomendada pelo fabricante e durou 25 minutos. A eluição foi feita com a *Elution Buffer* e durou aproximadamente 1 hora. A coluna foi lavada com *Start Buffer* e reequilibrada para outras amostras. Após o final do seu uso, foi armazenada em etanol 20%.

Após o processo de purificação com essa coluna, uma diálise se torna necessária, com o objetivo de tirar o sal da amostra. As soluções usadas para a diálise foram, na ordem:

- Tris HCl 50 mM, pH 8,0
- Acetato de sódio 25 mM, pH 4,5

A amostra ficou em cada solução entre 12-16 horas, a aproximadamente 4 °C.

3.5. MÉTODO DE BRADFORD

O método de Bradford foi feito na amostra purificada pelo ÄKTA *pure*, para detecção de proteína no pico obtido. O reagente utilizado foi o reagente de Bradford da SIGMA (código: B6916) e *Bovine Albumin Fraction V* (BSA) para elaboração da curva padrão nas seguintes concentrações: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL e 0,0625 mg/mL. A curva padrão teve como função a determinação das concentrações das amostras através da absorbância obtida e para cada ponto da curva, fornecida por uma equação da reta. Foram feitas triplicatas, tanto dos padrões quanto das amostras. O teste foi feito na microplaca de 96 poços e a leitura realizada no espectrofotômetro *Softmax M3*, a 595 nm, utilizando o programa *Softmax Pro 6*. Na microplaca foram pipetados 10

μL de BSA mais 200 μL de reagente para os pontos da curva e 10 μL de amostra mais 200 μL de reagente para os pontos que se desejava determinar a concentração de proteínas.

$$\text{Equação a reta: } y = 1,38x - 0,084 \rightarrow R^2 = 0,97$$

3.6. MÉTODO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA

Esse método teve como característica quantificar proteínas na faixa de 280 nm, na qual apenas os aminoácidos triptofano, tirosina e cisteína são detectados (ZAIA, 1998). Como as amostras estavam purificadas antes da quantificação, foi possível aplicar essa forma de detecção. É importante ressaltar que a estrutura da proteína possui o aminoácido triptofano. Para esse método, foi necessário obter o coeficiente de extinção molar para aplicar na fórmula de Lambert-Beer. A fórmula está descrita a seguir:

$$A_{280} = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Onde: A_{280} = absorvância a 280nm

ϵ = coeficiente de extinção molar

l = espessura da cubeta

c = concentração do composto

A fórmula de Lambert-Beer fornece como resultado a concentração em mol. Para obter a concentração em mg/mL, deve-se multiplicar o resultado pelo peso molecular da proteína em Da, sendo esse igual a 24570,92 Da. Os dados de coeficiente de extinção molar e peso molecular foram obtidos através do site ProtParam, após obtenção da sequência da proteína no site UniProt.

3.7. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS (SDS-PAGE)

Após a detecção de presença proteica pelo método de Bradford para as amostras da coluna *HiTrap Phenyl FF (high sub)* e pelo método de absorção no ultravioleta para

as amostras da coluna *HiTrap Heparin HP*, o SDS-PAGE foi feito para confirmar o peso molecular da proteína presente, conferindo sua compatibilidade com o tamanho do rhPDGF-BB. O gel utilizado foi o gel separador 12% e gel concentrador 5%.

- Gel Separador (volumes para 1 gel):
 - 1,7 mL de água
 - 2 mL de acrilamida 30%
 - 1,25 mL de Tris 1,5 M (pH 8,8)
 - 150 μ L de SDS 10%
 - 50 μ L de persulfato de amônio 10%
 - 3 μ L TEMED
- Gel Concentrador (volumes para 1 gel):
 - 1,75 mL de água
 - 0,41 mL de acrilamida 30%
 - 0,34 mL de Tris 1,5 M (pH 6,8)
 - 75 μ L de SDS 10%
 - 25 μ L de Persulfato de amônio 10%
 - 3 μ L de TEMED

O marcador de peso molecular utilizado para todos os géis foi o *Precision Plus Protein™ All Blue Standarts* da BIO RAD, que está representado na Figura 12.



Figura 12. Marcador de peso molecular utilizado para todos os géis: *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* da BIO RAD.

As amostras foram preparadas da seguinte forma: 20 µL de cada amostra foram misturados à 5 µL de tampão de amostra e aquecidos a 100 °C por 10 minutos, para que as proteínas fossem desnaturadas. Desse conteúdo, 20 µL de cada amostra preparada foram pipetados no gel. A voltagem utilizada para as corridas foi de 100 V, com duração entre uma hora e meia e duas horas. Seguiu-se a coloração do gel de poliacrilamida. A coloração por *Coomassie Blue* só é capaz de corar se houver, no mínimo, 30 ng de proteína por banda, no método mais eficiente, ao contrário do método de coloração por nitrato de prata que possui maior sensibilidade e é capaz de corar a partir de 1 ng de proteína (CANDIANO et al., 2004). Sendo assim, para as amostras detectadas pelo Bradford usou-se *Coomassie blue* para corar o gel e para as amostras detectadas pelo método da ultravioleta corou-se com nitrato de prata, que é mais sensível e tem capacidade de corar menores concentrações de proteína.

Tampões e corantes:

- Tampão de amostra 2X (Loading Buffer-2x)
Tris HCl pH 6,8 100 mM
SDS 4,0%

Azul de bromofenol 0,2%

Glicerol 20,0%

- Tampão de corrida 10X

Tris 250 mM

Glicina pH 8,3 2,5 M

SDS 1%

- Corante coomassie blue (1L)

Coomassie blue 2,5 g

Metanol 450 mL

Ácido acético glacial 100 mL

Água Milli-Q 450 mL

- Coloração por nitrato de prata

Acetona 50%

TCA 50%

AgNO₃ 20%

Na₂S₂O₃.5H₂O 10%

Na₂CO₃

HCHO₂ 37%

Ácido acético 1%

3.8. CONCENTRAÇÃO E DIÁLISE DAS AMOSTRAS

Como o processo de eluição da proteína pelo equipamento ÄKTA é feita através da passagem de tampão pela coluna, a amostra acabou se diluindo. Como a concentração de proteína por amostra já era baixa devido ao sistema de produção, foi necessário concentrar as amostras para análises posteriores.

O concentrador a vácuo Speed Vac, modelo RVC 2-18 CDplus da marca CHRIST foi utilizado para concentrar as amostras em *ependorfs*, por 2 horas a 60 °C. A

concentração ocorreu para que a proteína tivesse quantidade mínima necessária para que pudesse ser identificada no SDS-PAGE.

Como no gel não foi possível visualizar nitidamente as bandas de interesse e era necessário dialisar a amostra para que pudesse ser detectada no MALDI ou por HPLC, optou-se por utilizar o Vivaspin 2, 10 kDa MWCO da GE Healthcare (cod.: 28-9322-47), que tem capacidade de 2mL e era adequado para que não se perdesse proteína durante o processo pois a empresa recomenda que se use um MWCO (corte de peso molecular, ou *molecular weight cutoff*) pelo menos 50% menor que o tamanho da molécula de interesse (que nesse caso, possui ~25 kDa). Para essa etapa, as duas frações coletadas no ÄKTA para cada amostra foram unidas e tiveram os volumes completados para 2 mL com água Mili-Q (volume máximo do Vivaspin), sendo centrifugadas por 8 minutos a 3600 rpm com temperatura de 19 °C. O descarte foi coletado e foi adicionado mais 1,5 mL de água para repetir o mesmo procedimento, tendo ao final o descarte novamente coletado e a fração dialisada e concentrada, em torno de 30 µL, armazenada. O processo de completar o volume da amostra com água e de repetir esse processo foi indicado pelo fabricante e é importante para aumentar a eficiência da diálise, pois ocorre a diluição do sal da amostra, facilitando sua separação junto com a água durante a concentração.

3.9. Detecção por HPLC após purificação

A detecção por HPLC foi executada para quantificar o rhPDGF-BB nas amostras purificadas. O HPLC utilizado foi cedido pela Universidade Católica de Brasília e a aluna Gabriela Carneiro foi ao local para executar as análises em fase reversa. O padrão de rhPDGF-BB com concentração de 5 ng/mL foi diluído em água (20 µL de padrão + 80 µL de água) e foi injetado na coluna Shimpack VP-ODS com temperatura controlada de 30 °C, com fase móvel pronta de acetonitrila pura com 0,1% de ácido trifluoroacético. A leitura foi feita em 216 nm e 280 nm. O motivo das outras amostras não terem sido detectadas no equipamento encontra-se no tópico Resultados e Discussão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETECÇÃO DE GLICOSE, LACTATO, UREIA E GLUTAMINA E VALIDAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO RÁPIDO

A importância do monitoramento de compostos como glicose, lactato, ureia e glutamina já foram explicitados anteriormente neste trabalho. A detecção por HPLC é considerada a forma mais precisa de detecção e é amplamente utilizada, mas diversos autores buscam outras formas de quantificação que tenham resultados que se correlacionam com resultados gerados por HPLC (MAGRI et al., 2018; ROMEU-NADAL et al., 2018). O trabalho de Yardimci et al. (2019) é um exemplo da busca por novas formas de quantificação, e testa o monitoramento da fotodegradação de ácido húmico por um método colorimétrico e relata ter resultados tão eficientes quanto os obtidos no HPLC. Ryu et al. (2017) relata em seu estudo de determinação de capsaicinoides presentes em pimentas as dificuldades da utilização do HPLC, como a necessidade de equipamentos de maior valor, custo e tempo, que por vezes acaba impossibilitando sua utilização, e por isso também sugere um teste colorimétrico como alternativa, demonstrando sua acurácia e sua aplicabilidade em seu estudo, com o benefício de usar equipamentos mais simples, em menor tempo.

Sendo assim, as detecções de glicose e lactato foram feitas por testes colorimétricos assim como pelo HPLC, para traçar um perfil de correlação e visualizar suas aplicabilidades para monitoramento em tempo real do meio de cultivo celular. Das 40 amostras analisadas através do HPLC, apenas 20 amostras para glicose e 23 para lactato puderam ser comparadas com testes colorimétricos por duas razões: algumas amostras analisadas no HPLC não foram analisadas através do kit colorimétrico e algumas outras amostras apresentaram problema nos cromatogramas devido a problemas relatados previamente no equipamento. Ureia e glutamina também foram detectadas, mas por apenas um método. A ureia foi detectada através do kit colorimétrico para avaliar sua concentração no meio, mas não foi avaliada pelo HPLC por falta de uma

coluna de sílica monolítica, que seria a escolha para detecção (FARIA et al., 2006). A glutamina foi detectada através do HPLC e não foi utilizado teste colorimétrico, devido ao alto valor do kit para executar a análise (kit de detecção produzido pela Sigma-Aldrich custa R\$ 2,376,00, valor referente ao ano de 2018/2019).

As análises comparativas das amostras foram divididas de acordo com o sistema de cultivo/produção (garrafas de cultivo e Fibra Stage) e cronologia, tanto para glicose quanto para lactato, para facilitar a visualização e a comparação dos dados. A Tabela 7 indica as amostras divididas pelos sistemas, bem como a data e o tempo de cultivo. É importante ressaltar que o meio era trocado entre 48 e 72 horas, retirando o meio condicionado e adicionado novo meio. As divisões das amostras são: quando as células chegaram ao laboratório e iniciaram a adaptação (Figura 13), o cultivo celular realizado em garrafas após a adaptação (Figura 14), os dados do segundo Fibra Stage realizado (Figura 15) e por último, o cultivo celular em garrafas após o Fibra Stage (Figura 16). Para todas as amostras comparativas (glicose e lactato), o valor-p foi calculado através do teste *t* para verificar a existência ou não de diferença estatística entre os pontos, tendo o ponto de corte determinado em 0,05 e um valor menor que esse representa a existência de diferença estatística (FERREIRA; PATINO, 2015). O meio não metabolizado, ou seja, fresco, apresentou as seguintes concentrações (g/L) detectadas pelo HPLC: glicose (1,66), lactato (0,32) e glutamina (3,17).

Tabela 7. Amostras coletadas de meio condicionado agrupadas quanto ao sistema de cultivo celular, apresentando nome, data de coleta do meio e o tempo de cultivo em horas no momento da coleta.

Tipo De Cultivo	Amostra	Data	Tempo de Cultivo (h)
Adaptação Celular	A1	04/08/17	72
	A2	07/08/17	72
	A3	11/08/17	96
	A4	15/08/17	96
	A5	18/08/17	72
	A6	21/08/17	72
Cultivo em Garrafa 1	B1	30/08/17	48
	B2	Inóculo	-
	B3	29/09/17	39
	B4	20/11/17	96
	B5	21/02/18	73
	B6	26/02/18	73
Fibra Stage	C1	09/03/18	43,5
	C2	12/03/18	72
	C3	14/03/18	120
	C4	19/03/18	243
Cultivo em Garrafa 2	D1	19/03/18	72
	D2	21/03/18	45
	D3	23/03/18	48
	D4	26/03/18	79
	D5	28/03/18	45
	D6	30/03/18	43,5
	D7	03/04/18	-
	D8	05/04/18	70

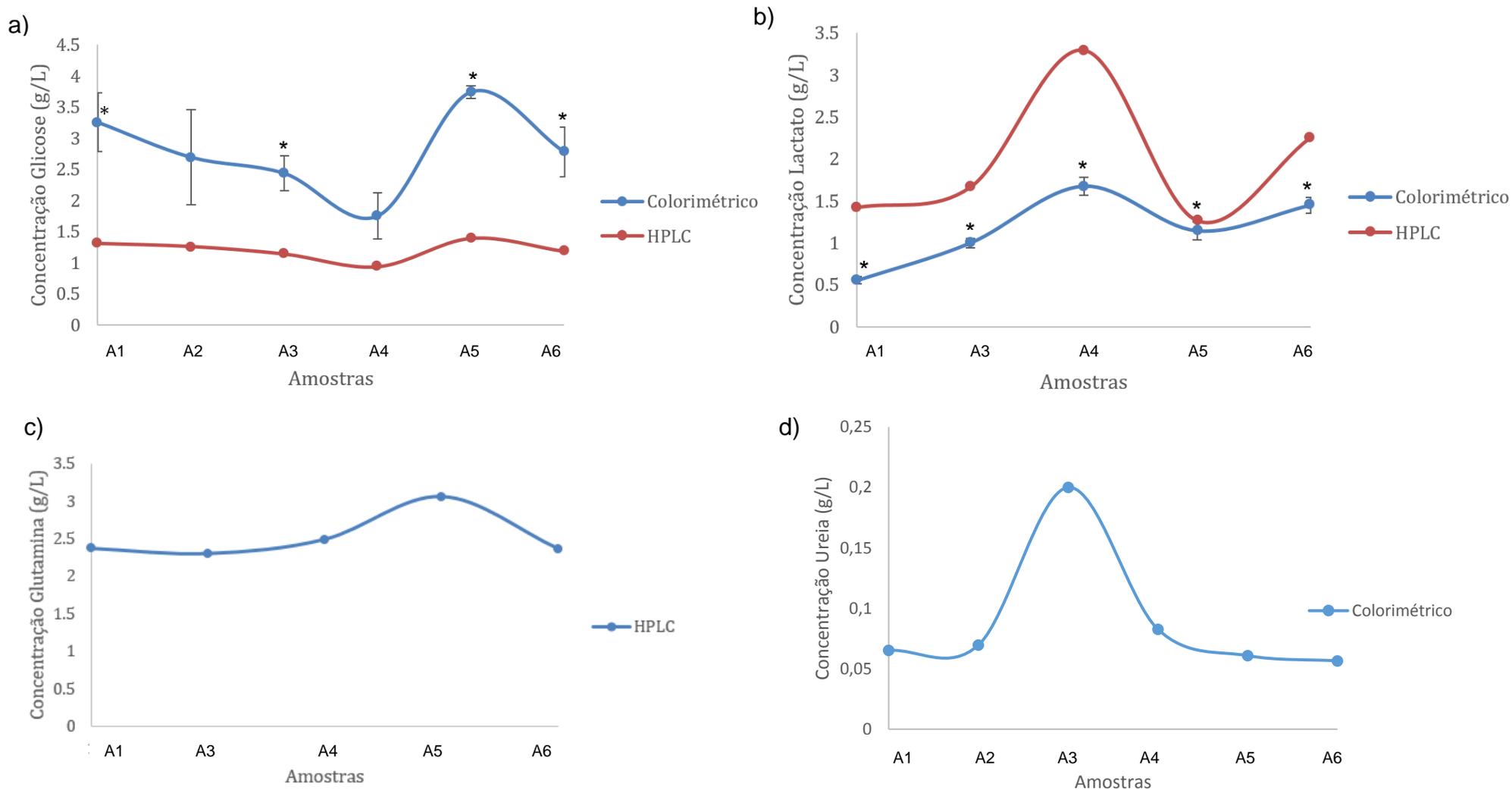


Figura 13. Análise dos perfis de concentração de glicose e metabólitos durante a adaptação celular. A) Concentração em g/L de glicose por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. B) Concentração de lactato em g/L por amostra detectados por HPLC e por colorimetria. C) Concentração de glutamina em g/L detectado por HPLC. D) Concentração de ureia em g/L detectado por colorimetria.

*existência de diferença estatística entre os pontos

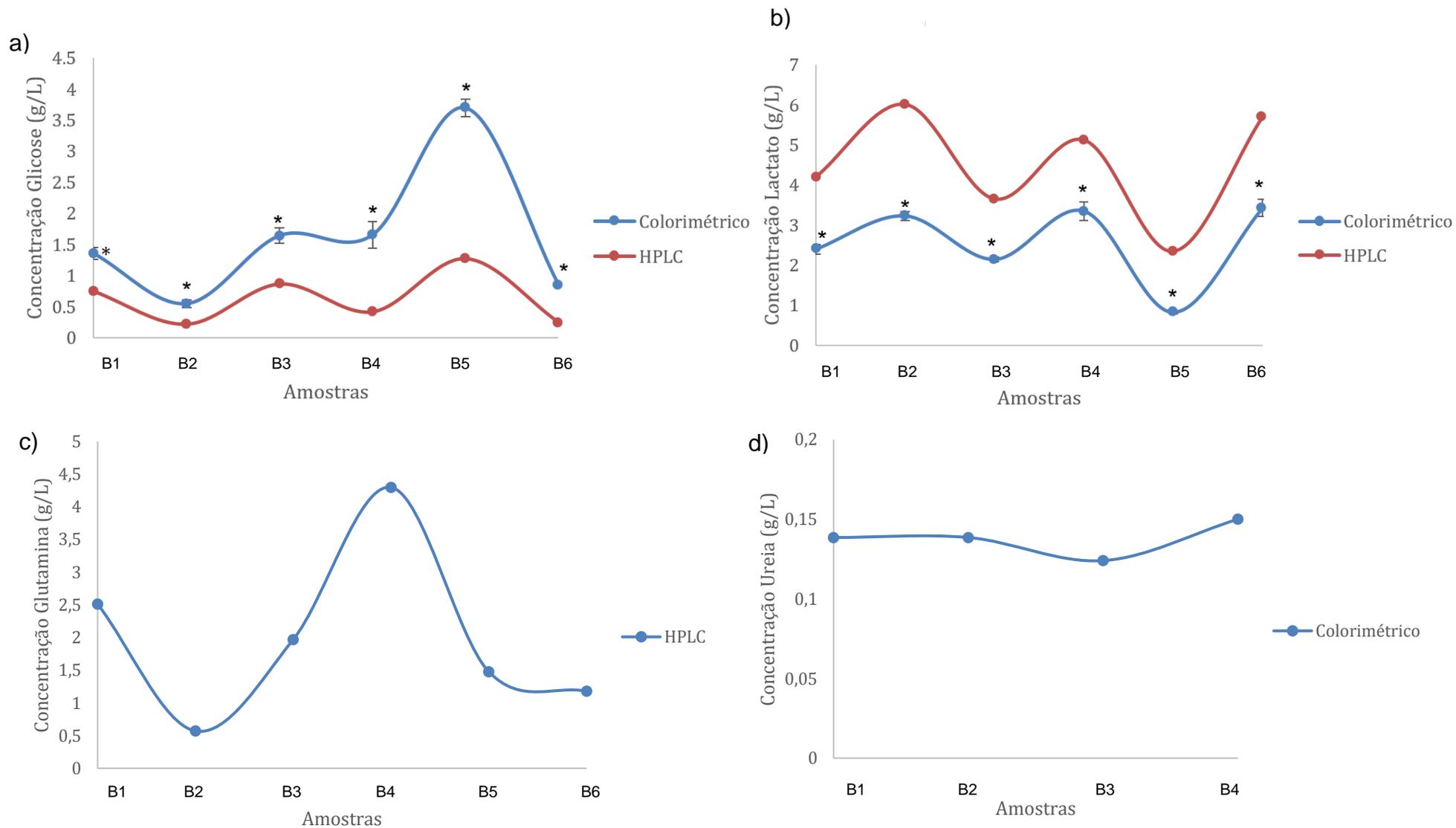


Figura 14. Análise dos perfis de concentração de glicose e metabólitos durante o cultivo celular em garrafas. A) Concentração em g/L de glicose por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. B) Concentração de lactato em g/L por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. C) Concentração de glutamina em g/L detectado por HPLC. D) Concentração de ureia em g/L detectado por colorimetria.

*existência de diferença estatística entre os pontos

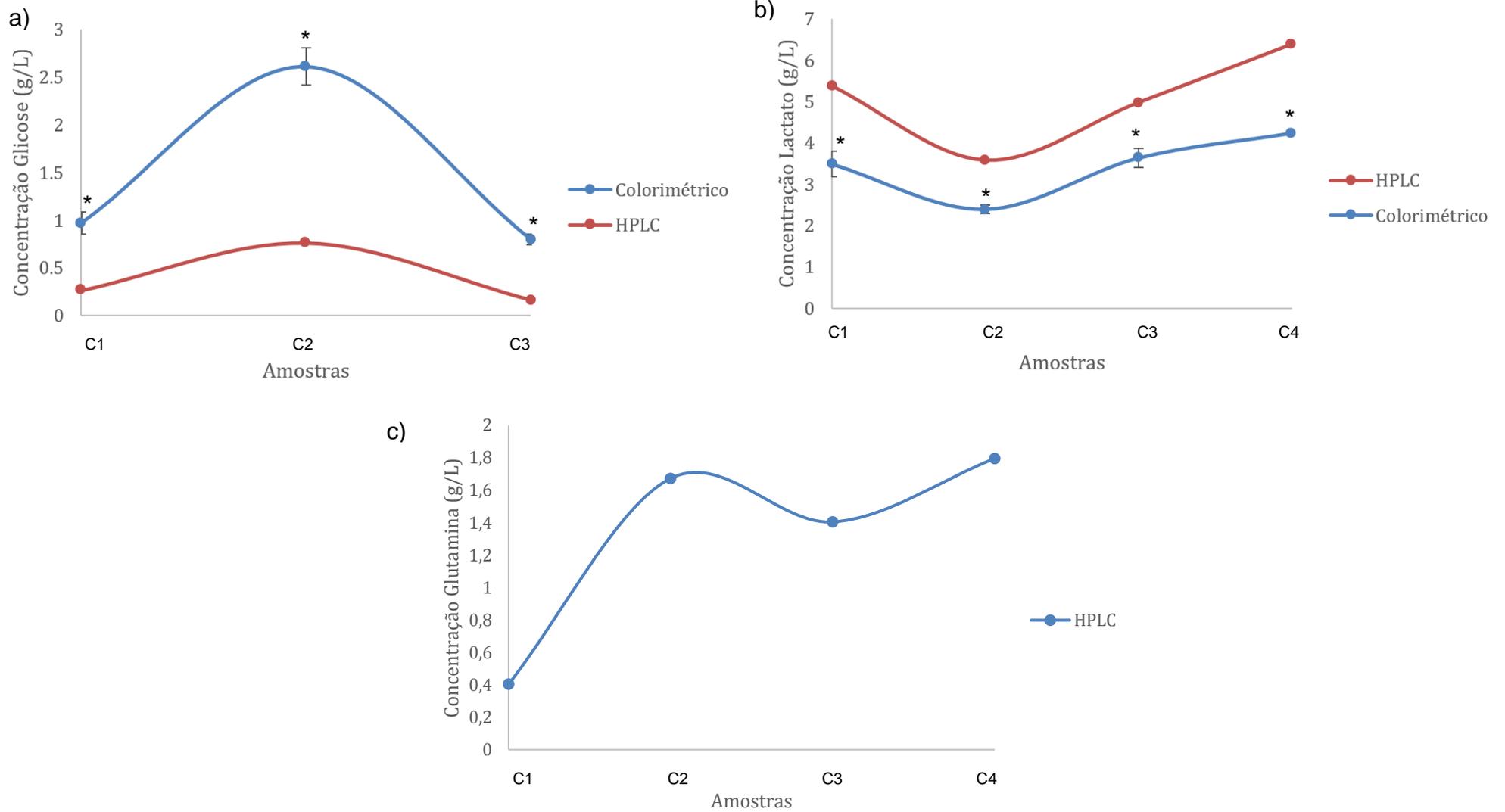


Figura 15. Análise dos perfis de concentração de glicose e metabólitos durante o primeiro cultivo em Fibra Stage. A) Concentração em g/L de glicose por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. B) Concentração de lactato em g/L por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. C) Concentração de glutamina em g/L detectado por HPLC.

*existência de diferença estatística entre os pontos

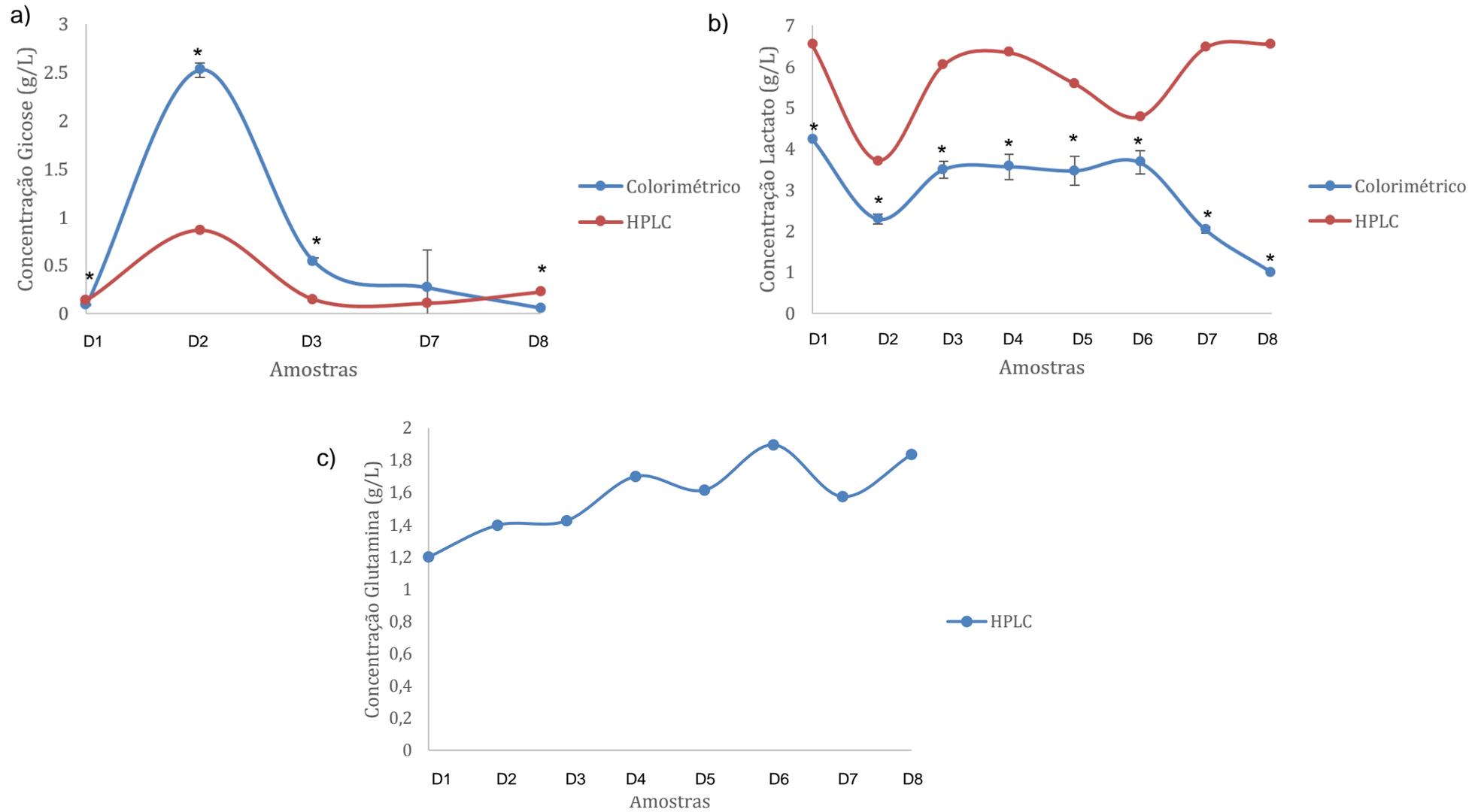


Figura 16. Análise dos perfis de concentração de glicose e metabólitos durante o cultivo celular em garrafas após o Fibra Stage. A) Concentração em g/L de glicose por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. B) Concentração de lactato em g/L por amostra, detectados por HPLC e por colorimetria. C) Concentração de glutamina em g/L detectado por HPLC. *existência de diferença estatística entre os pontos

A visualização dos gráficos permite comparar os perfis de detecção tanto para o método colorimétrico quanto para o HPLC, e percebe-se que possuem curvaturas parecidas (forma da curva) em ambas as metodologias, apesar da detecção pelo método colorimétrico ser conhecida por superestimar ou subestimar os resultados, como citado por Magri et al. (2018). A existência da diferença estatística entre as metodologias já era esperada, pois o HPLC tem maior acurácia em sua detecção, maior especificidade e reprodutibilidade (MENDEZ; STEPPE; SCHAPOVAL, 2003). Porém, os testes colorimétricos apresentam perfil similar e podem ser adotados como uma forma de sinalização do que está acontecendo no meio, ainda que de forma mais superficial, para que as mudanças das concentrações de glicose, lactato, e ureia sejam detectadas precocemente. A glicose é a principal fonte de energia e é essencial para a manutenção das células, tendo seu consumo relacionado com o conseqüente aumento da concentração de lactato no meio, provavelmente devido ao aumento de osmolaridade causado por este último (OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992). Lactato e ureia são subprodutos inibitórios, por causarem mudanças de pH tanto no meio de cultivo quanto intracelularmente, principalmente a ureia, que pode provocar apoptose celular quando presente (OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992; CRUZ et al., 2000; RYLL; VALLEY; WAGNER, 1994).

É importante ressaltar que as amostras que não foram detectadas no HPLC para a glicose podem ter tido problemas no equipamento (no índice de refração) ou a concentração de glicose pode estar abaixo do limiar de detecção do padrão de menor concentração, equivalente a 0,0625 g/L.

A ureia logo deixou de ser detectada pelo método colorimétrico, pois além de possuir uma metodologia com maior complexidade e que demanda maior tempo e gera resíduos tóxicos (azida). Para sistemas sem agitação, a molaridade relacionada à diminuição do crescimento celular é de 1,1 mM (equivalente a 0,66 g/L) e para sistemas com agitação, é de 3,5 mM (equivalente a 2,1 g/L) (CRUZ et al., 2000). Sendo assim, é possível observar que sua concentração está baixa durante o processo (com valor máximo detectado de 0,2 g/L), e esse foi outro fator que levou a descontinuação de sua detecção e de sua avaliação pelo HPLC. Outras amostras que não estão apresentadas nestes gráficos foram avaliadas no teste colorimétrico de ureia e não apresentaram

concentrações maiores que as relatadas na Figura 13 e na Figura 14. A avaliação da concentração de glutamina também é uma forma indireta de avaliar se a concentração de ureia está aumentando no meio (HENRY; DUROCHER, 2011).

A glutamina, de forma geral, apresenta valores um pouco menores que os encontrados no meio não metabolizado (3,17 g/L), o que é explicado por ser uma fonte de energia também utilizada pela célula para produzir energia, sendo uma doadora de “esqueletos de carbono” (BIAGGIO, 2014). A glutamina aparenta ter atividade regulatória em genes vinculados à síntese e a degradação de proteínas, além de ter fundamental participação na proliferação celular, bem como em seu desenvolvimento (CRUZAT; PETRY; TIRAPÉGUI, 2009). Porém, a glutamina só é consumida em um fluxo maior quando a célula necessita suprir sua demanda energética devido à baixa concentração de glicose ou a utilização não tão eficaz da glicose como fonte de energia (ELIAS et al., 2003). O consumo moderado da glutamina nas amostras se relaciona com a baixa concentração de ureia encontrada, sabendo-se que sua concentração aumenta à medida que aumenta o consumo de glutamina pelas células (HENRY; DUROCHER, 2011). A alta da concentração da glutamina em relação à concentração do meio não metabolizado durante o cultivo celular em garrafas representado na Figura 14 ocorre concomitantemente a uma diminuição da concentração de glicose (variando entre 0,5 e 1 g/L) e aumento de lactato (entre 5 e 6 g/L), o que pode levar a uma compensação no metabolismo celular, reduzindo o fluxo de piruvato advindo da via glicolítica no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, e produzindo glutamato derivado do α -cetoglutarato para a recuperação de ATP através de uma via oxidativa (ALTAMIRANO et al., 2001).

Para todas as amostras analisadas no HPLC, observou-se o aumento da concentração de lactato quando comparado à concentração presente no meio não condicionado (equivalente a 0,32 g/L). O aumento nessa concentração é explicado pela metabolização celular da glicose, que tem como subproduto o lactato (advindo da conversão do piruvato glicolítico). Os níveis inibitórios de lactato relatados na literatura de 20 mM foram ultrapassados nas análises obtidas, com valores em torno de 60 mM, o que pode explicar a baixa concentração de proteínas obtidas no meio durante a purificação, devido à sua ação inibitória na produtividade de proteínas (HENRY; DUROCHER, 2011; HENRY; PERRIER; KAMEN, 2005). O ajuste de pH do meio é

apresentado como uma solução para o efeito inibitório do lactato, apesar de ainda assim poder apresentar efeito tóxico para as células (HASSELL; GLEAVE; BUTLER, 1991; TSAO et al., 2005).

4.2. TESTES DE PURIFICAÇÃO NO ÄKTA *PURE*

4.2.1 Coluna HiTrap Heparin HP

Os dois tampões utilizados possuem funções distintas, o *binding buffer* é utilizado para equilibrar a coluna e aplicar a amostra, garantindo que a proteína se ligue à coluna. O *elution buffer* é utilizada na etapa de eluição da proteína, para que “desgrude” da coluna e possa ser coletada. Os tampões para a coluna de heparina foram elaborados e utilizados no equipamento para detecção de picos sob luz UV, o qual se encontrava com muitos ruídos e sem possibilidade de equilíbrio. A hipótese de o problema ser os reagentes foi levantada e as soluções foram refeitas com novos reagentes, filtradas e de-aeradas, e obtiveram o mesmo gráfico ruidoso. Foi executada então a limpeza de todo o equipamento e a limpeza específica da célula de UV. Os colaboradores do NUCEL/NETCEM/FMUSP foram contatados, e informaram outros tampões que poderiam ser utilizadas com a respectiva coluna, diferentes das indicadas no manual do fabricante. Os novos tampões (descritos em Materiais e Métodos) foram elaborados e as purificações foram executadas, obtendo pico de detecção em todas as amostras. Os cromatogramas gerados (Figura 17 a Figura 25) são advindos de uma corrida com duração de aproximadamente 25 minutos e surgimento de pico entre 12 e 14 minutos (frações 3 e 5). As alturas dos picos variaram entre aproximadamente 15 e 55 mAU, o que indica diferença de concentração de proteína nas amostras, com os maiores picos presentes nas amostras 2 (inóculo do primeiro Fibra Stage), 6 (final do primeiro Fibra Stage), 8 e 9 (células cultivadas em garrafas em 2019). As últimas duas amostras apresentaram os picos mais altos, que juntamente com a presença da característica de

adesão celular durante o cultivo sugeriram que a inserção do gene codificador da proteína rhPDGF-BB na célula HEK 293T provavelmente continua no genoma celular.

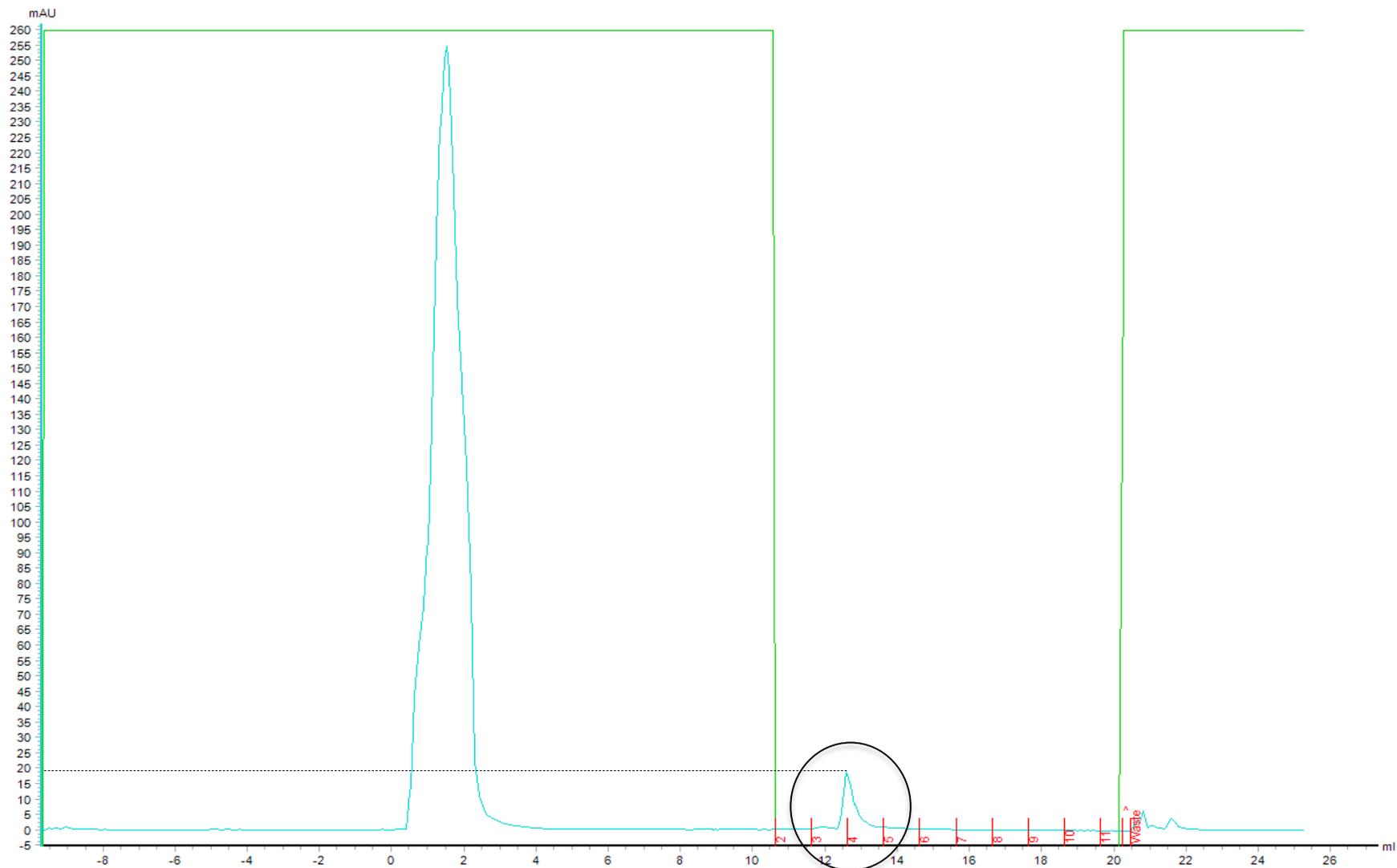


Figura 17. Perfil de purificação da amostra 1 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição

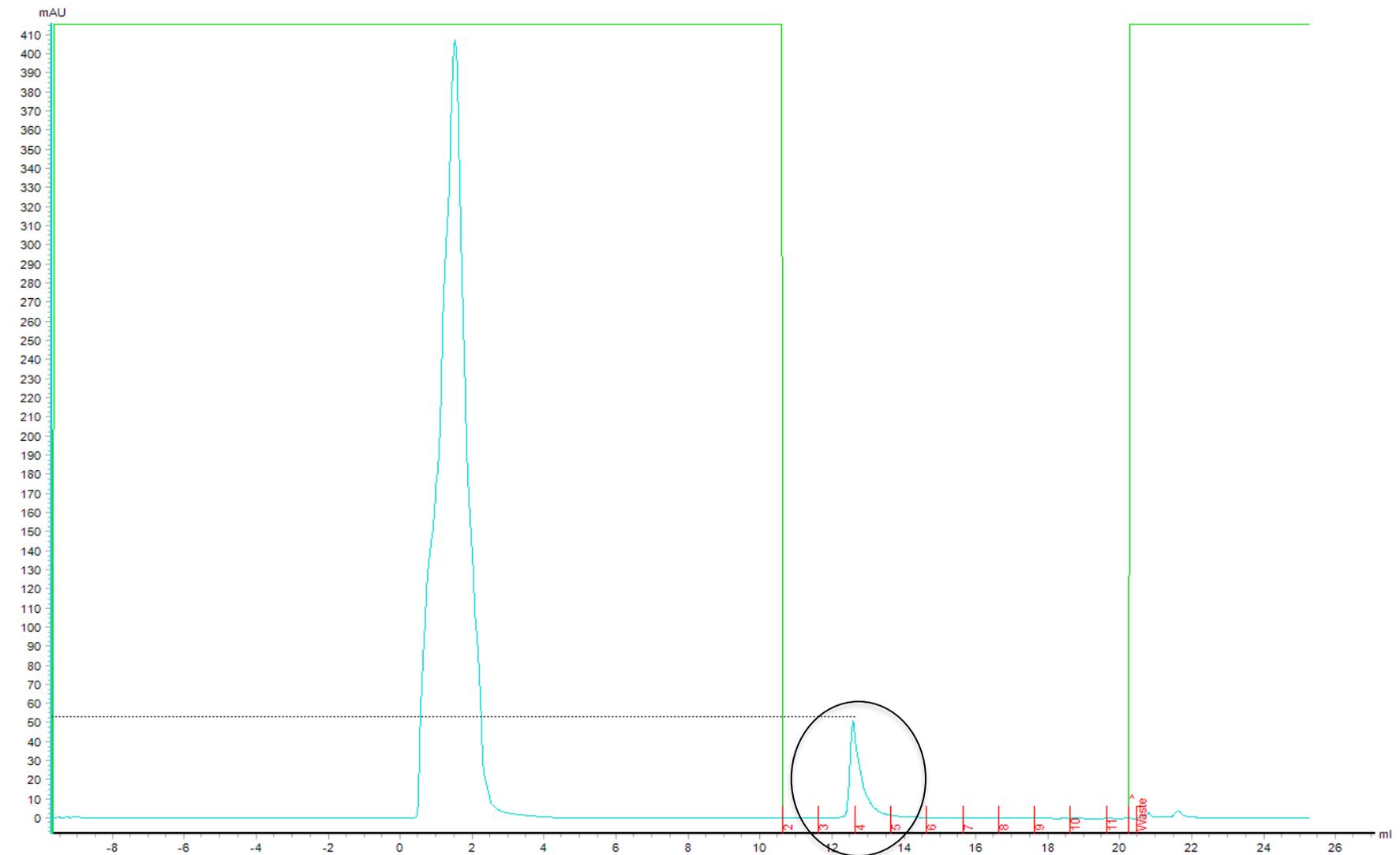


Figura 18. Perfil de purificação da amostra 2 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

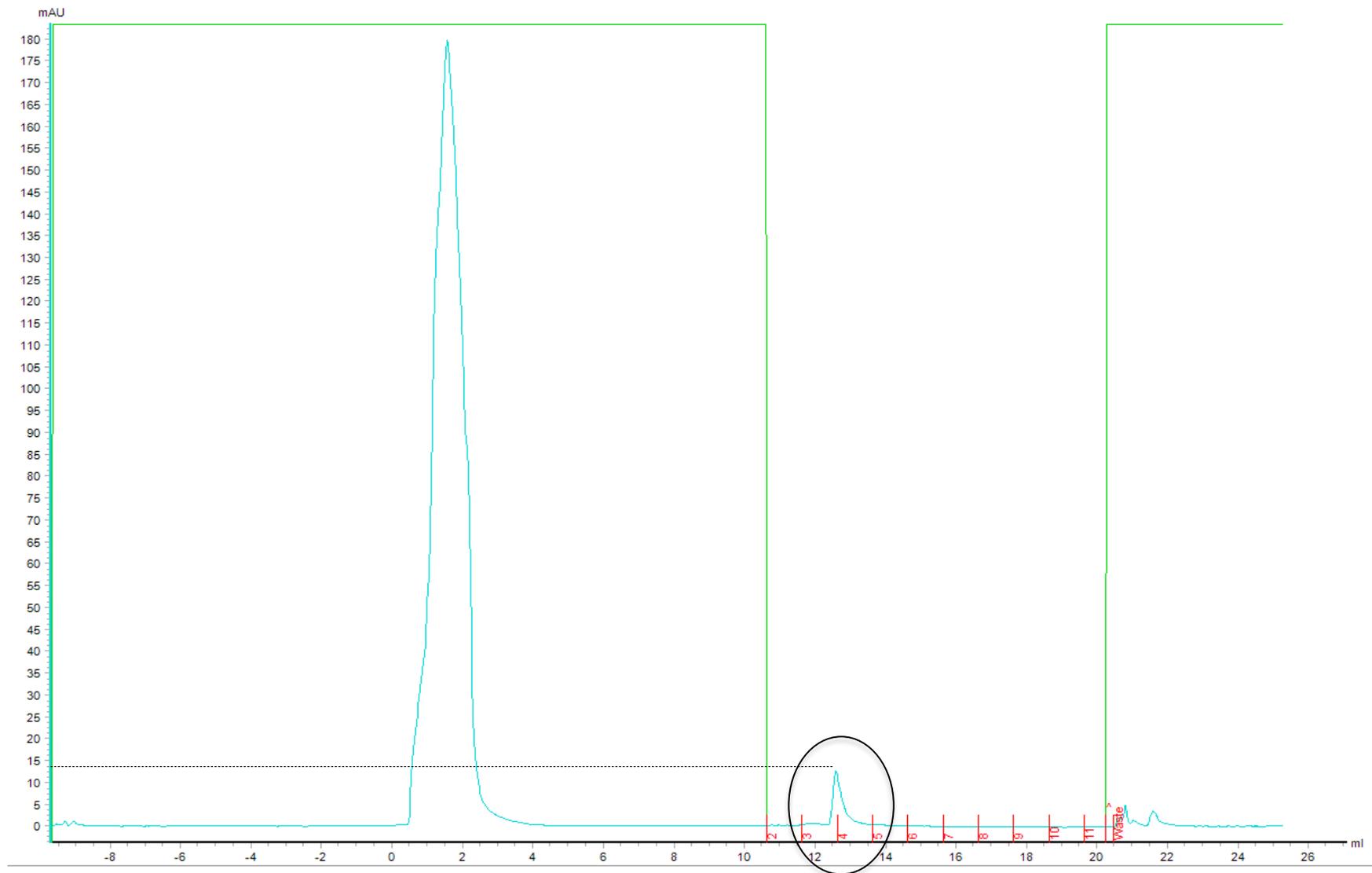


Figura 19. Perfil de purificação da amostra 3 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

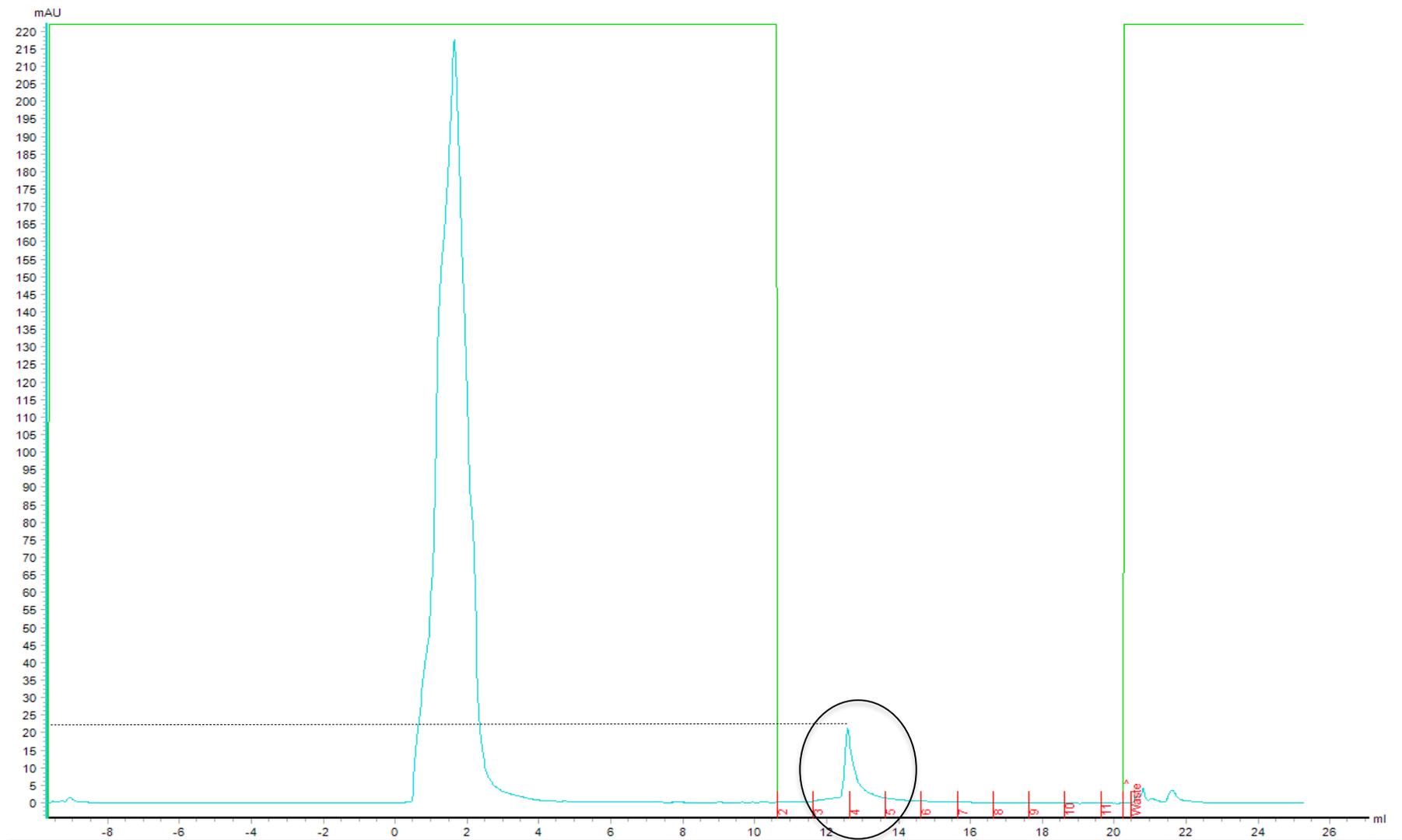


Figura 20. Perfil de purificação da amostra 4 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

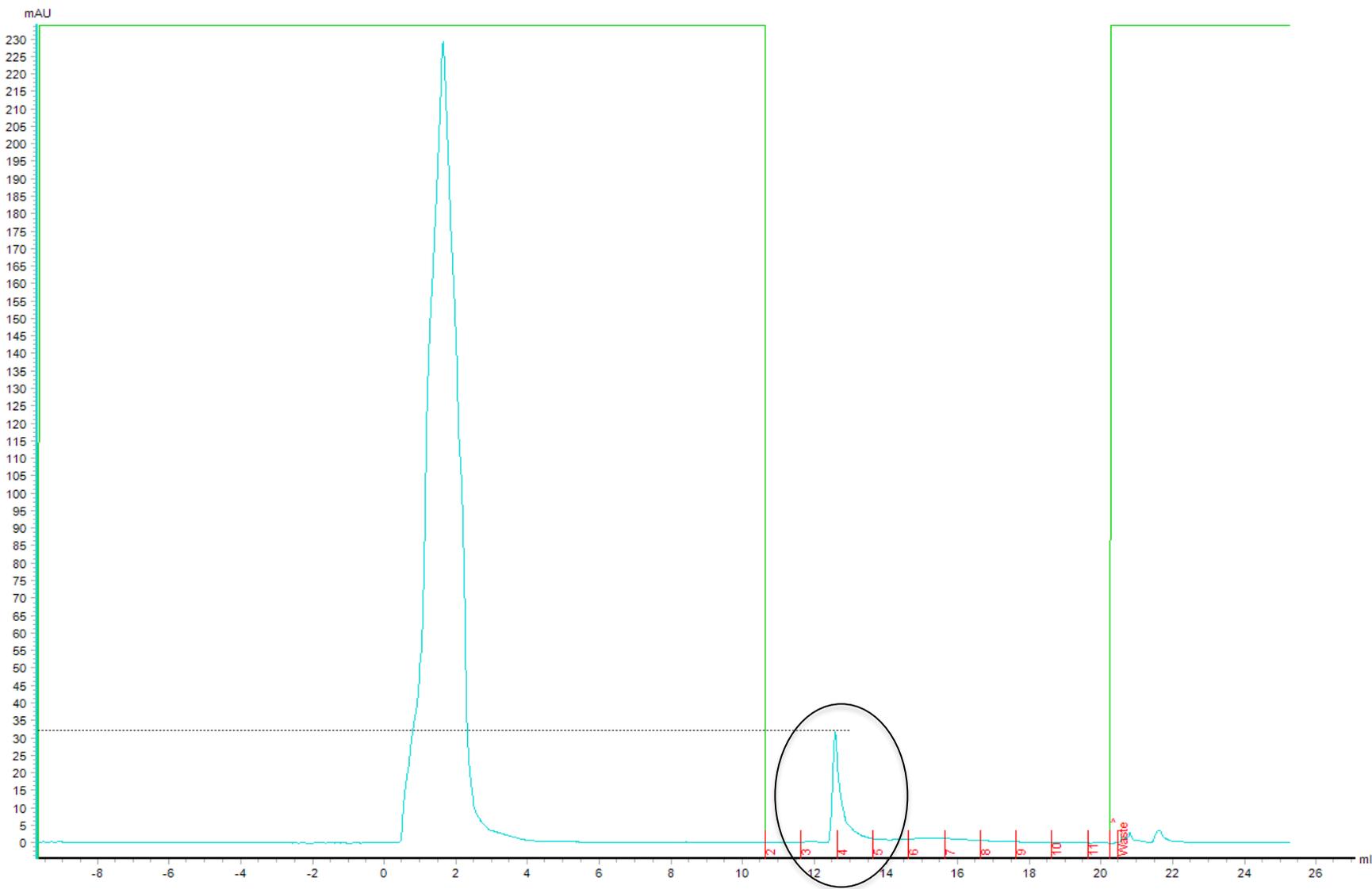


Figura 21. Perfil de purificação da amostra 5 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

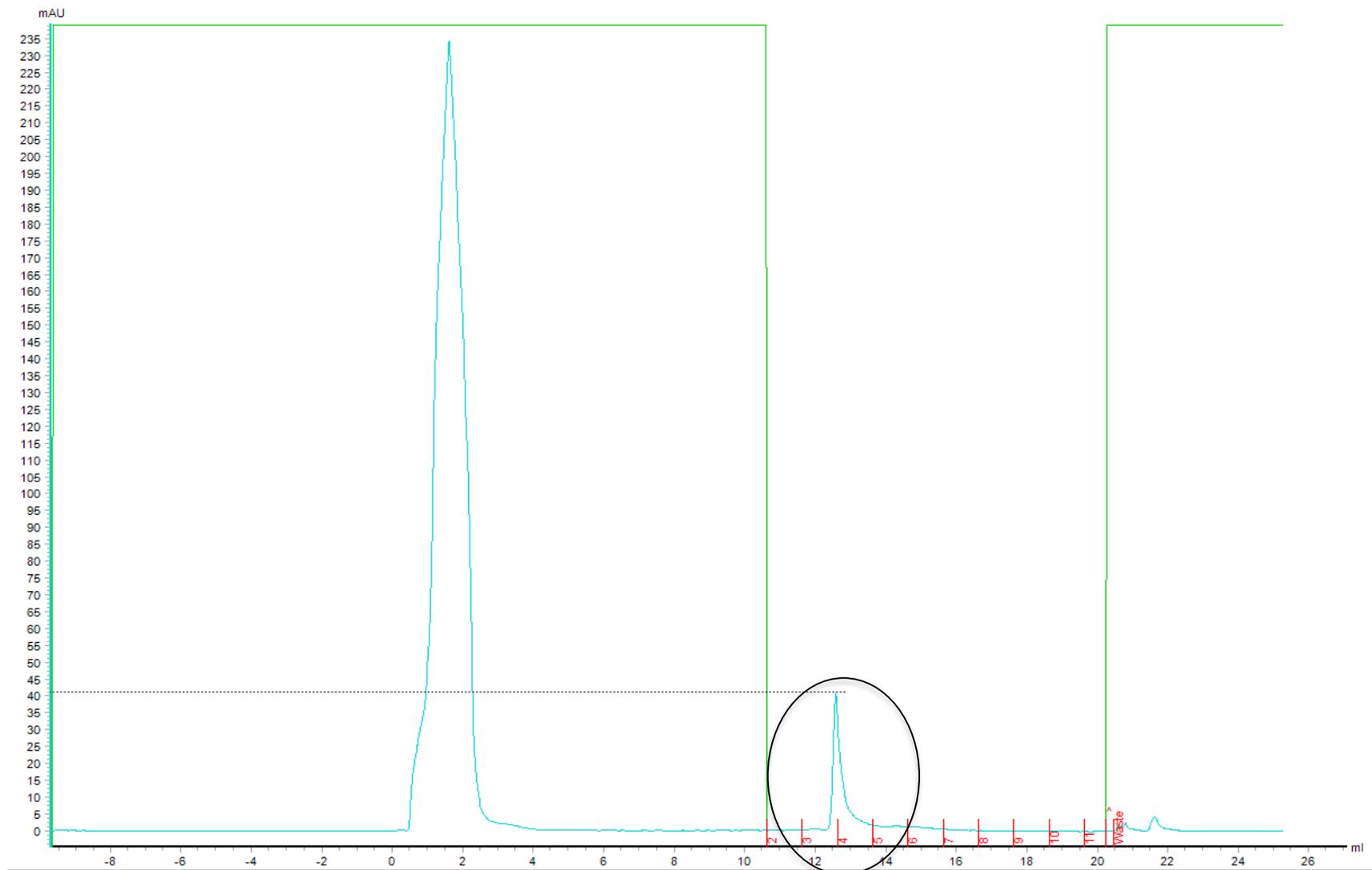


Figura 22. Perfil de purificação da amostra 6 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

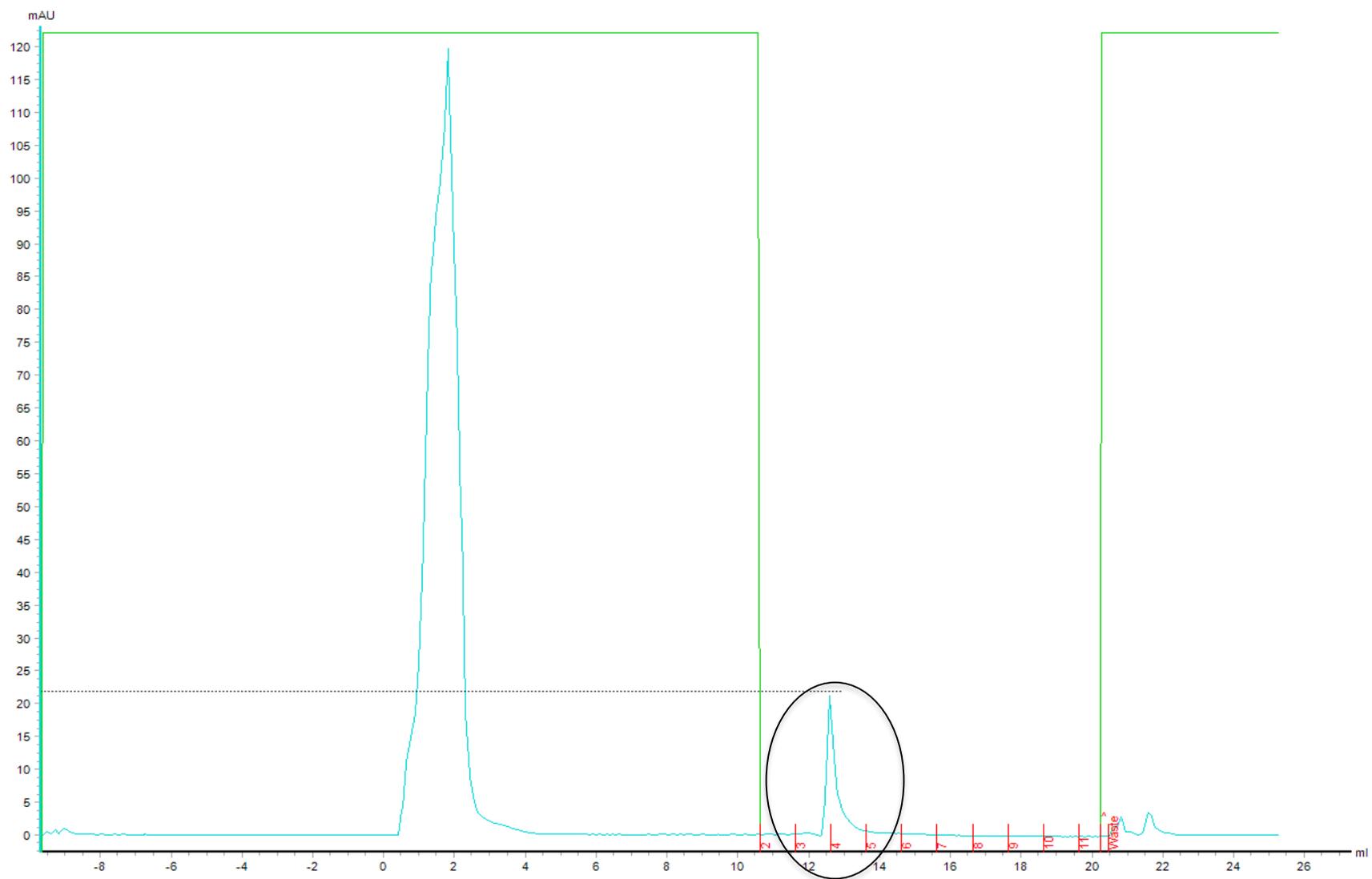


Figura 23. Perfil de purificação da amostra 7 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

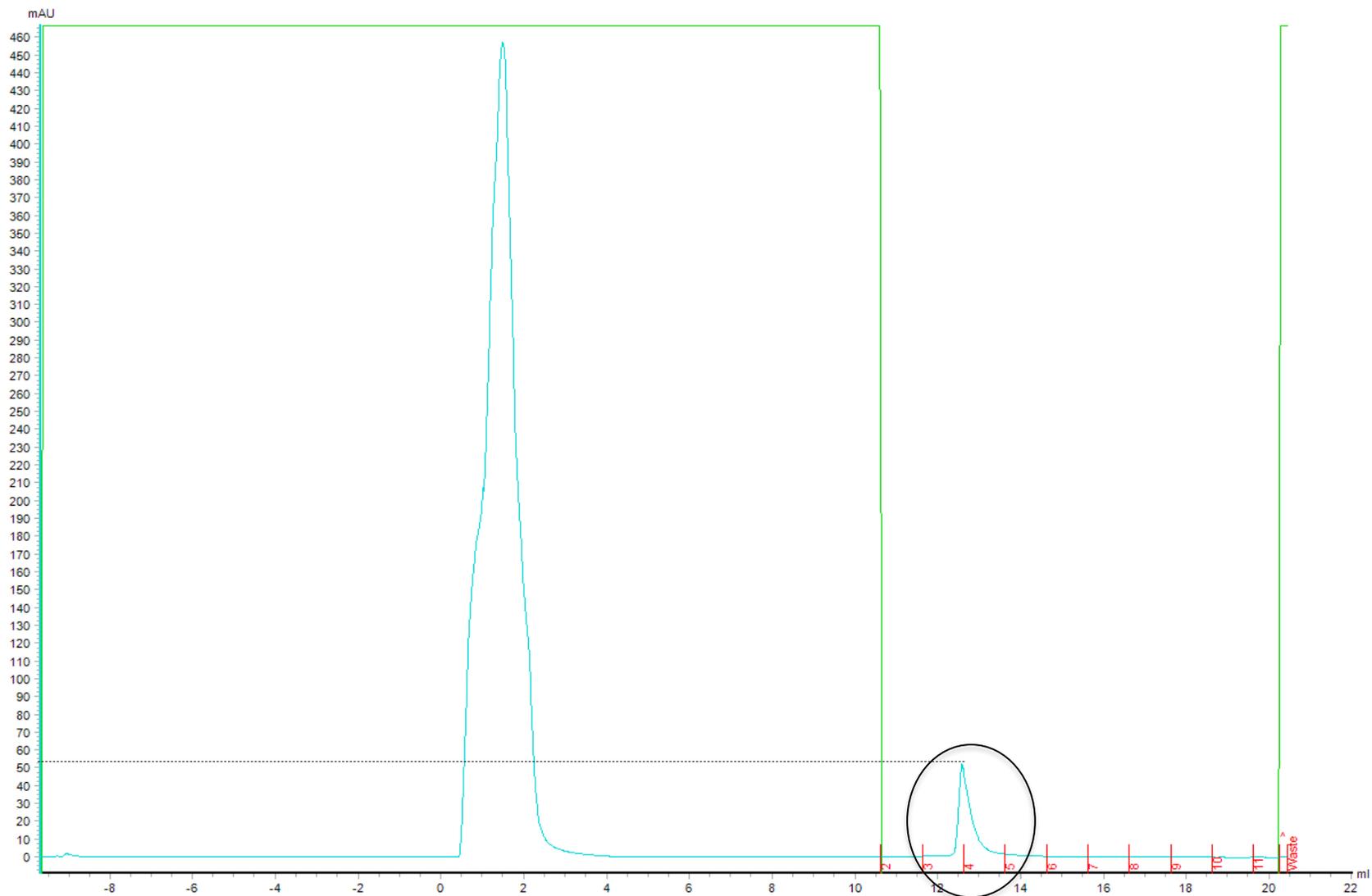


Figura 24. Perfil de purificação da amostra 8 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

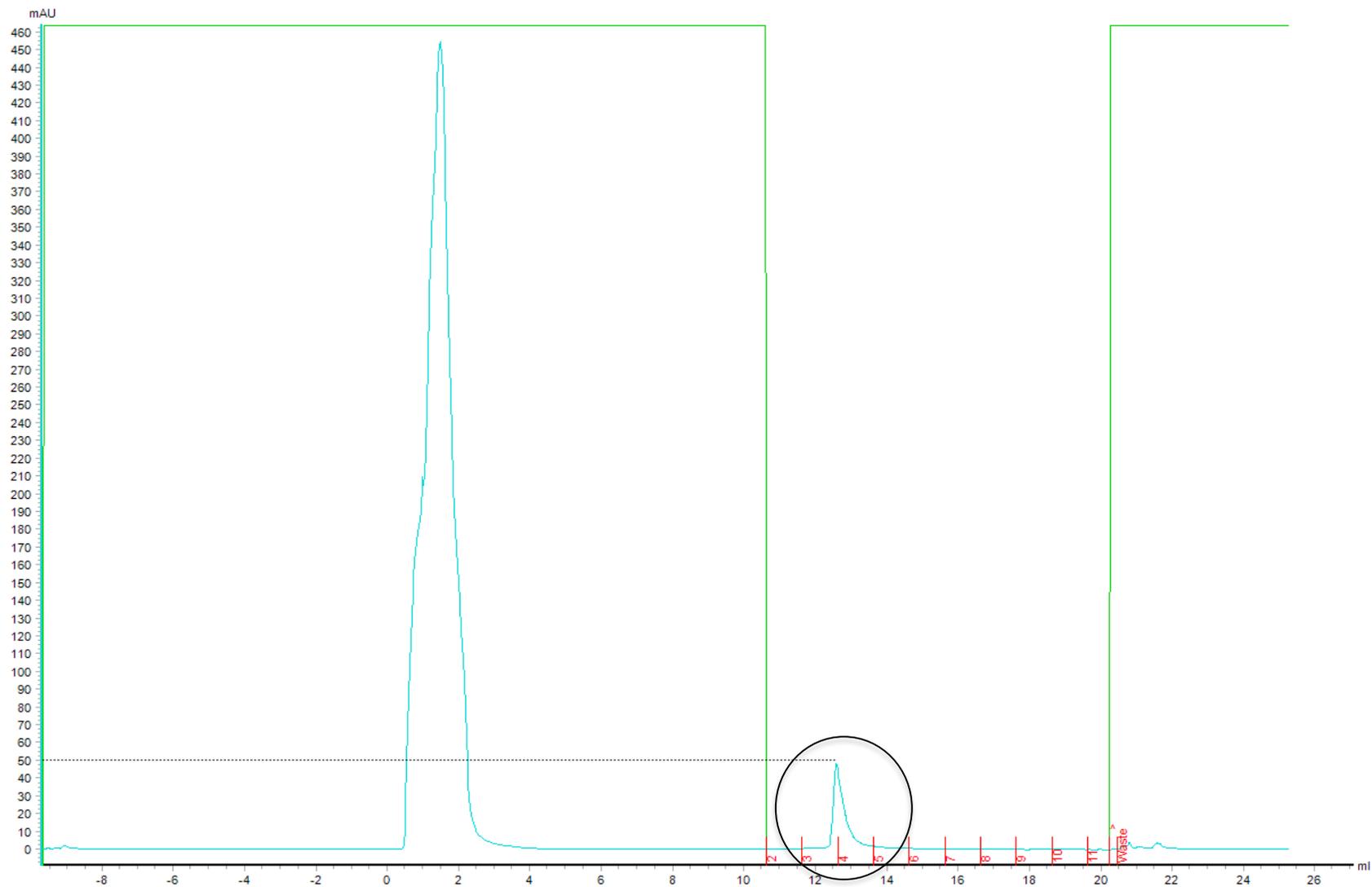


Figura 25. Perfil de purificação da amostra 9 no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

Após o final das corridas, foi observado que o pico estava contido principalmente nas frações 3 e 4. Sendo assim, as frações 3, 4 e 5 de todas as amostras foram coletadas para análise (a fração 5 sendo coletada apenas para verificar se ainda não possuía proteínas no final do pico). As frações foram submetidas ao método de Bradford para verificação da concentração proteica em cada amostra. Porém, como as amostras estavam muito diluídas também por conta do processo de eluição do ÄKTA, não foi possível ter precisão com esse método. Verificou-se que as frações 5 não continham proteína, porém as triplicatas das frações 3 e 4 para todas as amostras eram destoantes entre si.

Com a imprecisão da quantificação pelo método de Bradford, optou-se por quantificar através do método de absorção do ultravioleta na região de 280 nm. As frações foram lidas, constatando a falta de proteínas na fração 5 e as concentrações nas frações 3 e 4 de cada amostra estão indicadas na Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações de proteína obtidas pelo método ultravioleta para cada uma das amostras nas frações 3 e 4 coletadas da purificação no ÄKTA.

Amostra	Concentração (mg/mL) da fração 3	Concentração (mg/mL) da fração 4
1	0,05	0,09
2	0,14	0,11
3	0,04	0,04
4	0,06	0,06
5	0,06	0,07
6	0,08	0,08
7	0,05	0,07
8	0,16	0,14
9	0,12	0,13

Após a determinação da concentração de proteína por amostra, 500 µL das amostras foram concentradas em SpeedVac, até obter volume final de aproximadamente 100 µL, sendo 20 µL pipetados nos géis (a concentração em temperatura mais elevada não foi um problema pois as proteínas são desnaturadas para que possam migrar de

forma mais fácil no gel) (RATH et al., 2009). Apesar da baixa concentração das amostras, o limiar de detecção para coloração com Coomassie (30 ng) não foi atingido, impossibilitando a detecção de bandas com essa metodologia. As frações 3 e 4 para cada amostra foram pipetadas separadamente para verificar se havia diferença significativa de concentração de rhPDGF-BB em cada uma delas. O resultado do SDS-PAGE para esse processo encontra-se na Figura 26, sendo importante ressaltar que além da detecção do rhPDGF-BB, ainda há a interferência de proteínas do soro fetal bovino que podem ter afinidade com a coluna de heparina (SAKASHITA; ENGVALL; RUOSLAHTI, 1980).

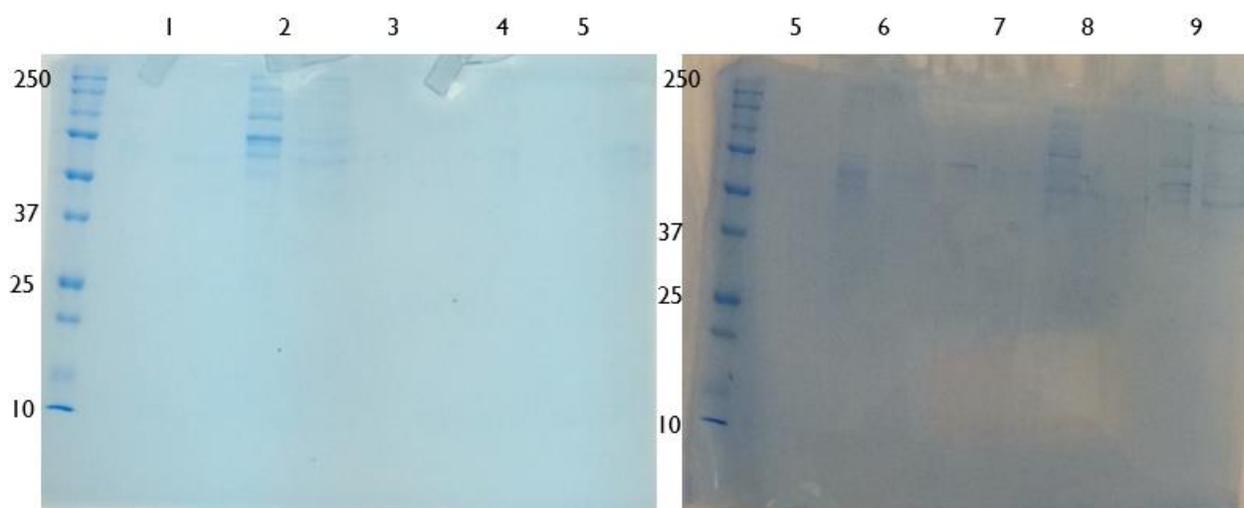


Figura 26. Géis corados com Coomassie Blue para todas as amostras purificadas na coluna de heparina, quase não havendo coloração devido à baixa concentração de proteína por banda. O marcador de peso molecular é dado em kDa e as amostras estão na seguinte ordem no primeiro gel: marcados de peso molecular, fração 3 da amostra 1, fração 4 da amostra 1, fração 3 da amostra 2, fração 4 da amostra 2, fração 3 da amostra 3, fração 4 da amostra 3, fração 3 da amostra 4, fração 4 da amostra 4 e fração 3 da amostra 5. No segundo gel estão: marcador de peso molecular, fração 4 da amostra 5, fração 3 da amostra 6, fração 4 da amostra 6, fração 3 da amostra 7, fração 4 da amostra 7, fração 3 da amostra 8, fração 4 da amostra 8, fração 3 da amostra 9 e fração 4 da amostra 9.

Após a visualização dos géis, eles foram descorados completamente com ácido acético para que a coloração com nitrato de prata pudesse ser feita. Os resultados dos géis corados com prata encontram-se na Figura 27.

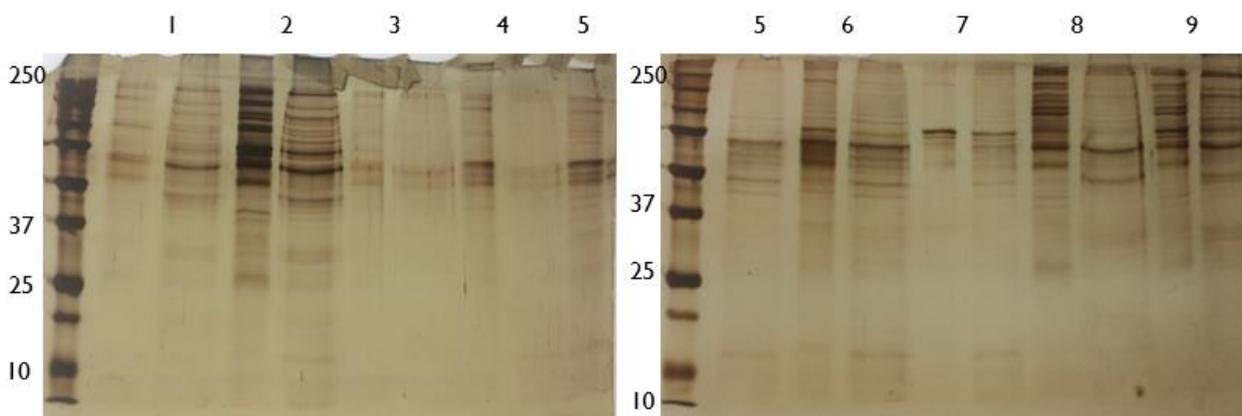


Figura 27. Géis corados com nitrato de prata para todas as amostras purificadas na coluna de heparina. O marcador de peso molecular é dado em kDa e as amostras estão na seguinte ordem no primeiro gel: marcados de peso molecular, fração 3 da amostra 1, fração 4 da amostra 1, fração 3 da amostra 2, fração 4 da amostra 2, fração 3 da amostra 3, fração 4 da amostra 3, fração 3 da amostra 4, fração 4 da amostra 4 e fração 3 da amostra 5. No segundo gel estão: marcador de peso molecular, fração 4 da amostra 5, fração 3 da amostra 6, fração 4 da amostra 6, fração 3 da amostra 7, fração 4 da amostra 7, fração 3 da amostra 8, fração 4 da amostra 8, fração 3 da amostra 9 e fração 4 da amostra 9.

As frações 3 e 4 das amostras não apresentam diferenças significativas na altura da banda em que a proteína é esperada, em torno de 25 a 32 kDa (CHOI et al., 2011), por consequência, ambas as frações de cada amostra foram unidas, afim de aumentar a concentração proteica e realizar os testes para quantificação.

O resultado do SDS-PAGE corado com prata apresentou bandas na parte superior do gel, que não são compatíveis com o tamanho desejado. Logo, a hipótese de que essas bandas sejam provenientes do meio de cultivo ou do soro fetal bovino utilizado no cultivo celular foram levantadas. O meio DMEM puro, o soro fetal bovino puro e o meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (que é utilizado no cultivo celular) foram purificados para análise dos cromatogramas. Os cromatogramas obtidos do processo de purificação no equipamento ÄKTA com a coluna de heparina para o soro fetal bovino puro, o meio DMEM puro e o meio DMEM com soro encontram-se na Figura 28, Figura 29 e Figura 30, respectivamente.

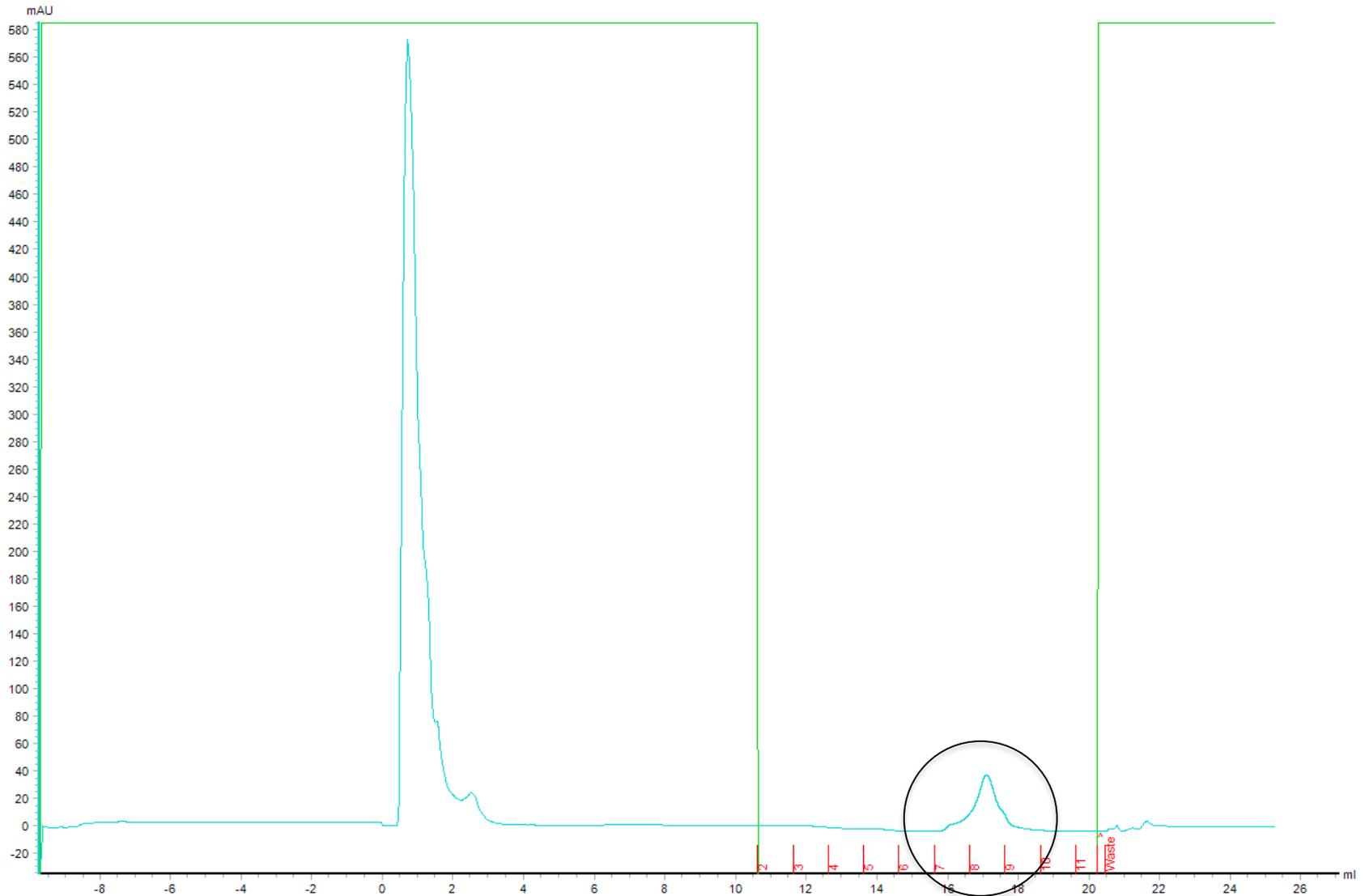


Figura 28. Perfil de purificação do soro fetal bovino puro no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

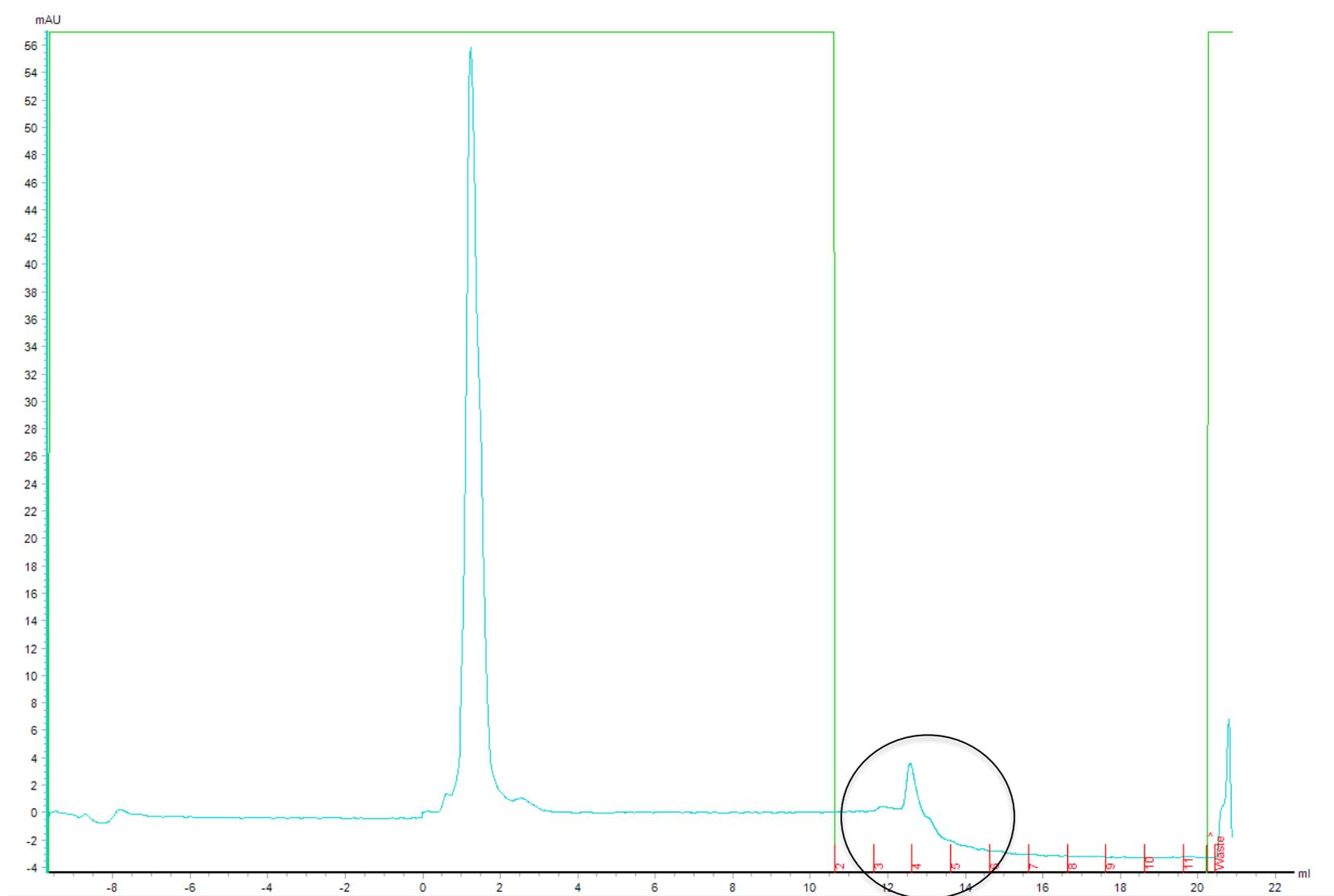


Figura 29. Perfil de purificação do meio DMEM não condicionado puro no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

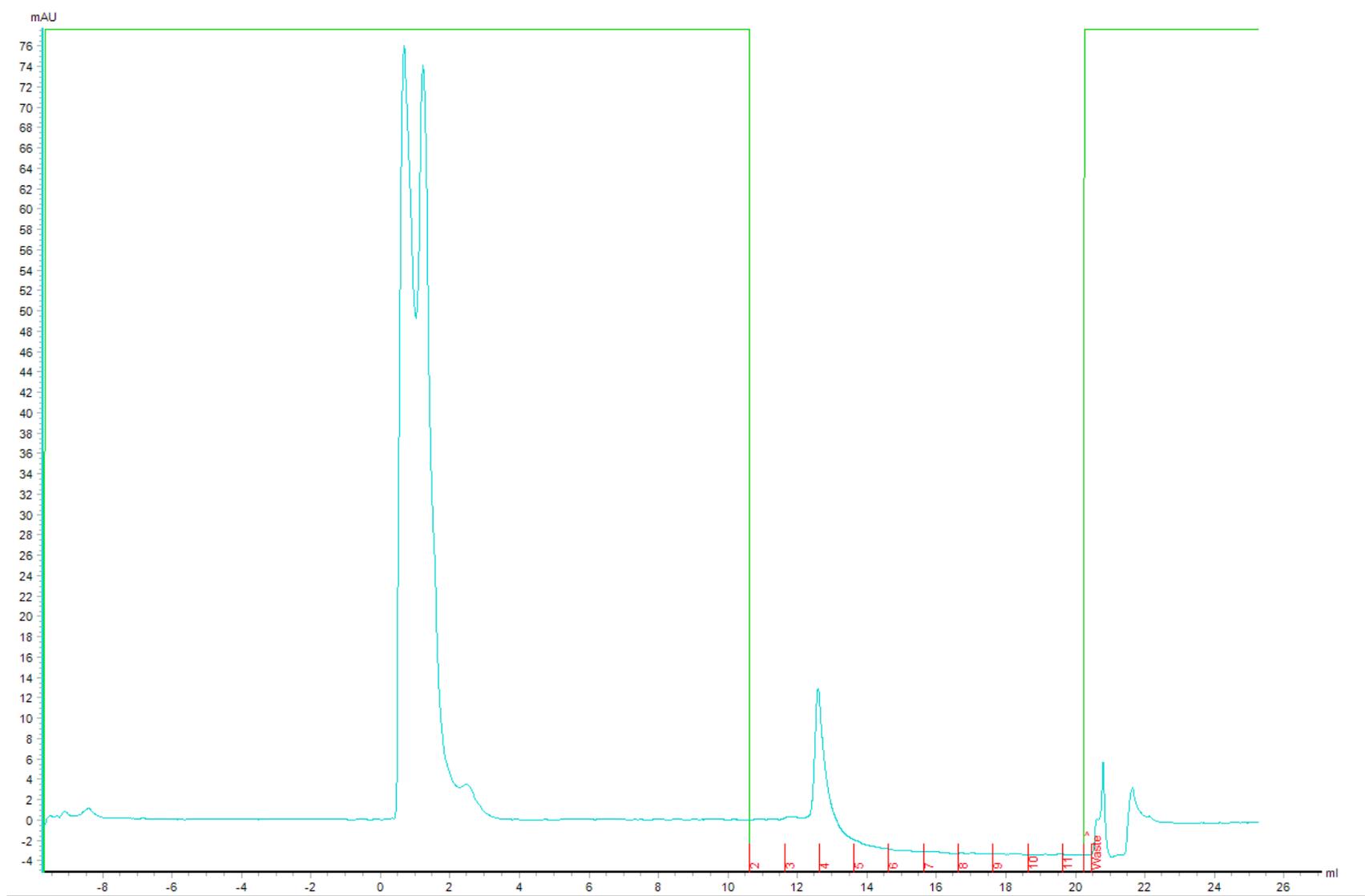


Figura 30. Perfil de purificação do meio DMEM não condicionado com 10% de soro fetal bovino no equipamento ÄKTA com a coluna *HiTrap Heparin HP*. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica o pico obtido no processo de purificação durante a eluição.

Os cromatogramas obtidos a partir da purificação do DMEM, soro e ambos juntos comprovam que as bandas visualizadas na parte superior do gel podem ser interferentes vindos da associação do soro com o meio, pois o pico obtido quando ambos se encontram juntos está na mesma fração das amostras coletadas (frações 3 e 4). A transferrina e a albumina são as proteínas mais presentes no soro fetal bovino, com um tamanho de aproximadamente 69kDa, podem se tornar um empecilho no processo de purificação, como visualizado neste trabalho (HONG; MENG; KALKANIS, 2016). Alternativas para o uso do soro fetal bovino no cultivo celular devem ser estudadas, como o uso de sericina, uma proteína obtida do bicho-da-seda, que tem ação na proliferação nas células de mamífero (TERADA ET AL., 2002; SASAKI ET AL., 2005).

Os métodos qualitativos e quantitativos são de extrema importância pois ajudam a constatar se o que se obtém no Bradford e no SDS-PAGE é mesmo a proteína de interesse. Alguns ensaios são conhecidos para essas finalidades, e são usadas em trabalhos acadêmicos com frequência, conforme descrito brevemente:

- O *Western Blot* é uma técnica qualitativa que utiliza anticorpos para detecção proteica (BABAVLIAN et al., 2016), que não foi possível ser executada pela falta dos anticorpos específicos;

- A espectrofotometria de massa (MALDI-TOF) é utilizada também como uma análise qualitativa e detecta as massas moleculares dos componentes das amostras (KARUMURI et al., 2007);

- O ELISA é um ensaio quantitativo e fornece informações sobre concentrações proteicas por amostra, e exige um kit específico para a proteína de interesse, ou a adaptação de uma metodologia de um outro kit (WANG et al., 2018). Infelizmente, não havia kit disponível e seu valor (R\$ 2.310,00, consultado em 2019) impossibilitou sua compra para uso;

- A metodologia para verificar se a proteína possui sua atividade biológica esperada é o teste *in vitro*, que tem como objetivo observar a atividade mitogênica do PDGF na proliferação de células, como as de células 3T3 (fibroblastos de camundongo),

de células IMR-90 (fibroblasto de pulmão humano) (BABAVALIAN et al., 2016; KARUMURI, 2007; CHOI et al., 2011);

- A quantificação de proteínas pelo HPLC com fase reversa é uma alternativa na literatura, que foi optada nesse trabalho pela possibilidade de sua execução (SOARES et al., 2003). O padrão de PDGF injetado na coluna para servir como guia para as leituras das amostras. Porém, como é possível visualizar na Figura 31, não foi possível obter pico significativo no cromatograma. Como todas as amostras possuíam diluição similar ou menor quando comparado ao padrão, não foi possível fazer sua detecção por esta metodologia.

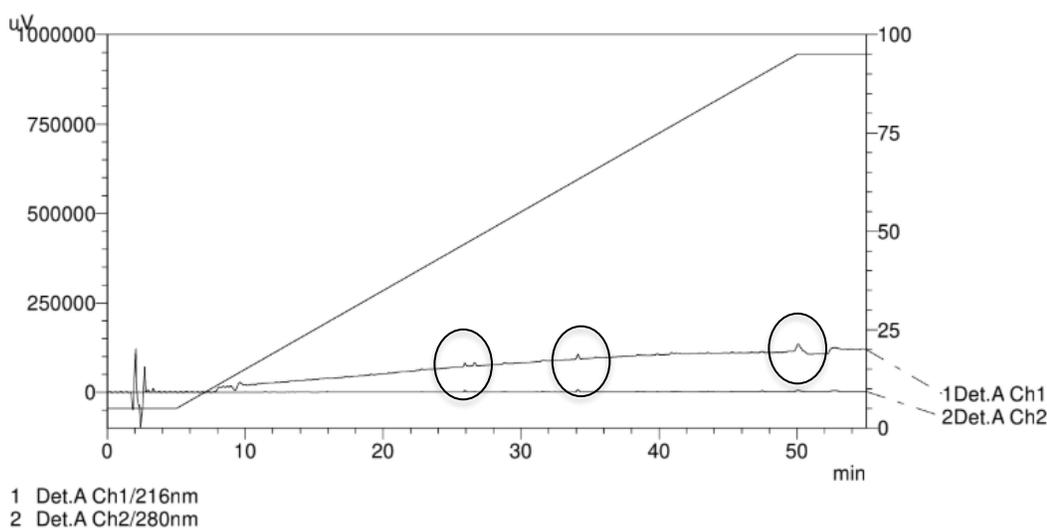


Figura 31. Cromatograma obtido em HPLC do padrão de rhPDGF-BB e gerado pelo próprio software do equipamento. O eixo X indica o tempo (min) e o eixo Y a detecção pela luz UV. Os círculos representam os picos obtidos.

A detecção por MALDI-TOF é uma alternativa para a detecção de baixas concentrações proteicas quando a detecção por HPLC não é possível. A utilização do equipamento situado na Universidade Católica de Brasília para a comprovação da presença do rhPDGF-BB nas amostras foi impossibilitada devido à um problema no computador do equipamento, que não foi solucionado até a entrega deste trabalho.

4.2.2 Coluna HiTrap Phenyl FF (High Sub)

A busca por uma nova coluna para purificação do rhPDGF-BB se deu pelo fato da coluna de Heparina, já estabelecida para a purificação, possuir um alto valor de compra (5 colunas de 5mL custam R\$ 6.783,00, valor consultado em 2019). Além disso, o rhPDGF-BB é uma proteína hidrofóbica (COOL; NURCOMBE, 2018; STROOBANT; WATERFIELD, 1984). Como a coluna *HiTrap Phenyl FF (high sub)* é uma coluna de interação hidrofóbica, foi a opção escolhida, pois além de ser compatível com a característica da proteína, estava disponível para uso no laboratório e possui um custo reduzido quando comparada à outra coluna (5 colunas de 5 mL custam R\$ 3.567, valor consultado em 2019). É importante ressaltar alguns pontos dessa coluna de interação hidrofóbica. Segundo o livro de instruções fornecido pela empresa, quando se aumenta a concentração do sal, eleva a interação hidrofóbica e aumenta também a capacidade de adsorção da resina da coluna por proteínas.

Antes das purificações se iniciarem na coluna de afinidade a heparina, uma primeira amostra (amostra 2) foi escolhida para estabelecer os parâmetros para as próximas purificações na coluna de interação hidrofóbica. A amostra selecionada obteve dois picos de purificação, mas no final da corrida, como é possível observar na Figura 32, na extrema direita do gráfico.

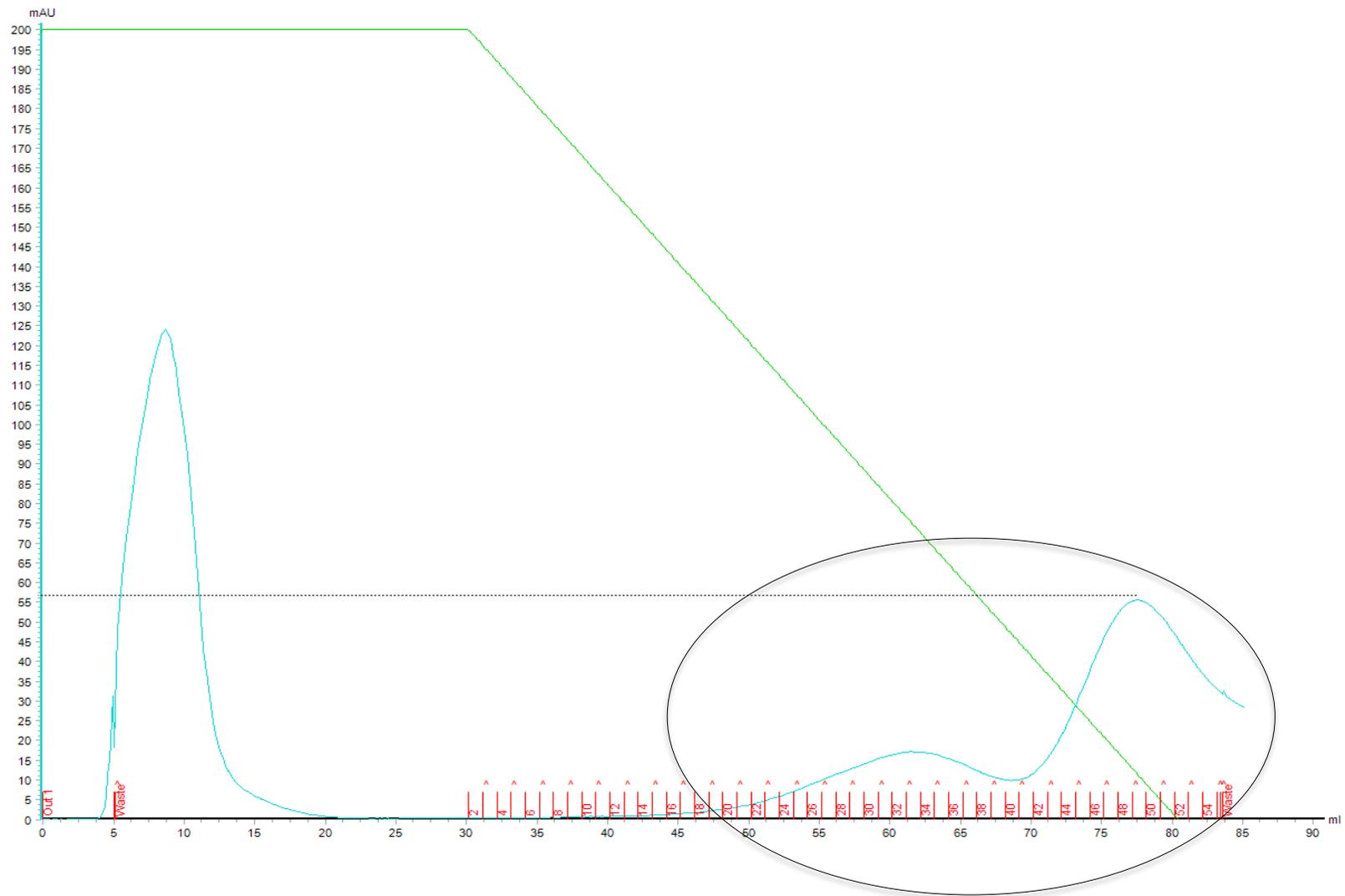


Figura 32. Perfil de purificação da amostra 2 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Phenyl FF (high sub), solução com molaridade de 1,5 M. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas. O círculo preto indica os picos obtidos no processo de purificação durante a eluição.

As frações referentes aos picos (pico maior e pico menor) foram coletadas, a quantificação de proteína por Bradford foi realizada, dando positivo apenas para o pico maior (pico menor obteve valor negativo, pico maior obteve aproximadamente 0,42 mg/mL). O SDS-PAGE foi realizado em seguida para verificação do peso molecular da molécula purificada, sendo esperado o valor de aproximadamente 25 kDa, referente ao peso da proteína de interesse. Entretanto, o resultado observado no gel indica presença proteica no pico maior e com o dobro do valor almejado, como é possível visualizar na Figura 33.

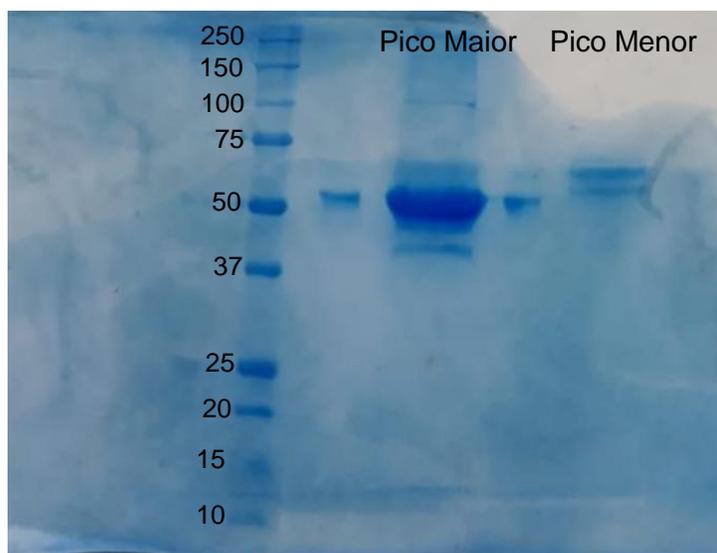


Figura 33. Resultado do gel de SDS-PAGE da amostra teste purificada no ÄKTA, pipetados na sequência: marcador molecular (dado em kDa), pico maior gerado no ÄKTA e pico menor. O pico maior acabou vazando para os lados devido ao excesso de amostra pipetado para o tamanho do poço, cerca de 30L.

O pico ao extremo final da eluição e o resultado do peso molecular encontrado no gel, indicando uma possível união de dois dímeros da proteína fez com que uma nova abordagem fosse tomada. O livro de instruções disponibilizado pela empresa sugere que, quando esse resultado for obtido na coluna de purificação, deve-se abaixar a molaridade de sulfato de amônia ou mudar o pH da solução para que o pico fique mais centralizado na corrida, ou seja, para que a ligação se torne mais fraca e a molécula se desprenda

antes na eluição. A mudança de molaridade foi a opção escolhida pois uma alteração no pH poderia desnaturar a proteína ou prejudicar nosso processo de purificação.

Após o ajuste de molaridade do tampão para 1 M, as amostras 6 e 7 foram injetadas no equipamento, porém, não foram observados picos durante a eluição (Figura 34 e Figura 35), explicitando que a mudança de molaridade havia desfavorecido a purificação, fazendo com que a proteína não se ligasse na coluna, ou seja, a interação hidrofóbica se tornou fraca demais.

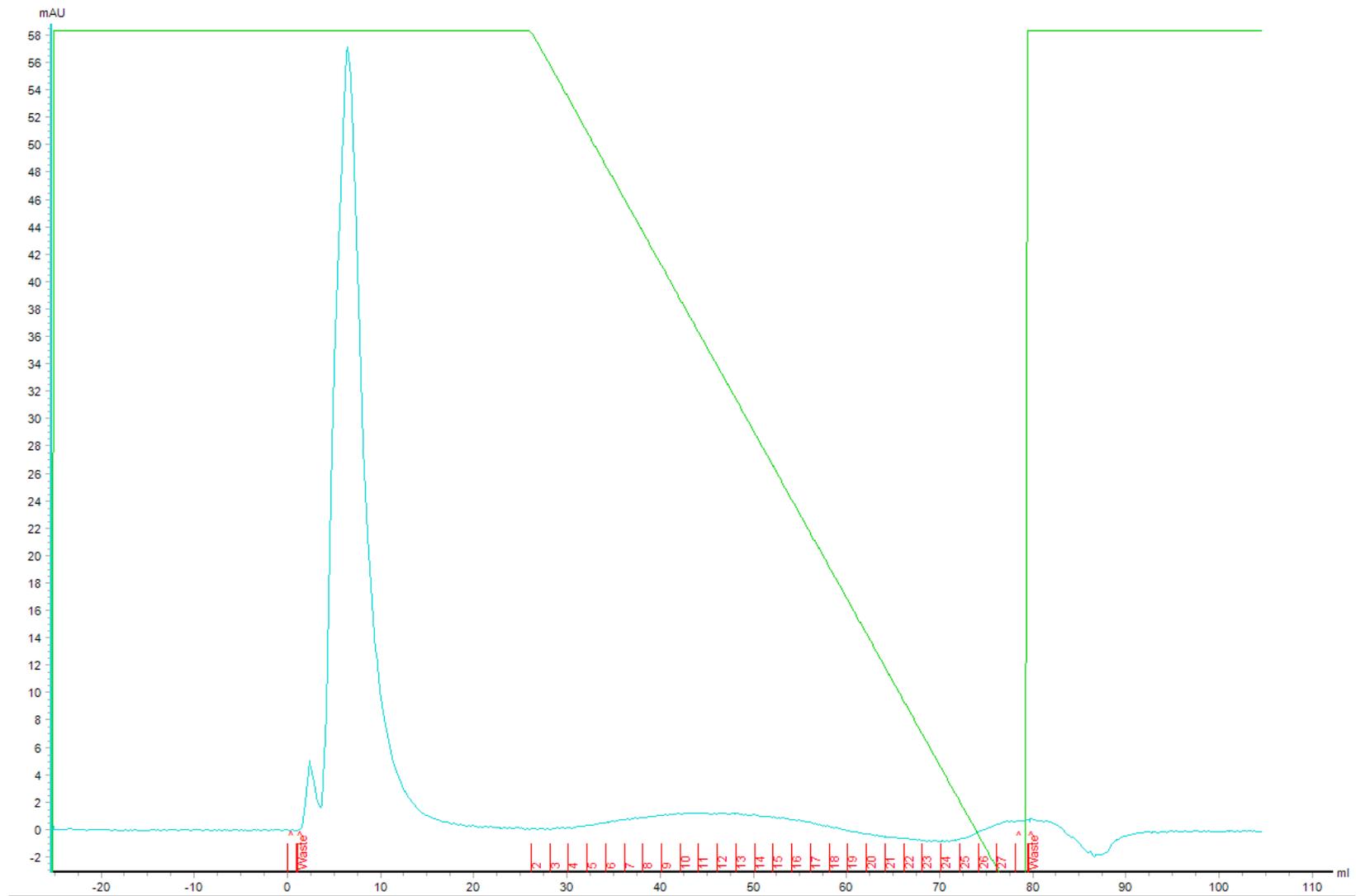


Figura 34. Perfil de purificação da amostra 6 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Phenyl FF (high sub), solução com molaridade de 1M, não obtendo pico. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.

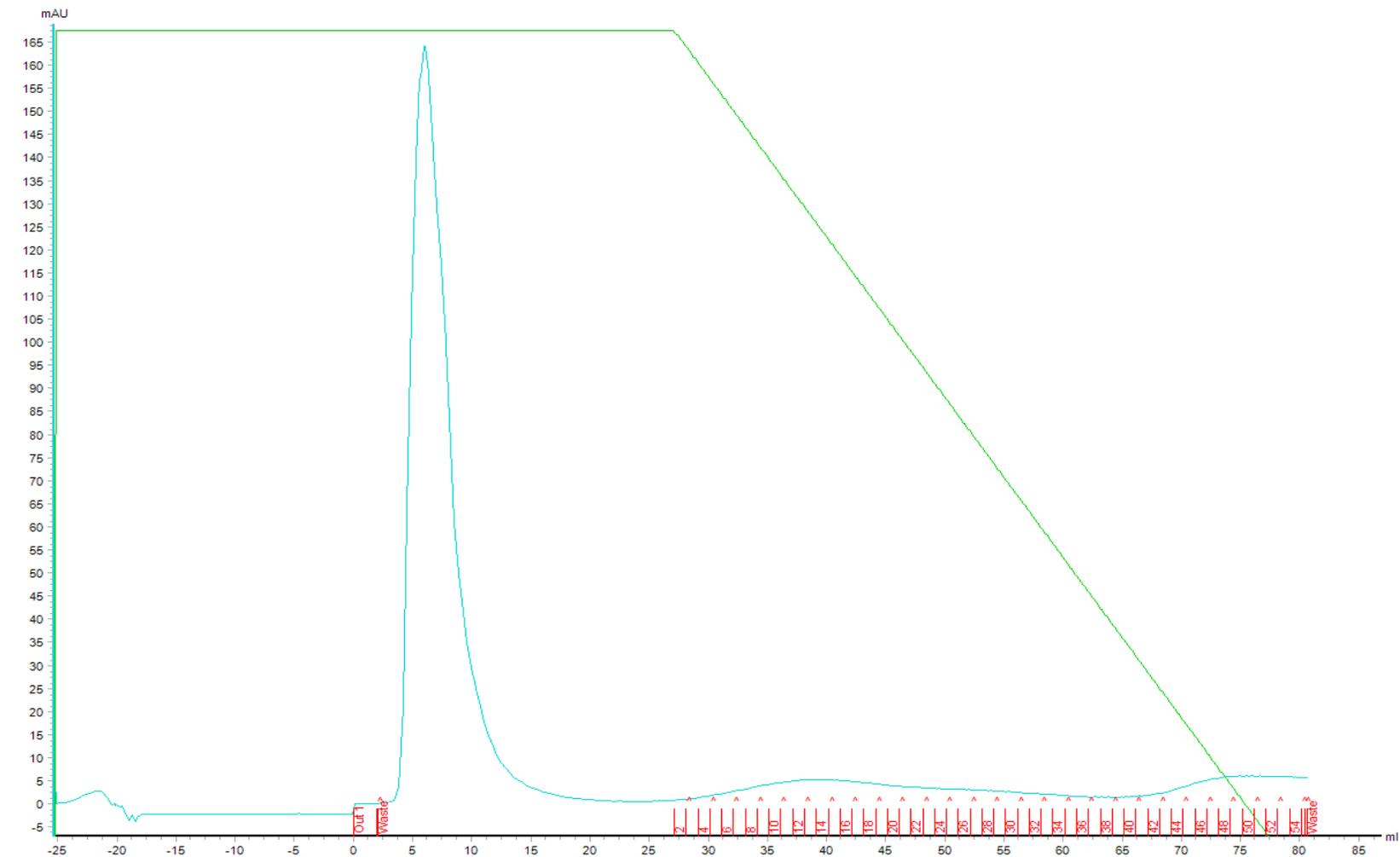


Figura 35. Perfil de purificação da amostra 7 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Phenyl FF (high sub), solução com molaridade de 1M, não obtendo pico. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.

Como o pico se estabeleceu no final da eluição com a molaridade de 1,5 e não se obteve pico com 1,0 M, foi testada uma solução intermediária com 1,3 M de sulfato de amônio com as amostras 2 e 6. O pico obtido estava perto de 10 mAU, e permaneceu no final da corrida, como mostrado na Figura 36 e na Figura 37.

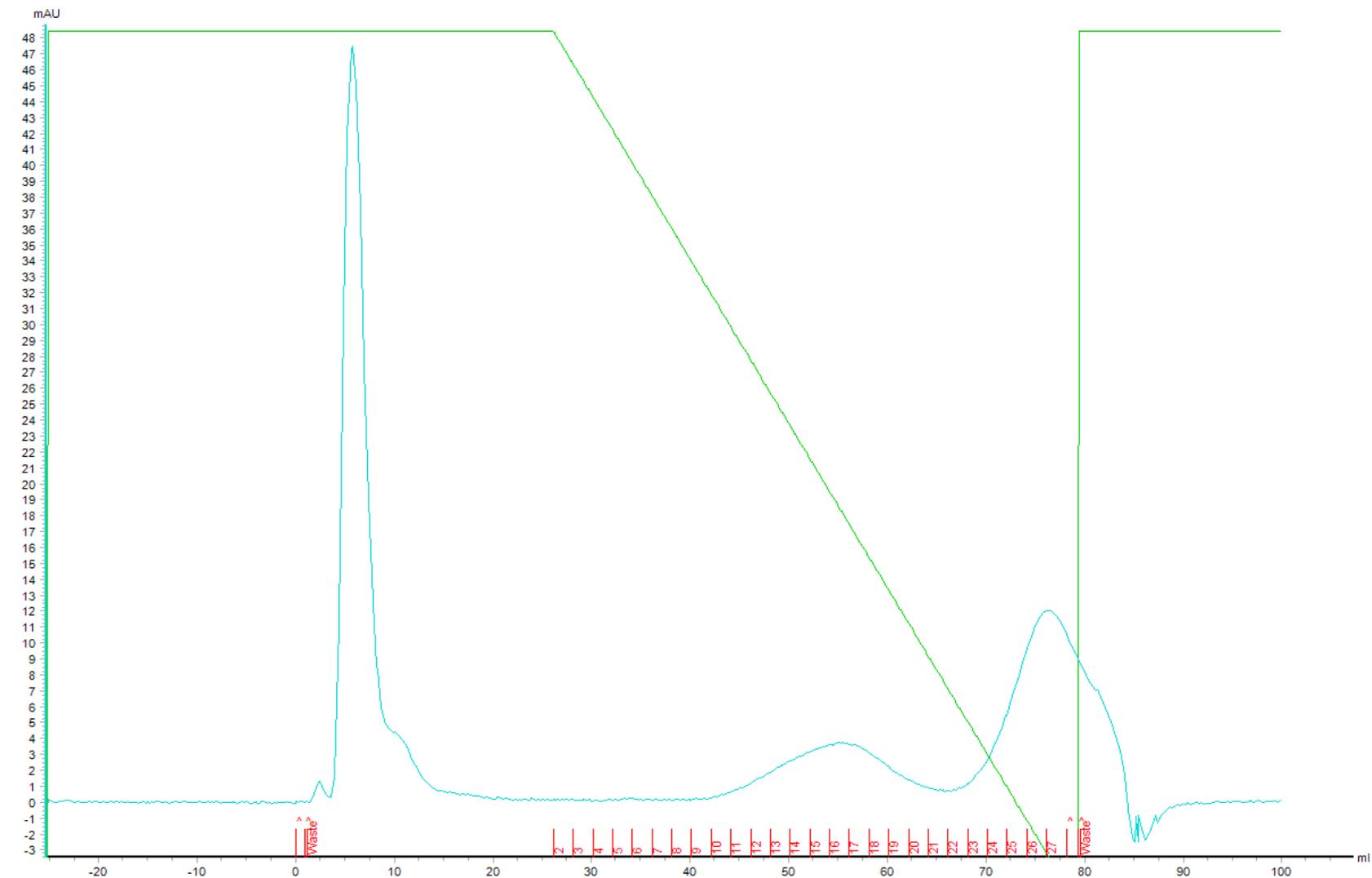


Figura 36. Perfil de purificação da amostra 2 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Phenyl FF (high sub), solução com molaridade de 1,3 M, com pico no extremo final da corrida. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.

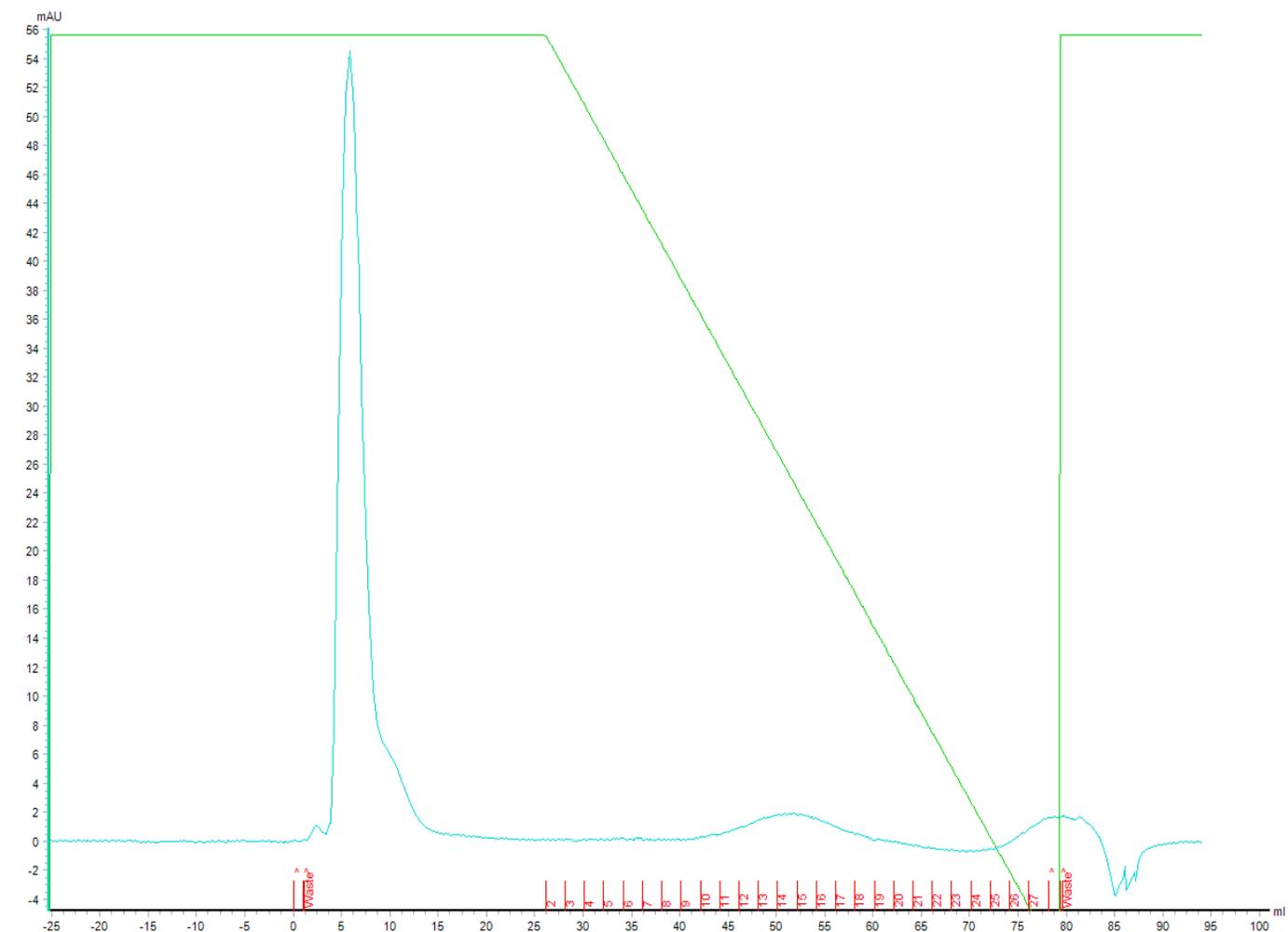


Figura 37. Perfil de purificação da amostra 6 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Phenyl FF (high sub), solução com molaridade de 1,3 M, com pico no extremo final da corrida. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorvância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.

Com os resultados obtidos com o tampão de 1,3 M, optou-se por injetar a amostra 6 novamente na coluna utilizando o tampão usado na coluna de Heparina (Tris 20mM e NaCl 1M), pois a troca de sal é uma solução para resolver os problemas com a ligação à coluna e sua eluição. O resultado da purificação é apresentado na Figura 38.

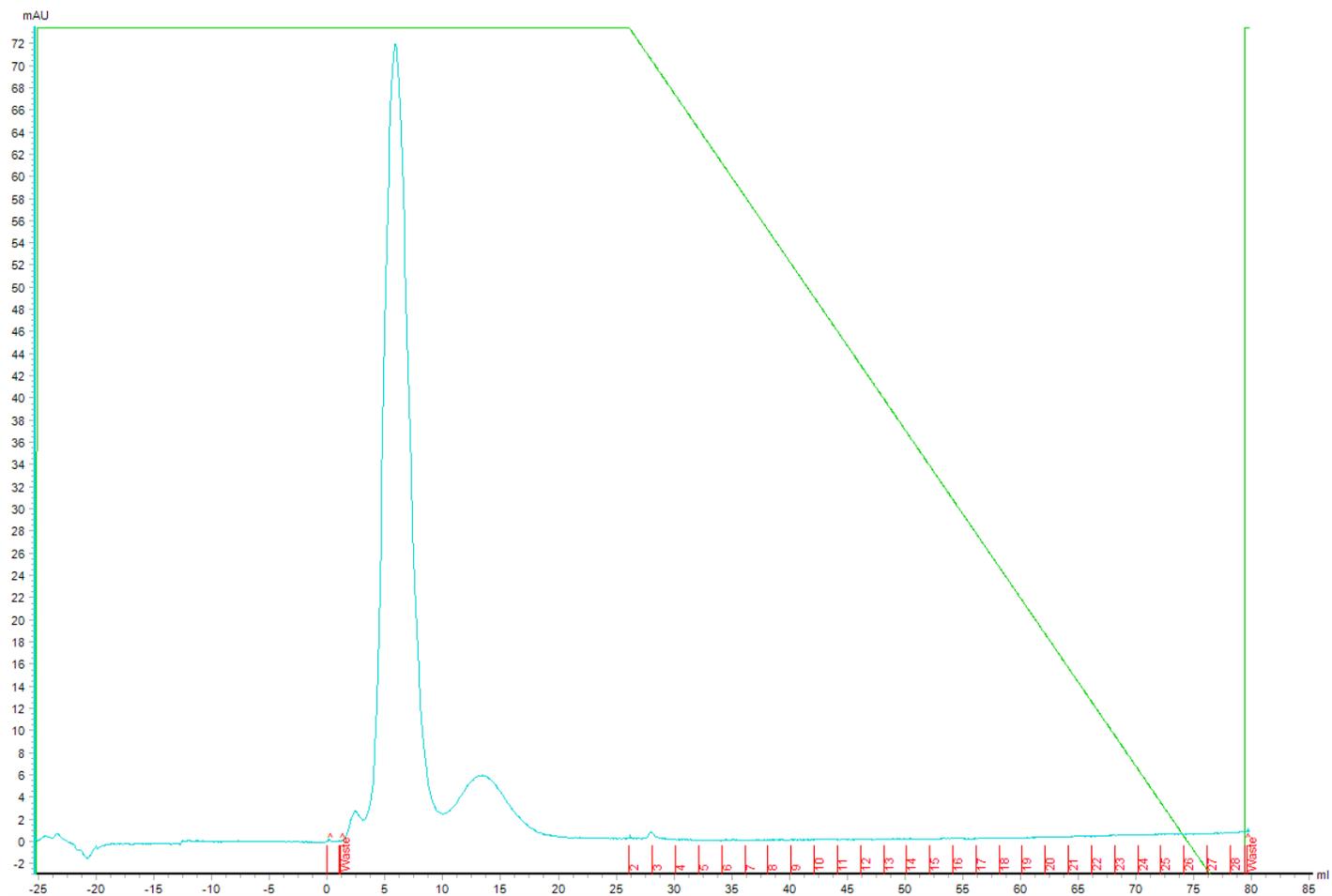


Figura 38. Perfil de purificação da amostra 6 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Phenyl FF (high sub), com troca de solução para a contendo Tris e NaCl, sem a presença de pico. No gráfico, o eixo Y representa a absorbância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume. A linha azul representa a absorbância, a verde representa a porcentagem de *Start Buffer* no sistema, e em vermelho as frações coletadas.

O estabelecimento do processo de purificação não foi possível para essa coluna utilizando o sulfato de amônio. Ainda assim, a escolha dessa coluna aparenta ser uma boa alternativa à coluna de heparina, pois obteve no primeiro teste de purificação com molaridade de 1,5 um pico com altura aproximada de 55 mAU, mesma altura alcançada no pico obtido pela coluna de heparina para a mesma amostra. A otimização do processo de adsorção e dessorção da proteína para essa coluna pode trazer maior grau de recuperação proteica, bem como maior pureza nas amostras. Para entender o processo

de adsorção e dessorção da proteína na coluna e como a escolha do sal pode afetar essa interação, é importante entender o conceito de “*salting-in*” e “*salting-out*”. O efeito conhecido como *salting-out* depende de estruturas chamadas de cosmotrópicas, que são compostos hidratados e tem efeitos em proteínas e macromoléculas, promovendo interações hidrofóbicas e aumentando a capacidade de adsorção com a coluna em questão. Já o efeito *salting-in* envolve estruturas caotrópicas que são desestabilizantes das dobras proteicas, desfavorecendo as interações hidrofóbicas por aumentar a sua solubilidade, fazendo com que a dessorção das proteínas ocorra e a eluição e coleta das amostras purificadas aconteça (GE HEALTHCARE, 2018; ZHANG; CREMER, 2006; NUCCI; VANDERKOOOL, 2008). O fabricante do equipamento orienta que quando esses perfis de purificação são obtidos com o uso desta coluna, um sal que forneça um ambiente menos hidrofóbico pode ser uma solução. Sendo assim, ocorreria a adsorção da proteína à coluna, mas com uma interação não tão forte a ponto de se desprender apenas no final da corrida. Sais como Na₂SO₄, NaCl, KCl e CH₃COONH₄ são opções listadas no manual e devem ser levadas em consideração como alternativas para testes, encontrando um balanço entre o efeito “*salting-in*” e “*salting-out*”, demonstrado na Figura 39 (GE HEALTHCARE, 2018).

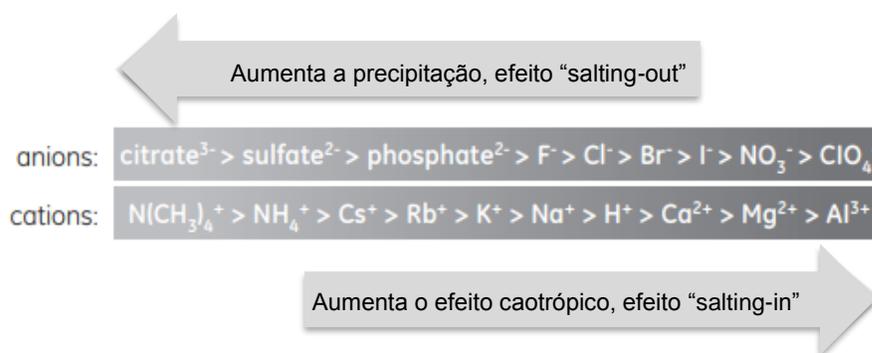


Figura 39. Ânions e Cations que podem ser utilizados para aumentar o efeito “*salting-out*” ou “*salting-in*” (Adaptado de GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, 2018).

5. CONCLUSÃO

5.1. VALIDAÇÃO DOS TESTES COLORIMÉTRICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE E LACTATO

Os testes colorimétricos apresentaram diferença estatística para quase todos os pontos analisados quando comparados aos resultados obtidos no HPLC, que possui maior fidedignidade, superestimando (para glicose) ou subestimando (para lactato) os valores de concentração. Mesmo assim, apresentaram formatos de curvas similares aos formatos gerados pelos dados do HPLC e podem ser usados como guias da situação do meio celular em tempo real durante o processo, para possibilitar a tomada de medidas de forma rápida e eficaz.

5.2. PURIFICAÇÃO NA COLUNA HITRAP HEPARIN HP

A purificação foi realizada obtendo um único pico de purificação no centro da eluição, sem picos interferentes, que é a recomendação da empresa GE Healthcare Life Sciences, produtora tanto do equipamento ÄKTA quanto da coluna. As amostras encontravam-se diluídas pelo processo e com baixa concentração de proteínas, o que dificultou sua detecção. O SDS-PAGE apresentou bandas fracas, e a constatação da presença do rhPDGF-BB não pode ser realizada devido à não detecção via HPLC devido à baixa concentração e a problemas técnicos para detecção de massa no equipamento MALDI.

5.3. PURIFICAÇÃO NA COLUNA HITRAP PHENYL FF (HIGH SUB)

Não foi possível estabelecer o processo de purificação para essa coluna, pois dificuldades com o sal sugerido pelo fabricante juntamente com sua molaridade fizeram com que o pico de purificação surgisse ao extremo final da eluição, o que provoca perda de proteína no processo, ou o pico não foi estabelecido quando a molaridade foi diminuída. Ainda assim, apresenta potencial de purificação para a proteína rhPDGF-BB e a continuação dos estudos com outros sais deve ser realizada.

6. BIBLIOGRAFIA

ALBRECHT, Jan; NOREMBERG, Michael D. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. **Hepatology**, v. 44, n. 4, p. 788-794, 2006.

ALTAMIRANO, Claudia et al. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 6, p. 1032-1041, 2001.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes 2019. **Diabetes Care**, v. 42, p. S81-S187, 2019.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes 2010. **Diabetes Care**, v. 33, n. Supplement 1, p. S62-S69, 2010

BABAVALIAN, H. et al. Cloning and expression of recombinant human platelet-derived growth factor-BB in Pichia Pink. **Cellular and Molecular Biology**, v. 62, n. 8, p. 45-51, 2016.

BALDO, Brian A. Side effects of cytokines approved for therapy. **Drug safety**, v. 37, n. 11, p. 921-943, 2014.

BERTHOLD, Wolf; WALTER, Joachim. Protein purification: aspects of processes for pharmaceutical products. **Biologicals**, v. 22, n. 2, p. 135-150, 1994.

BIAGGIO, Rafael Tagé. **Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BIOMIMETIC PHARMACEUTICALS. RhPDGF-BB Technology Overview. **Biomimetic Therapeutics, Inc.**, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual do Pé Diabético: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica** - Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

CAMILLOIII, Luis Antônio Sangionill Giovana. Suscetibilidade de linhagens celulares e cultivos primários ao Neospora caninum. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, 2009.

CANDIANO, Giovanni et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CAPLAN, Arnold I.; CORREA, Diego. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 12, p. 1795-1803, 2011.

CARVALHO, Lucas Silva et al. Production Processes for Monoclonal Antibodies. In: **Fermentation Processes**. IntechOpen, 2017.

CHEN, Wenjing et al. Transgenic Silkworm-Based Silk Gland Bioreactor for Large Scale Production of Bioactive Human Platelet-Derived Growth Factor (PDGF-BB) in Silk Cocoons. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2533, 2018.

CHOI, Jun-Hui et al. Expression and production of therapeutic recombinant human platelet-derived growth factor-BB in *Pleurotus eryngii*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 611-623, 2011.

COOL, Simon; NURCOMBE, Victor. **Pdgf-b/pdgf-bb binding variants of heparan sulfates**. U.S. Patent Application n. 15/542,123, 13 set. 2018.

CRUZ, H. J. et al. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 1-2, p. 43-52, 2000.

CRUZAT, Vinicius Fernandes; PETRY, Éder Ricardo; TIRAPEGUI, Júlio. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 392-397, 2009

DAVIS, J. 10 Systems for Cell Culture Scale-up. **Medicines from Animal Cell Culture**, p. 145, 2007.

DECARLI, Monize Caiado et al. DROSOPHILA S2 cell culture in a WAVE Bioreactor: potential for scaling up the production of the recombinant rabies virus glycoprotein. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 11, p. 4773-4783, 2018.

DIGIOVANNI, Christopher W.; PETRICEK, James M. The evolution of rhPDGF-BB in musculoskeletal repair and its role in foot and ankle fusion surgery. **Foot and Ankle Clinics**, v. 15, n. 4, p. 621-640, 2010.

DUMONT, Jennifer et al. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1110-1122, 2016.

EAGLE, Harry. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v. 122, n. 3168, p. 501-504, 1955.

ELIAS, Cynthia B. et al. Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and trichoplusiani insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 1, p. 90-97, 2003.

ESTES, Scott; MELVILLE, Mark. Mammalian cell line developments in speed and efficiency. In: **Mammalian cell cultures for biologics manufacturing**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 11-33.

FARIA, Anízio M. et al. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, 2006.

FERREIRA, Juliana Carvalho; PATINO, Cecilia Maria. O que realmente significa o valor-p?. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 5, p. 485-485, 2015.

GASTEIGER, Elisabeth et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: **The proteomics protocols handbook**. Humana press, 2005. p. 571-607.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. HiTrap™ Heparin HP. **Instructions 71-7004-00 AU**, 2014. Disponível em: <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11177>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. HiTrap™ HIC columns. **Instructions 1103452 AH**, 2018. Disponível em: <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13692>>. Acesso em: 14 jun. 2019

GHADERI, Darius et al. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 863, 2010.

GLASER, Vicki. Disposable bioreactors become standard fare. **GEN**, v. 25, n. 14, p. 80-81, 2005.

GÖKŞEN, Sibel; BALABANLI, Barbaros; COŞKUN-CEVHER, Şule. Application of platelet derived growth factor-BB and diabetic wound healing: the relationship with oxidative events. **Free Radical Research**, v. 51, n. 5, p. 498-505, 2017.

GRÄSLUND, Susanne et al. Protein production and purification. **Nature methods**, v. 5, n. 2, p. 135, 2008.

GUPTA, Priyanka et al. Optimization of agitation speed in spinner flask for microcarrier structural integrity and expansion of induced pluripotent stem cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 1, p. 45-59, 2016.

HAN, George; CEILLEY, Roger. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. **Advances in therapy**, v. 34, n. 3, p. 599-610, 2017.

HAO, Cui et al. Heparin: An essential drug for modern medicine. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 163, p. 1-19, 2019.

HASSELL, T.; GLEAVE, S.; BUTLER, M. Growth inhibition in animal cell culture. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 29-41, 1991.

HEASLEY, Lynn E.; JOHNSON, G. L. The beta-PDGF receptor induces neuronal differentiation of PC12 cells. **Molecular biology of the cell**, v. 3, n. 5, p. 545-553, 1992.

HENRY, Olivier; DUROCHER, Yves. Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. **Metabolic engineering**, v. 13, n. 5, p. 499-507, 2011.

HENRY, O.; PERRIER, M.; KAMEN, A. Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors. **Metabolic engineering**, v. 7, n. 5-6, p. 467-476, 2005.

HONG, Xin; MENG, Yuling; KALKANIS, Steven N. Serum proteins are extracted along with monolayer cells in plasticware and interfere with protein analysis. **Journal of biological methods**, v. 3, n. 4, 2016.

HUNTINGTON, G. B.; ARCHIBEQUE, S. L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. E-Suppl, p. 1-11, 2000.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas, 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation**, 2017.

KARUMURI, Nagaraju N. et al. Simple, rapid, high-purity preparation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 9, p. 1333-1339, 2007.

KASVI. **Frasco Para Cultivo De Células 75 Cm2 Tampa Vent (C/ Filtro).5 Un/Pct**. Disponível em: <[https://kasvi.com.br/produtos/?ref=K11-2250&desc=frasco-para-cultivo-de-c%C3%A9lulas-75-cm2-tampa-vent-\(c/-filtro\).5-un/pct](https://kasvi.com.br/produtos/?ref=K11-2250&desc=frasco-para-cultivo-de-c%C3%A9lulas-75-cm2-tampa-vent-(c/-filtro).5-un/pct)>. Acesso em: 3 jun. 2019.

KATUNUMA, Nobuhiko; OKADA, Mitsuko; NISHII, Yasuho. Regulation of the urea cycle and TCA cycle by ammonia. **Advances in enzyme regulation**, v. 4, p. 317-335, 1966.

K.NBS. **FibraStage™ Disposable, High-Yield Cell Culture System**. Disponível em: <<http://www.knbs.co.kr/pdf/fibrastagebrochure.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2019

LANDSMAN, Adam et al. Diabetic foot ulcers treated with becaplermin and TheraGauze, a moisture-controlling smart dressing: a randomized, multicenter, prospective analysis. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 100, n. 3, p. 155-160, 2010.

LEE, Yih Yean et al. Low-glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus production. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 2, p. 501-509, 2003.

LIU, Chi-Hsien; LIU, Yi-Xin; WU, Wei-Chi. Facile development of medium optimization for antibody production: implementation in spinner flask and hollow fiber reactor. **Cytotechnology**, v. 70, n. 6, p. 1631-1642, 2018.

MAGRI, Agnes et al. A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods—colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 27, p. 6985-6990, 2018.

MANDELBAUM, Samuel Henrique; DI SANTIS, Érico Pampado; MANDELBAUM, Maria Helena Sant'Ana. Cicatrização: current concepts and auxiliary resources. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.

MARTÍ-CARVAJAL, Arturo J. et al. Growth factors for treating diabetic foot ulcers. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 10, 2015.

MCLIMANS, William F. et al. The submerged culture of mammalian cells: the spinner culture. **The Journal of Immunology**, v. 79, n. 5, p. 428-433, 1957.

MENDEZ, Andreas SL; STEPPE, Martin; SCHAPOVAL, Elfrides ES. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 33, n. 5, p. 947-954, 2003.

MENZEL-SEVERING, J. Emerging techniques to treat corneal neovascularisation. **Eye**, v. 26, n. 1, p. 2, 2012.

Mind the Graph. Disponível em: <<https://www.mindthegraph.com/>>. Acesso em: 20 mar. 2019

MIZUKAMI, Amanda et al. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells in a disposable fixed bed culture system. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 2, p. 568-572, 2013.

MIZUKAMI, Amanda; SWIECH, Kamilla. Mesenchymal stromal cells: from discovery to manufacturing and commercialization. **Stem cells international**, v. 2018, 2018.

NFOR, Beckley K. et al. Rational and systematic protein purification process development: the next generation. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 673-679, 2009

NUCCI, Nathaniel V.; VANDERKOOI, Jane M. Effects of salts of the Hofmeister series on the hydrogen bond network of water. **Journal of molecular liquids**, v. 143, n. 2-3, p. 160-170, 2008.

OZTURK, Sadettin S.; RILEY, Mark R.; PALSSON, Bernhard O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 39, n. 4, p. 418-431, 1992.

PAPANAS, Nikolaos; MALTEZOS, Efstratios. Becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. **Clinical interventions in aging**, v. 3, n. 2, p. 233-240, 2008.

PHELAN, Katy; MAY, Kristin M. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. **Current protocols in cell biology**, v. 66, n. 1, p. 1.1. 1-1.1. 22, 2015.

PÖRTNER, R. Bioreactors for mammalian cells. In: **Animal Cell Culture**. Springer, Cham, 2015. p. 89-135.

ProtParam. Disponível em: <<https://web.expasy.org/protparam/>>. Acesso em: 12 abr. 2019

RAMOS, Joana Nery. **A contribuição das doenças metabólicas no desenvolvimento do cancro**. 2014. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Universidade de Lisboa, Lisboa.

RATH, Arianna et al. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1760-1765, 2009.

RAY, Angel K. et al. Platelet-derived growth factor-BB stimulated cell migration mediated through p38 signal transduction pathway in periodontal cells. **Journal of periodontology**, v. 74, n. 9, p. 1320-1328, 2003.

ROCHA, Hugo et al. Rastreio neonatal dos défices do ciclo da ureia em Portugal. **Boletim Epidemiológico Observações**, v. 5, p. 12-15, 2016.

ROMEU-NADAL, M. et al. Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. **Journal of Chromatography B**, v. 830, n. 1, p. 41-46, 2006.

RYLL, Thomas; VALLEY, Ulrich; WAGNER, Roland. Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 2, p. 184-193, 1994.

RYU, Wang-Kyun et al. Rapid determination of capsaicinoids by colorimetric method. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 4, p. 798-803, 2017.

SAKASHITA, Shigeo; ENGVALL, Eva; RUOSLAHTI, Erkki. Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. **FEBS letters**, v. 116, n. 2, p. 243-246, 1980.

SAMUEL, A. et al. Platelet derived growth factor in diabetic lower extremity ulcer: A randomized, double blind, placebo controlled study in Indian condition. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 9, p. 3887–3892, 2016.

SASAKI, Masahiro et al. Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 183-188, 2005.

SCHNEIDER, Ian C.; HAUGH, Jason M. Mechanisms of gradient sensing and chemotaxis: conserved pathways, diverse regulation. **Cell Cycle**, v. 5, n. 11, p. 1130-1134, 2006.

SINGH, Vijay. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. **Cytotechnology**, v. 30, n. 1-3, p. 149-158, 1999.

SOARES, Carlos RJ et al. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the λ PL promoter: use of HPLC for product quantification. **Protein Engineering**, v. 16, n. 12, p. 1131-1138, 2003.

STEPHANO, Marco Antonio; SANTOS, Patrícia Barros dos. Tecnologia de cultivo de células de mamíferos. **Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial**, 2015.

STROOBANT, P.; WATERFIELD, M. D. Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. **The EMBO journal**, v. 3, n. 12, p. 2963-2967, 1984

TERADA, Satoshi et al. Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. **Cytotechnology**, v. 40, n. 1-3, p. 3-12, 2002.

TSAO, Y.-S. et al. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. **Journal of biotechnology**, v. 118, n. 3, p. 316-327, 2005.

VARLEY, J.; BIRCH, J. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. **Cytotechnology**, v. 29, n. 3, p. 177, 1999.

WANG, Lulan et al. High yield of human monoclonal antibody produced by stably transfected *Drosophila schneider* 2 cells in perfusion culture using wave bioreactor. **Molecular biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 170-179, 2012.

WANG, Y. et al. High-level secretory production of recombinant human platelet-derived growth factor-BB by *Saccharomyces cerevisiae* under the non-selective conditions. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2009.

WANSCHER, Anne Sofie Molsted et al. Production of functional human insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) using recombinant expression in HEK293 cells. **Protein expression and purification**, v. 108, p. 97-105, 2015.

WERNER, Sören et al. Bioreactor technology for sustainable production of plant cell-derived products. **Bioprocessing of Plant In Vitro Systems**, p. 413-432, 2018.

XIAO, Qingzhong et al. Stem cell-derived Sca-1+ progenitors differentiate into smooth muscle cells, which is mediated by collagen IV-integrin $\alpha1/\beta1/\alpha v$ and PDGF receptor pathways. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C342-C352, 2007.

YAMAMOTO, K. et al. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor β . **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 766–772, 2008.

YARDIMCI, Batuhan et al. Monitoring Humic Acid Photodegradation by CUPRAC Colorimetric and HPLC Determination of Dihydroxybenzoate Isomers Produced From a Salicylate Probe. **Analytical Letters**, p. 1-14, 2019.

YAZDANPANA, Leila; NASIRI, Morteza; ADARVISHI, Sara. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 1, p. 37, 2015.

YU, Ying et al. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 284, n. 2, p. C316-C330, 2003.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZAULYANOV, Larissa; KIRSNER, Robert S. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf®) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 1, p. 93, 2007.

ZHANG, Yanjie; CREMER, Paul S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 6, p. 658-663, 2006.

ZIYADEH, Najat et al. A matched cohort study of the risk of cancer in users of becaplermin. **Advances in skin & wound care**, v. 24, n. 1, p. 31-39, 2011.