



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

**EXPRESSÃO ESTÁVEL DE TIREOTROFINA HUMANA (r-hTSH)
EM CÉLULAS DE MAMÍFERO (CHO) QUE EXPRESSAM α 2,6-
SIALILTRANSFERASE**

Renata Damiani

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

Orientadora:
Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela

São Paulo

2009

Dedico este trabalho

A meus pais, Helena Maria Damiani e Antonio Estevam Damiani, por todo amor, carinho, apoio, compreensão e pelo grande incentivo de uma vida inteira. Sem vocês não teria conseguido metade do que já consegui até hoje.

Aos meus irmãos Marcelo Estevam Damiani e Karina Damiani por todos os momentos que dividimos durante nossas vidas.

A meus avós, Maria de Lourdes da Conceição Chagas e Dorgamim Francisco Chagas, por todos os ensinamentos, por todo amor e carinho a mim dispensados...

A toda minha família, minha base, meu porto seguro, sem os quais meus sonhos seriam apenas sonhos...

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre guiar meus passos e meus pensamentos e por ter me aberto todas as portas até aqui.

À Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, a quem devo muito respeito e gratidão, pela orientação, paciência, incentivo, amizade e por sempre ter acreditado em meu trabalho.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela confiança, incentivo e oportunidade a mim dispensados.

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

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

Ao amigo Johnny, fundamental para a realização deste trabalho, por todo apoio, paciência, ensinamentos e preciosa colaboração.

Ao amigo Herbert, que muitas vezes deixou o que estava fazendo para me ajudar em algum experimento ou em alguma figura.

Aos amigos Junqueira, Rosângela e Zé Maria, pelo companheirismo diário e por estarem sempre prontos a ajudar.

Às amigas Cláudia, Eliza, Geyza e Susana por toda amizade consolidada, por todos os conselhos, por não terem me deixado desanimar diante das dificuldades que encontrei e por terem tornado minha caminhada até aqui mais fácil.

Às amigas Beatriz, Camila, Danielle, Juliana, Karina, Keli, Larissa e Rosa, por todos os HHs, por todas as risadas, por todos bons momentos que passamos juntas.

Aos amigos Arlete, Cristiane, Dani Yoshito, Diane, Eduardo, Eric, Fernanda, Janaina, Jean, Júnior, Márcia, Marcos, Marcos Jr., Miriam, Natalia, Neide, Nélio, Regina, Rodrigo, Rodrigo Mosca, Rute, Sueli, Stefany, Taís e Tamara, por tornarem os meus dias e meus almoços mais felizes...

Aos amigos Priscila e Tiago pelas longas conversas e toda cumplicidade nos momentos mais difíceis.

Ao amigo Maurício, por nunca me deixar esquecer que eu precisava escrever...

Às amigas Edna, Néia e Sandra por todas as “fofocas” e por me proporcionarem bons momentos de descontração ao longo desses anos.

Aos amigos Camila, Daniele, Thamara, Rita, Fábio e Julio, por estarem sempre presentes em minha vida, por me ensinarem o significado da amizade verdadeira e nunca me deixarem desistir dos meus sonhos.

À minha cunhada, Giovana, que com toda sua paciência, me ajudou a arrumar muitas figuras.

A todos os colegas do centro de biotecnologia do IPEN que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho...

À CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro

A todos vocês, expresso minha gratidão!!

*“E aqueles que foram vistos dançando foram
julgados insanos por aqueles que não podiam ouvir a
música”*

Friedrich Nietzsche

**EXPRESSÃO ESTÁVEL DE TIREOTROFINA HUMANA (r-hTSH) EM
CÉLULAS DE MAMÍFERO (CHO) QUE EXPRESSAM α 2,6-
SIALILTRANSFERASE**

Renata Damiani

RESUMO

Uma linhagem celular de CHO, previamente modificada geneticamente pela introdução de cDNA da α 2,6 sialiltransferase de rato, gerou, pela primeira vez, um hTSH recombinante com sialilação humanizada (hlsr-hTSH), mais similar ao hormônio nativo, com 61% de ligação de ácido siálico na conformação α 2,3 e 39%, na conformação α 2,6. O clone mais produtivo, quando submetido à amplificação gênica com 8 μ M de metotrexato, apresentou um nível de secreção de aproximadamente 2 μ g de hTSH/10⁶ células/dia, nível este útil para a purificação e caracterização do produto. A massa molecular relativa do heterodímero e das subunidades α e β do hlsr-hTSH purificado, determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF, e a hidrofobicidade relativa, determinada por RP-HPLC, não apresentaram diferenças significativas com relação às preparações de hTSH recombinante derivadas de células CHO sem a modificação devida ao gene da α 2,6 sialiltransferase. Entretanto, algumas diferenças foram observadas na composição dos N-glicanos, com mais estruturas tri- e tetra-sialiladas no hlsr-hTSH. O hlsr-hTSH mostrou-se eqüipotente ($p > 0,05$) à preparação comercial de r-hTSH (Thyrogen) e 1,5 vezes mais potente do que a preparação nativa de hTSH ($p < 0,001$), quando analisado por um bioensaio *in vivo* baseado na capacidade do TSH de estimular a liberação de T₄.

STABLE EXPRESSION OF HUMAN THYROTROPIN (hTSH) IN MAMMALIAN CELLS (CHO) EXPRESSING α 2,6 SIALYLTRANSFERASE

Renata Damiani

ABSTRACT

A CHO cell line, previously genetically modified by the introduction of rat α 2,6-sialyltransferase cDNA, generated for the first time a human-like sialylated recombinant hTSH (hlsr-hTSH) more similar to the native hormone, with 61% of α 2,3- and 39% of α 2,6-linked sialic acid residues. The best clone, when submitted to gene amplification with up to 8 μ M methotrexate, presented a secretion level of $\sim 2 \mu\text{g hTSH}/10^6$ cells/day, useful for product purification and characterization. The relative molecular masses (M_r) of the heterodimer and of the α - and β -subunits of purified hlsr-hTSH, determined by MALDI-TOF mass spectrometry, and the relative hydrophobicities, determined by RP-HPLC, were not remarkably different from those presented by two r-hTSH preparations secreted by normal CHO cells. Some differences were observed, though, in N-glycan composition, with more tri- and much more tetra-sialylated structures in hlsr-hTSH. When analyzed via an *in vivo* bioassay based on hTSH-induced T_4 release in mice, hlsr-hTSH was shown to be equipotent ($p > 0.05$) with the commercial preparation of r-hTSH (Thyrogen), and 1.5-fold more potent than native hTSH ($p < 0.001$).

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 MATERIAL.....	17
3.1.1 Preparações hormonais utilizadas.....	17
3.1.2 Cultivo celular.....	17
3.1.2.1 Reagentes utilizados nos procedimentos de cultivo celular.....	17
3.1.2.2 Linhagem celular.....	18
3.1.2.3 Material plástico estéril.....	18
3.1.3 Purificação e análise do hlsr-hTSH.....	18
3.1.3.1 Colunas cromatográficas.....	18
3.1.3.2 Resinas cromatográficas.....	19
3.1.3.3 Reagentes químicos.....	19
3.1.4 Imunoensaios.....	19
3.1.4.1 Anticorpos.....	19
3.1.4.2 Reagentes para marcação do anticorpo de detecção.....	20
3.1.4.3 Outros reagentes.....	20
3.1.5 Ensaio biológico.....	20
3.1.6 Focalização isoeletrica.....	20
3.1.7 Proteína total.....	21
3.1.8 SDS-PAGE.....	21
3.1.9 Equipamentos e acessórios principais.....	21
3.2 MÉTODOS.....	23
3.2.1 Transfecção pelo método do fosfato de cálcio.....	23
3.2.2 Seleção e amplificação.....	24
3.2.3 Cultivo celular.....	25
3.2.4 Purificação.....	25
3.2.4.1 Cromatografia de troca iônica.....	25
3.2.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa preparativa (RP-HPLC).....	26
3.2.5 Avaliação da proteína de interesse.....	26
3.2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	26

3.2.5.2 Ensaio imunorradiométrico (IRMA).....	27
3.2.5.3 Determinação da proteína total.....	27
3.2.5.4 SDS-PAGE.....	28
3.2.5.5 Atividade biológica.....	28
3.2.5.6 Espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	29
3.2.5.7 Distribuição de isômeros de carga.....	29
3.3 Análise de carboidratos.....	29
3.3.1 Análise estrutural.....	29
3.3.2 Análise da ligação ácido siálico-galactose.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Transfecção, seleção e amplificação das células CHO modificadas.....	31
4.2 Cultivo celular.....	35
4.3 Purificação do hlsr-hTSH.....	37
4.4 Caracterização do produto purificado.....	46
4.4.1 Massa molecular.....	46
4.4.2 Hidrofobicidade.....	49
4.4.3 Atividade biológica.....	50
4.2.4 Distribuição dos isômeros de carga.....	53
4.2.5 Análise estrutural dos carboidratos.....	55
4.2.6 Análise da ligação ácido siálico-galactose.....	61
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÕES.....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

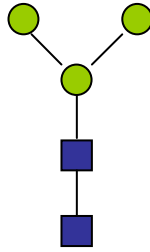
1. INTRODUÇÃO

Muitas glicoproteínas recombinantes têm sido desenvolvidas visando o uso em humanos e a célula mais utilizada para tal é a célula de ovário de hamster chinês (CHO). Esta linhagem celular é amplamente empregada principalmente por ser de fácil e eficiente cultivo, além de expressar um alto nível do transgene. Além disso, os glicanos encontrados nas glicoproteínas derivadas desta linhagem celular são relativamente similares, tanto na estrutura quanto na composição, aos de glicoproteínas humanas (Gooche, 1991; Jenkins, 1994; Bragonzi, 2000; Ribela, 2003; Jeong, 2008).

Um aspecto importante na produção de glicoproteínas com potencial uso terapêutico é a sua glicosilação e heterogeneidade de glicofomas. As cadeias de carboidratos na proteína podem afetar sua solubilidade, susceptibilidade à protease, sua antigenicidade, o “folding” estrutural, a bioatividade e especialmente a sua depuração *in vivo* que modula os níveis circulatórios da glicoproteína (Gooche, 1992; Helton, 1994; Szkudlinski, 2000).

A glicosilação é uma modificação pós-traducional, sendo um processo de múltiplas etapas envolvendo centenas de enzimas. Os oligossacarídeos basicamente podem estar ligados covalentemente a um resíduo de asparagina (Asn) (glicosilação-N) ou à serina (Ser) ou treonina (Thr) (glicosilação-O).

Os N-glicanos apresentam um núcleo pentassacarídeo, que consiste de dois resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e três resíduos de manose (Man), ligado a um resíduo de asparagina de uma sequência de aminoácidos (“sequon” - Asn-x-Ser/Thr, onde x pode ser qualquer aminoácido com exceção da prolina) (Figura 1).

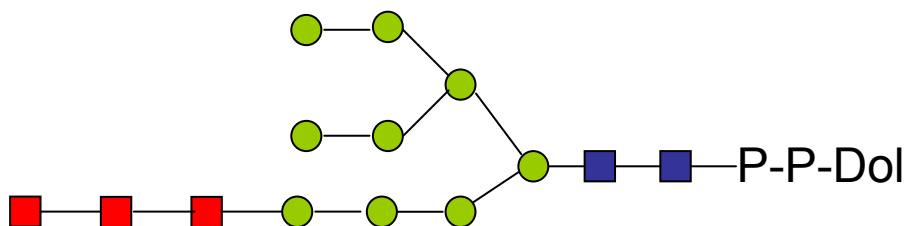


Sequon = Asn – X – Ser/Thr

● Manose ■ N-acetilglucosamina

Figura 1 Núcleo pentassacarídeo de um N-glicano (Butler, 2006)

No processo de biossíntese *in vivo*, os carboidratos são primeiramente ligados a um lipídeo de cadeia longa (dolicol fosfato) e então transferidos à cadeia polipeptídica nascente, sendo esta transferência catalisada pela enzima oligossacariltransferase (Gooche, 1992; Butler, 2006; Molinari, 2007). Isto ocorre no retículo endoplasmático. A estrutura oligossacarídica ligada ao dolicol fosfato compreende três resíduos de glicose (Glc), nove resíduos de manose (Man) e dois resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Figura 2).



$\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$

■ Glc ● Man ■ GlcNAc

Figura 2 Precursor de N-glicano aderido a um dolicol doador (Butler, 2006)

Subsequentemente ocorre uma série de reações catalisadas por exoglicosidases, principalmente pelas enzimas glicosidases e manosidases

existentes na membrana do retículo endoplasmático. A primeira etapa é realizada pela enzima α 1,2 glucosidase (Gluc I) que remove um terminal glicose. Posteriormente, ocorre a remoção dos outros dois resíduos de glicose pela ação da enzima α 1,3 glucosidase II (Gluc II) e de um resíduo de manose pela manosidase I (Ellgaard, 2003). O processamento dos oligossacarídeos continua no complexo de Golgi, catalisado por diferentes exoglicosidases e glicosiltransferases, com adição sequencial de monossacarídeos, tais como galactose, N-acetilglucosamina, fucose e ácido siálico, levando assim às estruturas complexas e definitivas dos carboidratos (Baenziger, 1988; Green, 1988). Na Figura 3 estão esquematizados estes processos.

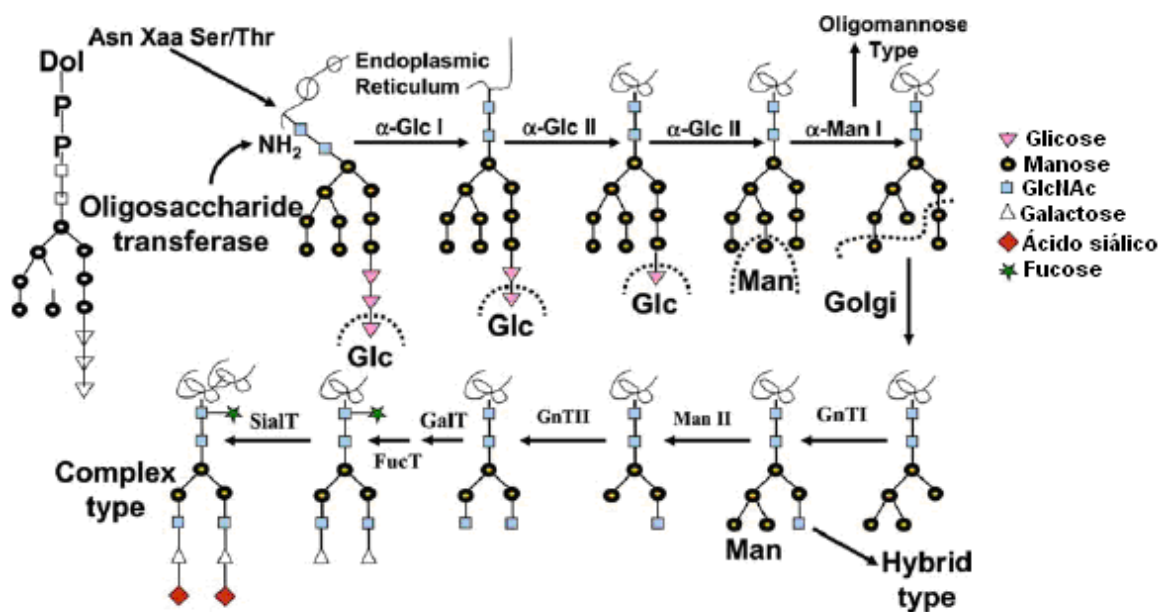
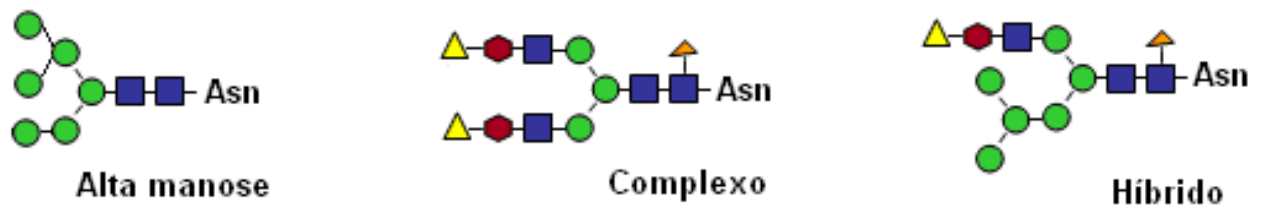


Figura 3 Vias de glicosilação de um N-glicano (Butler, 2006)

Estas reações das transferases no complexo de Golgi, nem sempre ocorrem de forma completa, o que acaba por gerar uma heterogeneidade nas estruturas finais. Tal heterogeneidade fica evidente ao observarmos o nível variável de antenas (2 a 4) nessas estruturas oligossacarídicas. Além disso, pode haver adição de resíduos de ácido siálico na posição terminal da antena, adição de um resíduo de fucose na região inicial do núcleo, o que pode refletir um processo incompleto no complexo de Golgi (Butler, 2006).

Com base na natureza e na localização dos resíduos de açúcares adicionados ao núcleo pentassacarídeo, os glicanos podem ser classificados em

três subgrupos: os glicanos do tipo alta manose, nos quais há a ligação de múltiplos resíduos de manose à estrutura do núcleo; glicanos do tipo complexo, onde existe a ligação de resíduos de N-acetilglucosamina na região da antena e glicanos do tipo híbrido, que contem ambos os resíduos, manose e N-acetilglucosamina, ligados ao núcleo (Figura 4).



(●) Manose, (■) N-acetilglucosamina, (▲) Fucose, (●) Galactose e (▲) Ácido siálico

Figura 4 Tipos de N-glicanos (Morelle, 2006).

Devido à complexa estrutura das glicoproteínas, a sua síntese só pode ser obtida em sistemas de células eucariotas. Entre os sistemas eucariontes, leveduras e plantas são incapazes de realizar glicosilação complexa como a dos mamíferos. Em eucariontes inferiores como leveduras (*pichia pastoris* ou *sacharomyces*, por exemplo), estruturas do tipo alta manose são liberadas como produto final da glicosilação. Nestes sistemas, estruturas híbridas também podem ser encontradas. No caso de células de insetos, existe a produção de oligossacarídeos truncados e estruturas terminadas em manose. Já em células de mamíferos, estruturas do tipo alta manose são produzidas como uma etapa intermediária da formação de estruturas complexas (Ribela, 2003; Betenbaugh, 2005; Butler, 2006; Molinari, 2007).

Portanto, a escolha da célula hospedeira é fundamental para o perfil de glicosilação das glicoproteínas (Rudd, 1997; Raju, 2000; Butler, 2006). A composição de oligossacarídeos aderidos a uma proteína é definida não só pela estrutura da proteína e pelos eventos pós-traducionais que ocorrem no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, mas também pelas condições do cultivo celular e pelo ambiente extracelular aos quais as células produtoras da glicoproteína estão submetidas. De fato, Jenkins e colaboradores (1996) reportam uma piora na glicosilação decorrente do excesso de produtos metabólicos no meio de cultura de células produtoras de glicoproteínas recombinantes, como por

exemplo o aumento da concentração de amônia no meio de cultura diminui a atividade das sililtransferases presentes no complexo de Golgi.

A glicoproteína objeto do presente estudo é a tireotrofina. A tireotrofina humana (hTSH) é um hormônio pertencente à família dos hormônios glicoprotéicos, da qual fazem parte também a foliculotrofina (FSH), luteotrofina (LH) e a gonadotrofina coriônica (CG). São hormônios heterodiméricos, consistindo de duas subunidades ligadas não covalentemente, a subunidade α comum a todos os glicohormônios e a subunidade β única, que confere a especificidade biológica de cada hormônio (Latif, 2001).

A subunidade α é composta por 92 aminoácidos incluindo 10 resíduos de cisteína ligadas por pontes dissulfeto. Esta subunidade é codificada por um único gene, localizado no cromossomo 6 em humanos, apresentando 4 exons e 3 introns, e sua sequência de aminoácidos é comum aos quatro glicohormônios (Fiddes, 1981; Grossmann, 1997, Szkudlinski, 2002). Já os oligossacarídeos de ligação N das cadeias α dos quatro hormônios apresentam diferenças (Amoresano, 1996). O gene da subunidade β dos diferentes glicohormônios difere no tamanho, organização estrutural e localização cromossomal. No caso do TSH, o gene da subunidade β está localizado no cromossomo 1 (Dracopoli, 1986). Muito embora exista cerca de 80% de analogia entre as subunidades β dos hormônios glicoprotéicos, ela é distinta o suficiente para ter uma alta especificidade ao seu respectivo receptor (Pierce, 1981).

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

Este hormônio tem um grande interesse clínico, tanto em aplicações diagnósticas como terapêuticas e tem sido amplamente utilizado para avaliação clínica da função tireoideana, para melhorar a qualidade e interpretação de testes

para a tireóide realizados em medicina nuclear, no tratamento de bócio multinodular e de outras patologias e principalmente no diagnóstico e tratamento do câncer de tireóide (Haugen, 1999; Luster, 2006).

No campo diagnóstico *in vitro*, o advento de imunoenaios ultra-sensíveis possibilitou o uso destes em testes primários da função tireoideana, sendo a determinação de TSH de fundamental importância na rotina de análises clínicas ligadas à fisio-patologia da tireóide e no programa de screening do hipotireoidismo neonatal (Hay,1991; Ribela, 1996; Peroni,1997). Estas e outras importantes aplicações do hTSH recombinante são apresentadas na Tabela 1 (Szkudlinski,2002; Emerson, 2003).

Tabela 1- Aplicações do rec-hTSH

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

* FDA – Food and Drug Administration

A síntese, purificação e caracterização do rec-hTSH foi pela primeira vez descrita por Cole e colaboradores (1993a) que desenvolveram uma linhagem de células CHO DHFR⁻ capazes de expressar altos níveis de hTSH recombinante. Para tanto, eles utilizaram dois vetores, sendo um para a subunidade α , ligada ao gene da diidrofolato redutase (DHFR), um marcador gênico amplificável, e um para a subunidade β , sem marcador gênico. Após um processo de amplificação gênica, obtiveram níveis de expressão da ordem de $4,5 \mu\text{g}/10^6$ células/dia.

Usando também células CHO DHFR⁻, Hussain e colaboradores (1996) utilizaram praticamente a mesma estratégia de transfecção, a única diferença sendo que o gene da subunidade β estava ligado a um marcador gênico não amplificável, que confere resistência à neomicina (*neo*). Utilizando perfusão em hollow-fiber, atingiram níveis de 10-14 μg de hTSH/mL.

Grossmann e colaboradores (1997), utilizando um sistema de baculovírus, obtiveram um TSH biologicamente ativo, após produzirem vírus recombinantes capazes de expressar as subunidades α e β individualmente. Após co-infectar células de insetos com tais vírus, obtiveram níveis de expressão de TSH da ordem de $1 \mu\text{g}/\text{mL}$. Porém este produto não foi utilizado *in vivo*, sendo destinado apenas a estudos relacionados à estrutura-função do TSH, uma vez que TSH derivado de células de inseto apresenta uma baixa atividade *in vivo*, bem como estrutura de carboidratos diferente daquela das células de mamíferos.

Por fim, Peroni e colaboradores (2002) estabeleceram também uma linhagem de células CHO DHFR⁻ que expressa hTSH, utilizando uma estratégia similar à empregada por Cole e colaboradores (1993a) e com vetores dicistrônicos. Utilizando está estratégia obtiveram níveis de TSH da ordem de $7,2 \mu\text{g}/10^6$ células/dia.

A massa molecular do hTSH varia em torno de 28-30 kDa (Mendonça, 2005). Diferenças na massa molecular do hTSH podem acontecer devido à heterogeneidade nas cadeias de carboidratos. As porções de carboidratos, no caso do hTSH, correspondem a cerca de 15 a 35% do seu peso. A subunidade α do hTSH apresenta duas cadeias oligossacarídicas ligadas à asparagina e a subunidade β possui apenas uma.

Em proteínas heterólogas, as porções de carboidratos aderidas pós-traducionalmente, frequentemente diferem das porções de carboidratos encontradas em proteínas expressas em suas células hospedeiras naturais. Por

exemplo, os oligossacarídeos do TSH de origem hipofisária apresentam, ligados ao resíduo de N-acetilgalactosamina (GalNAc), um resíduo de sulfato (Baenziger, 1994). Já no TSH recombinante derivado de células CHO não existe cadeias oligossacarídicas terminadas em sulfato, uma vez que estas células não possuem N-acetilgalactosamina transferase e sulfatotransferases, responsáveis pela ligação de GalNAc e pela sulfatação da GalNAc respectivamente (Szkudlinski, 1995).

Na Figura 5 é mostrado um esquema das terminações das cadeias de TSH de diferentes origens. Os carboidratos do TSH bovino (bTSH) apresentam, ocupando a posição terminal, resíduos de N-acetilgalactosamina-sulfato, enquanto que os do TSH humano de origem hipofisária (pit-hTSH) terminam em N-acetilgalactosamina-sulfato e galactose-ácido siálico. No caso do hTSH recombinante derivado de células CHO (rec-hTSH), os carboidratos terminam em galactose-ácido siálico, enquanto os do rec-hTSH derivado de células de inseto terminam em manose.

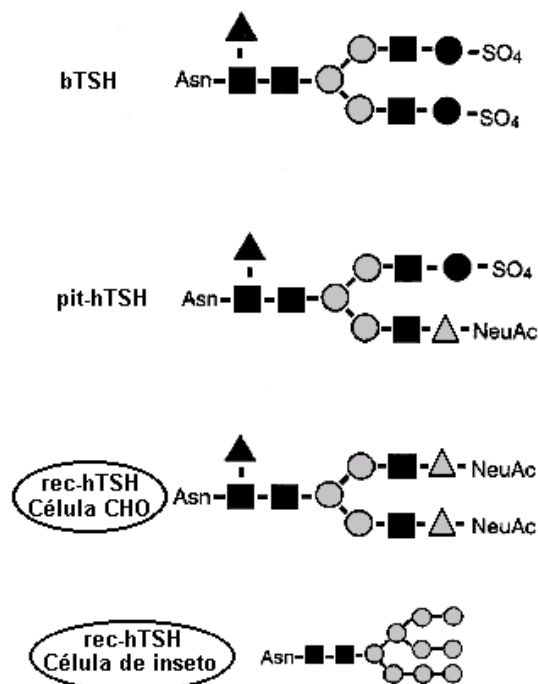


Figura 5 Diferentes estruturas de carboidrato de TSH de diferentes origens (Szkudlinski, 2002)

Estas diferenças no tipo de estruturas de carboidratos encontradas em diferentes células podem afetar de forma drástica a atividade biológica *in vivo* e *in vitro* da proteína. De fato, Grossmann e colaboradores (1997) constataram que

um hTSH derivado de células de inseto apresentou uma atividade *in vitro* que era cerca de cinco vezes maior do que a atividade encontrada para o hTSH derivado de células CHO. Ao contrário, sua atividade *in vivo* foi substancialmente menor. Isso se deve à rápida depuração metabólica desta preparação, que ocorre em virtude dos receptores hepáticos assialoglicoprotéicos e macrófagos reconhecerem e promoverem a rápida depuração metabólica de estruturas que terminam em manose, N-acetilglucosamina (GlcNAc) e galactose (Gal) (Gooche, 1991). Já as glicoproteínas terminadas em ácido siálico permanecem por mais tempo na circulação.

Tem sido demonstrado na literatura que os resíduos de ácido siálico possuem importante papel na determinação do polimorfismo dos carboidratos e conseqüentemente da atividade biológica e farmacológica do hTSH. Mecanismos de depuração metabólica *in vivo* são altamente afetados pela composição terminal dos carboidratos, sendo a taxa de depuração inversamente proporcional ao grau de sialilação (Thotakura, 1992; Thotakura, 1995; Grossmann, 1997; Szkudlinski, 2002). Sendo assim, preparações com baixo teor de ácido siálico permanecem um tempo menor na circulação comparadas àquelas com maior teor de ácido siálico. Também foi demonstrado que a atividade biológica intrínseca (*in vitro*) é inversamente proporcional ao grau de sialilação (Canonne, 1995; Grossmann, 1997). Para a atividade biológica *in vivo* foram demonstradas também diferenças consideráveis em função do conteúdo de ácido siálico, maior atividade biológica tendo sido encontrada em preparações com maior teor de ácido siálico (Szkudlinski, 1993; Grossmann, 1997). Segundo Szkudlinski e colaboradores (1993, 2002) o ácido siálico também é determinante na definição do perfil de isoformas encontradas em uma glicoproteína. De fato, ao estudarem preparações recombinantes de hTSH com níveis diferentes de ácido siálico, estes autores observaram que enquanto várias bandas apareceram na região de 5,5 a 7,1 para uma determinada preparação, apenas uma única isoforma foi detectada quando 99% do conteúdo de ácido siálico desta preparação foi removido.

O termo ácido siálico descreve uma grande família de resíduos de carboidratos estruturalmente diferentes compostos de 9 carbonos (Figura 6A). Ocupa posição terminal nas cadeias de carboidratos N-ligados e O-ligados de glicoproteínas derivadas de células de mamíferos e são constituintes de várias glicoproteínas de importância biológica como, por exemplo, da tireotrofina, da

foliculotrofina, da luteotrofina, da gonadotrofina coriônica (Traving, 1998; Angata, 2002; Byrne, 2007).

Dentre as características estruturais do ácido siálico destacam-se o grupo amino no carbono 5 e o grupo carboxil do carbono 1. São estes grupos que conferem à molécula sua carga negativa e o caracteriza como um forte ácido orgânico (Traving, 1998).

Existem cerca de 50 análogos naturais de ácido siálico, que resultam de modificações no seu esqueleto, como por exemplo, a introdução no grupamento hidroxila de grupos sulfato, metil ou fosfato. A substituição mais comum ocorre no C-5 e o grupamento amino normalmente é acetilado. (Byrne, 2007).

Em células de mamíferos, os ácidos siálicos mais comuns são o ácido N-acetil-neuramínico (Neu5Ac) e o ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc), sendo que em células humanas só o primeiro está presente (Chou, 1998).

A diversidade estrutural dos ácidos siálicos resulta não apenas da natureza de monossacarídeos como também da sua ligação a outros açúcares, que ocorre em três configurações principais: α 2,3, α 2,6 e α 2,8 (Figuras 6B, C e D). A última forma existe em poucas glicoproteínas, por exemplo expressas em tecido neural (Ulloa, 2001). O processo de sialilação envolve a adição de um substrato doador (citidina monofosfato (CMP)-ácido siálico) a um carboidrato acceptor (Gal-GlcNAc-Man-R), via uma reação enzimática catalisada por uma sialiltransferase e realizada no Complexo de Golgi. Os resíduos de ácido siálico que estão presentes nas glicoproteínas cujas cadeias de carboidratos estão ligados à asparagina (N-ligadas), são ligados à posição 3 ou 6 da galactose. O ácido siálico com ligação α 2,3 à galactose da cadeia Gal-GlcNAc-Man-R é encontrado em glicoproteínas sintetizadas em células CHO e em células humanas, enquanto ácido siálico ligado em α 2,6 é encontrado apenas em glicoproteínas humanas (Lee, 1989; Svensson, 1990, Bergwerff, 1993).

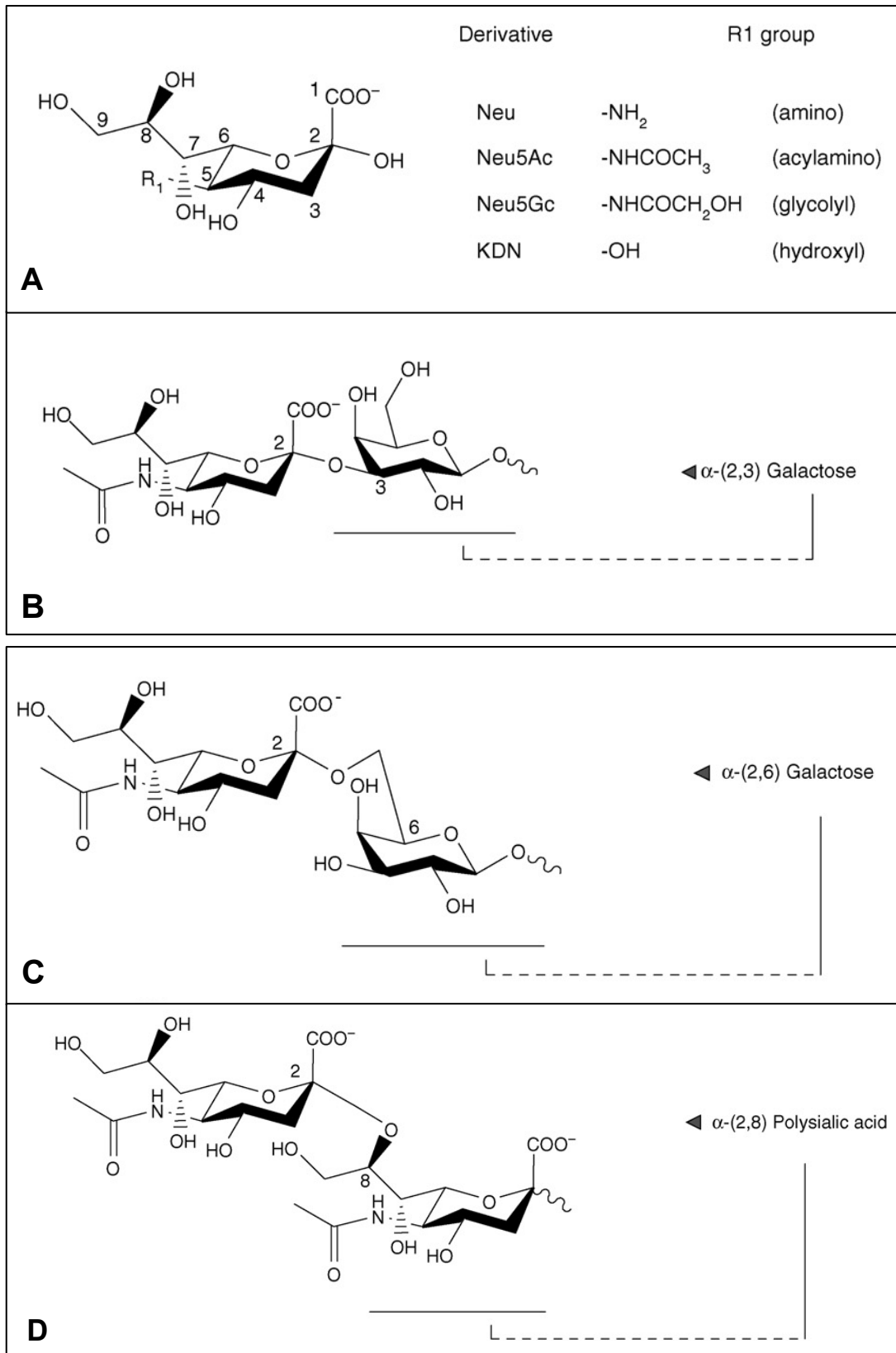


Figura 6 (A) Estrutura química do ácido siálico e seus análogos mais comuns (B) Ácido siálico ligado na posição α2,3 (C) Ácido siálico ligado na posição α2,6 e (D) Ácido siálico ligado na posição α2,8 (Byrne, 2007)

A principal função do ácido siálico está relacionada ao reconhecimento molecular e celular e, devido à sua carga negativa, está envolvido no transporte de moléculas carregadas positivamente e no fenômeno de atração e repulsão de células e moléculas. Além disso, o sistema imune é capaz de reconhecer estruturas como “própria” ou “não própria”, de acordo com o padrão de sialilação (Traving, 1998; Takashima, 2008; Bork, 2009).

Quando uma glicoproteína é administrada a um paciente, ela pode ser objeto de uma série de respostas geradas pelo hospedeiro, como por exemplo, denaturação ácida no trato gastrointestinal ou clivagem pelas enzimas hepáticas e renais. Além disso, as glicoproteínas recombinantes podem estimular o sistema imunológico e serem reconhecidas por anticorpos, resultando em uma prematura remoção destas glicoproteínas da circulação. (Byrne, 2007, Bork, 2009). Uma alternativa para aumentar a meia vida circulatória das glicoproteínas recombinantes e diminuir sua antigenicidade é aumentar sua sialilação, através da adição de resíduos adicionais de ácido siálico, ou modificar a estrutura dos N-glicanos (Grabenhorst, 1999; Byrne, 2007; Lim, 2008).

Fukuta e colaboradores (2000), promoveram uma modificação nas estruturas das cadeias de carboidratos presentes no interferon γ derivados de células CHO, mediada pela expressão da enzima N-acetilglucosaminiltransferase (GnT-IV), que promove a ligação de resíduos de N-acetilglucosamina à manose, na conformação α 1,3 e da enzima N-acetilglucosaminiltransferase (GnT-V) que promove, por sua vez, a ligação de resíduos de N-acetilglucosamina à manose na conformação α 1,6. Eles esperavam que utilizando estas duas enzimas fossem formadas estruturas de carboidratos multiantenárias e que, por consequência, houvesse uma maior sialilação destas estruturas. Entretanto, a super expressão destas duas enzimas por si só, acarretou uma baixa sialilação, ou seja, embora tenha havido a formação de cadeias de carboidratos multiantenárias, a sialilação foi incompleta. Santell e colaboradores (1999) também reportaram sialilação incompleta em glicoproteínas derivadas de células CHO, principalmente, quando estas células foram submetidas a condições de alta produtividade. Todos estes dados levam a crer que existe um processo de sialilação incompleto nas células CHO, o que resulta em estruturas apresentando resíduos de galactose exposta, que geram uma rápida depuração metabólica, mediada por receptores assialoglicoprotéicos, presentes no fígado, que reconhecem estes resíduos de

galactose desprotegidos e promovem a sua depuração. (Cole, 1993 b; Szkudlinski 1993, Takamatsu, 2003).

Na tentativa de sintetizar glicoproteínas recombinantes com uma sialilação mais próxima possível aquela da proteína natural, vários grupos modificaram a estrutura dos N-glicanos através da introdução do gene da $\alpha 2,6$ sialiltransferase ($\alpha 2,6$ -ST) nas células hospedeiras, tornando possível a ligação do ácido siálico à galactose na posição $\alpha 2,6$ (Monaco, 1996; Lamote, 1999). Escriva e colaboradores (1995) afirmam que a conformação da proteína influencia a razão de ligação de ácido siálico nas posições $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$. De fato, Grabenhost e colaboradores (1995) estudaram duas proteínas (proteína β -trace e antitrombina III) derivadas de células BHK previamente transfectadas com o gene da $\alpha 2,6$ -ST e constataram que, enquanto a proteína β -trace apresentava quantidades similares de ácido siálico ligado na posição $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$, a antitrombina III apresentava quantidades muito baixas de ácido siálico ligado na posição $\alpha 2,6$.

Monaco e colaboradores (1996) transfectaram, com um vetor contendo o cDNA do gene da $\alpha 2,6$ sialiltransferase de rato, uma linhagem de células CHO produtora de interferon- γ . Obtiveram, então, uma proteína com 40% de ligação de ácido siálico na posição $\alpha 2,6$ e 60% na posição $\alpha 2,3$ e um aumento de 56% no conteúdo de ácido siálico, resultado que sugere que a expressão de uma sialiltransferase extra pode aumentar o nível geral de sialilação de uma glicoproteína.

Fukuta e colaboradores (2000), utilizando células CHO transfectadas com o gene da $\alpha 2,6$ sialiltransferase, expressaram interferon γ com 83% de ligação do ácido siálico na conformação $\alpha 2,6$. Este produto apresentou um aumento de 1,5 vezes no conteúdo de ácido siálico com relação ao produto derivado de células CHO sem a introdução da $\alpha 2,6$ sialiltransferase. Foi ainda observada uma maior porcentagem de estruturas tri e tetra-antênrias e menor de estruturas di-antênrias. Estes autores não realizaram estudos relativos à atividade biológica e à farmacocinética da proteína.

Bragonzi e colaboradores (2000), utilizando células CHO da linhagem DXB-11 modificadas com o gene da $\alpha 2,6$ sialiltransferase, expressaram interferon γ com 40,4% de ligação de ácido siálico na conformação $\alpha 2,6$ e com conteúdo de ácido siálico similar ao do interferon γ derivado de células CHO sem esta

modificação. A fim de testar a atividade biológica do INF γ derivado das células modificadas em comparação com o INF γ derivado de células não modificadas, foi realizado um ensaio utilizando células LoVo (células derivadas de carcinoma de cólon), onde a regulação da expressão do MHC classe II foi monitorada. Não houve diferença significativa na atividade biológica destas duas proteínas. Porém, ao avaliar a taxa de depuração metabólica dessas duas preparações de INF γ , observou-se que a preparação derivada da linhagem celular modificada permaneceu mais tempo na circulação dos animais.

Jassal e colaboradores (2001), estudaram os efeitos da introdução da ligação $\alpha 2,6$ no anticorpo FA243, um IgG3 mutado, onde houve a substituição da fenilalanina 243 por uma alanina. Esta proteína mutada foi escolhida por que o IgG3 selvagem (sem a mutação) é muito pouco sialilado, enquanto seu mutante apresenta um alto índice de sialilação. A razão de ligação do ácido siálico $\alpha 2,6$: $\alpha 2,3$ no FA243 derivado de células CHO modificadas (FA-243-ST) foi de 0,9:1,0. Analisando a capacidade desse anticorpo e do IgG3 de acionar a lise mediada por complementos humanos, os autores verificaram que uma mesma lise foi induzida por uma mesma concentração de FA243-ST e de IgG 3 selvagem. Sabe-se, entretanto, que é necessária uma concentração 1,8 vezes maior de FA243 do que de IgG3 selvagem para gerar uma lise de 50%, o que sugere que a ligação $\alpha 2,6$ compensa qualquer efeito que a mutação possa causar no anticorpo.

Zhang e colaboradores (1998), analisando a atividade imunológica de eritropoietina no meio condicionado de células CHO com modificação para a $\alpha 2,6$ sialiltransferase e de células CHO sem a modificação, observaram uma maior imunorreatividade na segunda, o que pode indicar que a modificação da célula altera de alguma forma a eficiência secretória destas células. Ao medir a atividade biológica destas duas eritropoietinas os autores verificaram que a presença do ácido siálico ligado à galactose na posição $\alpha 2,6$ causou um decréscimo da reticulocitose que, porém, não foi significativamente diferente daquela observada para a eritropoietina derivada de células CHO sem a modificação, sugerindo que esta forma de sialilação não parece ser determinante para a bioatividade da proteína.

Pelos vários trabalhos comentados não está claro até que ponto a presença da ligação de ácido siálico na conformação $\alpha 2,6$ em proteínas

recombinantes produzidas por células CHO afeta a atividade biológica e a farmacocinética destas proteínas. De maneira geral, entretanto, assume-se que a modificação genética de linhagens celulares para que estas passem a ter uma sialilação mais próxima da humana é mais vantajosa para a produção de glicoproteínas recombinantes de importância médica.

Pelo que é de nosso conhecimento não há estudos descritos na literatura sobre sialilação humanizada para a tireotrofina recombinante derivada de células CHO.

2. OBJETIVOS

À luz do acima exposto e considerando o alto valor clínico do hTSH e a necessidade de se obter um biofármaco o mais semelhante possível à proteína nativa, são objetivos do presente trabalho:

- Obtenção de hTSH recombinante com ácido siálico ligado à galactose nas conformações α 2,3 e α 2,6, em células CHO modificadas para produzir α 2,6 sialiltransferase;
- Caracterização do novo produto “humanizado” (hlsr-hTSH) com relação à massa molecular relativa, hidrofobicidade, bioatividade *in vivo*, distribuição de isômeros de cargas, estrutura dos carboidratos e tipo de ligação do ácido siálico e sua comparação com outras preparações recombinantes derivadas de células CHO não modificadas, e com preparações hipofisárias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Preparações hormonais utilizadas

- hTSH de origem hipofisária (p-hTSH NIDDK) produzido e fornecido pelo “National Hormone and Pituitary Program” (Torrance, CA, EUA).
- hTSH de origem hipofisária (p-hTSH NOR), produzido e fornecido pelo Dr. Peter A. Torjesen do “Aker University Hospital” (Oslo, Noruega).
- hTSH derivado de células de ovário de Hamster Chinês (CHO) (Thyrogen®), produzido por “Genzyme Corporation” (Cambridge, EUA) e fornecido pela Collect (São Paulo, SP, Brazil).
- hTSH derivado de células CHO, produzido no laboratório de Hormônios do Centro de Biotecnologia do IPEN-CNEN/SP (r-hTSH IPEN), a partir de células CHO deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR), (linhagem mutante DXB-11), co-transfectadas com vetores dicistrônicos (pEDdc- α e pEAdc- β -hTSH) e submetidas à amplificação gênica com metotrexato (MTX) (Peroni, 2002)

3.1.2 Cultivo celular

3.1.2.1 Reagentes utilizados nos procedimentos de cultura celular

- Anfotericina B, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Bicarbonato de sódio p.a., Synth (São Paulo, Brasil)
- Dimetilssulfóxido (DMSO), MERK (São Paulo, Brasil).
- Geneticina (G418), *GenetIn*®, GIBCO-BRL, (Gaithersburg, MD, EUA).
- Gentamicina, Schering-Plougt (Rio de Janeiro, Brasil).
- Meio CHO-S-SFM II, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Meio mínimo essencial sem a presença de nucleosídeos (α -MEM), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Metotrexato (MTX), Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Penicilina-Estreptomicina, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Soro fetal bovino dialisado (SFBd), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- Tripsina, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).

3.1.2.2 Linhagens celulares

- Células CHO mutantes DXB-11, deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR⁻), transfectadas com os vetores pEDdc-ahTSH + pEAdc-βhTSH.
- Células CHO mutantes DXB-11, deficientes no gene da enzima DHFR e transfectadas com o gene da enzima α2,6 sialiltransferase, chamadas de “Universal Host” (CHO-UH), gentilmente cedidas pela Dra. Lucia Monaco do San Raffaele Scientific Institute (Milano, Itália) (Monaco, 1996)

3.1.2.3 Material plástico estéril

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

3.1.3 Purificação e análise do hlsr-hTSH

3.1.3.1 Colunas cromatográficas

a) Coluna de vidro utilizada em cromatografia clássica

- Coluna XK (20cm X 16mm DI), GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).

b) Colunas de aço inoxidável utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

- Coluna TSK G 2000 SW (60 cm X 7,5 mm D.I.), acoplada a uma pré-coluna SW (7,5 cm x 7,5 mm DI), Tosohaas (Montgomeryville, PA, EUA), para HPLC de exclusão molecular.
- Coluna C₄, 214 TP54 (25 cm X 4,6 mm D.I.), acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5 μm, 1,0cm X 4,6 mm D.I.), Vydac Separations Group (Hesperia, CA, EUA), para HPLC de fase reversa analítica.

- Coluna C₄, 214 TP510 (25 cm X 10 mm D.I.), acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5 µm, 1,0cm X 4,6 mm D.I.), Vydac Separations Group (Hesperia, CA, EUA), para HPLC de fase reversa semi-preparativa.

3.1.3.2 Resinas cromatográficas

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

3.1.3.3 Reagentes químicos

- Acetonitrila grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Acetato de sódio, Merck (São Paulo, Brasil).
- Ácido acético, Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Cloreto de sódio p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio monobásico p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio bibásico p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Metanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).

3.1.4 Imunoensaios

3.1.4.1 Anticorpos

- Anticorpo monoclonal (mAB) anti hTSH (anticorpo de detecção utilizado no radioensaio), fornecido pelo Netria, North East Thames Region Immunoassay Unit (Londres, Inglaterra).
- Anticorpo policlonal anti hTSH acoplado a celulose (anticorpo de captura, fase sólida), fornecido pelo Netria, North East Thames Region Immunoassay Unit (Londres, Inglaterra).

3.1.4.2 Reagentes para marcação do anticorpo de detecção

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

3.1.4.3 Outros reagentes

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

3.1.5 Ensaio biológico

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

3.1.6 Focalização isoelétrica

- Ácido acético p.a., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Ácido fosfórico p.a., Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Anfolina, pH 3,5 - 9,5, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)

- Bisacrilamida, Merck (São Paulo, Brasil).
- Coomassie Brilliant Blue R 250, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Glicina, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Hidróxido de sódio p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Marcador para focalização isoelétrica, pH 3,0 – 10, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Membrana de PVDF (0,2 μm), Sequi-Blot – Biorad (Hercules, CA, EUA).
- Metanol p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Persulfato de amônio, Merck (São Paulo, Brasil).
- TRIS-base, GE Healthcare, (Buckinghamshire, Inglaterra).

3.1.7 Proteína total

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

3.1.8 SDS-PAGE

- Acrilamida, MERK (São Paulo, Brasil)
- Ácido acético, p.a., MERK (São Paulo, Brasil)
- Azul de bromofenol, Sigma (Saint Louis, EUA)
- Dodecilsulfato de sódio, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia)
- Marcador de massa molecular para SDS-Page da GE Healthcare Bioscience (Uppsala, Suécia)
- Metanol, p.a., MERCK (São Paulo, Brasil)
- Persulfato de amônio, MERCK (São Paulo, Brasil)

3.1.9 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil).

- Agitador rotatório de tubos (“rotator”), fornecido pelo laboratório NETRIA, North East Thames Region Immunoassay Unit (Londres, Inglaterra).
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil).
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10A, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e a um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD, EUA).
- Aparelho para dosagem de glicose Accu-Check Active, Roche (Boeinger, Mannheim, Alemanha).
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo P100N, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich, Suíça).
- Bomba peristáltica modelo P-1, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Câmera de Neubauer, Boeco (Hamburg, Alemanha).
- Centrífuga, modelo LS-3 plus, Celm (São Paulo, Brasil).
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super Speed RC – 2B, Sorvall (Newtown, Connecticut, EUA).
- Coletor de frações, modelo Frac-200, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Contador gama tipo "poço", com troca automática de amostra, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para ^{125}I de 80%, Packard Instrument Company (Illinois, EUA).
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Estufa de cultura celular, modelo 3159, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Fluxo Laminar classe II A/B 3, modelo 1140, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Freezer -20°C , modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil).

- Freezer -40°C , modelo AB 240, Metalfrio (São Paulo, Brasil).
- Freezer -80°C , modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Leitor de placas de microtitulação modelo MR400 (Dynatech, Bethesda, EUA).
- Liofilizador, modelo Dura Stop – TDS – 3 DURA DRY, FTS Systems (Stone Ridge, EUA).
- Medidor digital de pH, modelo 420A, Orion (Boston, MA, EUA).
- Membrana para diálise modelo SnakeSkin, 3.500 MWCO, Pierce (Rockford, IL, EUA).
- Membranas de filtração de $0,22\ \mu\text{m}$, Millipore (Bedford, MA, EUA).
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha).
- Refrigerador duplex, modelo 320 clear, Brastemp (São Paulo, Brasil).
- Refrigerador com porta de vidro modelo VE 730, Metalfrio (São Paulo, Brasil).
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA).
- Tubos de poliestireno para imunoenaios ($7,5 \times 1,2\ \text{cm}$), EMTEL (São Paulo, Brasil).
- Sistema de focalização isoelétrica Multiphor II, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Sistema de transferência semi-seco Hoefer TE 70, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).

3.2 Métodos

3.2.1 Transfecção pelo método do fosfato de cálcio

Células CHO DHFR⁻, de uma linhagem que contém o gene codificando a $\alpha 2,6$ sialiltransferase, hospedeiro universal (UH) desenvolvido por Bragonzi e colaboradores (2000), foram cotransfectadas pelo método do fosfato de cálcio, utilizando diferentes quantidades dos vetores de expressão das subunidades α e β , na proporção de 1:5 ($4\ \mu\text{g pEDdc-}\alpha$: $20\ \mu\text{g pEAdc-}\beta$ hTSH), de forma análoga ao trabalho anteriormente realizado para uma linhagem de células CHO sem esta modificação (Peroni, 2002). As células foram semeadas em placas de cultura de 10 cm de diâmetro (10^6 células/placa) no dia anterior à transfecção. Em cada

placa foram utilizados: 2 mL de tampão HEBS pH 7,05; 24µg do DNA de interesse; 100µL de CaCl₂ 2,5 M.

A reação foi realizada em um tubo de centrifuga de 15mL e a solução de CaCl₂ foi adicionada gota a gota, sob borbulhamento constante de ar. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, por 30 minutos, para que ocorresse formação de microprecipitados de fosfato de cálcio/DNA, os quais foram então distribuídos sobre as células. Após incubação por 5-6h, à 37°C em atmosfera de CO₂, o meio foi aspirado e as células cresceram durante 2 dias em meio α-MEM + 2% de soro fetal bovino (SFB) antes do início da seleção.

3.2.2 Seleção e amplificação

A seleção dos transformantes DHFR⁺ foi realizada em meio seletivo α-MEM, na ausência de nucleosídeos e suplementado com 10% de soro fetal bovino dialisado (SFBd). As colônias positivas foram isoladas após 10-15 dias de incubação de 5 x 10⁴ células/placa de 10 cm de diâmetro em meio seletivo, utilizando-se cilindros de clonagem, e as células foram propagadas em placas de 6 poços até atingir a confluência. As células foram transferidas para placas de 24 poços e a produtividade dessas células foi determinada por meio de um ensaio imunorradiométrico (IRMA), anteriormente padronizado em nosso laboratório (Ribela, 1996). Alguns clones foram selecionados e submetidos à amplificação gênica.

A etapa de amplificação gênica se deu através da adição de concentrações crescentes de metotrexato (MTX) ao meio de cultivo. A princípio, as doses de MTX utilizadas foram as seguintes: 30, 60, 100 e 200 nM. Ao fim de cada etapa de amplificação, foi realizado um ensaio imunorradiométrico, a fim de determinar a concentração de hlsr-hTSH no meio de cultura. O clone que melhor respondeu a estas etapas de amplificação, foi submetido a uma nova etapa de amplificação gênica, onde as concentrações de MTX agora utilizadas foram: 0,5, 1, 2, 4, 8, 10, 15 µM MTX. Mais uma vez, ao final de cada etapa de amplificação, foi realizado ensaio imunorradiométrico para determinar a expressão de hlsr-hTSH. Cada etapa de amplificação durou aproximadamente 2 semanas.

3.2.3 Cultivo Celular

O processo de cultivo celular se deu em frascos T de 162 cm², com um inóculo inicial de $1,5 \times 10^6$ células/frasco. Durante a fase de crescimento celular, as células foram mantidas em 20 mL de meio α -MEM, suplementado com 10% de SFBd. Quando as células atingiram cerca de 80% de confluência, o que aconteceu em aproximadamente 4 dias, o meio foi substituído pelo meio de produção CHO-S-SFM II suplementado com 200nM MTX, 50 μ g/mL de penicilina/estreptomicina, 40 μ g/mL de gentamicina e 0,25 μ g/mL de anfotericina B. O meio foi então coletado e trocado diariamente, centrifugado a 1000 x g por 5 minutos, para a remoção das células e o sobrenadante armazenado a -20°C. Durante todo o processo de cultivo, o hlsr-hTSH foi quantificado mediante IRMA.

3.2.4 Purificação

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

3.2.4.1 Cromatografia de troca iônica

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

3.2.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa preparativa (RP-HPLC)

O pool das frações contendo hlsr-hTSH, detectado por IRMA, resultante da primeira etapa de purificação, foi concentrado para 10 mL em um dispositivo filtrante de centrifuga Amicon Ultra-15 e aplicado a uma coluna C₄ semi-preparativa de fase reversa. A coluna, conectada a um HPLC, foi mantida a 25°C e foram usados na fase móvel dois tampões A e B (tampão A: fosfato de sódio 0,05M pH 7,0 e tampão B: 50% de A + 50% de acetonitrila). A eluição das proteínas foi realizada com um gradiente linear de 25 a 100% de tampão B, durante 40 minutos. Um fluxo de trabalho de 2,5 mL/min e detecção por luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 220nm foram utilizados. O pool final foi dialisado contra tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,0, contendo 0,15M NaCl e 5mg/mL de glicina. Após a diálise, o hTSH foi liofilizado sob vácuo controlado entre 100-200mT na fase primária e sob vácuo máximo na fase secundária para retirada da umidade residual.

3.2.5 Avaliação da proteína de interesse

3.2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

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

Para compor a fase móvel a ser utilizada na RP-HPLC, foram utilizados dois tampões A e B, sendo o tampão A: fosfato de sódio 0,05M, pH 7,0; o tampão B: 50% de A mais 50% de acetonitrila. A eluição das proteínas se deu com um gradiente linear de 25 a 100% B, durante 40 minutos, com um fluxo de trabalho de 0,5mL/min. A coluna foi mantida durante todo o processo a 25°C.

Já para a HPSEC, a técnica de eluição foi isocrática, sendo o tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,0 contendo 0,15M de cloreto de sódio utilizado como fase móvel. O fluxo de trabalho utilizado foi de 1,0mL/min.

A preparação recombinante comercial Thyrogen® (Genzyme) foi utilizada como preparação referência nas duas técnicas de análise.

3.2.5.2 Ensaio imunorradiométrico (IRMA)

Os níveis de expressão do hlsr-hTSH foram determinados por ensaio imunorradiométrico (IRMA) desenvolvido em nosso laboratório (Ribela, 1996).

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

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

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

3.2.5.3 Determinação de proteína total

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

3.2.5.4 SDS-PAGE

O hlsr-hTSH presente no meio condicionado e nas diferentes etapas de purificação foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, na presença de 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) sob condições não redutoras.

As amostras a serem analisadas foram adicionadas ao tampão de amostra, que consiste de 2 mL de glicerol 20%, 3 mL de SDS 20%, 10 mg de azul de bromofenol (0,1%), 2,5 mL de tris-HCL pH 6,8 e água Milli-Q, na proporção de 3:1 (tampão:amostra) e aplicadas após serem submetidas a fervura por 15 minutos.

Durante a corrida eletroforética, a intensidade da corrente foi de 35mA. As proteínas presentes no gel foram fixadas mergulhando o gel em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial, por 30 minutos. O gel foi então imerso em solução corante composta por 0,25% de Coomassie Brilliant Blue G 250, 45% de metanol e 10% de ácido acético glacial, em agitação contínua, por aproximadamente 30 minutos. O gel foi descorado utilizando 10% de ácido acético em água Milli-Q até ser obtida a transparência desejada.

3.2.5.5 Atividade biológica

A avaliação da atividade biológica das preparações de hTSH foi realizada por um ensaio *in vivo*, utilizando camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c, com peso variando entre 22-30g. O ensaio baseia-se na capacidade que o TSH tem de estimular a produção de T_4 . Visando suprimir o TSH endógeno dos animais, foi administrada oralmente, durante 4-5 dias, triiodotironina (T_3), pH 7,5, com uma concentração final de $3\mu\text{g/mL}$. Após a supressão do TSH endógeno, as amostras a serem analisadas foram administradas intraperitonealmente ($10\mu\text{g/animal}$), em um volume de $200\mu\text{L}$, após diluição em solução salina. Para cada preparação foram utilizados 10 animais, bem como para o controle (salina). Após 6 horas da administração das amostras, foi realizada a coleta de sangue, via plexo retro-orbital e o nível de T_4 circulante foi mensurado por radioimunoensaio (RIA).

3.2.5.6 Espectrometria de massa (MALDI-TOF)

A massa molecular do hlsr-hTSH (aproximadamente 20-30 pmoles de amostra) foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry), em um sistema Voyager DE BioSpectrometry Workstation (Applied Biosystem), operado de modo linear do íon positivo, utilizando uma solução saturada de ácido sinapnóico (AS) em 50% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoracético como matriz. Esta análise foi realizada no laboratório da University of California at Riverside (Riverside, EUA), com o qual colaboramos.

3.2.5.7 Distribuição de isômeros de carga

O perfil das isoformas presentes nas amostras de hTSH foi obtido mediante focalização isoelétrica, que consiste de um gel de poliacrilamida 6%, onde as proteínas migram até encontrar seu ponto isoelétrico, que é o ponto de pH onde sua carga assume carga neutra. Para que se estabeleça um gradiente de pH no gel, uma pré corrida é realizada a 500 volts, por 30 minutos, para que os anfólitos que compreendem um range de pH entre 3,5 e 9,5 possam se difundir. As amostras são então submetidas a este gradiente, em uma corrida de aproximadamente 1 hora e utilizando 1500 volts. Após a corrida, as bandas focalizadas são transferidas para uma membrana de PVDF, via eletroblotting, por 2 horas, utilizando 25 volts. A coloração das bandas é realizada mergulhando a membrana por cerca de 2 minutos em 0,05% de corante Coomassie Brilliant Blue R250.

3.3 Análise de carboidratos

3.3.1 Análise estrutural

A análise das estruturas de carboidratos presentes no hlsr-hSTH foi realizada após clivagem dos glicanos pela ação da enzima PNGase F de *F. meningosepticun* (New England Biolabs, Hitchin, Reino Unido). Uma vez separados do peptídeo, os N-glicanos foram marcados com ácido aminobenzóico (4-ABA), e analisados em HPLC de fase normal, utilizando uma coluna TSK-gel Amide 80 (4,6 X 250 mm, 5 µm; TOSOH Bioscience, Stuttgart, Alemanha). Os

tempos de retenção dos picos detectados foram comparados aos tempos de retenção dos padrões de açúcares comerciais da Dextra Laboratories (Residing, Inglaterra) e Glyco (Novato, CA, EUA). As análises foram realizadas em colaboração com o Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Áustria.

3.3.2 Análise da ligação ácido siálico-galactose

A análise do tipo de ligação ácido siálico-galactose nos N-glicanos do hlsr-hTSH foi realizada no laboratório Proteodynamics and Glycodiag (Saint Beauzire/Chevilly, França) utilizando duas lectinas específicas: Neu5Ac α 2,3 (*Maackia amurensis* l) e Neu5Ac α 2,6 (*Sambucus nigra*), que reconhecem a ligação ácido siálico/galactose nas conformações α 2,3 e α 2,6 respectivamente. Para a detecção da interação dos glicanos presentes no hlsr-hTSH foi utilizado um anticorpo anti-hTSH biotinilado, posteriormente conjugado à estreptavidina.

A amostra de hlsr-hTSH foi tratada com uma neuroamidase que catalisa a hidrólise do ácido siálico na conformação α 2,3 e com uma neuroamidase que catalisa a hidrólise do ácido siálico nas duas conformações, para confirmar a especificidade da lectina.

Em paralelo às análises de hTSH foi analisada também uma glicoproteína controle (fetuina bovina) da qual se conhece a porcentagem de ligação do ácido siálico nas posições α 2,3 e α 2,6.

4. RESULTADOS

4.1 Transfecção, seleção e amplificação das células CHO modificadas

Após a transfecção das células CHO-UH com os vetores pEDdc- α -TSH e pEAdc- β -TSH, 24 clones foram isolados, sendo que 22 deles, como mostra a Figura 7, apresentaram alguma expressão de hlsr-hTSH. Entretanto, apenas cinco destes clones (clones 2, 5, 7, 8 e 10) apresentaram expressão específica maior ou igual a 1 ng/10⁶ cel/dia, sendo estes então escolhidos para a amplificação. Como mostra a Figura 8, quando submetidos à amplificação gênica induzida por MTX, o clone que melhor respondeu à amplificação foi o clone 8. Este foi então escolhido para ser submetido a concentrações maiores de MTX, visando expressões úteis de hTSH para a produção e purificação desta glicoproteína. A Figura 9 mostra que a expressão mais alta de hTSH recombinante com sialilação humanizada (2,1 μ g hTSH/10⁶ cel/dia e concentração de 1,4 μ g/mL) foi conseguida com 8 μ M MTX, tendo ocorrido, portanto, uma amplificação de ~ 1600 vezes (de 1,3 ng hTSH/10⁶ cel/dia a 2,1 μ g hTSH/10⁶ cel/dia).

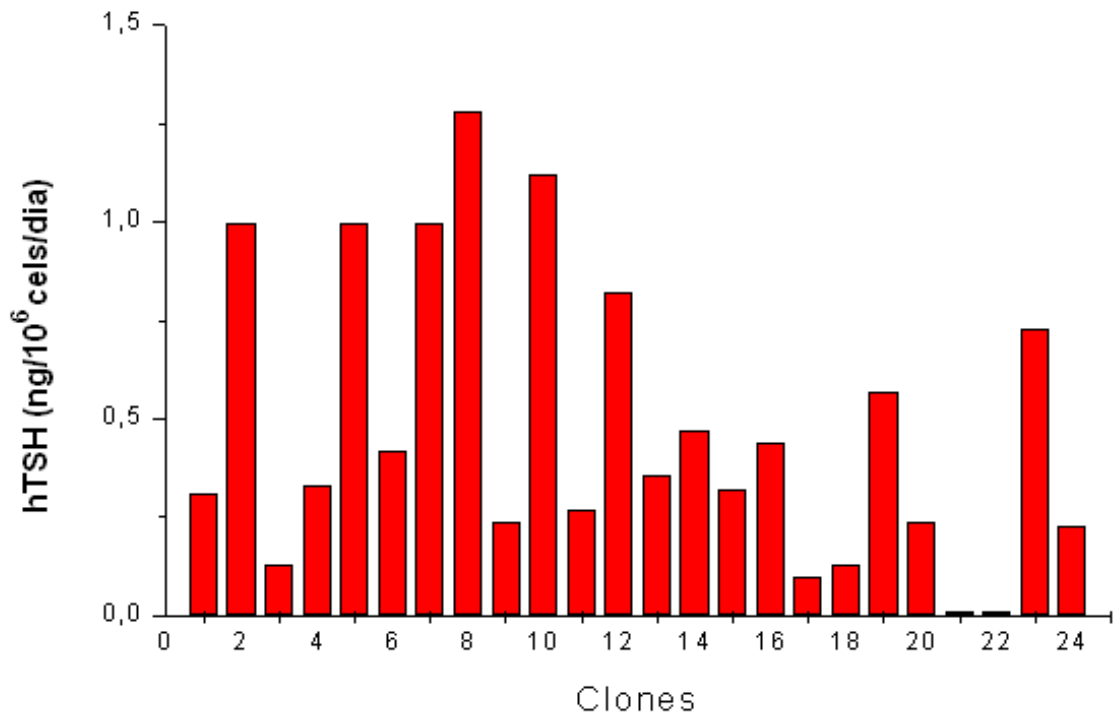


Figura 7 Níveis de expressão de hTSH (ng/10⁶cels./dia), determinados por IRMA, correspondente aos 24 clones isolados de células CHO-UH transfectadas com os vetores pEDdc- α hTSH + pEAdc- β hTSH.

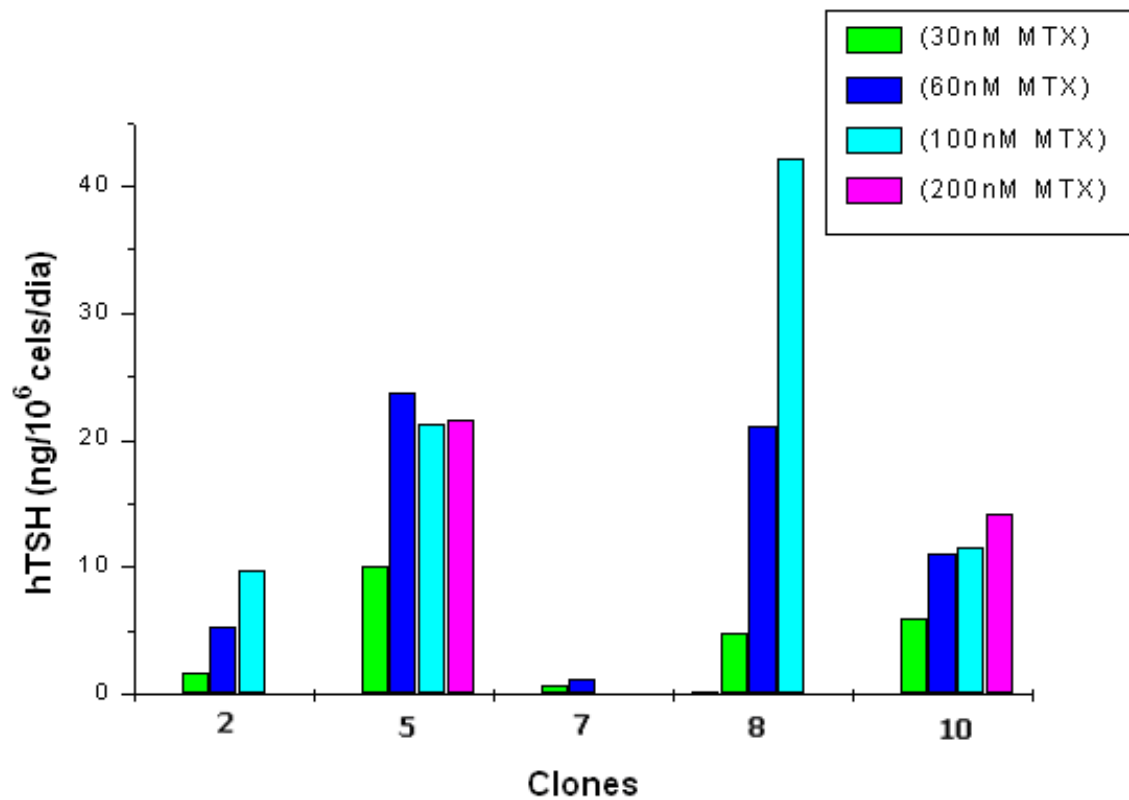


Figura 8 Níveis de expressão de hTSH (ng/10⁶cels./dia), determinados por IRMA, de 5 clones isolados de células CHO-UH transfetadas com os vetores pEDdc- α hTSH + pEAdc- β hTSH e submetidas à amplificação induzida por MTX.

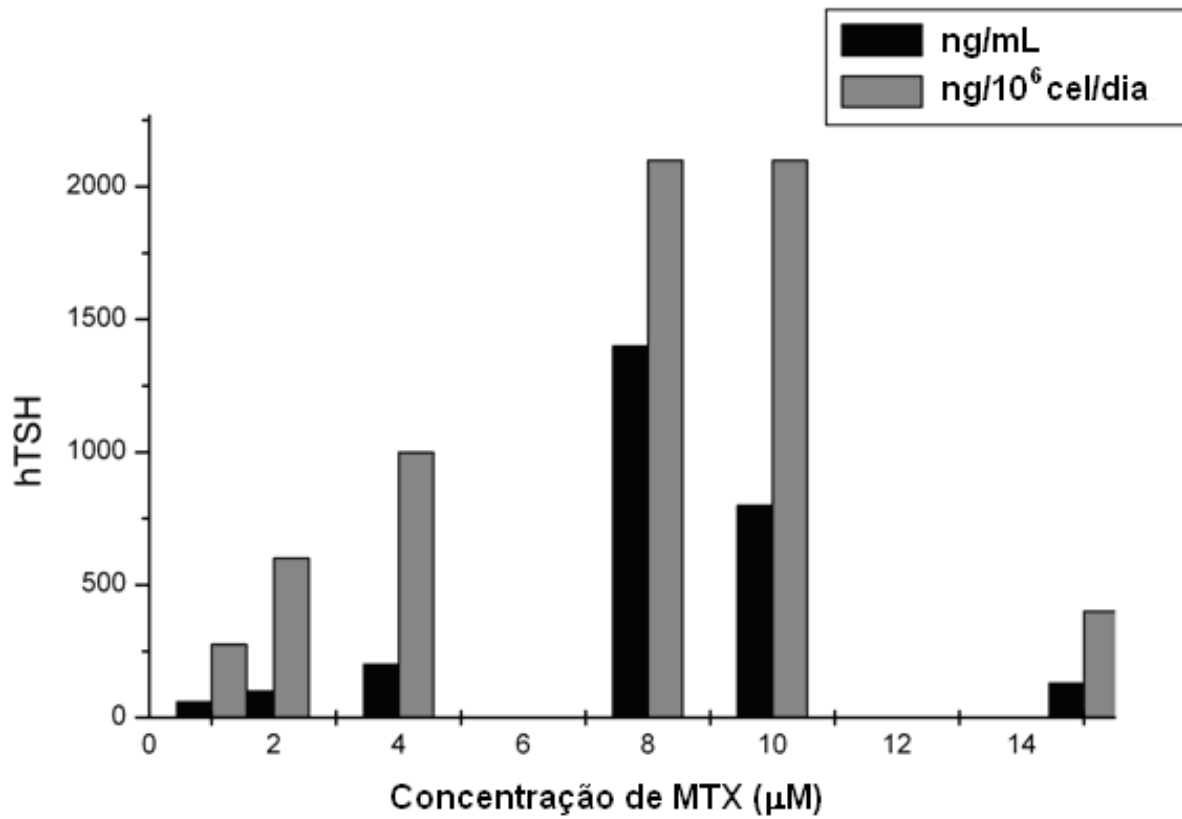


Figura 9 Níveis de expressão de hTSH (ng/ 10^6 cels/dia) e concentração no meio (ng/mL), determinados por IRMA, do clone 8, submetido à amplificação induzida por diferentes concentrações de MTX.

4.2 Cultivo Celular

As células CHO produtoras de hlsr-hTSH que apresentaram melhor produtividade foram cultivadas ao longo de 15 dias. Neste período, a produtividade das células manteve-se relativamente estável, como mostra a Figura 10.

A Figura 11A mostra a morfologia das células CHO-UH em comparação às células CHO sem a modificação com o gene da $\alpha 2,6$ ST (Figura 11B), sendo que as primeiras apresentam um aspecto mais fibroblástico, sendo então, mais semelhantes à CHO selvagem, enquanto as outras apresentam um aspecto mais globoso.

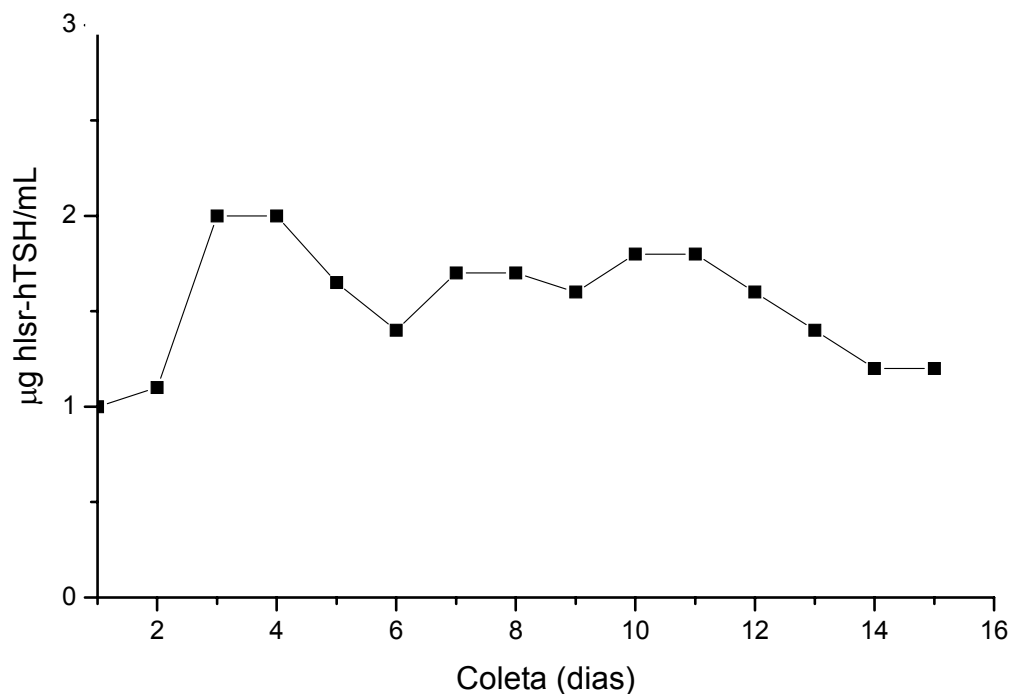


Figura 10 Concentração de hlsr-hTSH ($\mu\text{g}/\text{mL}$) no meio condicionado ao longo dos 15 dias de cultivo.

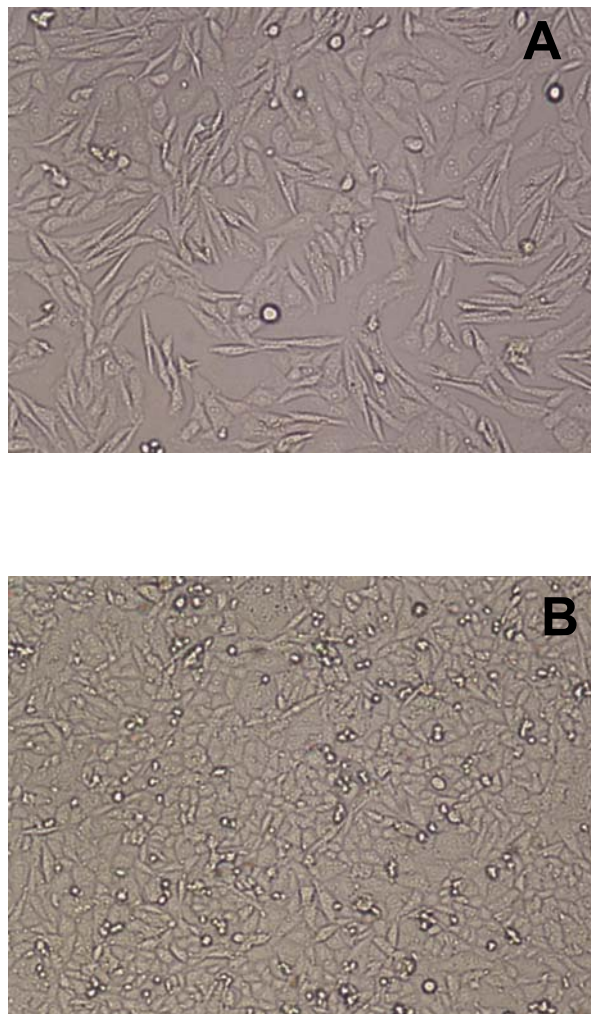


Figura 11 Células CHO modificadas para o gene $\alpha 2,6$ sialiltransferase (A) e células CHO sem esta modificação (B), vistas em microscópio invertido com aumento de 40X.

4.3 Purificação do hlsr-hTSH

O material coletado nos 15 dias de cultivo foi analisado em RP-HPLC. A Figura 12 mostra o perfil cromatográfico resultante desta análise, onde se podem observar vários picos, sendo o pico correspondente ao hlsr-hTSH identificado por comparação do seu tempo de retenção (34,6 min.) com o tempo de retenção da preparação referência (34,1 min.) e confirmada com a determinação da atividade imunológica, realizada ao longo de toda corrida. O “pool” analisado continha uma concentração de hlsr-hTSH de 0,84 µg/mL e uma concentração de proteína total (avaliada por BCA) de 121,8 µg/mL. Desta forma, a purificação se deu a partir de um “pool” cuja fração de massa era de 0,69% (Tabela 2).

Após a primeira etapa de purificação em uma coluna SP-Sepharose FF foi obtido um “pool” de aproximadamente 180 mL já bastante enriquecido, com fração de massa de 22,7%. O perfil cromatográfico correspondente a esta etapa de purificação é mostrado na Figura 13. A identificação das frações correspondente à proteína de interesse foi feita através do IRMA realizado ao longo de todo cromatograma. O controle de qualidade do pool assim obtido foi realizado mediante HPLC de exclusão molecular (HPSEC) e de fase reversa (RP-HPLC), sendo os perfis obtidos mostrados nas Figuras 14 e 15 respectivamente, onde observa-se ainda a presença de contaminantes de peso molecular maior do que o do hlsr-hTSH e de menor hidrofobicidade.

A etapa posterior foi realizada em uma coluna semi-preparativa de fase reversa. O pool resultante da SP-Sepharose FF foi concentrado com o auxílio de um dispositivo filtrante de centrifuga (Amicon Ultra 15), chegando a um volume de aproximadamente 6 mL. A Figura 16 mostra o perfil cromatográfico desta segunda etapa da purificação, onde é possível observar, no início da corrida, três ondas que refletem as 3 aplicações sucessivas de 2 mL. O material aí eluído é material de baixa hidrofobicidade que não fica retido na coluna. Também nessa etapa, foi realizada a varredura por IRMA que permitiu identificar as frações contendo o hlsr-hTSH.

Nesta etapa de purificação foi observada uma recuperação de 60% e um fator de purificação de 4,5 vezes. Com a estratégia adotada obtivemos um fator total de purificação de aproximadamente 150 vezes e uma recuperação total de 28%.

A Figura 17 mostra que após esta etapa foi possível obter um produto bastante puro, com uma pureza de 96% e 99% avaliada por HPSEC e RP-HPLC, respectivamente.

A pureza do produto foi confirmada também por SDS-PAGE, onde é possível observar a gradativa eliminação dos contaminantes, nas diferentes etapas da purificação, sendo o produto final tão puro quanto à proteína de referência, Thyrogen® (Figura 18).

Tabela 2 Purificação de hlsr-hTSH partindo de aproximadamente 5L de meio condicionado

Etapa da Purificação	Proteína total ¹ (mg)	hTSH (mg)	Rendimento da etapa (%)	Fração de massa (%)
Meio condicionado	665,0	4,52 ²	100	0,69
Eluato da troca catiônica	9,47	2,15 ³	48	22,7
Eluato da RP-HPLC	1,25	1,28 ³	60	102

1 Estimado por BCA

2 Estimado por RP-HPLC

3 Estimado por HPSEC

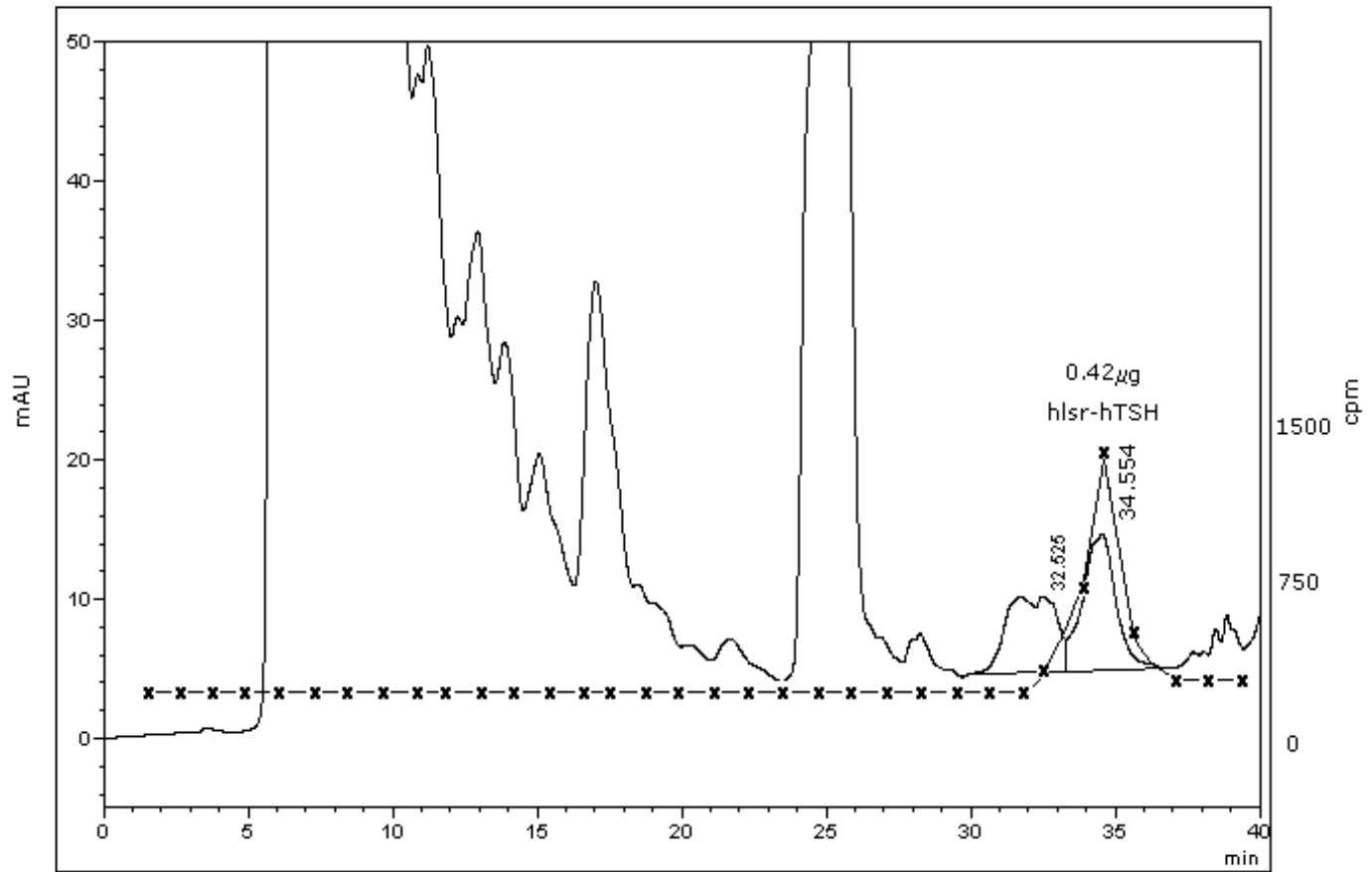


Figura 12 Perfil cromatográfico do meio condicionado em RP-HPLC. x-x representa a imunoreatividade determinada por IRMA. O tempo de retenção da preparação referência, neste ensaio, foi de 34,63 min.

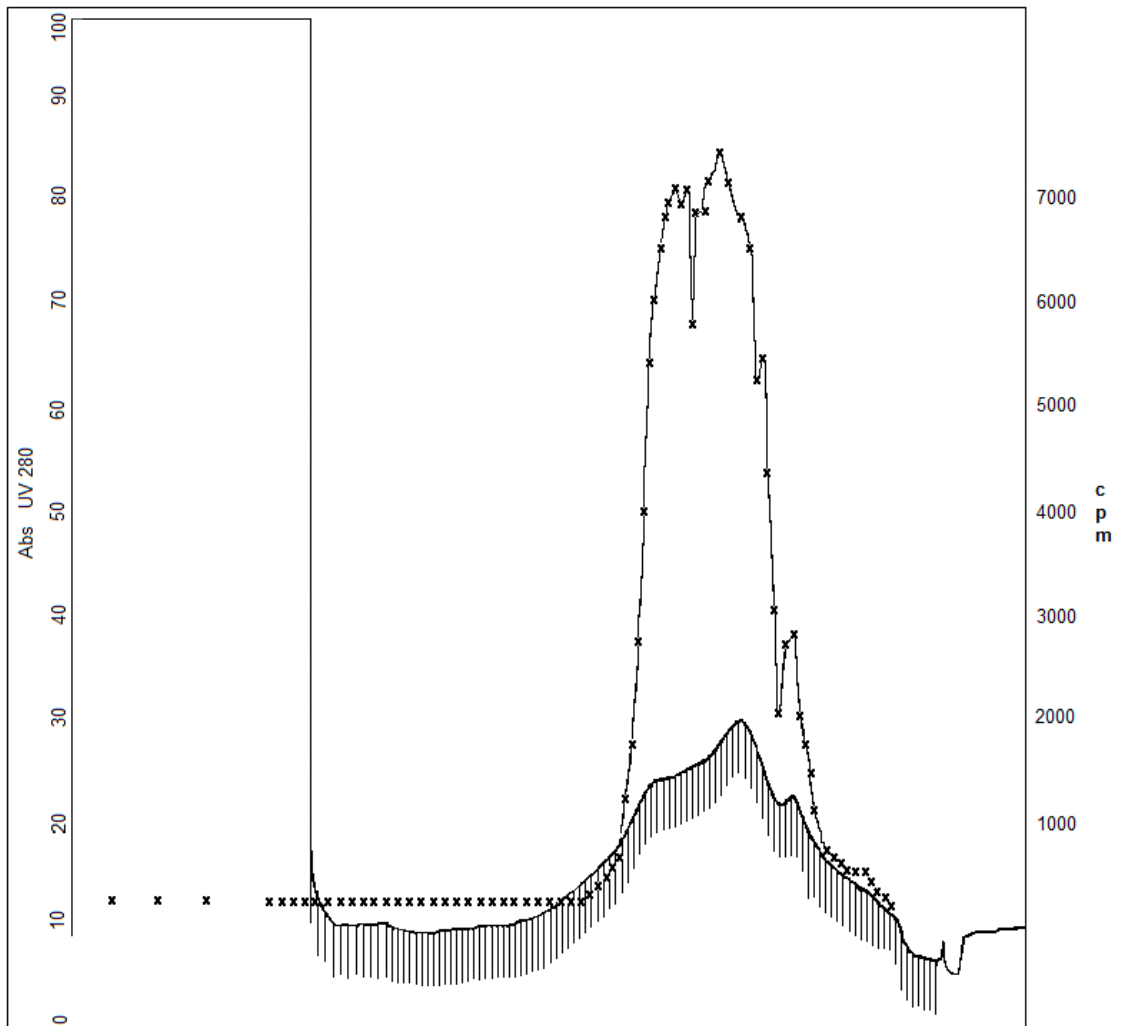


Figura 13 Perfil cromatográfico correspondente à primeira etapa de purificação (coluna SP- Sepharose FF) x—x imunoreatividade determinada mediante IRMA.

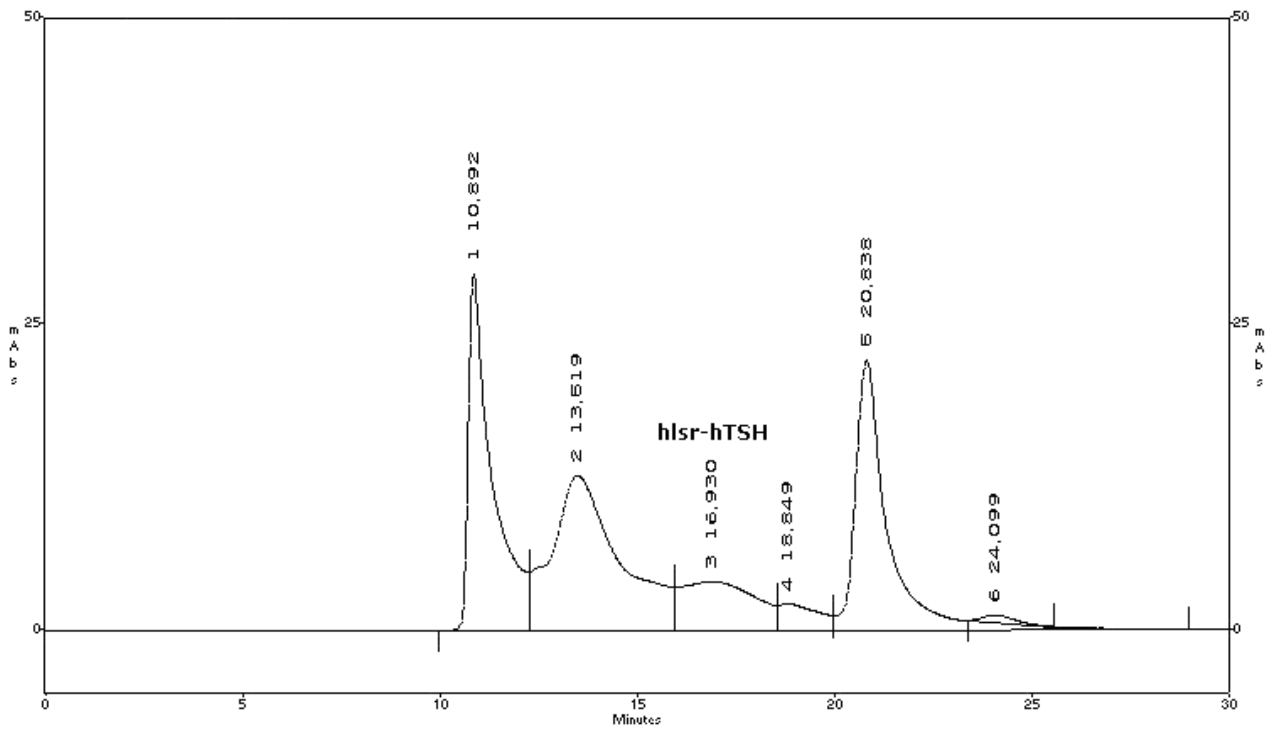


Figura 14 Perfil cromatográfico, em HPSEC, do eluato obtido após a primeira etapa de purificação. Neste ensaio o tempo de retenção da preparação referência foi de 17,2 minutos

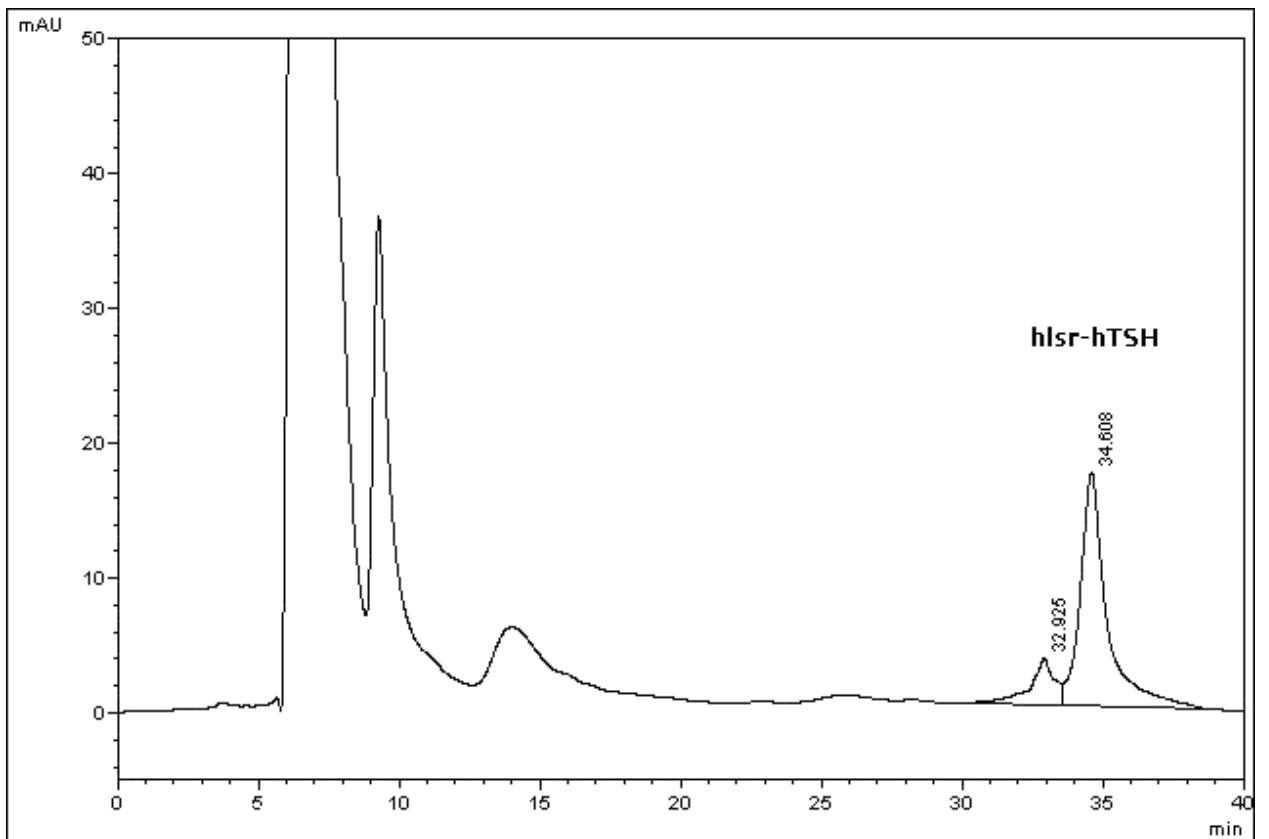


Figura 15 Perfil cromatográfico, em RP-HPLC, do eluato obtido após a primeira etapa de purificação. Neste ensaio o tempo de retenção da preparação referência foi de 34,6 minutos

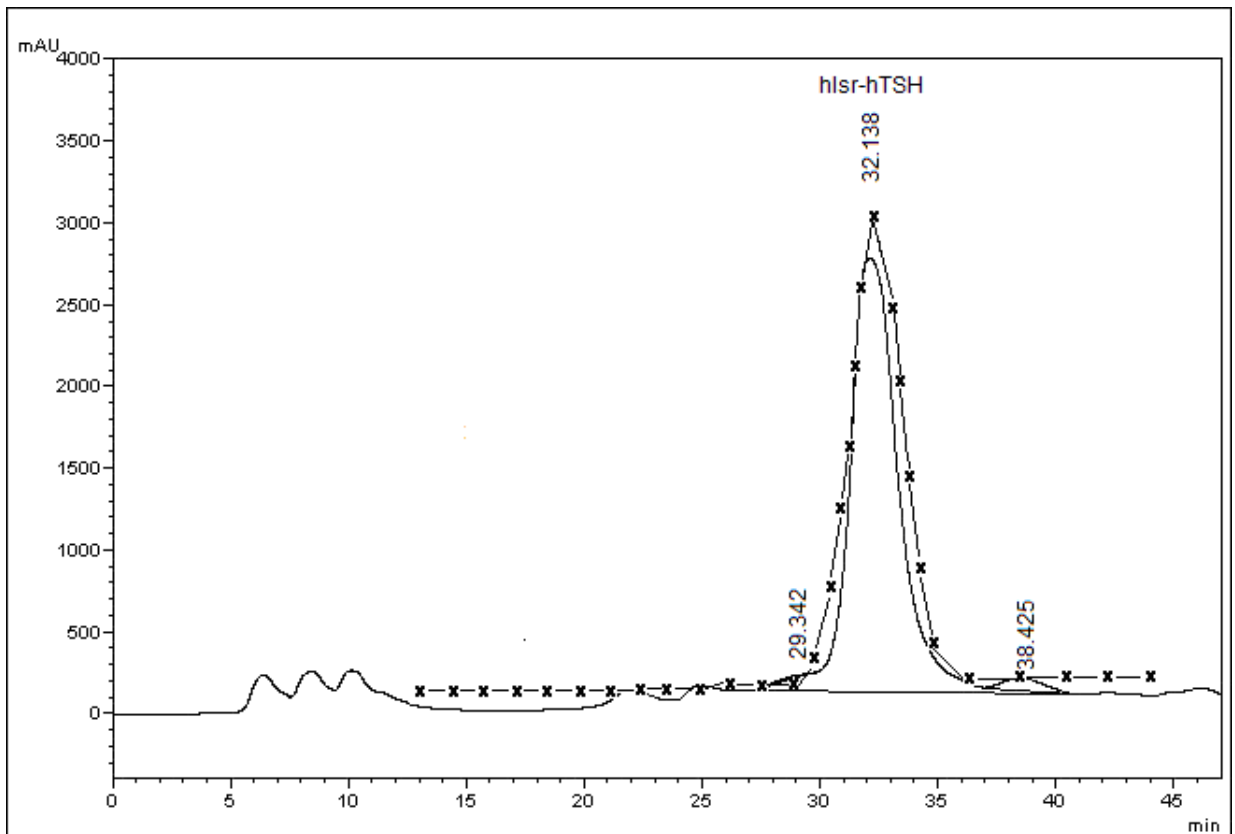


Figura 16 Perfil cromatográfico correspondente à segunda etapa de purificação (RP-HPLC semi preparativa). x—x imunoreatividade determinada via IRMA. Neste ensaio a preparação referência de hTSH apresentou $T_r = 32,60$ minutos

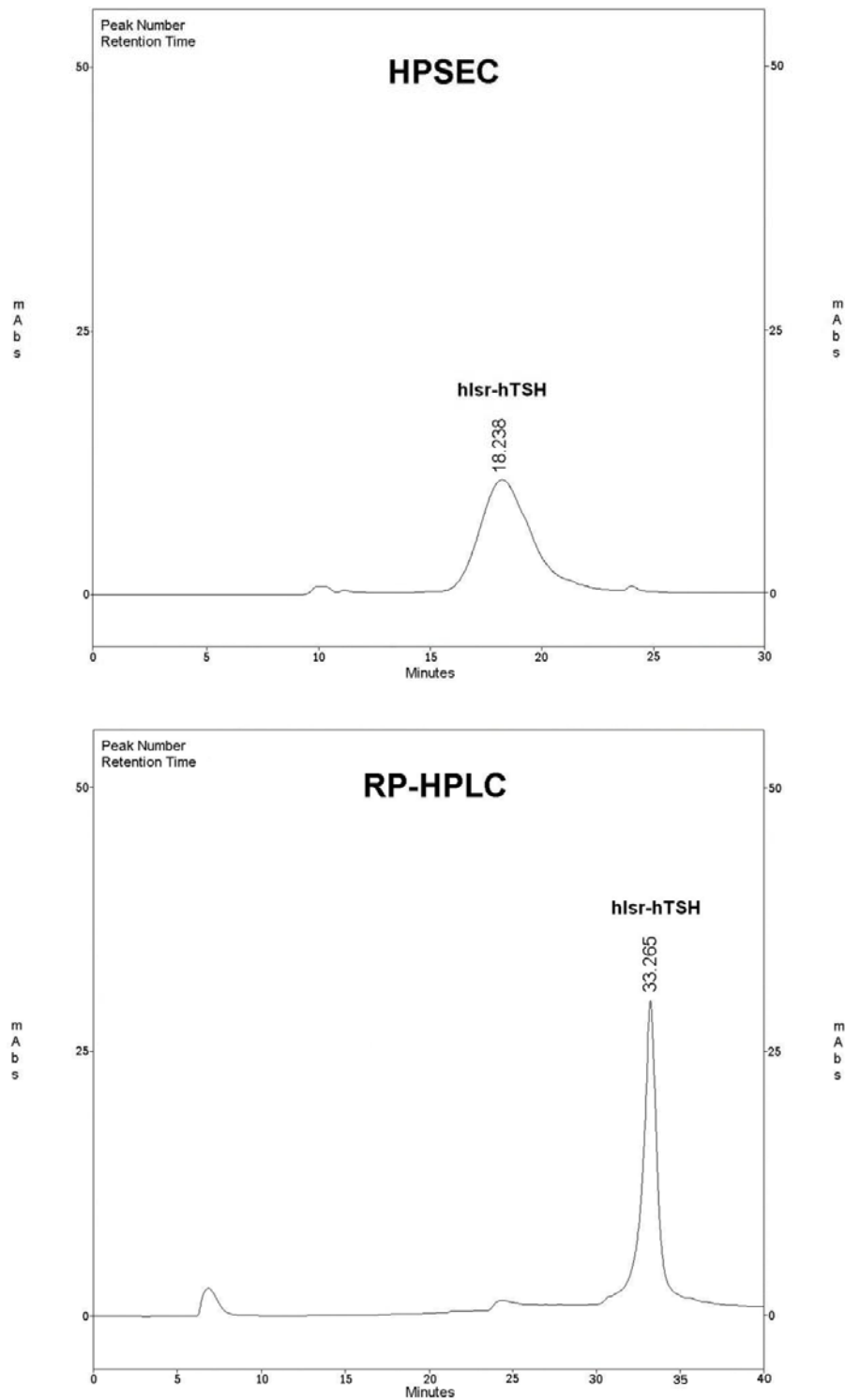


Figura 17 Perfil cromatográfico do hlsr-hTSH após duas etapas de purificação e uma etapa de liofilização, em HPSEC e RP-HPLC. O tempo de retenção da preparação referência, neste ensaio, foi de 18,50 min. na HPSEC e de 33,45 min. na RP-HPLC.

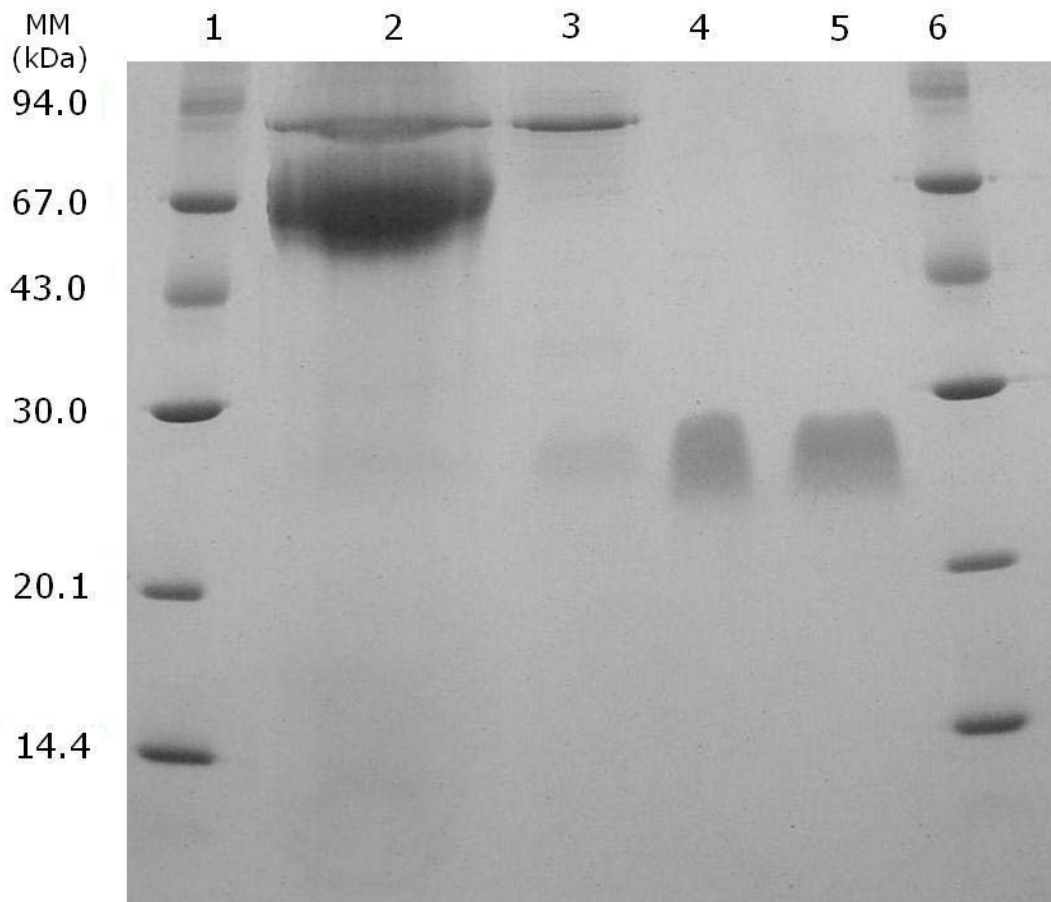


Figura 18 SDS-PAGE, em condições não-redutoras, das diferentes etapas da purificação do hlsr-hTSH. Colunas 1 e 6, marcadores de massa molecular ; coluna 2, meio condicionado de CHO; coluna 3, eluato da troca catiônica; coluna 4, eluato da RP-HPLC; coluna 5, Thyrogen®, utilizado como preparação de referência de hTSH recombinante.

4.4 Caracterização do produto purificado

4.4.1 Massa molecular

A massa molecular relativa (M_r) do hlsr-hTSH purificado e de suas subunidades foi determinada, em dois ensaios independentes, mediante espectrometria de massa MALDI-TOF, como exemplificado na Figura 19.

Os dados referentes a estas análises encontram-se compilados na Tabela 3, juntamente com os dados da espectrometria de massa do r-hTSH IPEN, r-hTSH Thyrogen® e p-hTSH NIDDK, que já haviam sido determinados em trabalho anterior (Mendonça, 2005). É possível observar que o valor experimental obtido pela determinação direta do heterodímero do hlsr-hTSH está de acordo com o valor correspondente à soma das massas de suas subunidades. Observa-se ainda que as massas encontradas, tanto para o hlsr-hTSH íntegro como para as suas subunidades, são maiores que os valores encontrados para o hTSH hipofisário. Este mesmo fato foi também observado para as demais preparações.

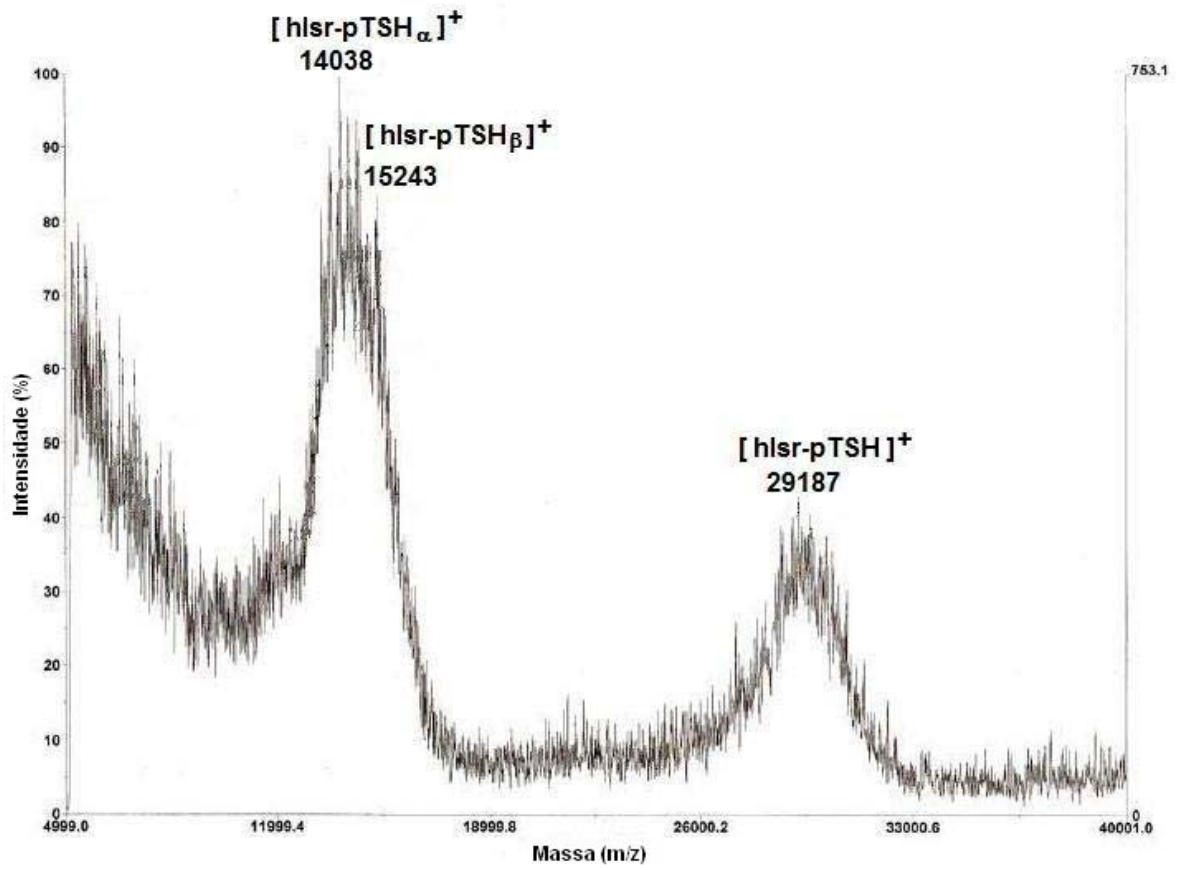


Figura 19 Espectrometria de massa MALDI-TOF do hlsr-hTSH

Tabela 3 Massa molecular relativa (M_r) de várias preparações de hTSH determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF

Preparação	Heterodímero (Experimental) $M_r \pm DP$	Subunidade α $M_r \pm DP$	Subunidade β $M_r \pm DP$	$(\alpha+\beta)$	$(\alpha+\beta) / \text{Exp.}$
p-hTSH NIDDK	$27829 \pm 26,9$	$13019 \pm 355,7$	$14476 \pm 21,8$	27495	0.99
r-hTSH IPEN	$29839 \pm 208,7$	$13961 \pm 55,9$	$15359 \pm 73,3$	29320	0.98
hlsr-hTSH	$29185 \pm 2,8$	$14070 \pm 45,3$	$15182 \pm 86,3$	29252	1.00
r-hTSH Thyrogen®	$29612 \pm 176,1$	$13860 \pm 58,7$	$15581 \pm 0,71$	29441	0.99

4.4.2 Hidrofobicidade

A hidrofobicidade relativa de seis preparações diferentes de hTSH (3 recombinantes e 3 hipofisárias) foi determinada utilizando RP-HPLC (Tabela 4). Observa-se que as preparações recombinantes apresentam uma menor hidrofobicidade do que as hipofisárias, sendo o hlsr-hTSH o menos hidrofóbico das preparações. Foi encontrada uma média entre os t_R das preparações pituitárias de $t_R = 33,74 \pm 0,051$ minutos, com um coeficiente de variação de 0,15% (n=3) que é significativamente diferente ($p < 0,005$) da média encontrada para os t_R das preparações recombinantes de $t_R = 33,36 \pm 0,085$ minutos com um coeficiente de variação de 0,26%.

Tabela 4 Hidrofobicidade relativa de preparações de hTSH (derivadas de células CHO e derivadas da hipófise)

PREPARAÇÃO	RP-HPLC t_R (min)
r-hTSH-IPEN	33,37
hlsr-hTSH	33,27
r-hTSH-Thyrogen®	33,44
p-hTSH-NIDDK	33,75
p-hTSH-NOR	33,68
p-hTSH-WHO	33,78

4.4.3 Atividade biológica

A atividade biológica do hlsr-hTSH foi avaliada *in vivo* em camundongos da linhagem BALB/c, em três ensaios independentes. Na Figura 20 é mostrado o nível de T₄ obtido para as diferentes preparações estudadas, onde se observam respostas menores de T₄ para as preparações hipofisárias do que para as preparações recombinantes. Na Tabela 5 é apresentada a potência das diferentes preparações de hTSH relativa à preparação de referência recombinante Thyrogen® e à preparação de referência hipofisária NIDDK. Não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre a potência do hlsr-hTSH e a do r-hTSH Thyrogen®, podendo-se, assim, dizer que o hlsr-hTSH é equipotente ao r-hTSH Thyrogen®, que é a única preparação de TSH comercialmente disponível. O hlsr-hTSH mostrou-se também equipotente ao r-hTSH IPEN. Quando comparado ao p-hTSH NIDDK, o hlsr-hTSH mostrou-se aproximadamente 1,5 vezes mais potente ($p < 0,001$).

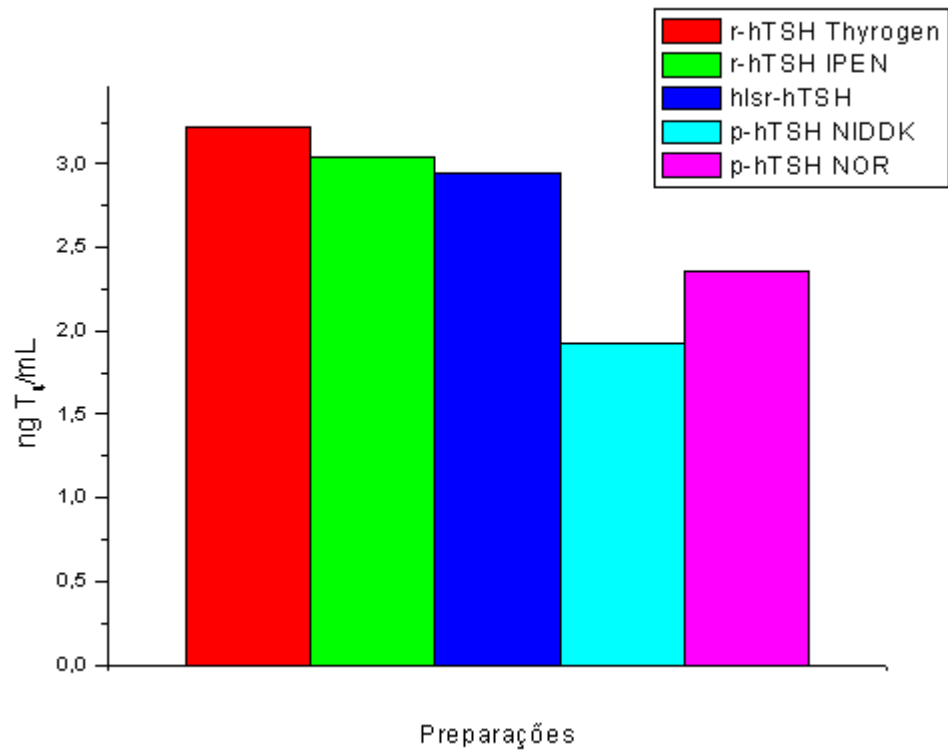


Figura 20 Nível de T₄ em função da dose de hTSH administrada nos camundongos (n=10)

Tabela 5 Potência relativa de diferentes preparações de hTSH, determinada por bioensaio *in vivo* (n=3)

Preparação	Potência (relativa ao r-hTSH-Thyrogen®)	Potência (relativa ao p-hTSH-NIDDK)
r-hTSH Thyrogen®	1,00	1,68 + 0,09
hlsr-hTSH	0,90 + 0,01	1,54 + 0,01
r-hTSH IPEN	0,94 + 0,17	1,60 + 0,19
p-hTSH NIDDK	0,60 + 0,03	1,00
p-hTSH NOR	0,83 + 0,16	1,38 + 0,20

4.2.4 Distribuição dos isômeros de carga

Para analisar a distribuição dos isômeros de carga do hlsr-hTSH, foi realizada uma focalização isoelétrica (IEF). Duas preparações recombinantes de hTSH (r-hTSH-IPEN e r-hTSH-Thyrogen®) e duas preparações hipofisárias (p-hTSH-NIDDK e p-hTSH-NOR) foram também submetidas à mesma análise (Figura 21). Uma grande heterogeneidade de cargas foi observada tanto nas preparações recombinantes como nas preparações hipofisárias. As preparações recombinantes apresentaram seis bandas principais distribuídas entre pH 5,20 e pH 7,35, enquanto as hipofisárias mostraram oito ou nove bandas no intervalo de pH de 4,82 a 7,35. A principal diferença encontrada no perfil de bandas obtido para as preparações recombinantes e hipofisárias é a presença de duas ou três isoformas de pH mais ácido nas preparações hipofisárias, que encontram-se distribuídas entre os pH 5,20 e 4,82. Quando o hlsr-hTSH foi comparado às outras preparações recombinantes, não foram observadas diferenças entre as três preparações, sendo a distribuição das cargas praticamente idêntica entre elas.

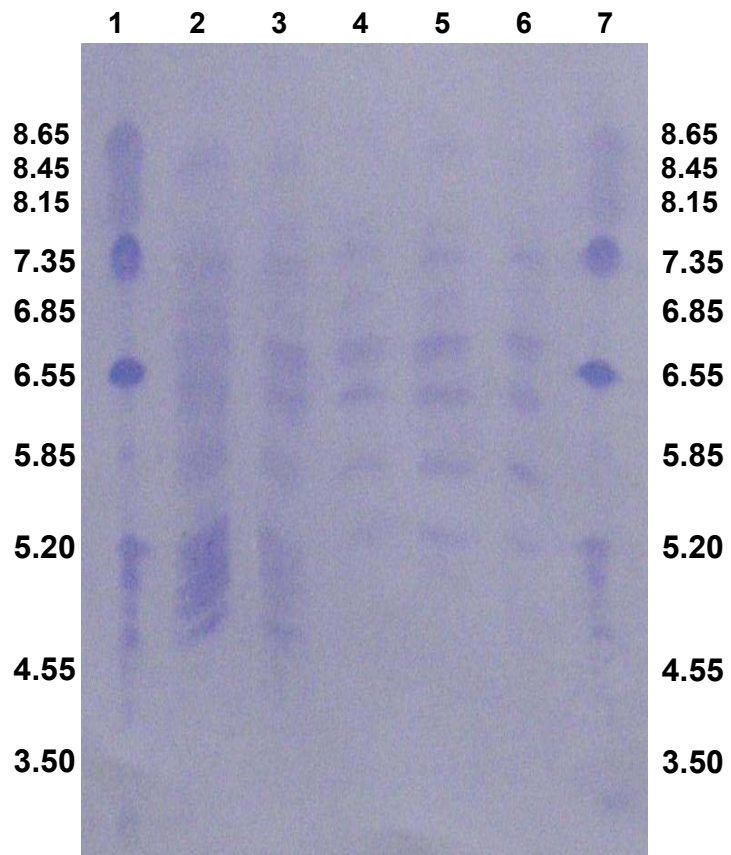


Figura 21 Perfil de distribuição dos isômeros de carga de preparações de hTSH. 1 e 7: marcadores de ponto isoelétrico; 2: p-hTSH-NOR; 3: p-hTSH NIDDK; 4: hlsr-hTSH; 5: r-hTSH IPEN; 6: r-hTSH Thyrogen®.

4.2.5 Análise estrutural dos carboidratos

Na Figura 22 e a na Tabela 6 é mostrada a análise por HPLC dos N-glicanos do hlsr-hTSH. Os glicanos identificados são do tipo complexo e apresentam estruturas di, tri e tetra-antenárias. Nas estruturas identificadas, foram observados diferentes níveis de sialilação e estas estruturas podem ou não apresentar um resíduo de fucose (Figura 23). Em trabalho anterior realizado em nosso laboratório (Oliveira, 2008), esta caracterização de carboidratos já havia sido realizada para as preparações de hTSH derivada de células CHO não modificadas (r-hTSH IPEN e r-hTSH Thyrogen®). Na Tabela 7 é mostrada, para os três hormônios, a frequência de N-glicanos com relação à antenaridade e ao nível de sialilação. Observa-se que no hlsr-hTSH ocorre uma menor frequência de estruturas di-antenárias (57,08%), do que nas outras duas preparações (82,6 e 80,8% respectivamente para o r-hTSH IPEN e Thyrogen®). A diferença mais marcante entre as três preparações recombinantes é, entretanto, nas estruturas tetra-antenárias tetra-sialiladas, que, no caso do hlsr-hTSH, compreendem aproximadamente 20% das formas sialiladas enquanto estas mesmas estruturas representam apenas 1,4% e 1,3% no r-hTSH-IPEN e no r-hTSH-Thyrogen® respectivamente. Observa-se também uma diferença entre o hlsr-hTSH e as outras preparações quanto às estruturas mono-sialiladas. Enquanto para o Thyrogen® e r-hTSH IPEN aproximadamente 80% das estruturas sialiladas são mono-sialiladas, no caso do hlsr-hTSH apenas cerca de 50% delas são mono-sialiladas. Diferença menor foi encontrada relativa às estruturas tri-sialiladas, tendo sido observado que no caso do hlsr-hTSH 20% das estruturas sialiladas são tri-sialiladas enquanto para os outros dois hormônios aproximadamente 10% tem esse nível de sialilação.

Na Tabela 8 encontram-se outros parâmetros importantes desta análise, onde é possível observar que no hlsr-hTSH existe um maior conteúdo de ácido siálico (5,47 mol de ácido siálico/mol de hTSH) quando comparado às outras preparações recombinantes aqui analisadas, bem como maior conteúdo de galactose. Vale ressaltar que as moles de ácido siálico, galactose e galactose expostas são cerca de 5 vezes menores na preparação hipofisária, enquanto a

razão moles de ácido siálico/moles de galactose é praticamente igual nas quatro preparações analisadas ($\sim 0,65$).

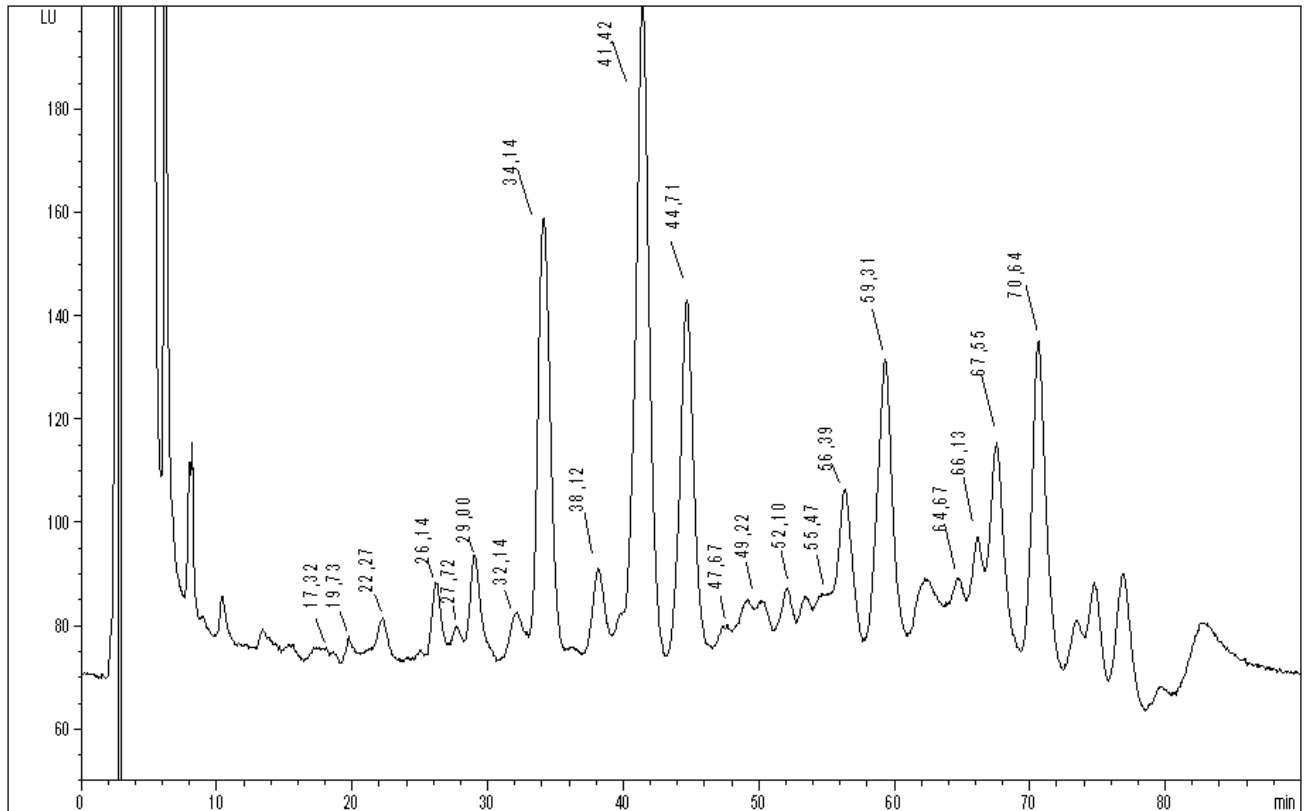


Figura 22 Separação dos N-glicanos do hlsr-hTSH analisados em HPLC de fase normal

Tabela 6 Análise qualitativa e quantitativa dos N-glicanos presentes no hlsr-hTSH, por HPLC de fase normal

Tempo de retenção (min.)	Área	N-glicanos	%
17,32	326	N2G0	0,78
19,73	277	N2G0F	0,66
22,27	563	N2G1	1,35
26,14	810	N2G1F	1,94
27,72/29,00	1595	N2G2	3,83
32,14	669	N2G2F	1,60
34,14	5135	N2G1S1	12,32
38,12	1005	N3G3	2,41
41,42	8921	N2G2S1	21,40
44,71	4598	N2G2S1F	11,03
47,67	270	N2G2S2	0,65
49,22	632	N2G2S2F	1,52
52,10	412	N4G4F	0,99
55,47	773	N3G3S2	1,85
56,39	2081	N3G3S3	4,99
59,31	3961	N3G3S3F	9,50
64,67	1091	N4G4S2	2,62
66,13	1330	N4G4S3	3,19
67,55	2787	N4G4S4	6,69
70,64	4451	N4G4S4F	10,68

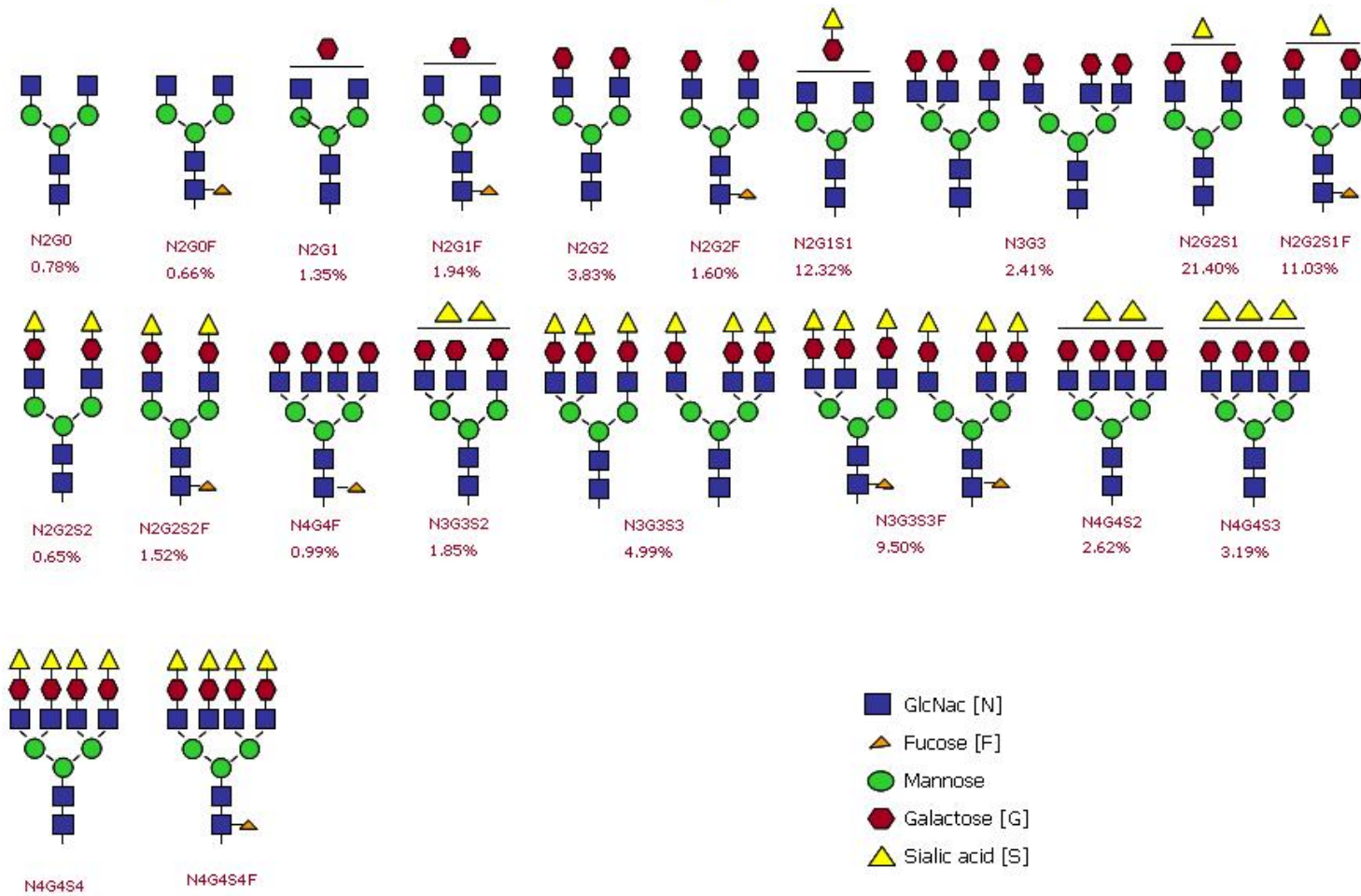


Figura 23 N-glicanos da preparação hlsr-hTSH

Tabela 7 Distribuição dos N-glicanos quanto à antenaridade e ao nível de sialilação

Nível de Sialilação	bi-antenária			tri-antenária			tetra-antenária			Total por nível de sialilação		
	hlsr	IPEN ^a (%)	THY ^a	hlsr	IPEN ^a (%)	THY ^a	hlsr	IPEN ^a (%)	THY ^a	hlsr	IPEN ^a (%)	THY ^a
0	10,16	6,47	5,28	2,41	3,87	6,59	0,99	1,23	1,19	13,56	11,57	13,06
1	44,75	69,66	68,45	_____	_____	_____	_____	_____	_____	44,75	69,66	68,65
2	2,17	6,51	7,03	1,85	0,70	n.d.	2,62	0,65	n.d.	6,64	7,86	7,03
3	_____	_____	_____	14,49	9,30	10,0	3,19	0,34	0,31	17,68	9,64	10,31
4	_____	_____	_____	_____	_____	_____	17,37	1,24	1,15	17,37	1,24	1,15
Total por Antenaridade	57,08	82,64	80,76	18,75	13,87	16,59	24,17	3,46	2,65			
Total glicanos sialilados										86,44	88,40	87,14

^aDados de Oliveira e colaboradores (2008)

Tabela 8 Parâmetros dos N-glicanos de quatro preparações de hTSH.

Preparação	Ácido siálico(mol)/ hTSH (mol)	Galactose(mol)/ hTSH (mol)	Ácido siálico(mol)/ galactose (mol)	Galactose exposta(mol)/ TSH (mol)
hlsr-hTSH	5,47	7,53	0,73	2,06
r-hTSH IPEN	3,61	5,95	0,61	2,34
r-hTSH Thyrogen®	3,57	6,06	0,59	2,49
p-hTSH NIDDK	0,90 ^a	1,33 ^a	0,68 ^a	0,43 ^a

^aDados de Cole e colaboradores (1993a)

4.2.6 Análise da ligação ácido siálico-galactose

Na Figura 24 é mostrada a intensidade da interação das lectinas específicas para a ligação $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$ com os glicanos do hlsr-hTSH em três situações diferentes: para o hlsr-hTSH sem tratamento prévio, para o hlsr-hTSH previamente tratado com uma neuraminidase que catalisa a hidrólise do ácido siálico nas duas ligações (asialo hTSH) e para hlsr-hTSH tratado com uma neuroamidase ativa preferencialmente para a ligação $\alpha 2,3$ ($\alpha 2,3$ asialo TSH). A intensidade de interação de ambas lectinas foi, no primeiro caso, normalizada para 100%. Para o asialo hTSH, observou-se um decréscimo na interação de ligação de 85 e 95% para as lectinas específicas para $\alpha 2,6$ e $\alpha 2,3$ respectivamente. No caso do $\alpha 2,3$ asialo TSH, observa-se um decréscimo na intensidade de sinal de cerca de 88%, quando analisado com a lectina específica para a ligação $\alpha 2,3$ enquanto com a lectina específica para a ligação $\alpha 2,6$, praticamente não houve alteração na intensidade do sinal. O nível de interação obtido após digestão com as neuramidases foi subtraído dos resultados obtidos para a amostra sem tratamento.

A análise controle, realizada com fetuina bovina, apresentou resultado análogo, porém com inespecíficas menores (Figura 25).

As análises assim realizadas forneceram para o hlsr-hTSH uma porcentagem de ligação de ácido siálico na conformação $\alpha 2,3$ de $61 \pm 10\%$ e de $39 \pm 10\%$ na conformação $\alpha 2,6$ (Figura 26). Esse mesmo estudo, realizado por nós para a proteína nativa, mostrou $68 \pm 10\%$ de ligação de ácido siálico na conformação $\alpha 2,3$ e $32 \pm 10\%$ na conformação $\alpha 2,6$.

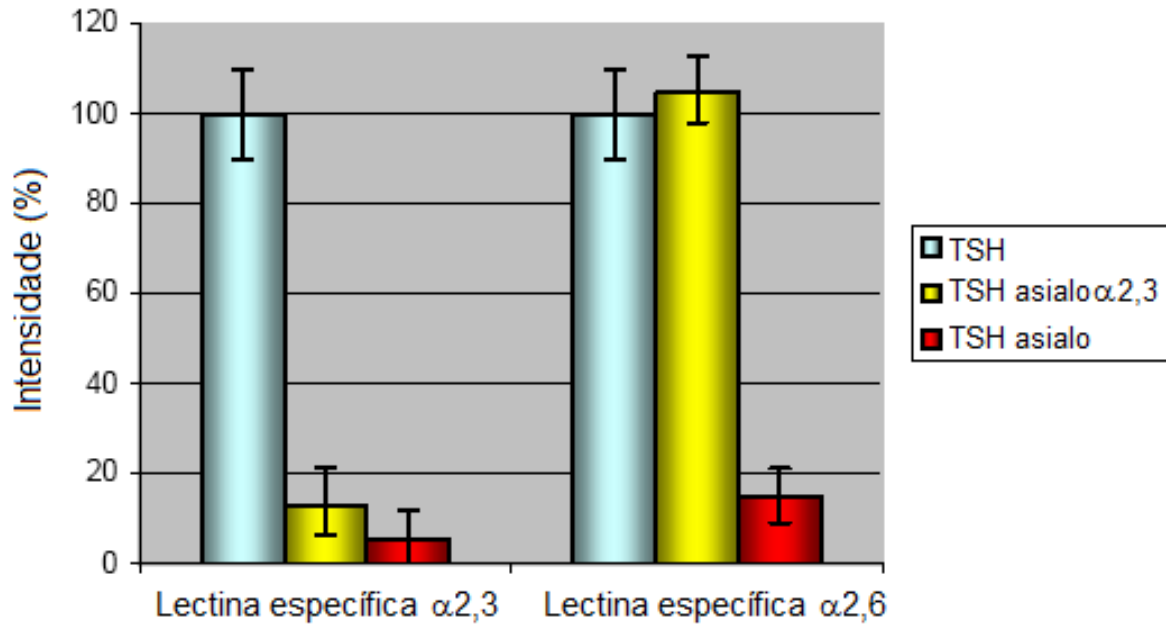


Figura 24 Interação das lectinas específicas Neu5Aca $\alpha 2,3$ e Neu5Aca $\alpha 2,6$ com os glicanos do hlsr-hTSH

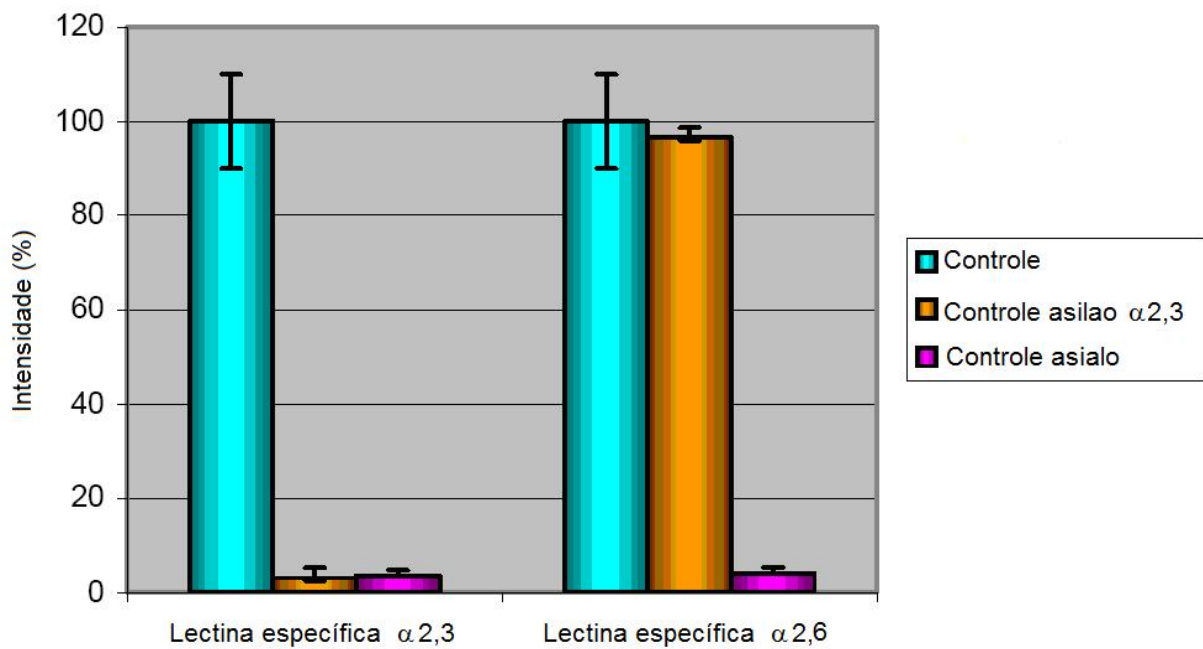


Figura 25 Interação das lectinas específicas Neu5Ac α 2,3 e Neu5Ac α 2,6 com os glicanos da proteína controle (fetuina).

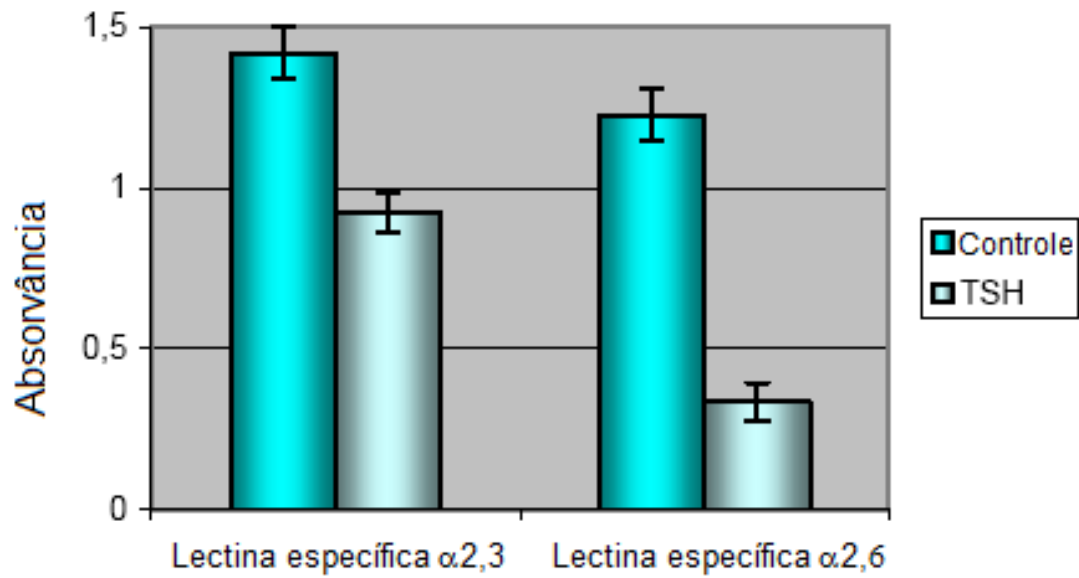


Figura 26 Absorbância da ligação do ácido siálico à galactose na conformação α 2,3 e α 2,6 no hlsr-hTSH.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi obtido um hTSH com padrão de sialilação similar àquele da proteína nativa, a partir de uma linhagem celular modificada, na qual foi introduzido o gene da $\alpha 2,6$ sialiltransferase. Esta nova proteína, denominada hlsr-hTSH, foi caracterizada com relação à massa molecular, hidrofobicidade, distribuição de isômeros de carga, bioatividade, além de ter tido sua estrutura de carboidratos e o tipo de ligação do ácido siálico à galactose determinados. A nova proteína foi comparada com outras duas preparações recombinantes derivadas de células CHO não modificadas (Cole, 1993a; Peroni, 2002) e com uma preparação hipofisária.

A mesma estratégia, envolvendo dois vetores de expressão (um para cada subunidade), e a mesma proporção dos vetores de expressão, empregada por Peroni e colaboradores (2002) foi adotada, neste trabalho, para a transfecção das células CHO modificadas. Para a obtenção de níveis úteis da proteína heterodimérica, foi necessária uma amplificação gênica com 8 μM de MTX, uma concentração bem maior do que aquela que levou a níveis úteis de hTSH derivado de células CHO não modificadas (1 μM de MTX). Com uma concentração ainda maior de MTX (10 μM), foi ainda obtida a mesma produtividade específica (2,1 $\mu\text{g}/10^6$ cel/dia), porém foi observada uma concentração menor de hlsr-hTSH no meio (0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Embora estes valores sejam menores daqueles reportados por Cole e colaboradores (1993a) (4,5 $\mu\text{g}/10^6$ cel/dia) e por Peroni e colaboradores (2002) (7,2 $\mu\text{g}/10^6$ cel/dia) para o hTSH derivado de células CHO não modificadas, ainda assim estes níveis de hTSH são úteis e permitiram a obtenção de material para ser purificado e caracterizado.

A estratégia de purificação adotada neste trabalho foi a mesma seguida para o hTSH convencional, em trabalho anterior (Oliveira, 2007) e permitiu a obtenção de um produto com alto grau de pureza (acima de 95%). Trata-se de uma técnica rápida e eficiente que permitiu, com rendimentos úteis (~30%) e com somente duas etapas de purificação, um alto fator de purificação (~150X),

partindo de um material extremamente diluído e impuro (isto é, com fração de massa bem baixa de ~0,69%)

Considerando que a acetonitrila é um solvente que potencialmente pode afetar a estabilidade de proteínas complexas (Ribela, 2006), é importante ressaltar que, embora o hlsr-hTSH tenha sido eluído na presença de até 25% de acetonitrila na segunda etapa de purificação (RP-HPLC), não houve perda de atividade biológica, sendo esta equivalente à da preparação referência, cuja purificação seguiu uma estratégia totalmente diferente (Cole, 1993a).

Uma ferramenta bastante utilizada para avaliar a identidade de uma proteína recombinante é a espectrometria de massa MALDI-TOF. A massa molecular do hlsr-hTSH e de suas subunidades, determinadas por esta técnica, bem como a de duas outras preparações recombinantes derivadas de células CHO não modificadas, foram maiores (5 a 8%) daquela da preparação hipofisária (diferença significativa com $p < 0,001$). Esta diferença pode ser atribuída às diferenças de carboidratos das preparações recombinantes e nativas (Thotakura, 1992; Szkudlinski, 1993). Estas mesmas diferenças também foram observadas em trabalho anterior para o hLH e hFSH (Carvalho, 2009), hormônios que pertencem à mesma família de glicohormônios. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as massas determinadas para as três preparações recombinantes.

Em todos os casos aqui estudados foi possível detectar simultaneamente a massa do heterodímero e de suas subunidades, estando a soma das massas das subunidades de acordo com a massa encontrada experimentalmente para cada preparação.

Observa-se no presente trabalho uma diferença significativa ($p < 0,005$) entre a hidrofobicidade das preparações recombinantes e das preparações hipofisárias, o que pode ser explicado, pela diferença de carboidratos existentes nesses dois tipos de preparações. Tal comportamento está de acordo com o descrito por Rassi (1996) que constatou que pequenas diferenças entre as porções de carboidratos das proteínas podem afetar, de alguma forma, a interação das mesmas com colunas de fase reversa. Também Oliveira e colaboradores (2003), descreveram, para o mesmo hTSH, diferenças entre preparações recombinantes e hipofisárias. O hlsr-hTSH foi, entre as três

preparações recombinantes aqui analisadas, a que se mostrou menos hidrofóbica, revelando uma menor interação com a coluna de fase reversa.

A análise do hlsr-hTSH, por focalização isoeletrica, revelou um padrão de distribuição de isoformas muito semelhante àquele reportado por Zhou e colaboradores (2004) e por Oliveira e colaboradores (2008) para o hTSH recombinante convencional. Os isômeros de carga do hlsr-hTSH apresentaram um padrão de distribuição similar às demais preparações recombinantes aqui analisadas, com pI variando entre 5,20 e 7,35. Já as preparações hipofisárias apresentaram 2 ou 3 isoformas na região mais ácida, sendo a variação de pH no intervalo de 4,82 a 7,35. Szkudlinski e colaboradores (1993a) também observaram valores de pI mais ácidos para a preparação hipofisária (6,5-4 contra 7,1-5,5 para as recombinantes). Provavelmente isto acontece porque isoformas específicas são separadas com base no conteúdo de carga negativa, que no caso do TSH hipofisário é determinado tanto pelos resíduos de ácido siálico como pelos resíduos de sulfato, apresentando, portanto, mais isoformas ácidas.

A atividade biológica do hlsr-TSH foi determinada por bioensaio *in vivo* e, como descrito por Oliveira e colaboradores (2007), foi utilizada a dose de 10µg/animal, dose esta que forneceu respostas reprodutíveis em uma região linear da curva dose-resposta. Os dados aqui obtidos revelaram que o hlsr-hTSH apresenta uma potência biológica praticamente equivalente à potência das preparações Thyrogen® e IPEN ($p > 0,05$).

Quando comparamos a potência das preparações recombinantes com a das preparações hipofisárias, observamos uma menor potência das últimas, o que está de acordo com Szkudlinski e colaboradores (1993) que também encontraram uma maior potência para a preparação recombinante de TSH. A maior potência encontrada para as preparações recombinantes pode ser explicada pelo maior nível de sialilação a elas associado, o que contribui diretamente para o maior tempo de permanência da proteína na circulação, uma vez que o ácido siálico a ela aderido impossibilita o reconhecimento da proteína pelos receptores assialoglicoprotéicos existentes no fígado, que são os responsáveis diretos pela depuração metabólica das glicoproteínas (Szkudlinski, 1993; Takamatsu, 2003). Cole e colaboradores (1993a) relacionaram o menor nível de sialilação das

preparações hipofisárias com a menor quantidade de galactose existente nestas preparações. Uma maior quantidade de galactose e ácido siálico nas preparações recombinantes foi também observada no presente trabalho (Tabela 8). Já Thotakura e colaboradores (1992) explicam o maior conteúdo de ácido siálico nas preparações recombinantes como consequência do número maior de estruturas di-, tri- e tetrasialiladas encontradas nas mesmas.

Ao comparar as três preparações recombinantes aqui analisadas, um maior conteúdo de ácido siálico (~1,5 vezes maior) foi encontrado para o hlsr-hTSH (5,47 moles de ácido siálico/moles de proteína contra 3,61 e 3,57 para o r-hTSH IPEN e r-hTSH Thyrogen®, respectivamente). Entretanto, não encontramos diferenças significativas na bioatividade destas três preparações, ao contrário de Szkudlinski e colaboradores (1993) que ao estudarem duas preparações recombinantes de hTSH com diferentes níveis de sialilação e um asialo hTSH, constataram que o hTSH pouco sialilado apresentou uma atividade biológica cerca de 3-4 vezes menor do que o hTSH mais sialilado, enquanto o asialoTSH apresentou a menor potência *in vivo*.

Fukuta e colaboradores (2000) também encontraram um conteúdo de ácido siálico 1,5 vezes maior para um interferon- γ com ligação de ácido siálico na conformação α 2,6 do que para um interferon convencional. Além disso, observaram nesta preparação de interferon- γ uma maior incidência de estruturas tri e tetra-antenárias e menor de estruturas di-antenárias. Fato semelhante foi também encontrado para o hlsr-hTSH. A maior porcentagem de estruturas tri- e tetra-antenárias encontradas nesta preparação sugere que a massa molecular do hlsr-hTSH poderia ser maior do que a das outras preparações, o que não foi observado na determinação da massa molecular destas três preparações via MALDI-TOF. Quando a massa molecular do hTSH foi estimada diretamente pela sequência primária de aminoácidos e somada à massa das porções de carboidratos, com base na contribuição de cada N-glicano específico, e comparado com os dados obtidos por MALDI-TOF, observou-se um valor cerca de 8,3% maior no hlsr-hTSH, mas de apenas 2,1% e 3,1% maior para o r-hTSH IPEN e r-hTSH Thyrogen® respectivamente. Embora o motivo desta diferença ainda não seja claro, especula-se que pode haver uma diminuição no nível de ocupação dos sítios de glicosilação do hlsr-hTSH ou talvez possa ocorrer perda de N-glicanos específicos durante o MALDI-TOF.

Análise semelhante ao do presente trabalho para os N-glicanos do hTSH foi também realizada por Morelle e colaboradores (2006), que identificaram 16 estruturas, incluindo uma estrutura tetra-sialilada penta-antenária (N5G5S4F), a qual não foi identificada neste trabalho. Loumaye e colaboradores (1998) analisaram as estruturas dos glicanos presentes no hFSH derivado de células CHO. Assim como ocorreu para as preparações de hTSH analisadas neste trabalho, foram identificadas 20 estruturas diferentes na preparação de hFSH, 14 das quais são comuns aos dois hormônios.

Um parâmetro importante abordado no presente trabalho diz respeito ao tipo de ligação do ácido siálico à galactose. O hlsr-hTSH, derivado de célula CHO na qual foi introduzido o gene da $\alpha 2,6$ sialiltransferase, foi analisado quanto a este parâmetro tendo apresentado $61 \pm 10\%$ de ligação do ácido siálico na conformação $\alpha 2,3$ e $39 \pm 10\%$ na conformação $\alpha 2,6$, revelando assim que a linhagem celular utilizada expressa de forma eficiente a enzima $\alpha 2,6$ sialiltransferase e possibilita a produção de proteínas recombinantes com sialilação “humanizada”.

Vale ressaltar que, apesar de possuir um padrão de sialilação mais semelhante ao da proteína nativa, a atividade biológica desta proteína não foi influenciada por isso, sendo equivalente à da preparação recombinante que só apresenta sialilação na posição $\alpha 2,3$. Ressalta-se que outras proteínas, com este tipo de alteração, tais como interferon γ (Bragonzi, 2000), eritropoietina (Zhang, 1998) e IgG 3 (Jassal, 2001), também não apresentaram diferenças significativas em sua atividade biológica quando comparadas à preparação sem a modificação para a sialiltransferase. Entretanto, do ponto de vista farmacêutico a modificação introduzida neste trabalho para o hTSH é de grande valia, dada a importância de se ter um biofármaco que apresente um padrão de sialilação similar ao encontrado nas proteínas nativas humanas.

6. CONCLUSÕES

- Foi obtida uma linhagem estável de CHO modificada pela adição do gene de hTSH a uma linhagem que já codificava a enzima α 2,6 sialiltransferase. Esta linhagem é capaz de secretar níveis de hTSH com sialilação “humanizada” (hlsr-hTSH) de $2,1 \mu\text{g}/10^6$ células/dia.
- Utilizando uma estratégia de duas etapas de purificação foi obtido hlsr-hTSH com pureza acima de 95%.
- O hlsr-hTSH mostrou-se equipotente ao r-hTSH IPEN e r-hTSH Thyrogen® e 1,6 vezes mais potente que a preparação hipofisária do NIDDK.
- Não foram observadas diferenças significativas com relação à massa molecular e hidrofobicidade quando o hlsr-hTSH foi comparado a outras preparações recombinantes de hTSH.
- O perfil de isoformas do hlsr-hTSH surpreendentemente não apresentou diferenças com relação às duas outras preparações recombinantes analisadas, apresentando, entretanto, diferenças com relação às preparações hipofisárias.
- Com relação às estruturas de carboidratos, foi encontrada uma maior porcentagem de estruturas tri- e tetra-antenárias no hlsr-hTSH do que nas outras preparações de hTSH recombinantes analisadas.
- O hlsr-hTSH diferiu dos demais hTSH recombinantes por apresentar ligação de ácido siálico também na conformação α 2,6.
- A porcentagem de ligação α 2,3 e α 2,6 do hlsr-hTSH foi de $68 \pm 10\%$ e $32 \pm 10\%$ respectivamente, semelhante à da proteína natural ($61 \pm 10\%$ e $39 \pm 10\%$).

- Os dados referentes a este trabalho foram recém publicados em *Protein Expression and Purification* v. 67, p. 7-14, 2009.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORESANO, A.; SICILIANO, R.; ORRU, S.; NAPOLEONI, R.; ALTAROCCHA, V.; DE LUCA, E.; SIRNA, A.; PUCCI, P. Structural characterization of human recombinant glycohormones follitropin, lutropin and choriogonadotropin expressed in Chinese hamster ovary cells. **Eur. J. Biochem.**, v. 242, p. 608-618, 1996.

ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 439-469, 2002.

BAENZIGER, J.U.; GREEN, E.D. Pituitary glycoprotein hormones oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 947, p. 287-306, 1988.

BAENZIGER, J.U. Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it! **FASEB J.**, v. 8, p. 1019-1025, 1994.

BERGWERFF, A.A.; OOSTRUM, Jv.; ASSELBERGS, F.A.M.; BÜRG, R.; HOKKE, C.H.; KAMERLING, J.P.; VLIEGENTHART, J.F.G. Primary structure of N-linked carbohydrate chains of a human chimeric plasminogen activator K₂tu-PA expressed in Chinese hamster ovary cells. **Eur. J. Biochem.**, v. 212, p. 639-656, 1993.

BETENBAUGH, M.J.; **US Pat.** 2005/0287637 A1, 2005.

BORK, K.; HORSTKORT, R.; WEIDEMANN, W. Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway. **J. Pharm. Sci.**, DOI: 10.1002/jps.21684, 2009.

BRAGONZI, A.; DISTEFANO, G.; BUCKBERRY, L.D.; ACERBIS, G.; FOGLIENI, C.; LAMOTTE, D.; CAMPI, G.; MARC, A.; SORIA, M.R.; JENKINS,

N.; MONACO, L. A new Chinese hamster ovary cell line expressing α 2,6-sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1474, p. 273-282, 2000.

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

BYRNE, B.; DONOHOE, G.G.; O'KENNEDY, R. Sialic acid: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. **Drug Discov. Today**, v. 12, p. 319-326, 2007.

CANONNE, C.; PAPANDREOU, M.J.; MEDRI, G.; VERRIER, B.; RONIN, C. Biological and immunochemical characterization of recombinant human thyrotrophin. **Glycobiology**, v. 5, p. 473-481, 1995.

CARVALHO, C.M.; OLIVEIRA, J.E.; ALMEIDA, B.E.; UEDA, E.K.M.; TORJESEN, P.A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Efficient isolation of the subunits of recombinant and pituitary glycoprotein hormones. **J. Chromatogr. A.**, v. 1216, p. 1431-1438, 2009.

CHOU, H.H.; TAKEMATSU, H.; DIAZ, S.; NICKERSON, E.; WRIGHT, K.L.; MUCHMORE, E.A.; NELSON, D.L.; WARREN, S.T.; VARKI, A. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 95, p. 11751-11756, 1998.

COLE, E.S.; LEE, K.; LAUZIERE, K.; KELTON, C.; CHAPPEL, S.; WEINTRAUB, B.; FERRARA, D.; PETERSON, P.; BERNASCONI, R.; EDMUNDS, T.; RICHARDS, S.; DICKRELL, L.; KLEEMAN, J.M.; MCPHERSON, J.M.; PRATT, B. Recombinant human thyroid stimulating hormone: development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma. **Bio-Technol.**, v. 11, p. 1014-1023, 1993 a.

COLE, E.S.; NICHOLS, E.H.; POISSON, L.; HARNOIS, M.L.; LIVINGSTON, D.J. *In vivo* clearance of tissue plasminogen-activator – the complex role of sites of glycosilation and level of sialylation. **Fibrinolysis**, v. 7, p. 15-22, 1993 b.

DRACOPOLI, N.C.; RETTIG, W.J.; WHITFIELD, G.K.; DARLINGTON, G.J.; SPENGLER, B.A.; BIEDLER, J.L.; OLD, L.J.; KOURIDES, I.A. Assignment of the gene for the β subunit of thyroid-stimulating hormone to the short arm of human chromosome 1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 1822-1826, 1986.

ELLSGAARD, L.; HELENIUS, A. Quality control the endoplasmic reticulum. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 181-191, 2003.

EMERSON, C.H.; TORRES, M.S.T. Recombinant human thyroid-stimulating hormone – Pharmacology, clinical applications and potential uses. **Biodrugs**, v. 17(1), p. 19-38, 2003.

ESCRIVA, H.; PIERCE, A.; CODDEVILLE, B.; GONZÁLEZ, F.; BANAISSA, M.; LÉGER, D.; WIERUSZESKI, J-M.; SPIK, G.; PAMBLANCO, M. Rat-mammary gland transferrin: nucleotide sequence, phylogenetic analysis and glycan structure. **Biochem. J.**, v. 367, p. 47-55, 1995.

FIDDES, J.C.; GOODMAN, H.M. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. **J. Mol. Appl. Genet.**, v. 1, p. 3-18, 1981.

FUKUTA, K.; YOKOMATSU, T.; ABE, R.; ASANAGI, M.; MAKINO, T. Genetic engineering of CHO cells producing human interferon- γ by transfection of sialyltransferases. **Glycoconj. J.**, v. 17, p. 895-904, 2000.

GOOCHEE, C.F.; GRAMER, M.J.; ANDERSEN, D.C.; BAHR, J.B.; RASMUSSEN, J.R. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors

affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. **Biotechnology**, v.9, p. 1347-1355, 1991.

GOOCHEE, C.F.; GRAMER, M.J.; ANDERSEN, D.C.; BAHR, J.B. The oligosaccharides of glycoproteins: factors affecting their synthesis and their influence on glycoprotein properties. In: Sikdar TP, Bier SK (Eds) **Frontiers in Bioprocessing**. Washington: American Chemical Society, v. 11, p. 199-240, 1992.

GRABENHORST, E.; HOFFMANN, A.; NIMTZ, M.; ZETTMEISSEL, G.; CONRADT, H.S. Construction of stable BHK-21-cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(β -1-4)GlcNAc- α 2,6 sialyltransferase α -2,6 linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(β -1-4)GlcNAc(β -1-2)Man(α -1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant β -trace protein. **Eur. J. Biochem.**, v. 232, p. 718-725, 1995.

GRABENHORST, E.; SCHLENKE, P.; POHL, S.; NIMTZ, M.; CONRADT, H.S. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. **Glycoconj. J.**, v. 16, p. 81-97, 1999.

GREEN ED, BAENZIGER JU. Asparagine-linked oligosaccharides on Lutropin, Follitropin and Thyrotropin. II – Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 36-44, 1988.

GROSSMANN, M.; WONG, R.; THE, N.G; TROPEA, J.E.; EAST PALMER, J.; WEINTRAUB, B.D.; SZKUDLINSKI, M.W. Expression of biologically active human thyrotropin (hTSH) in a baculovirus system: Effect of insect cell glycosylation on hTSH activity in vitro and in vivo. **Endocrinology**, v. 138, p. 92-100, 1997.

HAUGEN, B.R.; PACINI, E.; REINERS, C.; SCHLUMBERGER, M.; LADENSON, P.W.; SHERMAN, S.I.; COOPER, D.S.; GRAHAM, K.E.; BRAVERMAN, L.E.; SKARULIS, M.C.; DAVIES, T.F.; DEGROOT, L.J.;

MAZZAFERRI, E.L.; DANIELS, G.H.; ROSS, D.S.; LUSTER, M.; SAMUELS, M.H.; BECKER, D.V.; MAXON, H.R.; CAVALIERI, R.R.; SPENCER, C.A. A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 3877-3885, 1999.

HAY, I.D.; BAYER, M.F.; KAPLAN, M.M.; KLEE, G.G.; LARSEN, P.R.; SPENCER, C.A. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. **Clin. Chem**, v. 37, p. 2002-2008, 1991.

HELTON, T.E.; MAGNER, J.A. β -1,4-galactosyltransferase and α -mannosidase-II Messenger ribonucleic acid levels increase with different kinetics in thyrotrophs of hypothyroid mice. **Endocrinology**, v. 135, p. 1980-1985, 1994.

HUSSAIN, A.; ZIMMERMAN, C.A.; BOOSE, J.A.; FROEHLICH, J.; RICHARDSON, A.; HOROWITZ, R.S.; COLLINS, M.T. LASH, R.W. Large scale synthesis of recombinant human thyrotropin using methotrexate amplification: chromatographic, immunological, and biological characterization. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 1184-1188, 1996.

JASSAL, R.; JENKIS, N.; CHARLWOOD, J.; CAMILLERI, P.; JEFFERIS, R.; LUND, J. Sialylation of human IgG-Fc carbohydrate by transfected rat α 2,6-sialyltransferase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 17, p. 243-249, 2001.

JENKINS, N.; CURLING, E.M.A. Glycosilation of recombinants proteins: Problems and prospects. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 354-364, 1994.

JENKINS, N.; PAREKH, R.B.; JAMES, D.C. Getting the glycosilation right: implications for the biotechnology industry. **Biotechnology**, v. 14, p. 975- 981, 1996.

JEONG, Y.T.; CHOI, O.; LIM, H.R.; SON, Y.D.; KIM, H.J.; KIM, J.H. Enhanced sialylation of recombinant erythropoietin in CHO cells by human glycosyltransferase expression. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 1945-2952, 2008.

LAMOTTE, D.; BUCKBERRY, L.; MONACO, L.; SORIA, M.; JENKINS, N.; ENGASSER, J.M.; MARC, A. Na-butyrate increases the production and α 2,6-sialyltransferase engineered CHO cells. **Cytotechnology**, v. 29, p. 55-64, 1999.

LATIF, R.; GRAVES, P.; DAVIES, T.F. Oligomerization of the human thyrotropin receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 45217-45224, 2001.

LEE, E.U.; ROTH, J.; PAULSON, J.C. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 13848-13855, 1989.

LIM, S.F.; LEE, M.M.; ZHANG, P.; SONG, Z. The Golgi CMP-sialic acid transporter: a new CHO mutant provides functional insights. **Glycobiology**, v. 18, p. 851-860, 2008.

LOUMAYE, E.; DREANO, M.; GALAZKA, A.; HOWLES, C.; HAM, L.; MUNAFO, A.; ESHKOL, A.; GIUDICE, E.; DE LUCA, E.; SIRNA, A.; ANTONETTI, F.; GIARTOSIO, C.E.; SCAGLIA, L.; KELTON, C.; CAMPBELL, R.; CHAPPEL, S.; DUTHU, B.; CYMBALISTA, S.; LEPAGE, P. Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. **Hum. Reprod. Update**, v. 4, 862-881, 1998.

LUSTER, M. Present status of the use recombinant human TSH in thyroid cancer management. **Acta Oncol.**, v. 45, p. 1018-1030, 2006.

MENDONÇA, F.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotropin and its

immunological, biological, physico-chemical and mass spectral characterization. **J. Chromatogr. A**, v. 1062, p. 103-112, 2005.

MOLINARI, M. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. **Nat. Chem. Biol.**, v. 3, p. 313-320, 2007.

MONACO, L.; MARC, A.; EONDUVAL, A.; ARCEBIS, G.; DISTEFANO, G.; LAMOTTE, D.; ENGASSE, J.M.; SORIA, M.; JENKINS, N. Genetic engineering of alpha 2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effects on the sialylation of recombinant interferon-gamma. **Cytotechnology**, v. 22, p. 197-203, 1996.

MORELLE, W.; DONADIO, S.; RONIN, C.; MICHALSKI, J-C. Characterization of N-glycans of recombinant human thyrotropin using mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 20, p. 331-345, 2006.

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

OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Practical reversed-phase high-performance liquid chromatography method for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. **J. Chromatogr. A**, v. 1164, p. 206-211, 2007.

OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; VORAUER-UHL, K.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Influence of a reduced CO₂ environment on the secretion yield, potency and glycan structures of recombinant thyrotropin (hTSH) from CHO cells. **Mol. Biotechnol.**, v. 39, p. 159-166, 2008.

PERONI, C.N.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Sensitive human thyrotropin immunoradiometric assay set up by the identification and minimization of non specific bindings. **J. Immunoassay**, v.18, p. 247-265, 1997.

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

PIERCE, J.G.; PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 50, p. 465-495, 1981.

RAJU, T.S.; BRIGGS, J.B.; BORGE, S.M.; JONES, A.J.S. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. **Glycobiology**, v. 10, p. 477-486, 2000.

RASSI, Z.E. Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. **J. Chromatogr. A**, v. 720, p. 93-118, 1996.

RIBELA, M.T.C.P., BIANCO, A.C.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human thyrotropin produced by chinese hamster ovary cells for the preparation of immunoassay reagents. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 249-256, 1996.

RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. **J. Chromatogr. B**, v. 790, p. 285-316, 2003.

RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Curr. Pharm. Anal.**, v. 2, p. 103-126, 2006.

RUDD, P.M.; DWEK, R.A. Rapid, sensitive sequencing of oligosaccharides from glycoproteins. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 8, p. 488-497, 1997.

SANTELL, L.; RYLL, T.; ETCHEVERRY, T.; SANTORIS, M.; DUTINA, G.; WANG, A.; GUNSON, J.; WARENER, T.G. Aberrant metabolic sialylation of recombinant proteins expressed in Chinese hamster ovary cells in high productivity cultures. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 258, p. 132-137, 1999.

SVENSSON, E.C.; SOREGHAN, B.; PAULSON, J.C. Organization of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 29863-20868, 1990.

SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; BUCCI, I.; JOSHI, L.R.; TSAI, A.; EAST-PALMER, J.; SHILOACH, J.; WEINTRAUB, B.D. Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by chinese-hamster ovary cells – the role of sialylation and sulfatation in TSH bioactivity. **Endocrinology**, v. 133, p. 1490-1503, 1993.

SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D. Subunit-specific functions of N-linked oligosaccharides in human thyrotropin: Role of terminal residues of α - and β -subunits oligosaccharides in metabolic clearance and bioactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 9062-9066, 1995.

SZKUDLINSKI, M.W.; GROSSMANN, M.; LEITOLF, H.; WEINTRAUB, B.D. Human thyroid-stimulating hormone: structure-function analysis. **Methods**, v. 21, p. 67-81, 2000

SZKUDLINSKI, M.W.; FREMONT, V.; RONIN, C.; WEINTRAUB, B.D. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 473-502, 2002.

TAKAMATSU, S.; FUKUTA, K.; ASANAGI, M.; ABE, R.; YOKOMATSU, T.; FUJIBAYASHI, Y.; MAKINO, T. Monitoring biodistribution of glycoproteins with modified sugar chains. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1622, p. 179-191, 2003.

TAKASHIMA, S. Characterization of mouse sialyltransferase genes: their evolution and diversity. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 72, p. 1155-1167, 2008.

THOTAKURA, N.R.; DESAI, R.K.; SZKUDLINSKI, M.W.; WEINTRAUB, B.D. The role of the oligosaccharide chains of the thyrotropin alpha-subunit and beta-subunit in hormone action. **Endocrinology**, v. 131, p. 82-88, 1992.

THOTAKURA, N.R.; BLITHE, D.L. Glycoprotein hormones: glycobiology of gonadotropins, thyrotropin and free α subunit. **Glycobiology**, v. 5, p. 3-10, 1995.

TRAVING, C.; SCHAUER, R. Structure, function and metabolism of sialic acid. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 54, p. 1330-1349, 1998.

ULLOA, F.; REAL, F.X. Differential distribution of sialic acid in α 2,3 and α 2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 49, p. 501-509, 2001.

ZHANG, X.; LOK, S.H.L.; KON, O.L. Stable expression of human α -2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1425, p. 441-452, 1998.

ZHOU, Q.; PARK, S-H.; BOUCHER, S.; HIGGINS, E.; LEE, K.; EDMUNDS, T. N-linked oligosaccharide analysis of glycoprotein bands from isoelectric focusing gels. **Anal. Biochem.**, v. 335, p. 10-16, 2004.

