



CO-EXPRESSÃO DOS GENES DO FATOR IX E DAS ENZIMAS  
 $\gamma$ -CARBOXILASE, VKORC1 E PACE EM CÉLULAS CHO

Daniel André Ribeiro

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Engenharia Química,  
COPPE, da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do  
título de Mestre em Engenharia  
Química.

Orientadoras: Leda dos Reis Castilho

Helen Conceição Ferraz

Rio de Janeiro

Março de 2009

CO-EXPRESSION DO GENES DO FATOR IX E DAS ENZIMAS  
 $\gamma$ -CARBOXILASE, VKORC1 E PACE EM CÉLULAS CHO

Daniel André Ribeiro

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

---

Profa. Leda dos Reis Castilho, D.Sc.

---

Profa. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

---

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

---

Dra. Ariane Leites Larentis, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2009

RIBEIRO, DANIEL ANDRÉ

Co-expressão dos genes do fator IX e das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE em células CHO/Daniel André Ribeiro. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009

XVIII, 138 p.: il.; 29,7 cm

Orientador(a): Leda dos Reis Castilho

Helen Conceição Ferraz

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2009.

Referências bibliográficas: p. 115-133

1. Enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE. 2. Produção fator IX. 3. Células CHO. 4. Sistema de integração sítio-dirigida FRT. I. Castilho, Leda dos Reis *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

# **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação ao meu pai, José Antônio, que mesmo não estando presente fisicamente, me fornece inspiração para continuar sempre lutando contra todas as adversidades seja no trabalho ou na vida pessoal.

# AGRADECIMENTOS

Primeiramente, às minhas orientadoras, Leda Castilho e Helen Ferraz, pelos ricos conselhos que me foram dados durante todo o trabalho. Estes conselhos me forneceram o privilégio de aprender a fazer pesquisa de qualidade.

À minha família pelo apoio e compreensão dados nos momentos difíceis enfrentados na produção deste trabalho.

À minha querida namorada, Marina Damião, que com muita paciência me apoiou em tudo durante a produção da dissertação. Obrigado pelo auxílio em tarefas enfadonhas, pela compreensão quando fui obrigado a sacrificar os fins de semana para trabalhar e por estar ao meu lado sempre que preciso.

Aos meus colegas do laboratório de Engenharia de Cultivo Celulares (LECC/BIOMOL) pelo auxílio durante as experiências e por se comportarem como uma verdadeira equipe de trabalho.

Aos amigos do PEQ/COPPE, especialmente para Anna Carolina Camelo do Laboratório de Bioprocessos pelo apoio.

Ao Dr. Marcos Pinho pela ajuda com as análises de PCR em tempo real realizadas no Instituto de pesquisa do INCA (Instituto Nacional do Câncer).

À equipe do Laboratório de Hemostasia do HEMORIO pelas análises de coagulometria.

Um agradecimento especial para Maíra Pellegrini que com muita paciência e sabedoria me ensinou todos os conceitos e técnicas de biologia molecular, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, também, pelas ótimas idéias que ajudaram a resolver muitos problemas durante o trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

CO-EXPRESSÃO DOS GENES DO FATOR IX E DAS ENZIMAS  
 $\gamma$ -CARBOXILASE, VKORC1 E PACE EM CÉLULAS CHO

Daniel André Ribeiro

Março/2009

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Helen Conceição Ferraz

Programa: Engenharia Química

Neste trabalho o gene do fator IX, proteína utilizada no tratamento da hemofilia B, foi co-expresso com os genes das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE, responsáveis pelas modificações pós-tradução da molécula do fator IX, em células CHO. Estas modificações são imprescindíveis para a atividade biológica do fator IX. Foram construídos vetores bicistrônicos com o elemento IRES defectivo intermediando os dois genes, com os cDNAs do fator IX e das enzimas. A expressão gênica, a produção do fator IX total e a atividade do fator IX foram avaliadas em células CHO transfectadas com o vetor pIRES, de integração aleatória, e com o vetor pCDNA5/FRT, de integração sítio-dirigida. O nível de expressão e produção de fator IX em células transfectadas com o vetor pIRES foi baixo em relação ao obtido para o pCDNA5/FRT. Isto comprovou a superioridade do sistema de integração sítio-dirigida em relação à integração aleatória. Como a expressão utilizando o vetor pIRES foi baixa, praticamente não houve influência da co-expressão das enzimas. Já com o pCDNA5/FRT, a co-expressão da  $\gamma$ -carboxilase prejudicou a produção de fator IX funcional, provavelmente pela reduzida oferta de co-fator desta enzima, a vitamina K reduzida.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

CO-EXPRESSION IN CHO CELLS OF THE FACTOR IX AND OF THE ENZYMS  
 $\gamma$ -CARBOXYLASE, VKORC1 AND PACE GENES

Daniel André Ribeiro

March/2009

Advisors: Leda dos Reis Castilho

Helen Conceição Ferraz

Department: Chemical Engineering

In this work the factor IX gene, protein used in the hemophilia B treatment, was co-expressed with the enzymes  $\gamma$ -carboxylase, VKORC1 and PACE genes in CHO cells. These enzymes are responsible for the factor IX post-translation modifications, which are essential to the biological activity of factor IX. Bicistronic vectors were built with the factor IX and enzymes cDNAs, having the defective IRES element intermediating the two genes. The expression, the production of total factor IX and the factor IX activity were evaluate in CHO cells transfected with the aleatory integration vector, pIRES and with the site-direct integration vector, pcDNA5/FRT. Expression level and factor IX production in cells transfected with the pIRES vector were low as compared to those obtained for the pcDNA5/FRT. This result proved the superiority of the site-direct integration system in relation to the aleatory integration. As the expression using the pIRES vector was low, practically there was no influence of the co-expression of the enzymes. Co-expression of  $\gamma$ -carboxylase and factor IX using pcDNA5 vector had a negative impact on the production of the functional factor IX, probably due to the reduced availability of the  $\gamma$ -carboxylase co-factor, the vitamin  $\text{KH}_2$ .

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
2.1 – Proteínas recombinantes .....	5
2.2 – Produção do fator IX recombinante .....	10
2.3 – Clonagem e expressão de proteínas em células animais.....	13
2.3.1 – Componentes de um vetor de expressão em células animais .....	13
2.3.2 – O sistema Flp-In <sup>TM</sup> .....	17
2.4 – Bioquímica do fator IX.....	20
2.4.1 – Função do fator IX no organismo humano.....	20
2.4.2 – Estrutura do fator IX.....	23
2.4.3 – Estrutura do gene do fator IX.....	24
2.4.4 – As modificações pós-tradução e funções dos domínios do fator IX.....	26
2.5 – A $\gamma$ -carboxilação.....	30
2.5.1 – A enzima $\gamma$ -carboxilase.....	30
2.5.2 – O ciclo da vitamina K.....	34
2.5.3 – A vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKORC1).....	37
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 – Objetivo geral .....	45
3.2 – Objetivos específicos.....	45
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
4.1 – Linhagens de células animais e cepas bacterianas .....	46



4.2 – Manutenção e propagação de células.....	46
4.2.1 – Células animais.....	46
4.2.2 – Bactérias.....	47
4.3 – Criopreservação de células animais.....	47
4.4 – Descongelamento de células animais.....	48
4.5 – Preparação de bactérias competentes.....	48
4.6 – Criopreservação de bactérias.....	49
4.7 – PCR (reação em cadeia da DNA polimerase).....	49
4.8 – Eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA.....	51
4.9 – Transformação, seleção de colônias e extração plasmidial .....	51
4.10 – Etapas da construção dos vetores de expressão em células animais .....	53
4.10.1 – Insetos e vetores.....	53
4.10.2 – Montagem da estratégia de clonagem.....	55
4.10.3 – Inserção do cDNA do fator IX no vetor de clonagem pGEM-T Easy vector.....	56
4.10.4 – Clonagem do cDNA do fator IX no vetor de expressão pIRES.....	58
4.10.5 – Clonagem dos cDNAs da $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE no vetor pIRES contendo gene do fator IX.....	60
4.10.6 – Clonagem do cDNA do fator IX no vetor pcDNA5/FRT .....	61
4.10.7 – Clonagem das sequências do fator IX+IRES+enzimas ( $\gamma$ -carboxilase e VKORC1) no pcDNA5/FRT.....	63
4.11 – Quantificação dos vetores.....	66
4.12 – Sequenciamento dos vetores.....	66
4.13 - Transfecção nas células CHO Flp-In <sup>TM</sup> .....	66

4.13.1 – Transfecção com os vetores construídos no pIRES .....	66
4.13.2 – Transfecção com os vetores construídos no pcDNA5/FRT.....	68
4.14 – Técnicas analíticas.....	68
4.14.1 – Determinação da concentração celular.....	68
4.14.2 – Análise do fator IX total produzido por imunoenensaio do tipo ELISA....	69
4.14.3 – Análise de fator IX ativo por ensaio de coagulometria.....	71
4.14.4 – Análise da expressão dos genes inseridos nas células CHO Flp-In <sup>TM</sup> por PCR em tempo real.....	74
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
5.1 – Vetores construídos.....	79
5.1.1 – Vetor pGEM-T Easy com o cDNA do fator IX.....	79
5.1.2 – Vetores pIRES+fator IX e pcDNA5/FRT+fator IX.....	81
5.1.3 – Vetores fatorIX+pIRES+enzimas ( $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE)....	86
5.1.4 – Vetores fatorIX+IRES+enzimas (VKORC1 e $\gamma$ -carboxilase) /pcDNA5/FRT.....	90
5.2 – Análise da expressão do gene do fator IX e das enzimas (VKORC1, $\gamma$ - carboxilase e PACE) por PCR em tempo real.....	93
5.3 – Ensaio de avaliação da produção do fator IX total.....	102
5.4 – Avaliação da atividade do fator IX produzido.....	107
<b>6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>134</b>

## LISTA DE SIGLAS

aa	Aminoácido
A/T	Polimorfismo alanina ou treonina
ATG	Códon de iniciação (adenina, timina e guanina)
BGHpA	Sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino
BHK	Células de rim de hamster neonato ( <i>Baby Hamster Kidney</i> )
Bifurcação A6	Bifurcação da sequência de DNA com 6 adeninas
-β-OH	Indica a modificação pós-tradução β-hidroxilação
Cab-45	Proteína capaz de se ligar ao cálcio - 45
cDNA	Cópia do ácido desoxirribonucléico
CG	Gonadotrofina coriônica
CGHC	Sequência de aminoácidos do sítio redox da PDI
CHO	Células de ovário de hamster chinês ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
-CHO	Indica a modificação pós-tradução glicosilação
-CO <sub>2</sub>	Indica a modificação pós tradução γ-carboxilação
Cre	Recombinase do vírus bacteriófago P1
CREC	Família de proteínas (Cab-45, reticulocalbina, ERK-45 e calumenina)
C <sub>t</sub>	Ciclo limite ( <i>threshold cycle</i> )

CXXC ou CIVC	Sequência de aminoácidos do sítio redox da enzima VKORC1 (o X representa qualquer aminoácido)
DHFR	Enzima diidrofolato redutase
DMEM	Meio de cultivo Dulbecco's <i>modified</i> Eagle's
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase 1	Enzima desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
Domínio EGF	Domínio denominado de fator de crescimento epidermal
Domínio Gla	Domínio com ácidos glutâmicos $\gamma$ -carboxilados
DTT	Ditiotreitol
DVK	Dependente de vitamina K
<i>E. coli</i>	Bactéria <i>Escherichia coli</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> )
EMC	Encefalomiocardite
ERK-45	Proteína quinase regulada por sinal extracelular 45 ( <i>Extracellular signal-regulated protein kinase 45</i> )
ERO1	Oxidase do retículo endoplasmático 1 ( <i>Endoplasmatic reticulum oxidase 1</i> )
FAM	6-carboxifluoresceína
FIX	Fator de coagulação IX

FIXa	Fator de coagulação IX ativado
Flp	Enzima de recombinação Flipase
Flp-In	Sistema Flipase da Invitrogen
FMDV	Vírus causador da febre aftosa ( <i>foot-and-mouth disease virus</i> )
FRT	Sítio de recombinação da flipase ( <i>Flipase Recombination Target</i> )
FSH	Hormônio folículo estimulante
FV	Fator de coagulação V
FVa	Fator de coagulação V ativado
FVII	Fator de coagulação VII
FVIIa	Fator de coagulação VII ativado
FVIII	Fator de coagulação VIII
FVIIIa	Fator de coagulação VIII ativado
FX	Fator de coagulação X
FXa	Fator de coagulação X ativado
FXI	Fator de coagulação XI
FXIa	Fator de coagulação XI ativado
FXIII	Fator de coagulação XIII
FXIIIa	Fator de coagulação XIII ativado
G418	Antibiótico geneticina 418
G-CSF	Fatores estimulantes de colônias de granulócitos

GM-CSF	Fatores estimulantes de colônias de granulócitos e macrófagos
HEK293	Células de rim de embrião humano ( <i>Human Embryonic Kidney 293</i> )
IFN- $\alpha$	Interferon $\alpha$
IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IGF	Fator de crescimento similar à insulina ( <i>Insulin-like Growth Factor</i> )
IgG1/DTPA	Imunoglobulina 1/ ácido dietilenotriaminopentaacético ( <i>diethylenetriaminepentaacetic acid</i> )
IgG1/TNFR	IgG1/ receptor do fator de necrose tumoral ( <i>tumor necrosis factor receptor</i> )
IgG1/LFA3	IgG1/Antígeno associado à função de leucócitos ( <i>leukocyte function antigen</i> )
IRES	Sítio de entrada interna de ribossomos ( <i>Internal Ribosome Entry Site</i> )
LH	Hormônio luteinizante ( <i>luteinizing hormone</i> )
<i>Loxp</i>	<i>Locus</i> do cromossomo X-over do bacteriófago P1
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófago
min	Minutos
MGP	Proteína da matriz gla ( <i>Matrix Gla Protein</i> )
NOS	Linhagem de células de mieloma murino

PACE	Enzima capaz de clivar pares de aminoácidos básicos ( <i>Paired basic Amino acid Enzyme</i> )
PACE-Sol	Enzima capaz de clivar pares de aminoácidos básicos solúvel
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
-PO <sub>3</sub>	Indica a modificação pós-tradução fosforilação
rCMV	Promotor de citomegalovírus
RE	Retículo endoplasmático
rFIX	Fator de coagulação IX recombinante
rhBMP-2	Proteína morfogênica do osso recombinante ( <i>recombinant human bone morphogenetic protein 2</i> )
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
(S-S)	Representação da ligação dissulfeto forma oxidada
s	Segundos
shRNA	Sigla em inglês para RNA de grampo curto ( <i>Short Hairpin RNA</i> )
SH--SH	Representação de sulfetos reduzidos
siRNA	Silenciadores genéticos ( <i>silencing RNA</i> )
-SO <sub>3</sub>	Indica a modificação pós-tradução sulfatação

Sp2/0	Células de mieloma da série plasmocitária
SV40	Promotor de vírus símio 40 ( <i>Simian Virus 40</i> )
SV40pA	Sinal de poliadenilação do vírus de símio
TAMRA	6-carboxitetrametilrodamina
TFPI	Inibidor do fator tissular ( <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i> )
TGF	Fator de crescimento transformante
tPA	Ativador plasminogênico de tecido humano ( <i>Tissue Plasminogen Activator</i> )
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
Vitamina KH <sub>2</sub>	Vitamina K reduzida
Vitamina KO	Vitamina K oxidada
VKORC1	Vitamina K 2,3-epóxido redutase subunidade C1
WCB	Banco de células de trabalho ( <i>Work Cell Bank</i> )



## SIGLAS DOS AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo	Abreviação	Nomenclatura
Glicina	Gly	G	Ácido 2-aminoacético ou Ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propionico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propionico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propionico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propionico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico

Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropiónico
Triptofano	Trp	W	Ácido 2-amino-3-indolpropiónico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico

# 1. INTRODUÇÃO

A hemofilia é um distúrbio no processo de coagulação sanguínea gerado pela falta de fatores de coagulação, decorrente de um defeito recessivo no cromossomo X. Por esta razão, esta enfermidade atinge quase que exclusivamente indivíduos do sexo masculino, sendo rara a ocorrência em mulheres, nas quais os genes em ambos os cromossomos teriam que ser recessivos. Os tipos mais comuns da doença são: hemofilia do tipo A (deficiência na produção do fator de coagulação VIII) e hemofilia do tipo B (deficiência na produção do fator de coagulação IX). O indivíduo hemofílico não pode levar uma vida totalmente normal, pois qualquer corte, por menor que seja, pode acarretar em hemorragia grave com risco de morte. Outro problema grave são as repetidas hemorragias nas articulações que, em longo prazo, afetam a mobilidade do membro atingido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O tratamento da hemofilia consiste na reposição do fator deficiente através de injeção intravenosa. O tratamento pode ser profilático, sendo o fator deficiente administrado continuamente, ou imediatista, administrando-se o fator deficiente somente quando ocorre uma lesão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Existem duas formas de se obter concentrado de fatores sanguíneos: por fracionamento do plasma de indivíduos normais (hemoderivado) ou por produção em células animais modificadas geneticamente (recombinante). O recombinante é mais vantajoso de ser produzido, pois possui matéria prima ilimitada (são necessários 3 litros de sangue para se produzir uma injeção de fator sanguíneo hemoderivado) e uma menor probabilidade de contaminação por novos patógenos (KAUFMAN *et al.*, 1986).

No Brasil, existem 11.040 pacientes com coagulopatias hereditárias, dos quais 62,30 % correspondem à hemofilia A, 11,70 % à hemofilia B, 21,10 % à doença de von Willebrand, 2,9 % a outras coagulopatias e 2 % aos demais distúrbios da coagulação ainda sem diagnóstico. Estes dados foram obtidos até julho de 2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). O País gasta, em média, 100 milhões de dólares na importação de concentrado de fatores sangüíneos por ano. Cada unidade de fator sangüíneo custa em média, para o governo brasileiro, US\$ 0,20 e um paciente gasta cerca de 1,5 mil unidades por sessão. É comum haver falta de fatores VIII e IX no estoque do Ministério da Saúde, pois o País depende do fornecimento de empresas estrangeiras. Por isso, o governo investe em pesquisas que desenvolvam tecnologia nacional para produção destes fatores sangüíneos, reduzindo os gastos neste setor e a dependência externa.

O fator IX é uma proteína menos complexa e mais estável do que o fator VIII, portanto o desenvolvimento de um processo de produção do fator IX recombinante é, teoricamente, mais simples. O desenvolvimento de um processo para produzir o fator IX no Brasil traria grandes benefícios econômicos, além da auto-suficiência em fator IX sem a necessidade de fracionar plasma humano.

A Genetics Institute/Wyeth é a única empresa que produz fator IX recombinante (medicamento denominado de Benefix<sup>®</sup>) no mundo. Esta proteína é produzida em células animais (células da linhagem CHO), pois somente célula eucarióticas superiores são capazes de realizar todas as modificações pós-tradução que tornam o fator IX ativo. Apesar de possuir condições para realizar as modificações na molécula do fator IX, as células animais não realizam a  $\gamma$ -carboxilação com eficiência, sendo esta a principal modificação pós-tradução da molécula do fator IX. Portanto, somente uma pequena porção do fator IX total produzido pelas células tem atividade biológica.

A  $\gamma$ -carboxilação é catalisada pela enzima  $\gamma$ -carboxilase, sendo necessária a presença do seu co-fator, a vitamina K reduzida. A reação só ocorre por completo quando o co-fator é regenerado pela enzima vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKORC1). A co-expressão do gene do fator IX e do gene das enzimas  $\gamma$ -carboxilase e VKOR vêm sendo estudada com objetivo de melhorar a produção do fator IX funcional (HALLGREN *et al.*, 2002; WAJIH *et al.*, 2005b).

Além da  $\gamma$ -carboxilação, a clivagem do pró-peptídeo também é importante para conferir atividade biológica à molécula do fator IX. Análises do fator IX secretado por células animais, principalmente células CHO, mostrou que uma parte do fator IX mantinha o pró-peptídeo ligado à proteína. A enzima responsável por esta clivagem é uma furina, conhecida pela sigla PACE (*Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme*) e também foi co-expressa com o fator IX na busca de aumentar a secreção do fator IX com o pró-peptídeo clivado (WASLEY *et al.*, 1993).

Para que as células transfectadas tenham uma expressão controlada do gene do fator IX e do gene da enzima co-expressa, existem vetores comerciais, tais como o denominado pIRES (Promega). Este vetor possui um elemento IRES (sítio de entrada interna do ribossomo), o qual permite expressar duas proteínas a partir de um único RNA mensageiro, evitando que um gene seja inserido em uma região do genoma de baixa atividade transcripcional e o outro em uma região de alta atividade. Ressalta-se que, ao longo do presente trabalho, o termo “expressão” será empregado para denotar a etapa de transcrição do gene (DNA), para formação de RNA mensageiro (RNAm). A obtenção da proteína secretada pela célula será denominada “produção”, já que a formação de RNAm não necessariamente está diretamente relacionada à obtenção da

proteína no sobrenadante de cultivo celular, uma vez que podem ocorrer limitações referentes às etapas de tradução e secreção.

Sistemas de expressão mais eficientes, tais como o sistema de integração sítio-dirigida baseado em sítios FRT (*Flipase Recombination Target*), utilizando células CHO Flp-In<sup>™</sup>, desenvolvidas pela empresa Invitrogen, são capazes de promover a integração, de forma direcionada, do vetor de expressão em uma região de alta atividade transcripcional. Isto faz com que as células expressem o gene de interesse com maior eficiência e de forma mais homogênea em uma população de células transfectadas (SADOWSKI, 1995). O uso deste sistema na produção do fator IX é promissor, pois pode aumentar o nível de expressão da proteína, aumentando o rendimento final do processo.

A construção de vetores bicistrônicos contendo o gene do fator IX e das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE, utilizando o elemento IRES e o sistema de integração sítio dirigida, objetivando melhorar a produção do fator IX funcional, é o foco principal deste trabalho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Proteínas recombinantes

A elucidação de um modelo estrutural para a molécula de DNA, por Watson e Crick em 1953, foi o estopim para o início dos estudos da engenharia genética. A possibilidade de entendimento dos genes e de como as características de um animal eram transmitidas aos seus descendentes tornava-se cada vez mais claro. Em 1958, Werner Arber, da Suíça, descreveu as enzimas de restrição, que são endonucleases capazes de cortar moléculas de DNA em sítios específicos (DUARTE *et al.*, 2003).

As enzimas de restrição são ferramentas fundamentais no emprego da técnica do DNA recombinante. Utilizando estas enzimas, Paul Berg, em 1972, obteve as primeiras moléculas de DNA recombinante (JACKSON *et al.*, 1972).

Estas técnicas possibilitaram o desenvolvimento de processos de produção de proteínas recombinantes com fins terapêuticos que, junto com os anticorpos monoclonais de uso terapêutico, receberam a terminologia de biofármacos (WALSH, 2002). Desde 2000, um quarto de todas as novas drogas aprovadas são biofármacos, segundo dados obtidos até 2003 (WALSH, 2003a). Com um número crescente de biofármacos aprovados, o setor de produção cresceu rapidamente nos EUA e na Europa e a previsão é de continuar crescendo. Analistas prevêem que os biofármacos representem mais de 50% do total de novos produtos aprovados anualmente pelas agências regulatórias a partir de 2010 (WALSH, 2005).

As proteínas recombinantes podem ser produzidas por células microbianas ou animais. A primeira proteína terapêutica produzida por meio de técnicas de recombinação genética licenciada foi a insulina, em 1982. Como é relativamente simples, a insulina foi produzida em células bacterianas de *Escherichia coli* (BUTLER,

2005). No entanto, a maioria das proteínas usadas em terapia humana é complexa e sofre várias modificações pós-tradução que são fundamentais para sua atividade biológica, como por exemplo: glicosilações, carboxilações, hidroxilações, dentre outras. Por este motivo, as células animais são mais indicadas para a produção, principalmente pelo fato das células de mamíferos realizarem a glicosilação com padrão similar ao humano, pois esta é a modificação mais complexa e está presente em quase todas as proteínas terapêuticas. Em vários casos, a glicosilação determina a estabilidade, antigenicidade, solubilidade, localização, enovelamento, tempo de meia vida e, conseqüentemente, a atividade biológica das proteínas (PALOMARES *et al.*, 2004). As células animais mais utilizadas na indústria são: CHO (Chinese Hamster Ovary cells) e BHK (Baby Hamster Kidney cells). Algumas proteínas recombinantes produzidas no mundo em células animais estão descritas na Tabela 2.1

**Tabela 2.1.** Exemplos de biofármacos produzidos em células animais (MELLADO & CASTILHO, 2008).

Classificação	Produto	Proteína	Indicação/uso	Célula	Ano da primeira aprovação	Companhia	País
Fatores de crescimento hematopoiético	Epogen/Procrit	Epoetina $\alpha$	Anemia	CHO	1989	Amgen	Vários
	Epogin/Recormon	Epoetina $\beta$	Anemia	CHO	1990	Chugai	Japão, Europa
	Neorecormon	Epoetina $\beta$	Anemia	CHO	1997	Roche	Europa
	Nespo/Aranesp	Darbepoetina $\alpha$	Anemia	CHO	2001	Amgen	Europa, EUA
	Neutrogin/Granocyte	G-CSF (lenograstim)	Neutropenia	CHO	1991	Chugai	Japão, Europa
Fatores de crescimento	InductOS/Dibotermín $\alpha$	Proteína óssea morfogênica 2	Fratura da tíbia e cirurgia de coluna	CHO	2002	Wyeth	Europa
	Osigraft/Eptotermín $\alpha$	Proteína óssea morfogênica	Fratura da tíbia	CHO	2001	Howmedica International	Europa
Hormônios	Gonal-F	Hormônio folículo-estimulante (FSH)	Infertilidade feminina	CHO	1995	Serono	Europa, EUA
	Luveris/Lutropin alfa	Hormônio luteinizante	Infertilidade feminina	CHO	2000	Serono	Europa, EUA
	Ovitrelle/Ovidrel/Choriogonadotropin $\alpha$	Gonadotrofina	Infertilidade feminina	CHO	2000	Serono	Europa, EUA
	Puregon/Follistim AQ/Folitropin $\beta$	Hormônio folículo-estimulante (FSH)	Infertilidade feminina	CHO	1996	Organon	Europa, EUA
	Thyrogen	Tirotropina $\alpha$	Diagnóstico <i>in vivo</i> de função da tireóide	CHO	1998	Genzyme	Europa, EUA
Fatores de coagulação sanguínea	Advate	Fator VIII	Hemofilia A	CHO	2003	Baxter	Europa, EUA
	BeneFIX	Fator IX	Hemofilia B	CHO	1997	Genetics Institute	Europa, EUA
	Helixate NexGen/Kogenate FS	Fator VIII	Hemofilia A	BHK	2000	Bayer	Austrália, EUA, Europa, Suíça
	Kogenate	Fator VIII	Hemofilia A	BHK	1993	Bayer	Vários



Classificação	Produto	Proteína	Indicação/uso	Célula	Ano da primeira aprovação	Companhia	País
Enzimas terapêuticas	Novo Seven	Fator VIIa	Hemofilia A e B	BHK	1996	Novo Nordisk	Suíça, Europa, EUA
	Recombinante	Fator VIII	Hemofilia A	CHO	1992	Baxter	Vários
	Refacto	Fator VIII com domínio B excluído	Hemofilia A	CHO	1999	Genetics Institute/ Biotrum AB	Europa, EUA
	Activase/Alteplase	tPA	Infarto agudo do miocárdio	CHO	1986	Genentech	Vários
	Cerezyme	Glicocerebrosidase	Doença de Gaucher	CHO	1994	Genzyme	Europa, EUA
	<b>Fabrazyme/</b> Agalsidase $\beta$	$\alpha$ -Galactosidase A	Doença de Fabry	CHO	2001	Genzyme	Europa, EUA
	Hylenex	Hialuronidase	Aumento da absorção e dispersão de outras drogas injetadas	CHO	2005	Halozyme Therap.	EUA
	Myozyme/ Alglucosidase $\alpha$	$\alpha$ -Glicosidase ácida	Doença de Pompe	CHO	2006	Genzyme	Europa, EUA
	Naglazyme/ Galsulfase	N-acetilgalactosamina 4-sulfatase	Mucopolissacaridose VI	CHO	2005	BioMarin	Europa, EUA
	Pulmozyme	DNase I	Fibrose cística	CHO	1993	Genentech	Suécia, EUA, Suíça
Cítocinas	Replagal/ Agalsidase $\alpha$	$\alpha$ -Galactosidase	Doença de Fabry	Fibroblasto humano	2001	Shire Human Genetic Therapies	Europa
	TNKase/Tenecteplase/ Metalyze	tPA	Infarto agudo do miocárdio	CHO	2000	Genentech/ Boehringer Ingelheim	Europa, EUA
	Xigris/Drotrecogin $\alpha$	Proteína C ativada	Sepsis severa	HEK 293	2001	Eli Lilly	Europa, EUA
	Avonex	Interferon $\beta$ 1a	Esclerose múltipla	CHO	1996	Biogen	Europa, EUA
	Rebif	Interferon $\beta$ 1a	Esclerose múltipla	CHO	1998	Serono	Europa, EUA
Proteínas de fusão ou imunocombinados	Amevive/ Alefacept	Proteína de fusão (IgG1/LFA3)	Psoríase	CHO	2003	Biogen	EUA
	Enbrel/ Etanercept	Proteína de fusão (IgG1/TNFR)	Artrite reumatóide	CHO	1998	Immunex/ Wyeth	Europa, EUA
	Myoscint/ Imcromab Pentetate	Imunocombinado (IgG2a/DTPA)	Diagnóstico <i>in vivo</i> de doenças cardíacas	Hibridoma	1989	Centocor	Europa, EUA
	ProstaScint/ Capromab Pentetide	Imunocombinado (IgG1/DTPA)	Diagnóstico <i>in vivo</i> de próstata	Hibridoma	1996	Cytogen	EUA
	Avastin/ Bevacizumab	Imunoglobulina G1	Câncer colorretal	CHO	2004	Genentech/ Roche	Europa, EUA
	Bexxar/ Tositumomab	Imunoglobulina G2a	Linfoma Não-Hodgkin	Hibridoma	2003	Corixa/ GlaxoSmithkline	EUA
	Campath/ MabCampath/ Alemtuzumab	Imunoglobulina G1	Leucemia linfocítica crônica	CHO	2001	ILEX/ Genzyme	Europa, EUA
	Erbix/ Cetuximab	Imunoglobulina G1	Câncer de cabeça, de pescoço e colorretal	SP2/0	2004	ImClone/ Merck	Europa, EUA
	Herceptin/ Trastuzumab	Imunoglobulina G1	Câncer de mama	CHO	1998	Genentech/ Roche	Europa, EUA
	<b>Humira/</b> Adalimumab	Imunoglobulina G1	Artrite reumatóide	CHO	2002	Abbott Laboratories	Europa, EUA
Anticorpos	Panorex/ Edrecolomab	Imunoglobulina G2a	Câncer colorretal	n.d.	1995	GlaxoSmithkline	Alemanha
	Raptiva/ Efalizumab	Imunoglobulina G1	Psoríase	CHO	2003	Genentech/ Serono	Europa, EUA
	Remicade/ Infliximab	Imunoglobulina G1	Artrite reumatóide, doença de Crohn e outras	SP2/0	1998	Centocor	Europa, EUA
	ReoPro/ Abciximab	Imunoglobulina G (fragmento)	Complicações isquêmicas do coração	SP2/0	1997	Centocor	EUA
	Rituxan/ MabThera	Imunoglobulina G1	Linfoma Não-Hodgkin, artrite reumatóide	CHO	1997	IDEC/ Genentech/ Roche	Europa, EUA
	Simulect/ Basiliximab	Imunoglobulina G1	Profilaxia à rejeição de transplante renal	Mieloma murino	1998	Novartis	Europa, EUA
	Synagis/ Palivizumab	Imunoglobulina G1	Prevenção a doenças do trato respiratório	NS0	1998	MedImmune/ Abbot	Europa, EUA
	Xolair/ Omalizumab	Imunoglobulina G1	Asma	CHO	2003	Genentech/ Novartis	Europa, EUA

A necessidade de se obter vacinas virais, particularmente para a poliomielite, acelerou o desenvolvimento de bioprocessos em larga escala para células animais nos anos 50. Logo após, nos anos 70 e 80, aumentou o interesse na aprimoração de bioprocessos associados com a tecnologia de produção de proteínas recombinantes (BUTLER, 2005). Existem oito principais grupos de proteínas recombinantes: citocinas, fatores de crescimento hematopoiético, fatores de crescimento, hormônios, enzimas, anticorpos, imunoconjugados e fatores sangüíneos (MELLADO & CASTILHO, 2008).

As citocinas atuam na resposta imune do organismo. Um exemplo é o interferon, proteína usada para fortalecer o sistema imune quando o paciente é submetido ao tratamento de alguns tipos de câncer e de doenças que atacam o sistema imunológico. As três classes de interferon existentes (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) podem ser usadas no tratamento de várias enfermidades, como: hepatite e leucemia (IFN- $\alpha$ ), esclerose múltipla (IFN- $\beta$ ) e granulomatose crônica (IFN- $\gamma$ ), a qual consiste em uma doença genética rara que gera uma deficiência dos glóbulos brancos em realizarem fagocitose (WALSH, 2003b).

Os fatores de crescimento hematopoiéticos são proteínas que atuam na diferenciação de células hematopoiéticas. Os principais fatores são: a eritropoetina (EPO) e os fatores estimulantes de colônias de granulócitos (G-CSF), de colônias de macrófagos (M-CSF), e de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Estes biofármacos são utilizados no tratamento de anemia, doenças infecciosas, alguns tipos de câncer, transplante de medula óssea e neutropenia (MELLADO & CASTILHO, 2008).

Os fatores de crescimento são usados no tratamento de fraturas ósseas (proteínas osteogênicas) e úlcera de pele (fator de crescimento transformante, TGF, e o fator de crescimento epidérmico, EGF), no auxílio ao processo de cicatrização (fator de

crescimento derivado de plaquetas, PDGF). Além disso, o fator de crescimento similar à insulina (IGF) está sendo desenvolvido para o tratamento do nanismo, diabetes tipo 2 e doenças renais, entre outras doenças (MELLADO & CASTILHO, 2008).

No caso dos hormônios, os primeiros a serem produzidos de forma recombinante foram a insulina e o hormônio de crescimento usadas no tratamento da diabetes e baixa estatura, respectivamente. Ambos podem ser produzidos em células microbianas, tendo sido os primeiros biofármacos a serem registrados no mercado. Já as gonadotrofinas, que englobam o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH) e a gonadotrofina coriônica (CG), entre outros, são reduzidas em células de mamífero e empregadas no tratamento da infertilidade feminina, respectivamente (MELLADO & CASTILHO, 2008).

Existem muitas enzimas terapêuticas recombinantes. Uma delas é o t-PA (sigla em inglês para ativador de plasminogênio de tecido humano, utilizado em caso de infarto do miocárdio), sendo o primeiro biofármaco produzido por células animais aprovado, em 1986. Outro exemplo é a glucocerebrosidase, que é usada no tratamento da doença de Gaucher, que consiste em um distúrbio genético comum em populações judaicas. Os sintomas incluem um aumento do fígado e do baço devido ao acúmulo de um lipídeo denominado de glucocerebrosídeo (BEUTLER, 2006).

Os anticorpos produzidos de forma recombinante são empregados tanto para diagnóstico (*in vivo* e *in vitro*) quanto para o tratamento de inúmeras doenças, como: câncer, doenças auto-imunes, asma, doenças infecciosas, dentre outras (MELLADO & CASTILHO, 2008). Nos últimos anos, em média dois anticorpos monoclonais têm sido aprovados por ano (MARAFINO *et al.*, 2003).

Os fatores sangüíneos recombinantes são: o fator VIII (FVIII), o fator IX (FIX) e o fator VIIa (FVIIa). Estes fatores são utilizados no tratamento da hemofilia do tipo A,

da hemofilia do tipo B e de ambos os tipos de hemofilia, respectivamente. A hemofilia do tipo A consiste em uma doença genética vinculada ao cromossomo X que acarreta na falta ou defeito da produção do FVIII pelas células do corpo humano, impossibilitando a formação do coágulo. A hemofilia do tipo B resulta nos mesmos sintomas da A, porém o defeito está na produção do FIX. A produção dos fatores sanguíneos recombinantes começou na década de 90 com o FVIII recombinante produzido pela Baxter Healthcare, em 1992. Hoje já existem cinco produtos baseados em FVIII recombinante aprovados e um baseado em fator IX, o qual é denominado Benefix<sup>®</sup> (MELLADO & CASTILHO, 2008). O fator VIIa pode atuar nos dois tipos de hemofilia, pois, quando complexado com o fator tecidual, o FVIIa ativa o fator X a fator Xa, o qual após interagir com outros fatores, converte a protrombina em trombina, que em seguida dá origem à rede de fibrina que estanca o coágulo. Desta forma, o FVIIa é capaz de induzir a hemostase independentemente dos fatores VIII e IX (DUARTE *et al.*, 2003).

## **2.2. Produção do fator IX recombinante**

Os fatores de coagulação podem ser obtidos de duas formas: extraídos do plasma (hemoderivados) ou produzidos por células animais (recombinantes). Comparando os dois métodos, o mais indicado é o recombinante, pois possui matéria prima ilimitada e um baixo risco de transmissão de novos patógenos (JIANG *et al.*, 2002). Em contrapartida, estudos mostraram que o fator VIII hemoderivado possui um menor risco de sofrer inibição por anticorpos do paciente que o recombinante (GOUW, 2007). Muitos testes foram realizados para comparar a atividade biológica dos fatores derivados do plasma e dos recombinantes (DAVID *et al.*; ROTH *et al.*; BJORKMAN *et al.*, 2001; SHAPIRO *et al.*, 2005), pois a proteína recombinante precisa ser praticamente

idêntica à humana para que exerça sua função corretamente. Em todos os estudos, os resultados obtidos para os recombinantes foram satisfatórios.

O processo de produção de qualquer fator de coagulação sangüínea recombinante pode ser resumido em seis etapas (BERTHOLD *et al.*, 2001):

- (1) Desenvolvimento da linhagem produtora;
- (2) Preparação do banco de células;
- (3) Desenvolvimento do meio de cultivo;
- (4) Implementação da técnica de cultivo;
- (5) Purificação da proteína com etapa de inativação viral;
- (6) Formulação.

As linhagens produtoras ideais para produção dos fatores sangüíneos é a de células animais, pois, como já foi dito, as células animais possuem a capacidade de realizar as modificações pós-tradução de proteínas complexas, imprescindíveis para sua atividade biológica. No entanto, as células animais possuem algumas desvantagens, como: crescimento lento, o cultivo é mais complexo e o rendimento é baixo. A maioria dos problemas é devido ao fato dos fatores de coagulação serem proteínas muito complexas, ou seja, grandes e com muitas modificações pós-tradução (CHEN *et al.*, 1999). As células utilizadas na produção do único fator IX recombinante encontrado no mercado (Benefix<sup>®</sup>, produzido pelo Genetics Institute/Wyeth) são células CHO (*Chinese hamster ovary*), como visto na Tabela 1.

O vetor de expressão inserido na célula é fundamental para se obter um bom rendimento da proteína recombinante. O provável plasmídeo usado para gerar a

linhagem recombinante produtora do fator IX recombinante comercial (Benefix<sup>®</sup>) possui o gene do fator IX seguido do gene da DHFR (dihidrofolato redutase), usado para selecionar as células com metotrexato (MTX). Esta substância é um inibidor da DHFR e somente as células que produzirem altos níveis de DHFR, consequentemente produzindo também o gene localizado anteriormente ao da DHFR em altos níveis, sobrevivem à seleção pelo inibidor (ASSELBERG *et al.*, 1995). As células produtoras de fator IX foram co-expressas com o gene da enzima PACE solúvel (PACE-SOL), sendo esta responsável pela clivagem do pró-peptídeo da molécula do fator IX, tornando-o maduro, etapa fundamental para que a proteína exerça atividade biológica (EDWARDS & KIRBY, 1999). Deve-se estabelecer um meio de cultivo livre de proteínas animais e implementar um protocolo de adaptação das células ao meio sem soro antes do início do cultivo (SINACORE *et al.*, 2000).

Após a construção, os vetores são inseridos nas células animais e inicia-se um processo de seleção de clones altamente produtores. O clone escolhido é então depositado em um banco de células mestre.

No banco de células mestre, as células são testadas quanto à integração do gene de interesse, ou seja, é preciso ter certeza de que o gene do fator sangüíneo foi integrado ao genoma da célula permanentemente. É necessário assegurar que não houve nenhuma contaminação com micoplasmas, bactérias ou fungos. O próximo passo é criar um banco de células de trabalho (WCB, sigla em inglês *Working Cell Bank*) com um número maior de criotubos para serem usados como inóculo em uma ampliação de escala. No banco de trabalho, também é necessário realizar várias caracterizações, como, por exemplo, verificação da tumorigenicidade da célula (GOMPERS *et al.*, 1992).

Para se produzir uma proteína recombinante em biorreator, deve-se ampliar a escala passo a passo. No caso do fator IX recombinante produzido pelo Genetics Institute/Wyeth (Benefix<sup>®</sup>), o aumento de escala iniciou-se em frascos agitados do tipo *spinner* de diferentes volumes até o inóculo ser feito em um biorreator de 250 L. Neste biorreator, o volume de cultura celular foi expandido até ser atingida uma quantidade de células suficiente para inocular um biorreator de 2500 L. O processo é realizado em batelada e as células são propagadas por 3 dias até atingirem uma alta concentração. Neste momento, aproximadamente 80% de suspensão celular é removida e o que sobra no biorreator é ressuspendido com meio fresco (EDWARDS & KIRBY, 1999).

A fase de recuperação e purificação da proteína pode ser considerada uma das mais importantes, pois, para um biofármaco ser aprovado no mercado, necessita ser extremamente puro. O processo de produção do Benefix<sup>®</sup> é constituído de sete etapas de purificação, sendo elas: ultrafiltração seguida de diafiltração, uma cromatografia de troca aniônica, uma cromatografia de troca catiônica, uma coluna cromatográfica de hidroxiapatita (usada para tentar reter somente as proteínas  $\gamma$ -carboxiladas), uma cromatografia com quelante metálico ( $\text{Cu}^{2+}$ ), uma membrana retentora de vírus e novamente um estágio de ultrafiltração/diafiltração. Ao final das etapas de purificação, são adicionadas algumas substâncias estabilizantes (formulação). Ao fim do processo, o fator IX recombinante é liofilizado, para evitar degradação da proteína, e armazenado em pequenos frascos (HARRISON *et al.*, 1998).

## **2.3. Clonagem e expressão de proteínas em células animais**

### **2.3.1. Componentes de um vetor de expressão em células animais**

O sistema de expressão consiste no tipo de célula no qual se pretende expressar a proteína e deve ser escolhido levando em consideração alguns fatores, como:

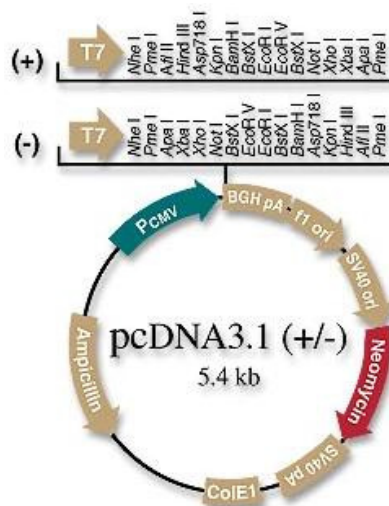
características do crescimento celular, nível de expressão, se a expressão é intra ou extracelular, modificações pós-tradução em relação à atividade biológica da proteína recombinante, assim como fatores econômicos (MAKRIDES, 1999). A principal vantagem das células animais deve-se ao fato destas realizarem as modificações pós-tradução com mais eficiência quando comparadas com células microbianas.

O vetor de expressão é a molécula de DNA utilizada para carrear o gene de interesse ao interior da célula hospedeira. A escolha do vetor de expressão é de fundamental importância para se obter um clone que expresse a proteína de interesse em alto nível. Existem muitos vetores disponíveis no mercado. Mesmo assim, produzir proteínas recombinantes não é trivial. A eficiência de expressão de um gene em células animais depende de vários fatores, como: elementos de controle transcripcional e traducional, processamento do RNA, número de cópias do gene, estabilidade do RNA mensageiro (RNAm), sítio de integração no cromossomo, potencial toxicidade da proteína recombinante produzida para a célula hospedeira e também propriedades do hospedeiro (WIRTH *et al.*, 1988; MAKRIDES, 1999).

Os elementos que um vetor usado para clonagem e expressão em células animais deve conter são: (1) promotor capaz de induzir uma transcrição, como, por exemplo, promotor maior tardio de adenovirus e o promotor de citomegalovirus imediato adiantado (*rCMV early promoter*), sendo este último o mais utilizado (MEHTA *et al.*, 2009); (2) sequências opcionais que auxiliam no processamento do RNAm como, por exemplo, sinalizadores de poliadenilação e a sequência de Kozak (CC(A/G)CCAUGG), que é capaz de promover um aumento na transcrição do gene (DU *et al.*, 2008); (3) um terminador da transcrição, localizado a jusante da sequência, o qual impede a transcrição através de outro promotor, aumentando a estabilidade do RNAm; (4) origem de replicação, por exemplo de SV40 (Simian Virus 40 – vírus que afeta macacos)



facilita a expressão transiente; (5) sítio múltiplo de clonagem, onde será inserida a sequência do gene a ser expresso; (6) gene eucariótico de resistência a antibiótico para seleção de células transfectadas; (7) gene procariótico de resistência a antibiótico para propagação em bactérias (MAKRIDES, 1999, BOLLATI-FOGOLÍN & COMINI, 2008). A Figura 2.1 mostra um exemplo de um vetor comercial, destacando todos os elementos necessários para expressão em células animais.



**Figura 2.1.** Vetor pcDNA3.1 da Invitrogen. Os elementos presentes neste vetor são: P<sub>CMV</sub>, promotor forte de citomegalovírus que assegura um elevado nível de expressão; BGHpA, elemento da sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino que permite a produção de uma extremidade 3' definida do RNAm; f1 ori, origem de replicação do fago filamentososo f1 que permite produzir recombinantes de cadeia simples e é um componente de propagação em *E.coli*; SV40ori, origem de replicação do vírus SV40 em células de mamífero; Neomicina, gene marcador de referência regulado por um promotor/estimulador e uma sequência poli A SV40 (SV40 pA); ColE1, origem de replicação derivada do plasmídeo ColE1; gene procariótico de resistência à ampicilina (INVITROGEN MANUALS, 2009a).

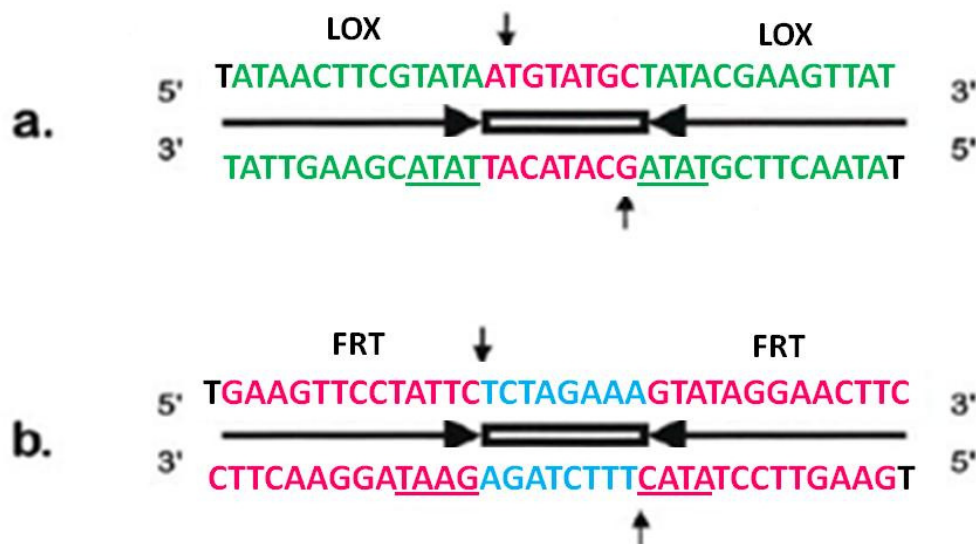
O vetor ilustrado na Figura 2.1 é para expressão monocistrônica. No entanto, é possível construir vetores policistrônicos, através dos quais se pode promover a expressão de mais de um gene, por exemplo utilizando o elemento IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). Este elemento consiste em um fragmento de DNA presente em

vários tipos de vírus, que atua como um recrutador de ribossomos e, quando localizado entre dois genes (vetor bicistrônico), promove a expressão do segundo gene, dirigida apenas pelo promotor localizado anteriormente ao primeiro gene. Ou seja, ocorre a expressão de 2 genes a partir de um único RNAm (HOUDEBINE & ATTAL, 1999). Estudos comparativos comprovaram que os vírus da EMC (encefalomiocardite) e FMDV (sigla em inglês do vírus causador da febre aftosa, *foot-and-mouth disease virus*), ambos da família dos picornavírus, apresentam os elementos IRES que possuem maior atividade transcricional (BORMAN *et al.*, 1995). O elemento IRES do vírus da EMC é o mais utilizado quando se pretende construir vetores bi, tri ou até mesmo tetracistrônicos (FUSSENEGGER *et al.*, 1998; LI & ZHANG, 2004; DOUIN *et al.*, 2004).

A sequência original do elemento IRES do vírus da EMC pode ser observada, na sua forma mais estável, na Figura 2.2. Quando se usa o elemento IRES original do vírus EMC, o nível de expressão do segundo gene é bem mais alto que o do primeiro. Porém, é possível realizar modificações na sequência do IRES que influenciam o nível de expressão do segundo gene em relação ao primeiro. Por exemplo, o vetor comercial pIRES (Clontech) possui o elemento IRES do vírus da EMC modificado. A inclusão de uma adenina na região de bifurcação, que originalmente possui 6 adeninas, e a retirada do último ATG fazem com que o nível de expressão do segundo gene decaia, acarretando em uma expressão um pouco maior do primeiro gene (Figura 2.2). Ademais, quando o vetor é monocistrônico, foi observado um nível de expressão do gene de interesse quase 2 vezes maior do que a expressão deste mesmo gene localizado no primeiro cístron de um vetor bicistrônico utilizando o IRES do vírus da EMC normal ou modificado. Todos os dados relatados neste parágrafo foram observados após a



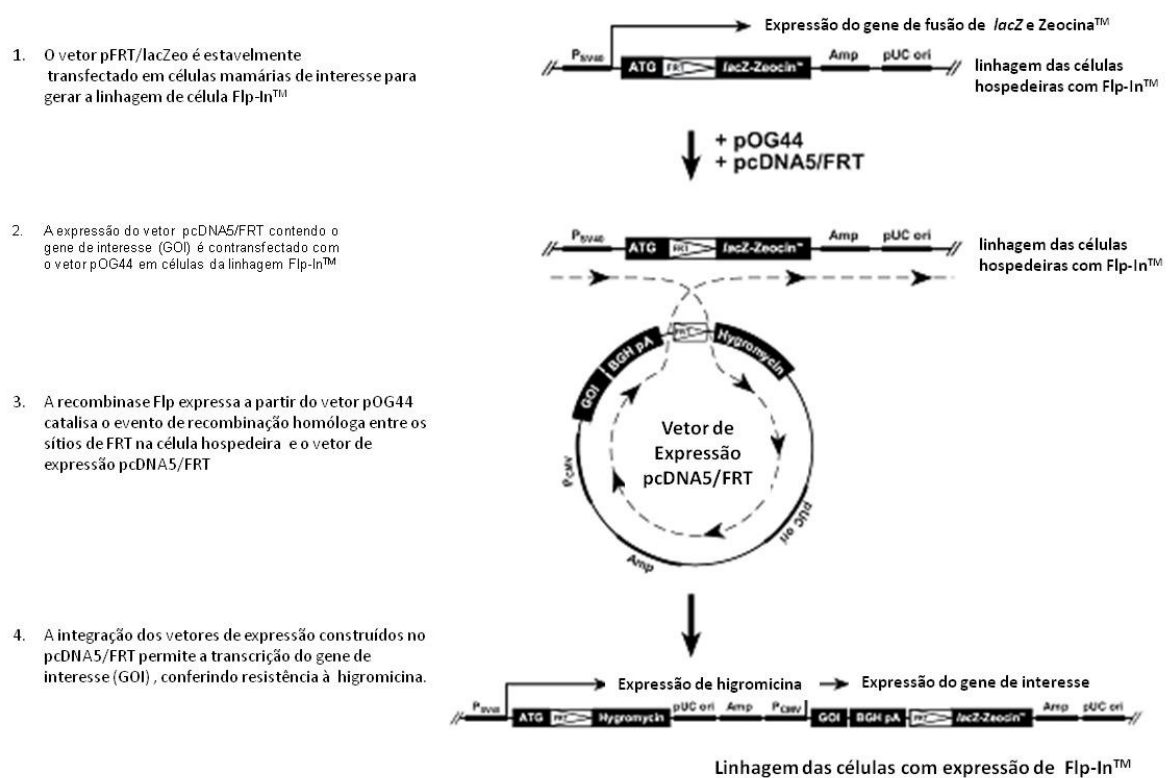
possível após a descoberta das enzimas Flp (Flipase), provenientes de um plasmídeo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e da enzima Cre, isolada do bacteriófago P1 (SADOWSKI, 1995; HAMILTON & ABREMSHI, 1984). Ambas fazem parte da família das integrases sítio-dirigida. A Flp reconhece o sítio FRT (*Flipase Recombination Target*) e a Cre o sítio *Loxp*. As sequências dos sítios da FRT e *Loxp* são diferentes, porém a organização é a mesma, consistindo em duas sequências de 13 pb invertidas e simétricas, separadas por uma região com 8 pb, como mostra a Figura 2.3 (SHAIKH & SADOWSKI, 2000).



**Figura 2.3.** Sítios de reconhecimento das recombinases Cre (a) e Flp (b). Ambos possuem duas sequências com 13 pb simétricas separadas por 8 pb (SHAIKH & SADOWSKI, 2000).

O mecanismo de ação do sistema de integração sítio-dirigida de várias recombinases foi caracterizado bioquimicamente, porém todos são semelhantes. O mecanismo de atuação da Flp foi um dos mais estudados. Para que este mecanismo funcione, primeiramente deve-se inserir na célula a sequência do sítio FRT em um local de alta atividade transcripcional (por exemplo, as células CHO Flp-In<sup>TM</sup> da Invitrogen que possuem o vetor pFRT/*lacZeo2* integrado ao genoma em uma posição adequada). O

vetor contendo o gene de interesse que será transfectado também deve conter o sítio FRT (ex.: pcDNA5/FRT fornecido pela Invitrogen). Além disso, é necessário co-transfectar as células com um vetor que expressa a recombinase Flp temporariamente (ex.: pOG44 também da Invitrogen, completando o sistema de integração da Invitrogen mostrado na Figura 2.4). Quando expressa, a enzima Flp rompe a sequência FRT na região entre as duas sequências simétricas utilizando a tirosina 343 como um nucleófilo. Logo após, a tirosina liga-se covalentemente ao fosfato 3' do sítio rompido e atua como um grupo de saída para ligar o DNA ao genoma da célula, envolvendo neste processo as argininas das posições 191 e 308 e a histidina da posição 305 (PAN *et al.*, 1993).



**Figura 2.4.** Esquema da integração sítio-dirigida das células CHO Flp-In™ da Invitrogen (INVITROGEN MANUALS, 2009b).

## 2.4. Bioquímica do fator IX

### 2.4.1. Função do fator IX no organismo humano

O fator IX, descoberto em 1952, é uma proteína que participa do processo de coagulação sanguínea (BIGGS *et al.*, 1952). Este processo promove a formação de uma rede de fibrina (coágulo) e as principais proteínas que participam do processo são: protrombina, fator V (FV), fator VII (FVII), fator VIIa (FVIIa, o sufixo “a” significa que a proteína está ativa), fator VIII (FVIII), fator IX (FIX), fator X (FX), fator XI (FXI), fator XIII (FXIII) e fibrinogênio. O sistema de coagulação é controlado por proteínas anticoagulantes, sendo as principais: antitrombina III, proteína C, proteína S e TFPI (sigla em inglês para inibidor do fator tissular). Existem estudos individuais de todas as proteínas do sistema de coagulação (GENTRY, 2004). A Tabela 2.2 mostra o teor e algumas propriedades das proteínas da coagulação (BUTENAS & MANN, 2002).

**Tabela 2.2.** Concentração e propriedades das proteínas atuantes na coagulação (adaptado de BUTENAS & MANN, 2002).

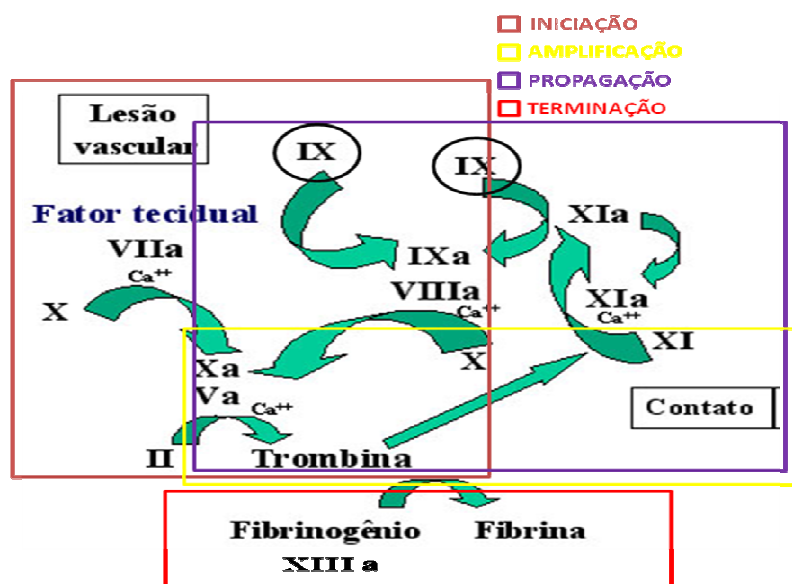
Proteína	Concentração Média no Plasma		Mr (Da)	Fonte	Função
	nM	µg/ml			
Protrombina	1400	100	72000	plasma	zimogêneo
Fator X	170	10	58500	plasma	zimogêneo
Fator IX	90	5.1	57000	plasma	zimogêneo
Fator XI	30	4.8	160000	plasma	zimogêneo
Fator XIII	90	30	320000	plasma	zimogêneo
Fator VII	10	0.5	50000	plasma	zimogêneo
Proteína C	60	3.7	62000	plasma	zimogêneo
Fator V	20	6.6	330000	plasma	procofator
Fator VIII	0.7	0.2	285000	plasma	procofator
Fator VIIa	0.1	0.005	50000	plasma	enzima
Fator Tissular	NA	NA	44000	endotélio	cofator
Trobomodulina	NA	NA	100000	endotélio	cofator
Antitrombina III	3400	200	58000	plasma	inibidor
Proteína S	300	21	69000	plasma	inibidor/cofator
TFPI	2.5	0.1	40000	plasma	inibidor
Fibrinogênio	7600	2600	340000	plasma	precursor

NA, não aplicável (proteína da membrana)

O processo de coagulação é iniciado pela exposição do fator tissular subendotelial ao fluxo sanguíneo por consequência de um rompimento de um vaso ou de um processo inflamatório. O fator tissular é expresso constitutivamente em células do tecido muscular liso e em fibroblastos. Está presente na membrana das células ao redor do tecido vascular e normalmente não entra em contato com o sangue (DAHBACK, 2005). A coagulação pode ser dividida em 4 fases: iniciação, amplificação, propagação e terminação (RIDDEL *et al.*, 2007). Na iniciação, o fator tissular forma um complexo com o FVIIa que ativa o FIX e o FX em pequenas quantidades. O FXa associa-se então ao cofator Va, formando o complexo protrombinase, o que gera uma pequena quantidade de trombina (HOFFMAN, 2004). Na fase de amplificação, ocorre a ativação das plaquetas que, quando ativadas, liberam parcialmente o FVa em sua superfície, enquanto a trombina formada ativa o FVIII para FVIIIa e o FXI para FXIa. Na fase de propagação, um grande número de plaquetas é recrutado para o local da injúria e é nesta fase que o FIX, ativado pelo FVIIa e pelo FXIa, forma um complexo com o FVIIIa. Este complexo é formado pela ligação entre os domínios serina-protease do FIXa e A2 do FVIIIa, com uma provável influência da interface entre os domínios serina-protease e EGF 2 do fator IXa (FRIBOURG *et al.*, 2005). O complexo FIXa-FVIIIa associado ao cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e a fosfolípídeos ativa o FX para FXa de 50 a 100 vezes mais do que a ativação realizada pelo complexo FVIIa-fator tissular na fase de iniciação. Portanto, esta etapa é crucial para que o processo de coagulação transcorra eficientemente (BUTENAS & MANN, 2002). Ainda na fase de propagação, o FXa, na presença de  $\text{Ca}^{++}$ , fosfolípídeos e do cofator (FVa), transforma a protrombina em mais trombina, proporcionando uma quantidade de trombina suficiente para transformar o fibrinogênio em fibrina. Na fase de terminação, o fibrinogênio associado ao FXIIIa se polimeriza e forma a rede de fibrina responsável por estancar o

coágulo. Após a formação da rede de fibrina, é necessário que o processo de coagulação cesse, pois, caso continue, o coágulo pode se espalhar pelos vasos e causar entupimento (trombose). Para evitar isto, o organismo possui as proteínas anticoagulantes citadas anteriormente, que atuam em determinadas proteínas do sistema de coagulação. A proteína C, com seu cofator (proteína S), inativa o FVa e o FVIIIa. A antitrombina III tem a função de inibir a trombina, o FIXa, o FXa e o FXIa. O TFPI (proteína secretada pelo endotélio) é responsável por inibir a via do fator tissular, atuando no complexo fator tissular-FVIIa.

Anteriormente, o processo de coagulação era denominado de cascata de coagulação, a qual continha duas vias: a intrínseca e a extrínseca. Contudo, a teoria mais atual propõe que estas duas vias ocorrem concomitantemente, ou seja, em um único processo. Portanto, nos dias atuais, não são mais usuais os termos cascata, via intrínseca e via extrínseca (RIDDEL *et al.*, 2007). A Figura 2.5 mostra um esquema resumido do processo de coagulação sangüínea, destacando a participação do fator IX.

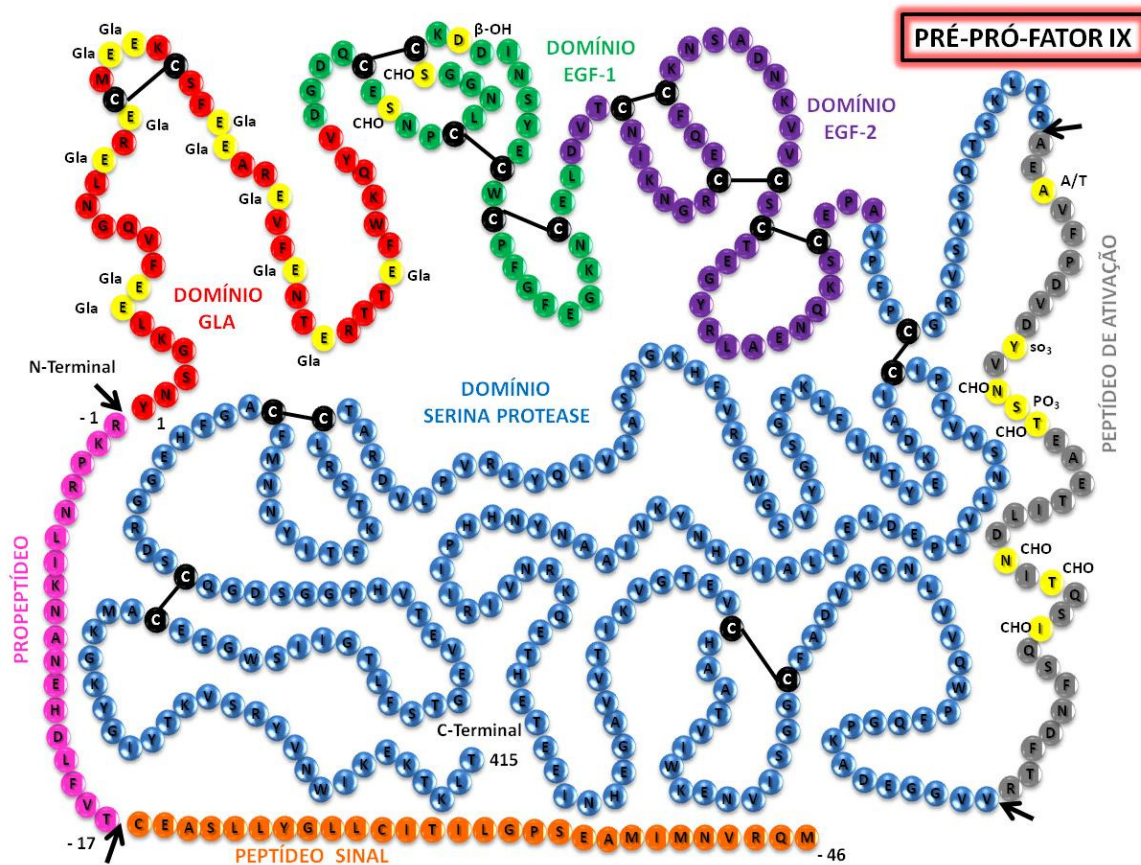


**Figura 2.5.** Esquema simplificado do sistema de coagulação sangüínea destacando as quatro fases descritas no texto, ocorrendo concomitantemente. É possível observar que o fator IX é ativado tanto na fase de iniciação quanto na de propagação (adaptada de FRANCO, 2001).



#### 2.4.2. Estrutura do fator IX

O fator IX humano é produzido por células do fígado, denominadas de hepatócitos. Ele é produzido como um pré-pró-peptídeo (KURACHI & DAVIE, 1982). O peptídeo sinal ou pré-líder é composto por 28 aminoácidos, iniciando com uma metionina e terminando com uma citosina. O pró-peptídeo ou pró-líder possui 18 aminoácidos, iniciando com treonina e terminando com arginina. Os dois peptídeos são eliminados durante o processo de secreção realizado pela célula. O fator IX maduro, ou seja, sem o peptídeo sinal e sem o pró-peptídeo, possui 415 aminoácidos, sendo iniciado por tirosina e finalizado por treonina. A molécula do fator IX é composta por 4 domínios. O primeiro, contendo aproximadamente 40 aminoácidos, é o domínio Gla, pois possui 12 resíduos de ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilados. Há, também, dois domínios EGF (sigla em inglês de fator de crescimento epidérmico), tendo cada um por volta de 20 aminoácidos. Estes 3 domínios formam a cadeia denominada leve. O último e maior domínio é o catalítico, possuindo 235 aminoácidos. O domínio catalítico forma a cadeia pesada. Na proteína, também é encontrado um peptídeo de ativação, com 35 aminoácidos, que ao ser retirado transforma o fator IX (FIX) em fator IX ativo (FIXa), no qual a cadeia leve e a cadeia pesada permanecem unidas através de uma ponte dissulfeto. Isto ocorre durante o processo de coagulação sanguínea (KURACHI *et al.*, 1993). A Figura 2.6 mostra a estrutura primária do fator IX.



**Figura 2.6.** Sequência de aminoácidos e estrutura dos domínios do pré-pró-fator IX humano. A estrutura do fator IX madura inicia com uma Tyr (Y), indicado pelo número 1. O fator IX possui um domínio GLA (em vermelho), onde são encontrados 12 resíduos de ácidos glutâmicos  $\gamma$ -carboxilados (Gla), destacados em amarelo dentro das imediações do domínio. Em seguida, estão os domínios EGF-1 (em verde) e EGF-2 (em roxo). A sequência posterior aos domínios EGF possui uma ponte de dissulfeto entre resíduos de cisteína (todas as pontes de dissulfeto presentes na estrutura estão destacadas em preto), que une toda a cadeia leve ao domínio serina protease (em azul), após a clivagem do peptídeo de ativação (em cinza) durante o processo de coagulação. Os aminoácidos em amarelo correspondem aos locais onde ocorrem as modificações pós-tradução do fator IX (CHO – glicosilação,  $\beta$ -OH –  $\beta$ -hidroxilação,  $\text{SO}_3$  – sulfatação,  $\text{PO}_3$  – fosforilação e A/T – sítio de Ala ou Thr, correspondente a um polimorfismo alélico). A figura ainda mostra o peptídeo sinal (em laranja) e o pró-peptídeo (em rosa), os quais são clivados por proteases antes do fator IX ser secretado (Baseado em KURACHI *et al.*, 1993; BOND *et al.*, 1998).

### 2.4.3. Estrutura do gene do fator IX

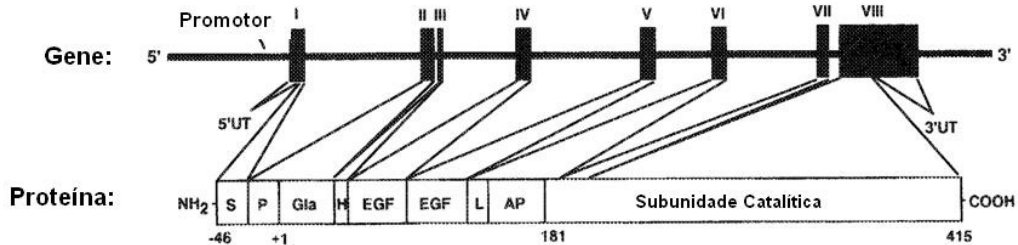
Em 1982, Choo construiu, pela primeira vez, um clone com o gene do fator IX humano (CHOO *et al.*, 1982). No mesmo ano, Kurachi e Davie isolaram e caracterizaram o cDNA do fator IX humano (KURACHI & DAVIE, 1982). A sequência completa do gene foi determinada por Yoshitake, em 1985 (YOSHITAKE *et al.*, 1985).

O gene do fator IX está localizado no *locus* q27 do cromossomo X (PURRELLO *et al.*, 1985) e é constituído de 34 kb, contendo 8 éxons, conforme mostrado na Figura 2.7. *Locus* significa lugar em latim, o p significa *petit* em francês e indica que o gene encontra-se no braço curto do cromossomo. O “q” representa o braço longo do cromossomo. Por fim, o número após a letra “q” representa o local da banda no braço do cromossomo, sendo que estas bandas podem ser vistas ao microscópio quando o gene está devidamente corado. A banda de número 1 é a mais próxima ao centrômero (GRIFFITHS *et al.*, 2001).

Após o *splicing* (processo no qual os íntrons são retirados), o gene do fator IX passa a conter 1,4 kb. Curiosamente, a organização dos éxons e íntrons do gene do fator IX é similar a várias outras proteínas dependentes de vitamina K, como por exemplo: fator X, fator VII, proteína C, proteína S e protrombina. Todas possuem 8 éxons homólogos ao gene do fator IX, exceto a proteína S e a protrombina, que possuem apenas os três primeiros éxons que são responsáveis por codificar o peptídeo sinal, o pró-peptídeo, o domínio Gla e uma curta sequência hidrofóbica (KURACHI *et al.*, 1993). As fases de *splicing* e o número de íntrons do domínio catalítico são idênticos aos do fator X. Todas estas semelhanças fornecem suporte à teoria de que todas as proteínas dependente de vitamina K presentes no plasma tiveram origem a partir de um único gene ancestral (LEYTUS *et al.*, 1986).

O primeiro éxon do gene do fator IX é responsável por codificar o peptídeo sinal. O pró-peptídeo, com exceção do primeiro aminoácido, é codificado pelo segundo éxon, assim como o domínio Gla, compondo uma única unidade genética. O terceiro, quarto e quinto éxons correspondem a estruturas únicas: à sequência hidrofóbica, ao domínio EGF-1 e ao domínio EGF-2, respectivamente. O sexto éxon codifica a sequência de junção (responsável por unir a cadeia leve ao domínio catalítico por uma

ponte dissulfeto), o peptídeo de ativação e o início do domínio catalítico. O sétimo e oitavo éxons correspondem ao restante do domínio catalítico, como mostrado na Figura 2.7 (KURACHI *et al.*, 1993).



**Figura 2.7.** Organização do gene do fator IX. O esquema mostra a relação entre os éxons (barras sólidas) e a formação da estrutura proteica correspondente. S, P, Gla, H, EGF, L, AP representam, respectivamente, o peptídeo sinal, o pró-peptídeo, o domínio  $\gamma$ -carboxilado, sequência hidrofóbica, os domínios EGF, a sequência de junção e o peptídeo de ativação. A última estrutura é o domínio catalítico (adaptado de KURACHI *et al.*, 1993).

#### 2.4.4. As modificações pós-tradução e funções dos domínios do fator IX

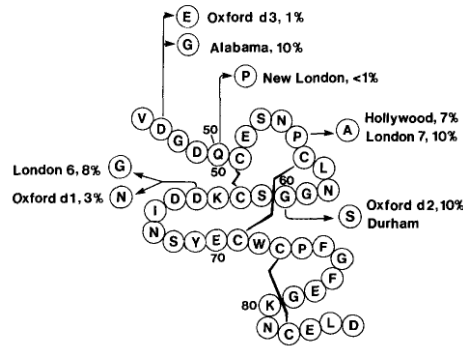
A molécula do fator IX sofre várias modificações durante seu processamento e estas modificações pós-tradução, assim como o correto envelhecimento dos domínios, são de extrema importância para que a proteína exerça sua função corretamente (ARRUDA *et al.*, 2001). A primeira modificação é a clivagem do peptídeo sinal que ocorre durante a secreção da cadeia de aminoácidos primária. O peptídeo sinal é uma região hidrofóbica que é requerida no transporte da cadeia polipeptídica nativa através do retículo endoplasmático (JORGENSEN *et al.*, 1987). O pró-peptídeo é clivado durante o processo de secreção por uma enzima denominada de PACE (*Paired Basic Amino acid Cleaving Enzyme*), a qual é capaz de clivar peptídeos após um par de aminoácidos básicos (Arg-Arg ou Lys-Arg). A enzima PACE foi a primeira da família das serina-proteases subtilisinas a ser descoberta, tendo originalmente sido denominada de furina

(BARR, 1991; NAKAYAMA, 1997). Esta enzima também é sintetizada como uma pró-proteína e sofre uma autoproteólise para remover o seu próprio pró-peptídeo, o que é fundamental para exercer sua atividade. Foi descoberto que o pró-peptídeo da PACE possui papel importante no enovelamento da própria PACE (REHEMTULLA *et al.*, 1992). No trabalho realizado por Bristol *et al.*, a co-expressão do gene do fator IX e do gene da PACE em células CHO aumentou a quantidade de fator IX produzido sem o pró-peptídeo e a secreção de uma PACE mutante solúvel foi capaz de processar o fator IX no meio condicionado (BRISTOL *et al.*, 1993). Foi verificado, também, por Wasley *et al.*, que a atividade do fator IX aumentou em 3 vezes quando co-expresso com a PACE em células CHO (WASLEY *et al.*, 1993).

O domínio Gla possui papel essencial na atividade biológica do fator IX, pois interage com o cálcio e os fosfolipídeos, auxiliando o fator IX na ligação com o tecido endotelial (ASTERMARK *et al.*, 1991). Neste domínio, ocorre a  $\gamma$ -carboxilação, modificação que adiciona grupos carboxílicos ( $\text{CO}_2$ ) ao carbono  $\gamma$  de 12 resíduos de ácido glutâmico. Esta modificação será detalhada no item 2.5. Em uma comparação realizada entre o domínio Gla do fator IX derivado do plasma e o do recombinante, foi visto que, no fator IX recombinante produzido por células CHO, só havia 10 sítios de  $\gamma$ -carboxilação totalmente ocupados e 2 parcialmente ocupados, resultando em uma média de 11.5 resíduos Gla por molécula, o que não comprometia a atividade do fator IX (BOND *et al.*, 1995). Entretanto, o domínio Gla, individualmente, não exerce uma forte afinidade com o cálcio, o que sugere que o domínio EGF funciona como um alicerce para o correto enovelamento do domínio Gla (ASTERMARK *et al.*, 1991). Este enovelamento também é auxiliado pela ligação, de alta afinidade, do cálcio com o primeiro domínio EGF (SUNNERHAGEN *et al.*, 1996). Pesquisas sugerem que o domínio Gla tem efeito sobre a conformação do domínio catalítico serina-protease do

fator IX (ASTERMARK *et al.*, 1994). Portanto, a ligação do cálcio ao domínio Gla induz a conformação global do fator IX.

Os domínios EGF possuem enovelamento próprio. Isto foi concluído após a observação de um enovelamento espontâneo tanto de domínios EGF sintéticos quanto dos isolados do fator IX, do fator X e da proteína C (ASTERMARK *et al.*, 1991). O domínio EGF-1 do fator IX possui três modificações pós-tradução. Uma delas consiste em uma  $\beta$ -hidroxilação no ácido aspártico 64 (BOND *et al.*, 1998). A hidroxilação no fator IX humano é parcial, aproximadamente 30%, e não necessita de vitamina K para ocorrer, diferentemente da  $\gamma$ -carboxilação. As outras modificações são duas O-glicosilações: no aminoácido Ser-53, é ligado um tri-sacarídeo Xilose-Xilose-Glicose, no aminoácido Ser-61, é ligado um glicano do tipo NeuAc-Galactose-GlicoseNAc-fucose (BOND *et al.*, 1998). Os domínios EGF também possuem, juntos, 6 pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína presentes na estrutura, ilustradas na Figura 2.6 (BOND *et al.*, 1998; SHAO *et al.*, 2002). Na Figura 2.8, é possível observar algumas mutações no domínio EGF-1, que são responsáveis por causar hemofilia B em determinado grupo de pessoas (STENFLO, 1991). Isto demonstra a importância da correta conformação dos domínios EGF na molécula do fator IX para que a mesma adquira atividade biológica. Até hoje, existem pesquisas que estudam mutações do fator IX em pacientes hemofílicos de vários locais do mundo (KWON *et al.*, 2008; MUKHERJEE *et al.*, 2008).



**Figura 2.8.** Esquema que ilustra diferentes possíveis mutações conhecidas no domínio EGF-1 do fator IX, que causam hemofilia B em determinados grupos de pessoas (STENFLO, 1991).

A região onde está localizado o peptídeo de ativação, que no processo de coagulação é retirado, transformando o fator IX na molécula ativa (FIXa), contém o maior número de modificações pós-tradução, são elas: Sulfatação no aminoácido Tyr-155; O-glicosilações nos aminoácidos Thr-159, Thr-169 e Thr-172; N-glicosilações nos resíduos de Asn-157 e Asn-167 (as N-glicosilações são completas e as O-glicosilações são parciais); uma fosforilação no resíduo Ser-158, que somente está presente no fator IX derivado do plasma; e o polimorfismo Ala/Thr. Os sítios de clivagem do peptídeo de ativação estão localizados nos resíduos Arg-145 e Arg-180 (BOND *et al.*, 1998). Todas as modificações pós-tradução podem ser visualizadas na Figura 2.6.

O domínio catalítico compõe a cadeia pesada do fator IX e é o maior domínio da molécula. Este domínio está conectado com a cadeia leve por, apenas, uma ligação dissulfeto entre os resíduos Cys-132 e Cys-239. Mutações realizadas nestes resíduos sustentam a importância dos mesmos (KURACHI *et al.*, 1993). Estudos estruturais determinaram que, após a retirada do peptídeo de ativação, a natureza eletrostática dipolar do domínio catalítico é alterada, pois uma grande face hidrofóbica foi retirada. Isto, provavelmente, interfere na conformação final do fator IXa, possibilitando ao mesmo ligar-se ao fator VIIIa no sistema de coagulação (PERERA *et al.*, 2001).

## 2.5. A $\gamma$ -carboxilação

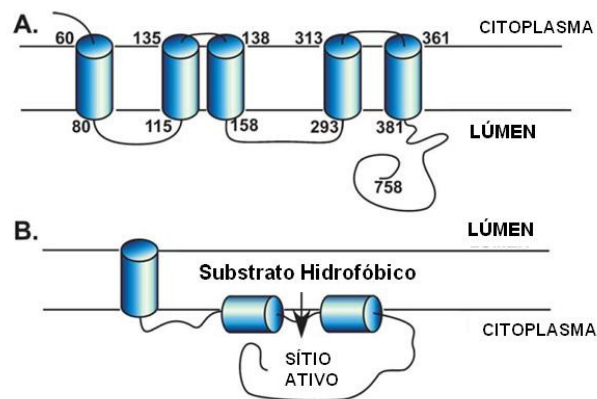
A  $\gamma$ -carboxilação é a mais extensa e mais importante alteração pós-tradução que ocorre na molécula do fator IX. Esta modificação ocorre em todas as proteínas conhecidas como dependentes de vitamina K (DVK), sendo que as que atuam na coagulação são: os fatores IX, VII, e X, a protrombina, e as proteínas C, S e Z (BERKNER, 2005; STAFFORD, 2005). No entanto, a  $\gamma$ -carboxilação também foi identificada em proteínas como a osteocalcina e a MGP (*Matrix Gla protein*), que atuam na homeostase do cálcio, evitando calcificações indesejadas, por exemplo, a (OLDENBURG, *et al.*, 2008). A  $\gamma$ -carboxilação, como já foi dito, consiste na adição de  $\text{CO}_2$  ao carbono  $\gamma$  dos resíduos de ácido glutâmico. A  $\gamma$ -carboxilase, auxiliada por outras enzimas (principalmente pela vitamina K epóxido redutase, VKORC1) e pelo seu co-fator (a vitamina K reduzida,  $\text{KH}_2$ ), é a responsável por esta modificação presente nas proteínas DVK. A  $\gamma$ -carboxilação é, até hoje, um tópico muito explorado (FURIE *et al.*, 1999; BERKNER, 2005 e 2008).

### 2.5.1. A enzima $\gamma$ -carboxilase

A enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase ou  $\gamma$ -carboxilase é uma proteína que integra a membrana do retículo endoplasmático (RE) e o complexo de Golgi. O cDNA da carboxilase humana foi isolado e clonado em 1991 (WU *et al.*, 1991). A cadeia polipeptídica é composta por 758 resíduos. Estudos da topologia da  $\gamma$ -carboxilase indicaram que o grupo amino terminal está situado no citoplasma e o C-terminal no lúmen do RE, respectivamente. A estrutura da enzima foi suposta como tendo 7 regiões hidrofóbicas, sendo que 5 delas penetram através da membrana do retículo endoplasmático (TIE *et al.*, 2000). No entanto, algumas sequências hidrofóbicas poderiam formar diferentes tipos estruturais. Estas sequências correriam em paralelo à



bicapa lipídica e apenas uma atravessaria a membrana lipídica (domínio monotópico), formando uma estreita interface entre a membrana e o ambiente aquoso. Desta maneira, o domínio monotópico forma uma entrada que permite a movimentação do substrato hidrofóbico da bicamada de fosfolipídeos para o sítio ativo da enzima, localizado no lúmen do RE ou no citoplasma. As sequências hidrofóbicas formam caminhos que permitem o acesso da vitamina K da membrana para o sítio ativo do lúmen. A Figura 2.9 mostra as prováveis topologias da  $\gamma$ -carboxilase. Entretanto, estas estruturas ainda não estão totalmente claras, portanto são necessários mais estudos para desvendar a topologia correta da  $\gamma$ -carboxilase (BERKNER, 2005).



**Figura 2.9.** Possíveis topologias da  $\gamma$ -carboxilase. A estrutura A propõe 5 regiões hidrofóbicas ancoradas na membrana do RE. Contudo, algumas sequências hidrofóbicas podem ser monotópicas (B), com apenas um domínio atravessando a membrana do RE, o que permite a movimentação de substratos hidrofóbicos ou co-fatores da membrana para o sítio ativo (adaptado de BEKNER, 2005).

O tamanho do gene que codifica a  $\gamma$ -carboxilase é de 13 kb, contendo 15 éxons.

O gene está localizado no cromossomo humano 2 no *locus* p12 (PRESNELL & STAFFORD, 2002)..

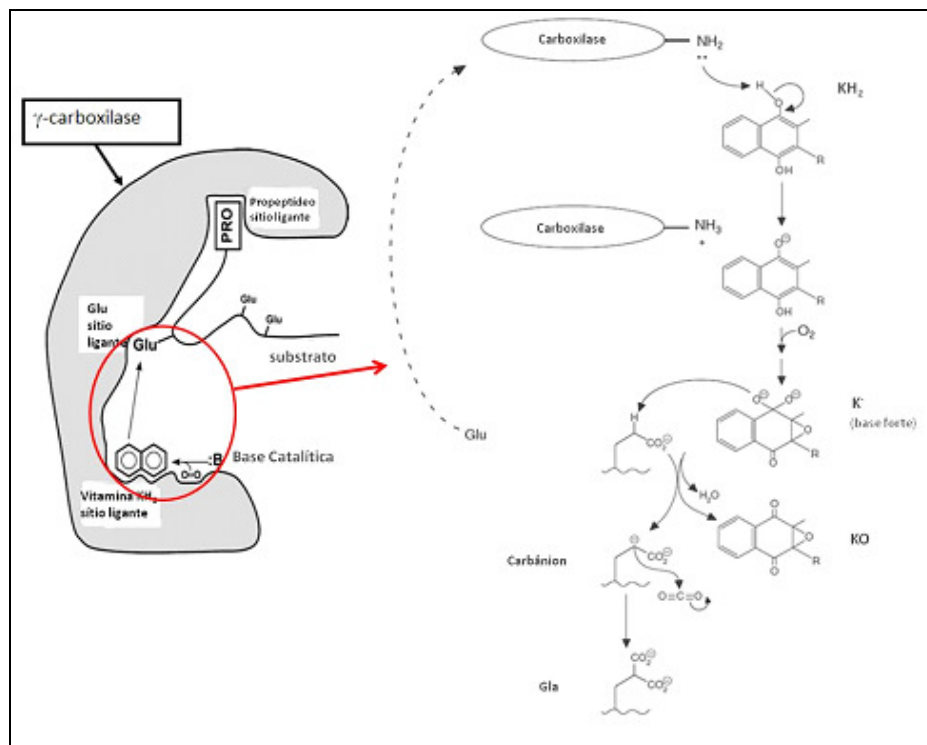
Antes de iniciar o mecanismo da  $\gamma$ -carboxilação, a proteína dependente de vitamina K precisa unir-se à  $\gamma$ -carboxilase. Isto ocorre através do sítio de interação com

o pró-peptídeo da proteína, uma região com aproximadamente 18 aminoácidos presente em todas as proteínas DVK. A sequência de aminoácidos do pró-peptídeo não é igual em todas as proteínas DVK, porém há muitas regiões do pró-peptídeo que são homólogas. Mutações no pró-peptídeo do fator IX praticamente aboliram a  $\gamma$ -carboxilação do mesmo (JORGENSEN *et al.*, 1987). Os pró-peptídeos de diferentes proteínas DVK possuem níveis de interação distintos com a  $\gamma$ -carboxilase. Foi observado por Stanley *et al.*, que os pró-peptídeos com baixa afinidade pela  $\gamma$ -carboxilase em uma  $\gamma$ -carboxilação da proteína VKD mais eficiente (STANLEY *et al.*, 1999). Pelo fato do pró-peptídeo da protrombina possuir uma baixa afinidade pela  $\gamma$ -carboxilase, foi realizada, por Blostein *et al.*, a troca do pró-peptídeo do fator IX pelo pró-peptídeo da protrombina através de manipulação genética, porém isto não aumentou o nível de  $\gamma$ -carboxilação do fator IX produzido por células HEK 293 (BLOSTEIN *et al.*, 2008). O mesmo experimento havia sido realizado por Camire *et al.*, com o fator X, porém com sucesso, tendo-se observado um aumento de 30 para 85% na eficiência da  $\gamma$ -carboxilação (CAMIRE *et al.*, 2000).

Existem duas propostas para a região de integração do pró-peptídeo do fator IX na molécula da  $\gamma$ -carboxilase. A primeira seria no resíduo amino-terminal 259 da  $\gamma$ -carboxilase e a segunda no resíduo C-terminal 438. Estas regiões são consideravelmente distantes na estrutura linear, porém estão bem próximas na estrutura tridimensional, o que causa esta diferença na observação (BANDYOPADHYAY, 2008).

Ao se ligar no sítio da  $\gamma$ -carboxilase, o pró-peptídeo causa mudanças alostéricas que regulam a carboxilação. Esta modificação aumenta a afinidade da enzima pelo seu substrato, que são os resíduos de ácido glutâmico ou Glu (LIN *et al.*, 2004). O substrato ligado aumenta a afinidade da enzima pelo seu cofator, a vitamina K reduzida (KH<sub>2</sub>). A

reação se inicia quando o sítio de lisina 218 da  $\gamma$ -carboxilase, atuando como uma base fraca, retira um próton da  $\text{KH}_2$ . A retirada do próton permite que ocorra uma reação da vitamina K reduzida desprotonada com o  $\text{O}_2$ , formando uma base forte, intermediária. Esta base forte ao retirar um hidrogênio da posição  $\gamma$  do resíduo de ácido glutâmico, forma um carbânion no resíduo de ácido glutâmico com um  $\text{pK}_a$  entre 25-28, aproximadamente. A formação deste carbânion está vinculada com a histidina da posição 160 da  $\gamma$ -carboxilase, como comprovado por pesquisa recente (RISHAVY & BERKNER, 2008). Após isto, o carbânion ataca o  $\text{CO}_2$  para gerar o resíduo de ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado. A Figura 2.10 ilustra a reação de  $\gamma$ -carboxilação (BERKNER, 2008).



**Figura 2.10.** Reação de  $\gamma$ -carboxilação. A proteína DVK liga-se à  $\gamma$ -carboxilase através do pró-peptídeo. Esta interação aumenta a afinidade da  $\gamma$ -carboxilase pelo resíduo de Glu. O efeito alostérico destas interações aumenta a atração da enzima pelo seu co-fator ( $\text{KH}_2$ ). O cofator reage com o sítio de Lys218, perdendo um próton. A reação do co-fator desprotonado com  $\text{O}_2$  forma um composto intermediário (base forte). A base forte retira o hidrogênio  $\gamma$  do resíduo Glu, formando um carbânion. O carbânion ataca a molécula de  $\text{CO}_2$  gerando o ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado, que possui 2 cargas negativas para interagir com o  $\text{Ca}^{2+}$  (adaptado de BERKNER, 2005 e 2008).

Na tentativa de aumentar a produção do fator IX recombinante funcional, o cDNA da  $\gamma$ -carboxilase bovina foi isolado e transfectado em células CHO produtoras de fator IX. Entretanto, a super expressão da  $\gamma$ -carboxilase bovina não aumentou a atividade específica do fator IX (REHEMTULLA *et al.*, 1993). A  $\gamma$ -carboxilase bovina também foi superexpressa em células CHO co-transfectadas com os genes do fator IX e da PACE, porém mesmo assim a atividade específica do fator IX secretado não aumentou (REHEMTULLA *et al.*, 1993). A co-expressão do fator IX e da  $\gamma$ -carboxilase em células BHK (*Baby hamster kidney*), em um mesmo vetor, causou uma diminuição do fator IX secretado e não aumentou a  $\gamma$ -carboxilação do fator IX (HALLGREN *et al.*, 2002). A explicação para isto seria o fato da alta atividade da  $\gamma$ -carboxilase aumentar a quantidade do complexo FIX- $\gamma$ -carboxilase no interior das células e, provavelmente, o co-fator da  $\gamma$ -carboxilase, a vitamina K reduzida, ser compartilhada entre os complexos formados no interior das células, limitando a taxa de  $\gamma$ -carboxilação e tornando-a mais lenta, o que teria impedido a secreção do fator IX totalmente  $\gamma$ -carboxilado (HALLGREN *et al.*, 2002).

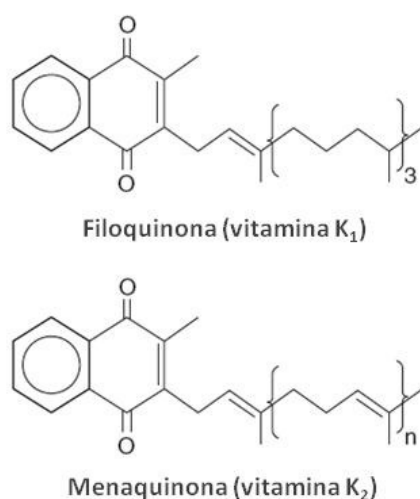
### **2.5.2. O ciclo da vitamina K**

A vitamina K foi descoberta após uma série de experimentos realizados por Henrik Dam com pintos. Foi observado que, ao expor os pintos a um alimento submetido a uma extração com solvente apolar para remover os esteróis, estes animais desenvolveram hemorragias subdurais e musculares, e o sangue extraídos dos pintos apresentou coagulação lenta. Baseado nos experimentos, Dam concluiu que alguma substância apolar removida pela extração foi responsável pelas hemorragias, propondo descobrir qual era esta substância. Experimentos subseqüentes foram realizados com o objetivo de descartar a possibilidade das hemorragias estarem sendo causadas por

vitaminas já conhecidas. Em 1935, Dam propôs que o fator anti-hemorrágico era uma nova vitamina, a qual ele denominou de vitamina K, pois o K era a primeira letra da palavra coagulação em alemão (*Koagulation*). Em 1939, o mesmo Henrik Dam e colaboradores isolaram a vitamina K<sub>1</sub> do óleo de alfafa. Na mesma época, a vitamina K<sub>2</sub> foi extraída do óleo de peixe (WALLIN *et al.*, 2008).

As vitaminas K descobertas foram classificadas como: filoquinona (vitamina K<sub>1</sub>, 2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona), produzida por plantas, e menaquinona (vitamina K<sub>2</sub>, 2-metil-3-poli isoprenoide-1,4-naftoquinona), produzida por bactérias. Após a sua identificação, a biossíntese de ambas tem sido estudada constantemente (OLDENBURG *et al.*, 2008).

A Figura 2.11 mostra a estrutura química das duas vitaminas K naturais conhecidas (WALLIN *et al.*, 2008). Existe também uma terceira forma, sintética, denominada de menadiona, que possui apenas um hidrogênio na posição 3 (TIE & STAFFORD, 2008).

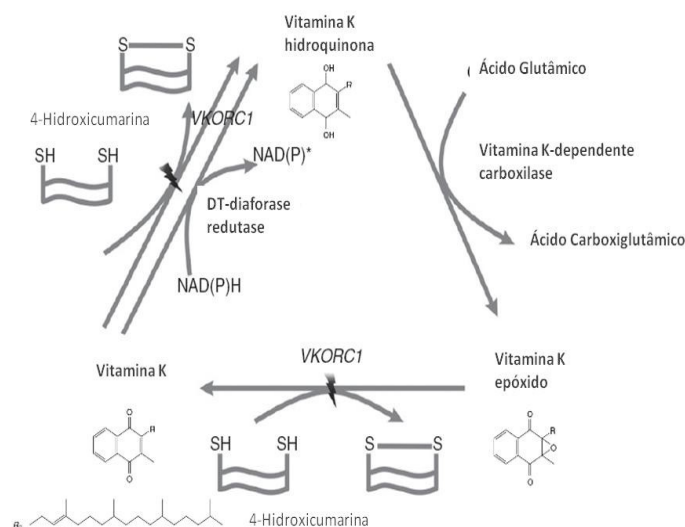


**Figura 2.11.** Família das vitaminas K lipossolúveis. A vitamina K<sub>1</sub> (filoquinona) é produzida em plantas e possui uma cadeia longa de isoprenoides saturados. A vitamina K<sub>2</sub> (menaquinona) é produzida em bactérias e possui uma cadeia longa de isoprenoides insaturados (adaptado de WALLIN *et al.*, 2008).

Após o conhecimento da influência da vitamina K na coagulação sanguínea, os estudos para desvendar o mecanismo de ação da vitamina K nas proteínas da coagulação foram intensificados. Em 1974, Stenflo e colaboradores identificaram os ácidos glutâmicos  $\gamma$ -carboxilados em moléculas de protrombina utilizando-se de várias técnicas analíticas, como: RMN, espectrometria de massa, análise de aminoácidos e degradação de brometo cianogênico (STENFLO, 1974; STENFLO *et al.*, 1974). Contudo, antes disso, já havia evidências sobre a atividade da enzima vitamina K-epóxido redutase (VKOR) decorrentes de testes realizados com varfarina, uma substância capaz de bloquear a enzima epóxido redutase (BELL & MATSCHINER, 1970). Em 1972, foi levantada a hipótese que a conversão da vitamina K em vitamina K epóxido e retornando à forma de vitamina K produzia atividade procoagulante e era inibida por varfarina. A partir deste momento, conceituava-se o termo ciclo da vitamina K (BELL & MATSCHINER, 1972).

No ciclo da vitamina K, ocorre a participação de duas enzimas: a  $\gamma$ -carboxilase e a vitamina K epóxi redutase. O ciclo funciona da seguinte forma: a enzima VKOR é responsável por sintetizar a vitamina K hidroquinona ( $KH_2$ ), que é usada como doadora de elétrons para a concretização da inserção do  $CO_2$  no carbono  $\gamma$  dos resíduos de ácido glutâmico da proteína dependente de vitamina K (reação catalisada pela  $\gamma$ -carboxilase). Durante este processo, a vitamina K hidroquinona é oxidada para vitamina K epóxido (KO), então o complexo enzimático vitamina K epóxido redutase atua, regenerando a vitamina K hidroquinona em 2 etapas, passando pela forma quinina. A enzima NADPH-vitamina K dependente redutase, formalmente conhecida como DT-diaforase, também reduz a forma quinina da vitamina K na forma completamente reduzida ( $KH_2$ ), porém não é capaz de reduzir a vitamina K epóxido (KO), o que é realizado apenas pelo complexo enzimático VKOR (STAFFORD, 2005; GARCIA & REITSMA, 2008;

OLDENBURG *et al.*, 2006; OLDENBURG *et al.*, 2008). A Figura 2.12 ilustra as etapas do ciclo da vitamina K.



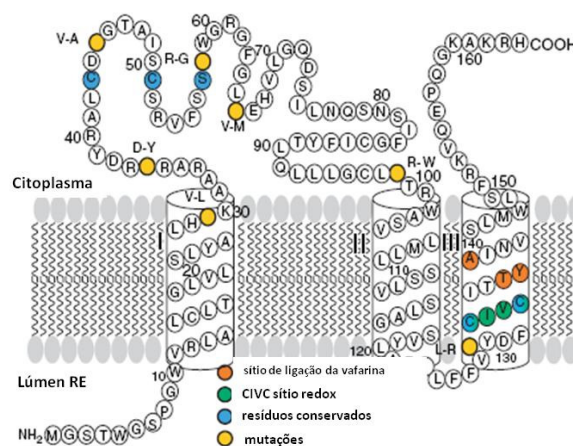
**Figura 2.12.** Ciclo da vitamina K. Durante o ciclo a vitamina K, hidroquinona é oxidada para a forma epóxido para que os resíduos de ácido glutâmico sejam  $\gamma$ -carboxilados. A vitamina K epóxido é reduzida para a forma hidroquinona pela subunidade do complexo enzimático VKORC1 (vitamina K 2,3-epóxido redutase) em duas etapas. Em paralelo, a enzima DT-diaforase, reduz a vitamina K, produzindo mais  $\text{KH}_2$ . Ligações dissulfeto são formadas, em uma proteína denominada de PDI (*protein disulfide isomerase*), à medida que a VKORC1 reduz a vitamina KO. A substância 4-hidroxicumarina é uma inibidora da VKORC1 (adaptado de GARCIA & REITSMA, 2008).

### 2.5.3. A vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKORC1)

A enzima VKOR, também designada de VKORC1 por alguns autores pelo fato de ser uma subunidade de um complexo enzimático, é uma proteína de 163 aminoácidos com 18,2 kDa de massa (TIE *et al.*, 2005). Experimentos de translocação (alteração cromossômica que implica em troca de material genético entre cromossomos não homólogos) foram realizados para desvendar a topologia da VKORC1 na membrana do retículo endoplasmático (TIE *et al.*, 2005). Os experimentos sugeriram que o C-terminal está localizado no citoplasma e o N-terminal no lúmen do RE. A VKORC1 é composta por 3 domínios transmembranares em  $\alpha$ -hélice, o primeiro iniciando no aminoácido 10 e

terminando no 29, o segundo abrangendo do aminoácido 101 ao 123, e o terceiro do 127 ao 149, conforme mostrado na Figura 2.13 (TIE *et al.*, 2005; OLDENBURG *et al.*, 2007). A estrutura ainda possui uma extensa região entrelaçada, com aproximadamente 69 aminoácidos, localizada no citoplasma entre o primeiro e o segundo domínio transmembranar, que contém regiões hidrofílicas e hidrofóbicas e 2 cisteínas (Cys-43 e Cys-51).

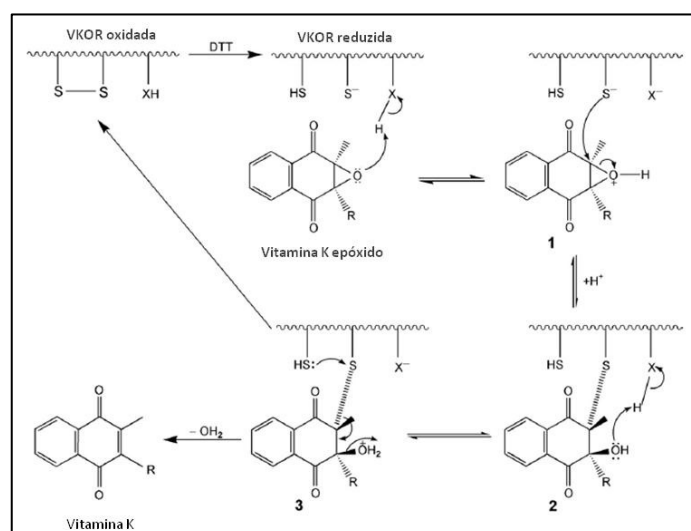
O sítio redox da VKORC1 foi identificado após serem realizadas duas mutações, em que as cisteínas 132 e 135 foram substituídas por duas alaninas, cessando a atividade da enzima, de modo que o sítio foi simbolizado como CXXC (WAJIH *et al.*, 2005a). A VKORC1 é sensível ao medicamento varfarina (WALLIN & SUSAN, 2004). Experimentos mutagênicos evidenciaram que os aminoácidos Tyr-138, Thr-139 e Ala-140 estariam envolvidos na ligação com a varfarina (OLDENBURG *et al.*, 2007).



**Figura 2.13.** Topologia proposta para a vitamina K epóxido redutase (VKORC1). O modelo prediz três  $\alpha$ -hélices transmembranares. A parte amino terminal da enzima está localizada no lúmen do RE (~10 aminoácidos ou aa). Logo após, encontram-se em sequência: a primeira  $\alpha$ -hélice (aa 11-30), uma grande sequência citoplasmática entrelaçada de 69aa, a segunda  $\alpha$ -hélice (aa 101-120), uma pequena sequência de 7aa localizada no lúmen do RE, a terceira  $\alpha$ -hélice (aa 128-147) e a parte carboxi terminal com 16aa. A figura mostra também os prováveis sítios de ligação com a varfarina (aa 138-140, em laranja), o sítio redox CXXC ou CXXC (aa 132-135, em verde), assim como os cinco aminoácidos da VKORC1 preservados em todas as espécies onde a enzima é encontrada (aa Cys-43, Cys-51, Ser/Thr-57, Cys-132 e Cys-135, marcados em azul). As mutações reportadas na literatura estão indicadas em amarelo, assim como o aminoácido que foi modificado (adaptado de OLDENBURG *et al.*, 2007).



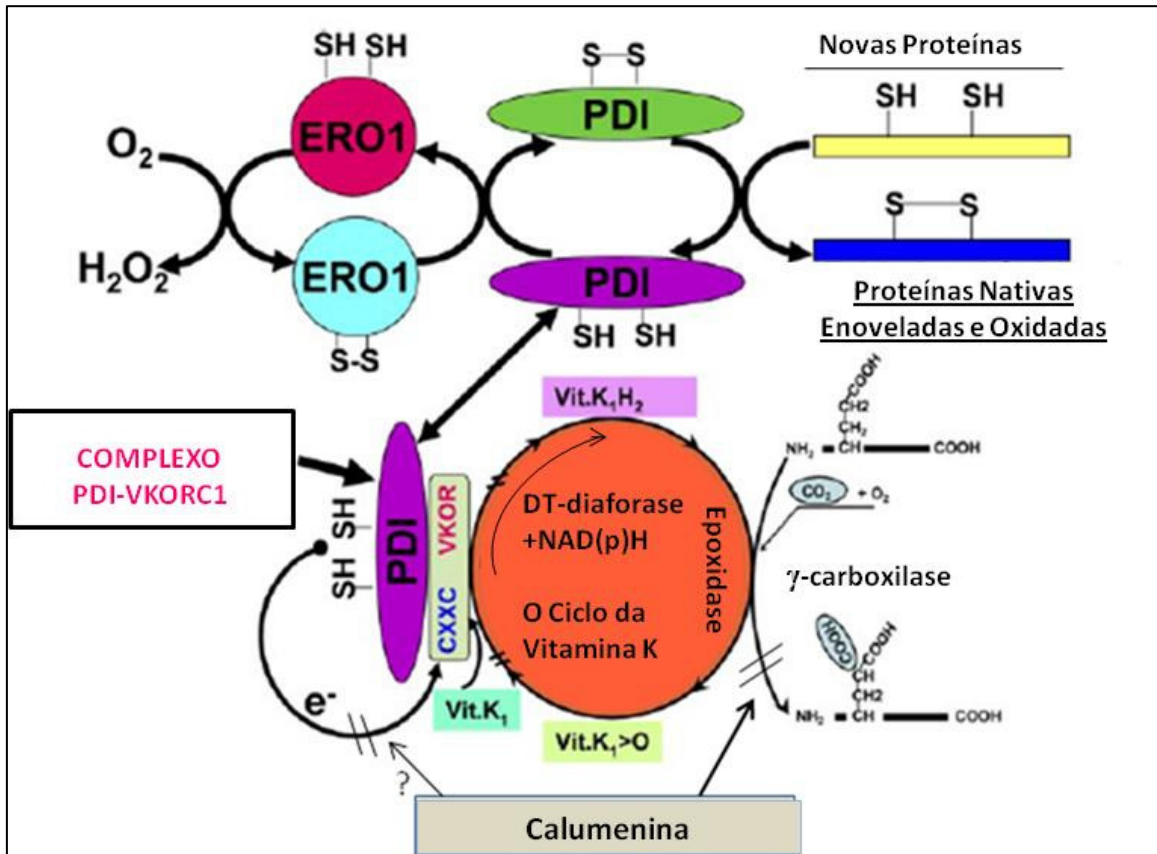
Como já foi dito, a função da VKORC1 é reduzir a vitamina K da forma epóxido para a forma hidroquinona, reciclando o co-fator da  $\gamma$ -carboxilase. Esta reação é realizada em duas etapas: transformação da vitamina KO para vitamina K e transformação da vitamina K em vitamina KH<sub>2</sub>. O mecanismo proposto para a primeira etapa da reação foi modelado por Silverman, em 1981, após experimentos *in vitro*. Neste modelo, um sítio de ligação dissulfeto da VKORC1 é reduzido por um composto contendo um grupo tiol (DTT-ditiotreitol, substância usada como agente redutor) para ativar a enzima. A vitamina K epóxido liga-se ao sítio reduzido da VKORC1 e o oxigênio da forma epóxido é protonado (composto 1 da Figura 2.14) por um resíduo ácido próximo. Um grupamento sulfidril formado no sítio ativo ataca o carbono da posição 2 da vitamina KO, formando um aduto  $\beta$ -hidróxi sulfeto (composto 2 da Figura 2.14). A protonação do grupo  $\beta$ -hidroxil gera um grupo de saída acarretando em uma eliminação redutiva (composto 3 da Figura 2.14) a qual é promovida por outro grupo sulfidril. Por fim, a vitamina KO é reduzida para vitamina K e as citosinas são oxidadas, formando uma ligação dissulfeto, conforme ilustrado na Figura 2.14 (TIE & STAFFORD, 2008).



**Figura 2.14.** Proposta mecanística para a primeira etapa da reação de redução da vitamina KO catalisada pela VKORC1 (adaptado de TIE & STAFFORD, 2008).

Alguns trabalhos sugeriram que uma tioredoxina é utilizada endogenamente pela célula para reduzir a VKORC1, atuando tanto na conversão da vitamina KO para vitamina K quanto na conversão da vitamina K para vitamina KH<sub>2</sub>, porém esta hipótese não foi comprovada (TIE & STAFFORD, 2008). Pesquisas descobriram que a proteína dissulfeto isomerase (PDI – *protein disulfide isomerase*), uma tioredoxina-oxidoreductase indireta e chaperona (proteína que auxilia no enovelamento de outras proteínas) presente em alta concentração no retículo endoplasmático, também atua no processo de  $\gamma$ -carboxilação (WALLIN *et al.*, 2002). O principal mecanismo de atuação da PDI é catalisar a oxidação de ditióis em novas proteínas que são sintetizadas no retículo endoplasmático, ajudando, desta forma, no enovelamento da nova proteína. Conseqüentemente, o sítio redox CGHC da PDI passa da forma oxidada (S-S) para a forma reduzida (SH--SH). A enzima retículo endoplasmático oxidase 1 (ERO1-*Endoplasmatic reticulum oxidase 1*) atua reoxidando a PDI para que a função de ajudar no enovelamento continue, sendo que este processo forma peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). No entanto, pesquisas atuais sugerem que algumas isomerases (PDI) formam complexos com a VKORC1 (PDI-VKORC1), sendo este complexo responsável por reduzir a vitamina K 2,3-epóxido. Ou seja, o centro redox CGHC (sequência de aminoácidos que representa o centro redox da proteína) da PDI doa elétrons para o centro CXXC da VKORC1 para reduzir a vitamina KO. Portanto, a PDI perde elétrons, formando uma ponte dissulfeto no centro redox. Esta evidência surgiu em um experimento que isolou o complexo PDI-VKORC1 com auxílio de um anticorpo de cabra, o anti-*c-myc* (WAJIH *et al.*, 2007). A Figura 2.15 mostra uma proposta mecanística mais atual e mais detalhada para a  $\gamma$ -carboxilação, destacando a atuação da PDI (WALLIN *et al.*, 2008). Inúmeras pesquisas foram realizadas na intenção de

desvendar o mecanismo endógeno para conversão de KO para K e de K para  $KH_2$ , ou seja, quais enzimas realmente atuam nestas reações, porém nenhuma proposta foi totalmente comprovada. O redutante fisiológico natural da VKORC1 ainda não é conhecido (TIE & STAFFORD, 2008).



**Figura 2.14.** Proposta mecanística da atuação da PDI na regeneração da vitamina K reduzida (Vitamina  $K_1H_2$ ). Os centros redox CGHC (S-S) na PDI são reduzidos (SH---SH) quando a PDI catalisa a oxidação de ditióis em novas proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático (RE), auxiliando no enovelamento destas proteínas nativas. A PDI é reoxidada pela enzima ERO1, formando  $H_2O_2$ , para que a operação de enovelamento oxidativo continue. A nova proposta de atuação da PDI sugere que parte das isomerases (PDI) formam estáveis complexos com a VKORC1 e estes complexos seriam responsáveis pela redução da vitamina K 2,3-epóxido (vitamina KO), formando a vitamina K reduzida (vitamina  $KH_2$ ), que atua como co-fator para a  $\gamma$ -carboxilação das proteínas dependentes de vitamina K. A proteína calumenina é mostrada como um inibidor da  $\gamma$ -carboxilase e um potencial inibidor da VKORC1 (adaptado de WAJIIH *et al.*, 2007 e WALLIN *et al.*, 2008).

A VKORC1 foi superexpressa pela primeira vez em células BHK com objetivo de observar a atividade da enzima em comparação com a mesma produzida

endogenamente e em comparação com células BHK transfectadas com o cDNA da enzima  $\gamma$ -carboxilase. No mesmo trabalho, também foi construído um vetor contendo os cDNAs da VKORC1 e da  $\gamma$ -carboxilase. Os resultados mostraram um aumento na atividade de incorporação de CO<sub>2</sub> em um substrato da  $\gamma$ -carboxilase nas células BHK transfectadas com o cDNA da VKORC1 e da VKORC1+  $\gamma$ -carboxilase, porém esta atividade não sofreu acréscimo em células transfectadas somente com o cDNA da  $\gamma$ -carboxilase (WAJIH *et al.*, 2005b). Com base nos dados obtidos por Wajih *et al.*, ocorreu a proposta de que a VKORC1 seria o fator limitante da  $\gamma$ -carboxilação. Como o fator IX é uma proteína com fins terapêuticos e a produção da sua forma funcional é limitada pelo fato da célula não efetuar a  $\gamma$ -carboxilação com eficiência, os autores co-transfectaram os cDNAs da VKORC1, da  $\gamma$ -carboxilase e da VKORC1+ $\gamma$ -carboxilase em células BHK produtoras de fator IX recombinante. Os resultados obtidos mostraram um aumento de 3 vezes na produção do fator IX funcional em relação às células BHK produtoras de fator IX não transfectadas com o gene da VKORC1. Também foi observado que a  $\gamma$ -carboxilase endógena já tem uma alta atividade, pois a co-transfecção da mesma não acarretou em aumento do fator IX funcional secretado (WAJIH *et al.*, 2005b). Por outro lado, o efeito da VKORC1 é limitado *in vivo*, pois o aumento da produção do fator IX funcional foi pequeno comparado com a quantidade da enzima VKORC1 superexpressa. A explicação para isto consiste na possibilidade da super expressão da VKORC1 estar saturando outro componente da  $\gamma$ -carboxilação, como a proteína redox que regenera o sítio ativo da VKORC1 (HALLGREN *et al.*, 2006).

Estudos identificaram que a chaperona calumenina, membro da família de proteínas que se ligam ao Ca<sup>2+</sup> denominadas de CREC (Cab-45, reticulocalbina, ERK-45 e calumenina), presente no retículo endoplasmático, inibe a  $\gamma$ -carboxilação

endogenamente (WALLIN *et al.*, 2001; 2004; WAJIH *et al.*, 2004). Células BHK transfectadas com os genes da VKORC1 e do fator IX recombinante (rFIX) tiveram o gene da calumenina silenciado com o uso de silenciadores genéticos do tipo siRNA (siRNA são fornecidos como um *pool* de siRNA de alvos específicos, contendo uma mistura de oligonucleotídeos, que tem a função de efetuar o silenciamento da expressão de genes de interesse específicos quando introduzidos nas células). Este silenciamento provocou um aumento drástico da produtividade do fator IX funcional. Em relação ao controle as células transfectadas com o rFIX, rFIX+VKORC1 e rFIX+VKORC1+siRNA<sub>calumenina</sub> aumentaram em 18%, 50% e 80% a produção do fator IX funcional, respectivamente (WAJIH *et al.*, 2006). Células produtoras de fatores IX, VII, e proteína C, co-expressando a VKORC1 estão sendo construídas com o gene da calumenina silenciado por transfecções com shRNA na Carolina do Norte, EUA, com o objetivo de aumentar a produtividade da forma funcional destas proteínas (WAJIH *et al.*, 2008; WALLIN *et al.*, 2008).

Nenhum dos trabalhos da literatura que co-expressaram as enzimas VKORC1, PACE e  $\gamma$ -carboxilase, utilizou vetores bicistrônicos. Portanto, não havia garantia de que todas as células que expressavam o fator IX estariam expressando as enzimas em questão, pois como os genes não pertenciam ao mesmo RNA mensageiro não necessariamente os dois seriam integrados ao genoma da célula. Além disso, cada gene poderia ser integrado em regiões diferentes do genoma, tendo níveis de expressão diferentes. No presente trabalho foram construídos vetores bicistrônicos com o elemento IRES defectivo, o que fornece um controle maior do nível de expressão do fator IX e das enzimas VKORC1,  $\gamma$ -carboxilase e PACE. Portanto, a utilização de vetores bicistrônicos pode proporcionar resultados diferentes dos reportados na literatura. A utilização do sistema de integração sítio-dirigida (FRT) também é uma inovação deste

trabalho, já que não há artigos na literatura que utilizaram o sistema FRT para expressar o fator IX e as enzimas VKORC1,  $\gamma$ -carboxilase e PACE. A comparação entre a influência destas três enzimas em células CHO ainda não foi reportado na literatura.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação foi construir vetores bicistrônicos, utilizando os vetores comerciais pIRES e pcDNA5/FRT, contendo o gene do fator IX no primeiro cístron e os genes das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE no segundo, sendo os genes intermediados pelo elemento IRES, para melhorar a produção do fator IX funcional em células CHO.

### 3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Comparar a produção do fator IX total e funcional produzido pelas células CHO transfectadas com os vetores bicistrônicos construídos no vetor pIRES;
- Comparar a produção do fator IX total e funcional produzido pelas células CHO transfectadas com os vetores bicistrônicos construídos no vetor pcDNA5/FRT, o qual promove integração sítio-dirigida;
- Comparar a eficiência do sistema de integração sítio dirigida (pcDNA5/FRT e células CHO Flp-In<sup>™</sup>) em relação à integração aleatória dos genes do fator IX e das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE;
- Analisar a influência do elemento IRES, oriundo do vetor pIRES, na expressão do genes do fator IX e das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE;
- Avaliar o aumento da expressão das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE em relação à expressão endógena das mesmas em células CHO.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Linhagens de células animais e cepas bacterianas**

As células de mamíferos CHO Flp-In™ utilizadas neste trabalho foram obtidas da Invitrogen. As mesmas consistem em células da linhagem CHO (*Chinese hamster ovary cells* ou células de ovário de hamster chinês) transfectadas com o plasmídeo pFRT/lacZeo2, de modo a possuir o sítio de integração dirigida FRT em uma região do genoma de alta atividade transcripcional.

As bactérias utilizadas nas clonagens são da cepa *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  e foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*).

### **4.2. Manutenção e propagação das células**

#### **4.2.1. Células animais**

As células CHO foram cultivadas aderidas em frasco T25 em uma mistura 1:1 de meio DMEM e Ham's F-12, ambos da empresa Cultilab, suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cultilab e Gibco). O volume de meio utilizado foi de 5 mL. As células foram mantidas a uma temperatura de 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO<sub>2</sub>. A propagação ou repique ocorreu quando as células estavam confluentes, da seguinte forma: após a retirada do meio com soro, as células foram lavadas com meio isento de soro fetal bovino. Em seguida, adicionou-se 2 mL de tripsina 0,05% (LGC) ao frasco T25, o qual foi incubado a 37°C por 2 min. Para que todas as células desprendessem da garrafa, foi necessário golpear a superfície inferior da garrafa. Por fim, foram adicionados 8 mL de meio com 5% de soro fetal bovino para



inativar a tripsina. A transferência de uma pequena quantidade de meio contendo células (ex: 300 µL) para um novo frasco T25, com meio DMEM/F-12 contendo 5% de soro fetal bovino, é suficiente para efetuar o repique. O frasco antigo foi descartado.

#### **4.2.2. Bactérias**

As bactérias da cepa *E. coli*, após transformação, foram cultivadas a 37°C em placas de Petri contendo meio Agar LB (Luria-Bertani com agarose) da empresa LGC com 100 µg/mL do antibiótico ampicilina. A propagação das bactérias para extração plasmidial foi realizada em 5 mL de caldo LB (LGC), com a mesma concentração de ampicilina do meio com agarose, a 37°C por 16 horas, sob agitação de 190 rpm.

#### **4.3. Criopreservação de células animais**

A partir de um frasco T25 confluyente, as populações de células CHO Flp-In™ transfectadas de forma estável foram retiradas do fundo do frasco, com o uso de tripsina 0,05%, e propagadas conforme descrito anteriormente. Do frasco com as células ressuspendidas, foi retirado uma alíquota para a determinação da concentração celular utilizando-se câmara de Neubauer. O ideal, para células aderentes, é congelar de 2 a 3 x 10<sup>6</sup> células por criotubo. O volume correspondente a esta quantidade de célula foi retirado e centrifugado (1200 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente). O pellet obtido foi ressuspendido em 1,8 mL de meio de congelamento (12,5% v/v de meio DMEM/ Ham's F-12, 7,5% v/v de dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma), previamente filtrado, e 80% v/v de soro fetal bovino), previamente resfriado a 4°C. A suspensão celular foi transferida para um criotubo, que foi imediatamente inserido em um recipiente de congelamento contendo isopropanol. O recipiente foi colocado a -80°C e retirado após 24 horas, quando foi transferido para o nitrogênio líquido (- 196°C). O

isopropanol promove uma queda lenta na temperatura a que as células são submetidas, evitando a formação de cristais de gelo que poderiam danificar as células.

#### **4.4. Descongelamento de células animais**

As células CHO Flp-In<sup>TM</sup> estavam estocadas em nitrogênio líquido (-196°C) e foram descongeladas da seguinte forma: o criotubo contendo as células foi retirado do tanque de nitrogênio líquido e colocado em um banho termostático a 37°C por aproximadamente 2 minutos. As células foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e ressuspensas em meio de cultivo DMEM-F12 sem soro, com o objetivo de lavar as células. Logo após, as células foram centrifugadas, novamente com a mesma velocidade e tempo, e ressuspensas em meio DMEM-F12 com 5% de soro. Então, as células foram transferidas para um frasco T25 e colocadas em uma estufa a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO<sub>2</sub>.

#### **4.5. Preparação de bactérias competentes**

As bactérias da cepa *E. coli* DH5- $\alpha$  foram preparadas quimicamente para receber DNA exógeno, pois não são naturalmente transformáveis (PRIMROSE & TWYMAN, 2006).

Após o crescimento em meio LB Agar, uma colônia foi selecionada e propagada em caldo LB, como descrito anteriormente. A partir desta propagação, foi feito um inóculo em um novo caldo LB (diluição 1:1000), porém desta vez a densidade óptica foi monitorada por espectrofotometria. Quando a cultura atingiu uma DO<sub>600nm</sub> de 0,3-0,5 (fase de crescimento exponencial da cultura bacteriana), as bactérias foram submetidas ao tratamento químico, que foi realizado por lavagens com MgCl<sub>2</sub> 100 mM e CaCl<sub>2</sub> 100

mM. Após o tratamento, às bactérias foi adicionado meio LB com 20% v/v de glicerol para congelamento. As bactérias competentes podem ser armazenadas em freezer a -80°C ou em nitrogênio líquido.

#### **4.6. Criopreservação de bactérias**

Após confirmado que uma determinada colônia bacteriana transformada efetivamente possui o vetor inserido, esta mesma foi propagada e, ao final do tempo estipulado para crescimento, uma alíquota de 850 µL de suspensão bacteriana foi misturada a 150 µL de glicerol 50% v/v em um criotubo que pode ser armazenado em freezer a -80°C ou em nitrogênio líquido.

#### **4.7. PCR (Reação em cadeia da DNA polimerase)**

A reação em cadeia da DNA polimerase (*PCR-polimerase chain reaction*) consiste em uma reação na qual uma enzima denominada de DNA polimerase produz várias cópias do gene de interesse a partir de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que se anelam a uma pequena quantidade da molécula de DNA molde que se deseja amplificar. Esta reação ocorre na presença de magnésio, de um tampão específico da enzima DNA polimerase e de oligonucleotídeos (dNTP). A reação de PCR é preparada em microtubos de 0,2 mL. Os componentes são submetidos a ciclos de temperatura em um termociclador. Os ciclos contêm uma temperatura de desnaturação, geralmente 94°C, uma temperatura de anelamento e uma temperatura de extensão. O número de ciclos é de cerca de 30-35. Em todas as reações de PCR, é importante a realização de um controle positivo e um negativo. A revelação da reação de PCR sempre é feita por eletroforese em gel de agarose com o uso de um corante de DNA, por exemplo, brometo de etídeo (BROWN, 2006).

A amplificação por PCR pode ocorrer com uma DNA polimerase de alta fidelidade, como, por exemplo, a *pfx50*, originária da arqueia *Thermococcus zilligii*, e a *pfu*, originária da arqueia *Pyrococcus furiosus* (LUNDBERG *et al.*, 1991). Esta e outras enzimas de alta fidelidade são capazes de produzir cópias do gene com uma probabilidade mínima de erro (ARNHEIM & ERLICH, 1992; AREZI *et al.*, 2003). No entanto, quando a intenção é apenas identificar a presença de um gene em um vetor, pode-se usar uma enzima menos específica e de menor custo, denominada de *Taq* polimerase, originária de *Thermus aquaticus* (KEOHAVONG & THILLY, 1989).

Todas as reações de PCR realizadas no trabalho foram efetuadas com a enzima *Taq* DNA polimerase da LGC, exceto para amplificação do gene do fator IX, realizada com a enzima *pfx50* DNA polimerase (Invitrogen). As quantidades utilizadas de cada componente da reação de PCR com a *Taq* DNA polimerase da LGC estão descritas na Tabela 4.1. A reação de PCR para amplificação do fator IX será descrita no item 4.10.3.

**Tabela 4.1.** Componentes e volumes adicionados nas reações de PCR efetuadas neste trabalho com enzima *Taq* DNA polimerase da LGC.

Componentes	Volume ( $\mu\text{L}$ )
água ultrapura	19,85
dNTP (25 mM)	0,20
Tampão (10 X conc.)	2,50
Magnésio (50 mM)	0,75
<i>primer fwr</i> (25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,25
<i>primer rev</i> (25pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,25
<i>Taq</i> polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,20
DNA molde	1,00
Total	25,00

A programação dos ciclos variou de acordo com a temperatura de anelamento ( $T_m$ ) dos iniciadores utilizados, as quais podem ser encontradas no anexo 1. A programação completa do termociclador Veriti da Applied Biosystems constituiu de uma incubação inicial a 94°C por 5 min., 35 ciclos repetitivos (94°C por 45 seg,  $T_m$  (°C) do iniciador por 45 seg, 72°C por 2 min) e uma incubação final a 72°C por 5 min.

#### **4.8. Eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA**

Para a preparação de um gel de agarose 1% (m/v), 1 g de agarose (Invitrogen) foi dissolvido em microondas por 1 minuto em 100 mL de tampão TBE (dissolveu-se 54g de tris base e 27,5g de ácido bórico em 800 mL de água ultrapura, foram adicionados 20 mL de EDTA 0,5 M, e completou-se o volume para 1 litro com água ultrapura, o pH foi ajustado para 8,3). A solução foi colocada no molde e, quando solidificado, o gel foi submerso em tampão TBE.

As amostras de DNA a serem analisadas e/ou purificadas foram misturadas com uma solução contendo azul de bromofenol (Sigma) 0,25% m/v e xileno cianol FF (Sigma) 0,25% m/v em tampão TBE (tampão de amostra 6x) e aplicadas em cada poço. A separação por eletroforese ocorreu a uma voltagem de 100-120V por 40 minutos. O gel foi corado por imersão em solução contendo brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 10 minutos e visualizado em um transiluminador UV.

#### **4.9. Transformação, seleção de colônias e extração plasmidial**

A transformação é o método para inserir um vetor em bactérias mais usado por ser relativamente simples de proceder e ter uma eficiência alta (PRIMROSE & TWYMAN, 2006). As transformações realizadas neste trabalho foram por transferência plasmidial através de choque térmico conforme, o seguinte procedimento:

- As células competentes da bactéria *E. coli* DH5 $\alpha$  foram retiradas do nitrogênio líquido e colocadas imediatamente no gelo;
- Após o descongelamento das bactérias (150  $\mu$ L de volume no criotubo), o vetor resultante da ligação (sem nenhum tratamento) foi misturado com as bactérias. A mistura foi realizada em um recipiente com gelo e homogeneizada suavemente, sem pipetar;
- O microtubo (1,5 mL) contendo as bactérias e o DNA da ligação permaneceu no gelo por 30 minutos;
- A mistura foi submetida a um choque térmico a 42 °C por 1 minuto em um banho térmico e logo após foi retornada ao gelo;
- À mistura foi adicionado meio de cultivo LB (950  $\mu$ L);
- O microtubo contendo meio de cultivo e bactérias foi incubado por 1 hora a 37°C sob agitação de 190 rpm em um agitador orbital;
- A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 4000 g;
- O sobrenadante foi retirado de maneira que restasse um pequeno volume no tubo para que as bactérias fossem ressuspensas (30  $\mu$ L aproximadamente);
- As bactérias ressuspensas foram adicionadas em uma placa contendo meio sólido Agar LB com ampicilina e espalhadas com uma alça de vidro flambada;
- A placa foi colocada em estufa a 37°C por 15 horas.

A seleção das colônias presentes na placa de meio foi realizada por PCR utilizando as colônias como DNA molde. Esta reação de PCR funciona da mesma forma que uma PCR comum. A única diferença é que, em vez de adicionar o vetor purificado,

adiciona-se a colônia contida na placa de LB Agar e estria-se a mesma em outra placa com meio sólido (ambas com antibiótico), porém identificando as colônias. Se o resultado da PCR for positivo, é porque o gene de interesse foi inserido com sucesso.

Após a reação de PCR de colônia, uma das colônias positivas foi inoculada em meio LB caldo com ampicilina para propagação, conforme método descrito acima. Após isto, o vetor contendo o gene de interesse foi extraído e purificado com o *kit Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen)

## **4.10. Etapas da construção dos vetores de expressão em células animais**

### **4.10.1. Insetos e vetores**

Os insertos utilizados nas clonagens foram: o cDNA do fator IX, de 1,4 kb (ATCC clonado no vetor pCMV5FIX) e os cDNAs das enzimas responsáveis pelas modificações pós-tradução do fator IX, a  $\gamma$ -carboxilase, de 2,3 kb (ATCC clone 68666, vetor pCMV.hGC+), a VKORC1, de 0,589 kb (Invitrogen ID 3944530, vetor pOTB7) e a PACE, de 2,4 kb (ATCC clone 79822, vetor pSVLfur), sendo que os três cDNAs encontravam-se clonados em vetores pBLUNT. As sequências de nucleotídeos dos genes estão no Anexo 1.

Os vetores utilizados foram: pGEM-T Easy vector (vetor de clonagem de produto de PCR da Promega), pIRES (vetor de expressão em células animais contendo o elemento IRES do vírus EMC para expressão bicistrônica, da Clontech) e pcDNA5/FRT (vetor capaz de se integrar ao genoma das células CHO Flp-In™ em uma região específica, da Invitrogen). As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 mostram os mapas dos

vetores utilizados nas clonagens, pGEM-T Easy, pIRES e pcDNA5/FRT, respectivamente.

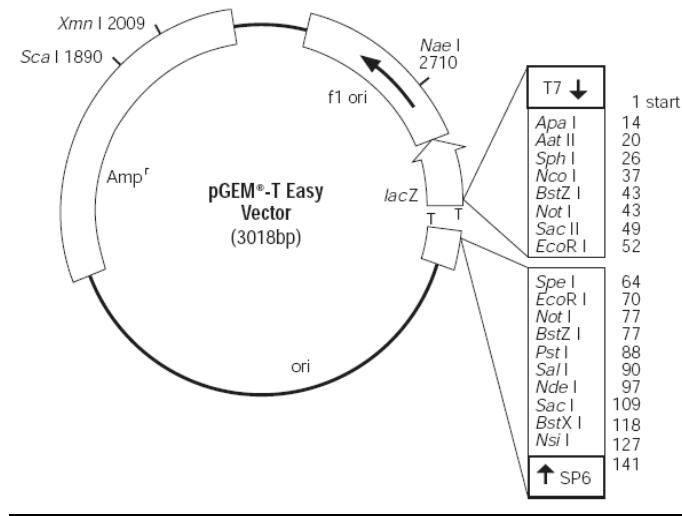


Figura 4.1. Mapa do vetor pGEM-T Easy (Promega).

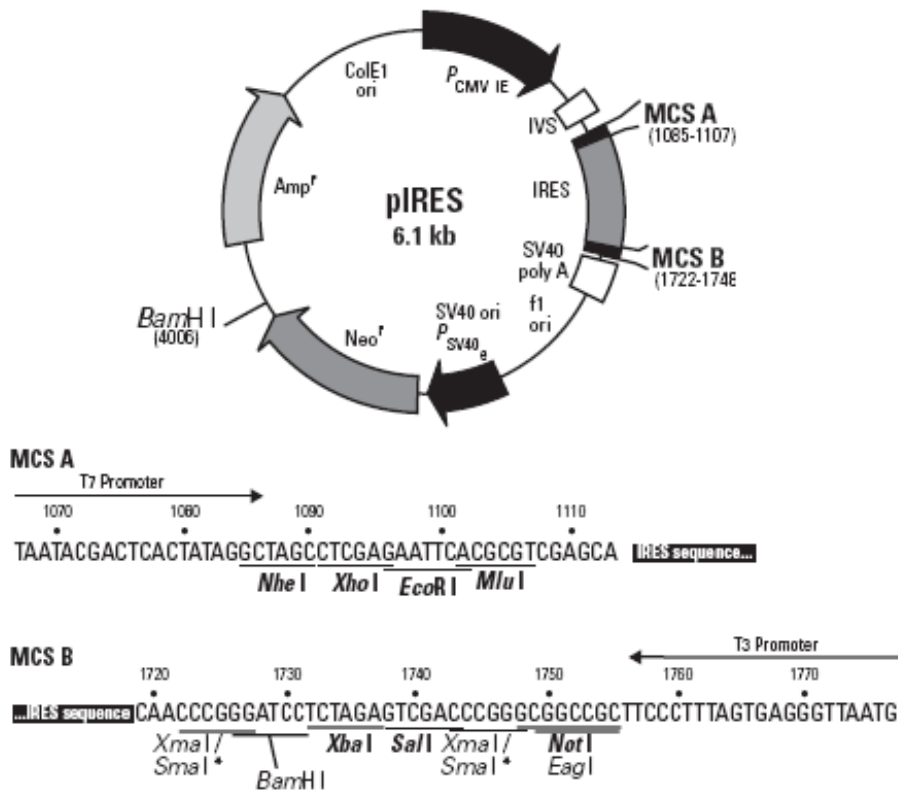
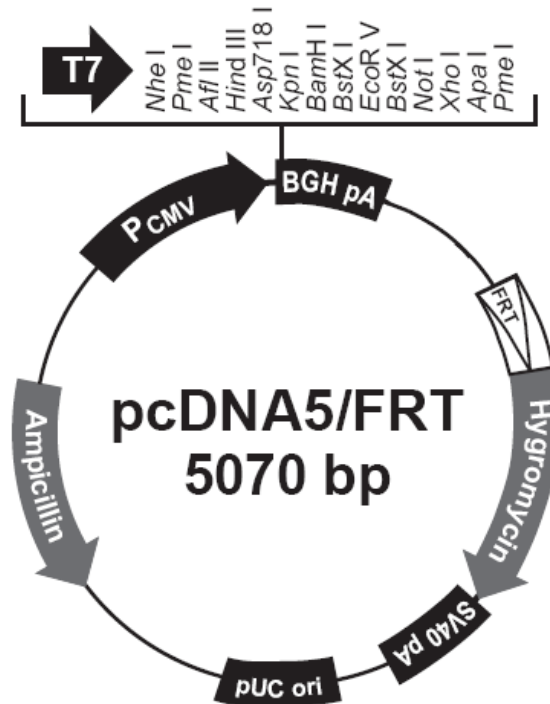


Figura 4.2. Mapa do vetor pIRES (Clontech).





**Figura 4.3.** Mapas do vetor pcDNA5/FRT (Invitrogen).

#### 4.10.2. Montagem da estratégia de clonagem

Anteriormente à realização dos experimentos, foi necessário planejar a estratégia de clonagem. Para isto utilizou-se o programa NEBcutter (disponível na internet através do site <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Este programa foi utilizado com o intuito de verificar quais enzimas de restrição podem ser usadas durante a clonagem, uma vez que, o NEBcutter indica quais endonucleases de restrição clivam a sequência de interesse. Enzimas ou endonucleases de restrição são capazes de fragmentar moléculas de DNA em determinadas sequências/sítios. Estas enzimas estão presentes em bactérias e têm a função de proteger o organismo bacteriano de materiais genéticos estranhos. O nome das enzimas tem origem no nome da espécie bacteriana onde ela é encontrada e o número é referente à ordem em que a enzima foi descoberta. Por

exemplo, a endonuclease *EcoRI* foi a primeira enzima de restrição descoberta da espécie *Escherichia coli* RY 13.

Neste trabalho, as sequências de DNA usadas para a realização das clonagens (fator IX,  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE) foram submetidas à análise no NEBcutter. As enzimas de restrição selecionadas para a construção dos vetores bicistrônicos e dos vetores apenas com o fator IX, também levando em consideração os sítios de restrição existentes nos vetores utilizados, foram: *XhoI*, *AscI*, *MluI*, *XbaI*, *NotI* e *NheI*. A Tabela 4.2 mostra as especificações das endonucleases utilizadas.

**Tabela 4.2.** Especificações das enzimas de restrição utilizadas (NEW ENGLAND BIOLABS, 2009).

<b>Enzima</b>	<b>Tampão *</b>	<b>BSA **</b>	<b>Temp.</b>
<i>AscI</i>	4	Não	37°C
<i>NheI</i>	2	Sim	37°C
<i>XhoI</i>	2	Sim	37°C
<i>MluI</i>	3	Não	37°C
<i>NotI</i>	3	Sim	37°C
<i>XbaI</i>	2	Sim	37°C

\* Composição dos tampões:

**Tampão 2:** 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM ditioneitol (pH 7.9)

**Tampão 3:** 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM ditioneitol (pH 7.9)

**Tampão 4:** 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 50 mM acetato de potássio, 1 mM ditioneitol (pH 7.9)

\*\*BSA: Necessária a adição de soroalbumina bovina (10 mg/mL)

#### **4.10.3. Inserção do cDNA do fator IX no vetor de clonagem pGEM-T Easy vector**

A sequência do fator IX, clonada no vetor fornecido pela ATCC (pCMV5FIX), foi amplificada por PCR. Os iniciadores utilizados na amplificação da sequência do fator IX possuíam as enzimas de restrição *XhoI*, no iniciador *forward* (ou senso, ou direto) e *AscI*, no iniciador *reverse* (ou antisenso, ou reverso. A reação de PCR para

amplificação do cDNA do fator IX está descrita na Tabela 4.3. A programação do termociclador utilizada nesta reação foi: Incubação inicial a 94 °C por 2 min, 35 ciclos repetitivos (94 °C por 15 s, 54 °C por 30 s e 68 °C por 1 min e 30 s) e uma incubação final a 68 °C por 5 min. A banda resultante da PCR foi retirada do gel de eletroforese e purificada com o *Kit* de purificação da GE (*GFX PCR DNA and gel band purification*). Após a purificação do produto de PCR, foi necessária a adição de uma adenina às extremidades do fragmento, para que o mesmo fosse ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy. Para adicionar a adenina foram misturados 21,35 µL de DNA do fator IX purificado, 0,2 µL de dNTP, 0,2 µL da enzima *Taq* DNA polimerase da LGC (enzima que não é de alta fidelidade), 2,5 µL do tampão da polimerase e 0,75 µL de magnésio. A mistura foi colocada a 72 °C por um período de 15 min.

**Tabela 4.3.** Composição da reação de PCR para a amplificação do gene do fator IX.

<b>Componentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
Água ultrapura	41,7
dNTP (25 mM)	0,4
Tampão pol. (10x conc.)	5,0
Magnésio (50 mM)	1,5
<i>primer</i> FIX-fwr (25 pmol/µL)	0,5
<i>primer</i> FIX-rev (25 pmol/µL)	0,5
<i>pfx50</i> (5 U/µL)	0,4
Total	50,0

Após a adição de uma adenina em cada extremidade, o cDNA do fator IX foi inserido no vetor pGEM-T Easy através de uma reação de ligação a 4 °C por 16 horas. Os componentes da reação de ligação foram: 3,5 µL do inserto (cDNA do fator IX com uma adenina acrescentada), 0,5 µL do vetor pGEM-T Easy vector da Promega, 1 µL da enzima ligase (T4 DNA ligase, Promega) e 5 µL do tampão da ligase.

Efetuada a ligação, os 10 µL de solução de DNA da reação de ligação foram usados na transformação de bactérias competentes e as colônias positivas foram selecionadas por PCR de colônia. Os iniciadores da reação de PCR de colônia para o gene do fator IX inserido no pGEM-T Easy foram: FIX-fwr e Sp6. A programação de temperatura foi: 94 °C por 2 min, 30X (94 °C por 15 s, 50 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e 30 s). Por fim, o plasmídeo foi extraído e purificado.

Para confirmar a presença do fator IX no pGEM-T Easy foi realizado, com o vetor purificado, uma dupla digestão com as enzimas *XhoI* e *AscI* e uma reação de PCR com os *primers* FIX-fwr e FIX-rev. Os componentes das reações de digestão estão descritos na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Componentes da reação de digestão para a confirmação do fator IX no vetor pGEM-T Easy (a reação ocorreu a 37 °C por 2 horas).

Componentes da mistura reacional	Volume (µL)
Vetor purificado pGEM-T Easy+FIX	7
Tampão NEB 4	2
<i>XhoI</i> (20000 U/mL)	1
<i>AscI</i> (3000 U/mL)	1
BSA NEB (0,1 mg/mL)	2
Água ultrapura	7
Total	20

#### 4.10.4. Clonagem do cDNA do fator IX no vetor de expressão pIRES

Para efetuar a clonagem do fator IX no vetor pIRES foram realizadas duas digestões: o vetor pGEM-T Easy contendo o cDNA do fator IX foi digerido com as enzimas *XhoI* e *AscI*, como descrito na Tabela 4.4, e o vetor pIRES, previamente purificado com o *kit* de *miniprep* da empresa Invitrogen, foi digerido com as enzimas *XhoI* e *MluI*, como descrito na Tabela 4.5. A ligação de fragmentos digeridos com *XhoI* e *AscI* (cDNA do fator IX) com os vetores digeridos com *XhoI* e *MluI* é possível, pois o sítio de restrição da enzima *AscI* é compatível com o sítio da enzima *MluI*. Contudo,

após a ligação é gerada uma nova sequência, não sendo possível uma nova digestão com nenhuma das duas enzimas (NEW ENGLAND BIOLABS, 2009).

Após as digestões dos vetores pGEM-T Easy+FIX e pIRES, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose para separar as bandas digeridas. As bandas do fragmento correspondente ao cDNA do fator IX e do vetor pIRES linearizado foram retiradas do gel e purificadas com o *Kit GFX PCR DNA and gel band purification* (GE). Após isto, foi realizada a ligação do inserto (cDNA do fator IX digerido com *XhoI* e *AscI*) com o vetor pIRES digerido com *XhoI* e *MluI*. Estas enzimas foram escolhidas de forma a inserir o cDNA no primeiro cístron (no MCSA, conforme Figura 4.2). Esta ligação e todas aquelas dos itens a seguir, diferentemente da ligação no pGEM-T Easy, foram realizadas a 16°C por 16 horas, sendo os componentes: 7 µL do inserto, 1 µL do vetor linearizado, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (NEB) e 1 µL do tampão da ligase.

**Tabela 4.5.** Digestão do pIRES com *XhoI* e *MluI*.

Componentes da mistura reacional	Volume (µL)
Vetor pIRES purificado	10
Tampão NEB 3	2
<i>XhoI</i> (20000 U/mL)	1
<i>MluI</i> (10000 U/mL)	1
BSA NEB (0,1 mg/mL)	2
Água ultrapura	4
Total	20

O produto resultante de ligação do cDNA do fator IX com o vetor pIRES foi usado na transformação de bactérias, que foram selecionada por PCR de colônia com os iniciadores universais T3 e T7. O vetor de uma das colônias positivas foi extraído e purificado. Para confirmar a presença do cDNA do fator IX no pIRES, o vetor

purificado foi submetido a uma reação de PCR com as combinações de iniciadores T7/T3 e T7/FIX-rev.

#### 4.10.5. Clonagem dos cDNAs da $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE no vetor pIRES contendo gene do fator IX

O cDNA das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE foram inseridos no vetor pIRES contendo o cDNA do fator IX na posição MSCB (Figura 4.2). As sequências das enzimas estavam clonadas no vetor de clonagem pBLUNT, com sítios das enzimas de restrição *XbaI* e *NotI* nas extremidades das três sequências. Portanto, foram realizadas três digestões com *XbaI* e *NotI* para retirar os cDNAs das enzimas do pBLUNT e uma digestão do vetor pIRES + fator IX com *XbaI* e *NotI*. Os volumes utilizados para cada componente estão descritos na Tabela 4.6. As digestões foram realizadas a uma temperatura de 37 °C por 2 horas, tendo aproximadamente 3000 ng de DNA, no mínimo, em cada reação. As concentrações dos vetores, medidas por absorbância, eram: pBLUNT+  $\gamma$ -carb: 295,3 ng/ $\mu$ L; pBLUNT+VKORC1: 403 ng/ $\mu$ L; pBLUNT+PACE: 375 ng/ $\mu$ L, e FIX+pIRES: 674 ng/ $\mu$ L.

**Tabela 4.6.** Volumes adicionados nas reações de digestão para clonagem das enzimas no vetor Fator IX+pIRES.

Componentes da mistura reacional	Volumes ( $\mu$ L)			
	pBLUNT + $\gamma$ -carb	pBLUNT+ VKORC1	pBLUNT+PACE	FIX+pIRES
Vetores purificados	10	7,4	8	8
Tampão NEB 3	2	2	2	2
<i>XbaI</i> (20000 U/mL)	1	1	1	1
<i>NotI</i> (10000 U/mL)	1	1	1	1
BSA (0,1 mg/mL)	2	2	2	2
água ultrapura	4	6,6	6	6
Total	20	20	20	20

Em seguida, os insertos (cDNA da  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE) e o vetor pIRES+fator IX digeridos com *XbaI* e *NotI* foram purificados do gel de agarose com o

*Kit GFX PCR DNA and gel band purification* (GE). As ligações foram realizadas com volumes de 1 µL do vetor, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Promega), 1 µL do tampão da ligase e 7 µL de inserto. O produto de ligação foi usado na transformação em bactérias e as colônias foram selecionadas por PCR de colônia com a utilização das seguintes combinações de *iniciadores*: para o vetor pIRES+FIX+VKORC1, T3/VKORC1-fwr; para o vetor pIRES+FIX+γ-carb, T3/γ-carb-fwr; para o vetor pIRES+FIX+PACE, T3/PACE-fwr. Uma colônia positiva de cada construção foi propagada em meio LB com ampicilina e, em seguida, os 3 vetores foram extraídos e purificados.

Para confirmar a presença do gene do fator IX e das enzimas (γ-carboxilase, VKORC1 e PACE) no pIRES, foram realizadas reações de PCR com os seguintes iniciadores: para o vetor pIRES+FIX+γ-carb, carb-fwr/carb-rev, T3/carb-fwr, T7/FIX-rev e FIX-fwr/FIX-rev; para o vetor pIRES+FIX+PACE, T3/PACE-fwr e T7/FIX-rev; para o vetor pIRES+FIX+VKORC1, T3/T7, FIX-fwr/VKORC1-rev. A reação de PCR com os iniciadores T3/T7 foi utilizada somente para o vetor com o fragmento menor de 2,7 kb (vetor pIRES+FIX+VKORC1), pois os fragmentos de 4,3 kb (vetor pIRES+FIX+γ-carb) e 4,4 kb (vetor pIRES+FIX+PACE) ultrapassavam a capacidade de extensão da enzima DNA polimerase.

#### **4.10.6. Clonagem do cDNA do fator IX no vetor pcDNA5/FRT**

Para efetuar a clonagem do cDNA do fator IX no vetor pcDNA5/FRT, vetor que é capaz de se integrar de forma direcionada em uma região do genoma com alta atividade transcricional, foi necessário digerir o vetor pGEM-T Easy contendo o cDNA do fator IX com a enzima de restrição *NotI*, pois esta digestão cliva o cDNA do fator IX nas extremidades, não comprometendo a integridade do cDNA, obtendo-se

uma banda ~1,6 kb, pois os sítios da enzima de restrição *NotI* está 100 pb à jusante e 100 pb à montante das extremidades do cDNA do fator IX, que possui 1,4 kb. O vetor pcDNA5/FRT foi também digerido com a enzima de restrição *NotI*. As digestões estão descritas na Tabela 4.7. Na clonagem utilizando apenas um sítio de restrição, pode ocorrer religamento do vetor e o inserto pode ser ligado no sentido contrário de leitura da sequência, ou seja, o códon de iniciação (ATG) estará no final do gene, portanto nenhuma proteína será expressa. Neste caso, a probabilidade de se obter colônias positivas é menor.

**Tabela 4.7.** Digestões para clonagem do gene do fator IX no pcDNA5/FRT.

Componentes da mistura reacional	Volumes ( $\mu\text{L}$ )	
	FIX+pGEM-T Easy (384ng/ $\mu\text{L}$ )	pcDNA5/FRT (301ng/ $\mu\text{L}$ )
Vetores purificados	7	10
Tampão NEB 3	2	2
BSA NEB (0,1 mg/mL)	2	2
<i>NotI</i> (10000 U/mL)	1	1
água ultrapura	8	5
Total	20	20

As bandas do gel de agarose contendo o cDNA do fator IX digerido com *NotI* nas extremidades e o vetor pcDNA5/FRT linearizado a partir da digestão com *NotI* foram extraídas e purificadas com o *Kit GFX PCR DNA and gel band purification* (GE). A ligação ocorreu da mesma forma que no item anterior (4.10.5), com 1 $\mu\text{L}$  de vetor e 7 $\mu\text{L}$  de inserto. A ligação foi transformada em bactérias, que foram espalhadas em placas contendo meio sólido LB Agar com ampicilina. As colônias foram selecionadas por PCR de colônia realizado com os iniciadores T7/FIX-rev. Uma das colônias positivas foi propagada em caldo LB com ampicilina. Em seguida, o vetor pcDNA5/FRT contendo o cDNA do fator IX foi extraído e purificado com o *kit Pure Link<sup>TM</sup> Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen).



Para confirmar a presença do cDNA do fator IX no pcDNA5/FRT, foi realizada uma reação de PCR com os iniciadores T7/BGhr e T7/FIX-rev. Esta última combinação de iniciadores, se positiva, prova que a sequência do fator IX está na posição correta.

#### 4.10.7. Clonagem das sequências do fator IX+IRES+enzimas ( $\gamma$ -carboxilase e VKORC1) no pcDNA5/FRT

Para clonar as três sequências (fator IX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase ou fator IX+IRES+VKORC1) simultaneamente no vetor pcDNA5/FRT, foi necessário realizar digestões com as enzimas de restrição *NheI* e *NotI*. O vetor pIRES contendo as sequências do fator IX+IRES+VKORC1 e o vetor pIRES contendo as sequências do fator IX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase, assim como o vetor pcDNA5/FRT, foram digeridos com as endonucleases *NheI* e *NotI* (Tabela 4.8).

**Tabela 4.8.** Digestões para clonagem do fator IX+IRES+enzimas no pcDNA5/FRT.

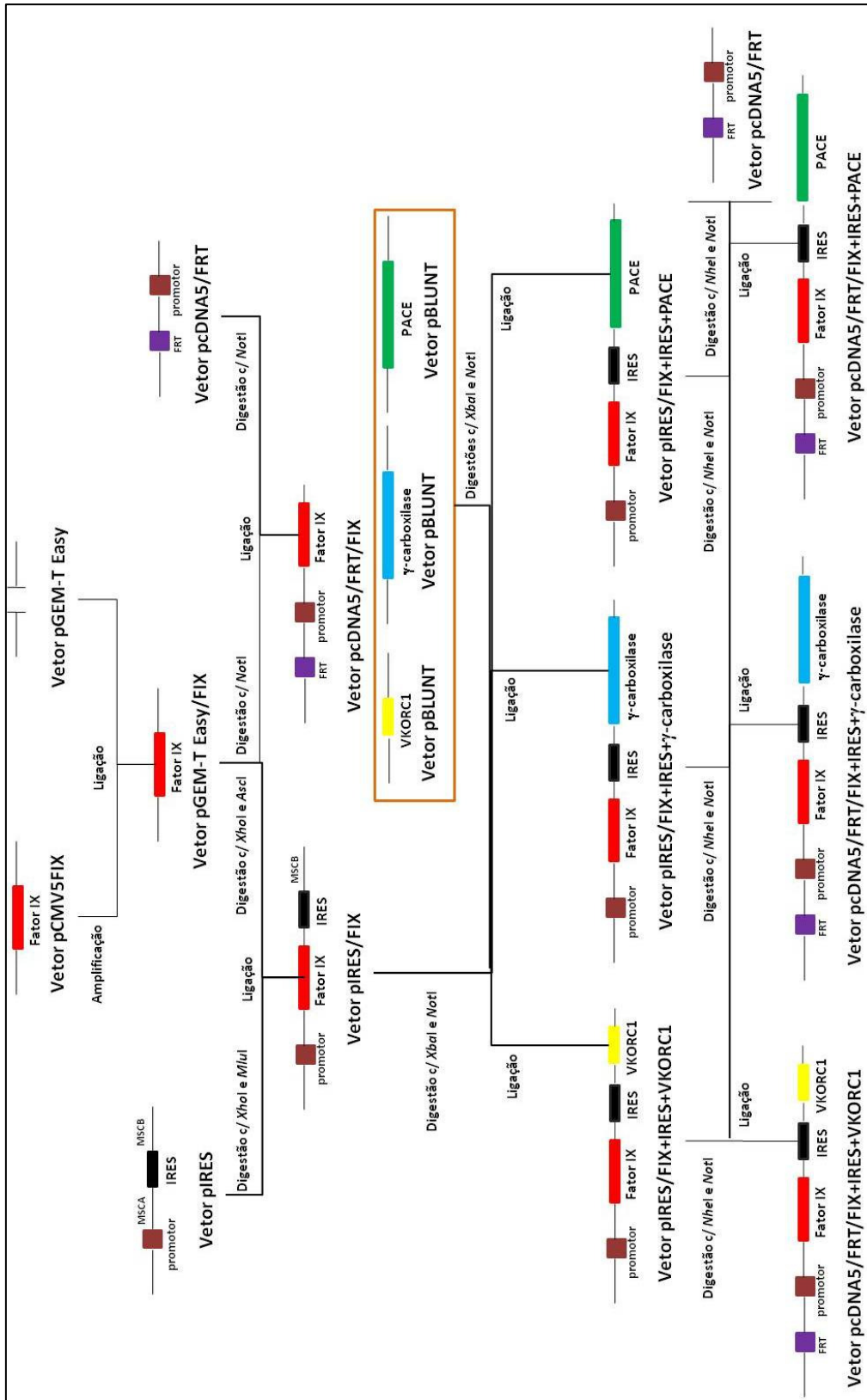
Componentes da mistura reacional	Volumes ( $\mu$ L)		
	FIX+IRES+VKORC1/pIRES (662 ng/ $\mu$ L)	FIX+IRES+ $\gamma$ -carb/pIRES (259 ng/ $\mu$ L)	pcDNA5/FRT (301 ng/ $\mu$ L)
Vetores purificados	7	11,5	10
Tampão NEB 2	2	2	2
BSA NEB (0,1 mg/mL)	2	2	2
<i>NheI</i> (10000 U/mL)	1	1	1
<i>NotI</i> (10000 U/mL)	1	1	1
água ultrapura	7	2,5	4
Total	20	20	20

As bandas correspondentes aos fragmentos fator IX+IRES+VKORC1 e fator IX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase, assim como a banda correspondente ao vetor pcDNA5/FRT linearizado, foram extraídas do gel de eletroforese e purificadas com o *Kit GFX PCR DNA and gel band purification* (GE). As ligações foram efetuadas da mesma forma que as anteriores. Após transformação em bactérias e seleção com ampicilina, as colônias

foram selecionadas com os iniciadores VKORC1-fwr/VKORC1-rev, para o vetor contendo os genes fator IX+IRES+VKORC1/pcDNA5/FRT, e carb-fwr/carb-rev, para o vetor contendo os genes fator IX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase/pcDNA5/FRT. Os vetores foram extraídos e purificados com o *kit Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen).

Para confirmar a presença dos genes inseridos no pcDNA5/FRT, foram realizadas reações de PCR com as combinações de iniciadores (os valores entre parênteses correspondem aos tamanhos de bandas esperados): T7/FIX-rev (1,5 kb) e carb-fwr/BGHr (2,4 kb), para o vetor fator IX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase/pcDNA5/FRT, e as combinações de iniciadores T7/FIX-rev (1,5 kb) e VKORC1-fwr/BGHr (0,6 kb), para o vetor fator IX+IRES+VKORC1/pcDNA5/FRT. A Figura 4.4 mostra um resumo da estratégia de clonagem utilizada. O iniciador BGHr está 100 pb à jusante dos fragmentos inseridos no vetor pcDNA5/FRT, por isso os tamanhos de banda esperados estão maiores 100 pb.

A proposta inicial era clonar o cDNA da enzima PACE também no vetor pcDNA5/FRT, para construir o vetor fatorIX+IRES+PACE/pcDNA5/FRT. Contudo, não foi possível realizar esta etapa devido à baixa concentração obtida em todas as extrações do vetor fatorIX+IRES+PACE/pIRES. Apesar de não ter sido realizada, esta etapa está descrita no esquema mostrado na Figura 4.4.



**Figura 4.4.** Esquema resumido da estratégia de clonagem.

#### **4.11. Quantificação dos vetores**

Todos os vetores construídos foram quantificados por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000 (Termo Scientific), que permite analisar amostras de 1 µL.

#### **4.12. Sequenciamento dos vetores**

O sequenciamento dos insertos clonados em todos os vetores construídos foi realizado pela empresa Macrogen, localizada na Coreia. Os iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento de cada cDNA utilizado neste trabalho estão no Anexo 1.

#### **4.13. Transfecção nas células CHO Flp-In<sup>™</sup>**

As transfecções foram realizadas por lipofecção, que consiste em uma técnica na qual o DNA a ser inserido na célula é misturado com um reagente lipídico (Lipofectamine 2000, Invitrogen), o qual aprisiona o DNA em micelas que, ao entrarem em contato com a membrana celular, que também possui natureza lipídica, são capazes de atravessar a mesma, transportando o DNA para o interior da célula e posteriormente para o núcleo, onde será integrado ao genoma (PRIMROSE & TWYMAN, 2006). As lipofecções foram realizadas em placas de cultivo de 24 poços. Os poços foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células 24 horas antes da transfecção. Cada poço foi preenchido com 500 µL de meio de cultivo DMEM-F12 com 5% de soro fetal bovino.

##### **4.13.1. Transfecção com os vetores construídos no pIRES**

Para realizar as transfecções dos vetores construídos no pIRES (fator IX/pIRES, fator IX+VKORC1/pIRES, fator IX+γ-carb/pIRES e fator IX+PACE/pIRES) em células CHO, foram utilizados 0,4 µg de vetor e 0,4 µL de lipofctamina (relação 1:1, massa de

DNA por volume de lipofectamina) em cada transfecção. Para realizar uma transfecção, o volume de vetor necessário para se obter 0,4 µg de DNA foi misturado com meio de cultivo sem soro de forma que o volume final fosse de 50 µL. Em um microtubo (volume de 1,5 mL) separado, a quantidade necessária de lipofectamina (0,4 µL) foi diluída em 50 µL de meio sem soro misturando-se gentilmente. A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os 50 µL de lipofectamina + meio sem soro aos 50 µL de DNA + meio sem soro misturando-se gentilmente, a mistura permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos. Após o tempo de incubação, os 100 µL da mistura contendo DNA + lipofectamina + meio sem soro foram adicionados ao poço da placa de 24 poços contendo as células CHO. A placa foi incubada a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Cada transfecção foi feita em triplicata. Para realizar a transfecção controle foram adicionados em um poço da placa 100 µL de meio sem soro apenas contendo lipofectamina.

Após as 24 horas foi realizado um repique, soltando as células dos poços com o uso de 200 µL de tripsina 0,05%. As células foram transferidas para frascos T25 com 5 mL de meio DMEM-F12 contendo 5% de soro fetal bovino e 700 µg/mL do antibiótico G418 (Geneticina da marca Sigma). O meio foi trocado de 5 em 5 dias até o controle morrer completamente, quando então, as células foram consideradas estáveis. As células foram mantidas com antibiótico durante dois meses. Ressalta-se que, no presente trabalho, não foi realizada seleção de clones. Portanto, todas as análises foram realizadas com populações de clones heterogêneos, denominadas de transfectomas, e não com populações de um único clone altamente produtor de fator IX, denominadas de populações clonais.

#### **4.13.2. Transfecção com os vetores construídos no pcDNA5/FRT**

Os vetores construídos no pcDNA5/FRT (fator IX/pcDNA5, fator IX+IRES+VKORC1/pcDNA5 e fator IX+IRES+ $\gamma$ -carb/pcDNA5) foram transfectados em células CHO Flp-In<sup>TM</sup> com o mesmo procedimento descrito para as transfecções com o vetor pIRES. Contudo, foi necessário co-transfectar o vetor pOG44, responsável por expressar a recombinase, que atua na integração sítio-dirigida. Portanto foram adicionados 0,2  $\mu$ g de vetor pcDNA5/FRT e 1,8  $\mu$ g de vetor pOG44 (relação 1 de pcDNA5/FRT : 9 de pOG44). A relação de DNA e lipofectamina foi a mesma do item 4.13.1 (2  $\mu$ g de DNA para 2  $\mu$ L de lipofectamina para cada transfecção).

Para seleccionar as células transfectadas com o vetor pcDNA5/FRT foram adicionados 700  $\mu$ g/mL do antibiótico higromicina B da Sigma. O procedimento foi idêntico ao realizado para as transfecções com o vetor pIRES, somente foi alterado o antibiótico. A transfecção com o vetor de integração sítio-dirigida (pcDNA5/FRT) gera transfectomas mais homogêneas do que a transfecção com o vetor de integração aleatória (pIRES). Isto implica em grande probabilidade de obtenção de uma maior quantidade de clones altamente produtores em um transfectoma.

#### **4.14. Técnicas analíticas**

##### **4.14.1. Determinação da concentração celular**

A concentração de células viáveis foi determinada ao microscópio óptico (Nikon TS 100P) em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de trypan, o qual é capaz de corar apenas células mortas, pois apenas quando danificada a membrana celular é permeável a este corante.

Após o repique das células aderentes com tripsina, uma alíquota de 1 mL de suspensão celular foi retirada. Misturou-se 100 µL de suspensão celular com 100 µL de corante azul de trypan (diluição 1:2), homogeneizando bem a mistura. Com uma micropipeta, retirou-se 20 µL da mistura, adicionando-se à câmara de Neubauer um volume suficiente para preencher o espaço entre a lâmina e a câmara, encostando-se a ponta da micropipeta na lâmina. Com o uso de um microscópio óptico, as células viáveis (não coradas pelo azul de tripan) presentes nos quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer foram contadas. Foi feita uma média aritmética com a contagem dos 4 quadrantes. O valor da contagem foi multiplicado pelo valor da diluição (no caso da diluição realizada neste trabalho, multiplicado por 2) e por  $10^4$  (considerando que cada quadrante tem volume de  $10^{-4}$  mL), obtendo-se a concentração celular em células por mL.

#### **4.14.2. Análise de fator IX total produzido por imunoenensaio do tipo ELISA**

A determinação do fator IX total produzido pelas células foi realizada por um imuno-ensaio do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) competitivo. A quantificação foi realizada mediante a comparação das amostras com uma quantidade conhecida de padrão. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com a proteína padrão de fator IX humano (HuFactorIX – ProSpec Tany Techno Gene). A sensibilização consistiu em adicionar 100 µL por poço de solução de fator IX padrão diluído em tampão de sensibilização (2,1 g de  $\text{NaHCO}_3$  + 1,3 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em 1 mL de água, pH igual a 9,6), a concentração de 250 ng/mL (25 ng/poço). Incubou-se por 1 hora a 37 °C e, posteriormente, durante a noite a 4 °C. Em seguida, lavou-se por 6 vezes consecutivas em PBS + TWEEN 20 0,05% e realizou-se o bloqueio dos sítios de ligação inespecífica com 200 µL de PBS (7,4) + BSA 1% por poço, por 1 hora a 37 °C. A curva padrão foi feita por diluição seriada de 1:2, em duplicata. A faixa de concentração do padrão foi de

12,5 µg/mL até 0,012 µg/mL. Nos poços restantes, foram adicionados 50 µL das amostras. Em seguida foram adicionados mais 50 µL do anticorpo primário (Sheep anti factor IX - BIODESIGN) diluído 1:20000 em solução diluente (5 mL de solução de lavagem em 45 mL de solução de bloqueio). A placa foi incubada a 37 °C em câmara úmida por 2 horas. Após lavagem da placa, novamente por 6 vezes, foram adicionados 100 µL de anticorpo secundário (Anti-sheep IgG-Sigma) diluído 1:15000 em solução diluente. Após 1 hora de incubação a 37 °C em câmara úmida e nova lavagem, foram adicionados 200 µL de solução de revelação (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM + MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH igual a 9,8, acrescida de p-nitrofenolfosfato 1 mg/mL), incubando-se a placa a 37 °C em câmara úmida. Quando apareceu uma coloração amarela (aproximadamente 40 minutos) foi realizada a leitura da placa a uma absorvância de 492 nm em leitor de microplacas (PowerWave XS, Biotek Instruments Inc., EUA). A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de NaOH 3 M em cada poço. Após a interrupção uma nova leitura foi realizada.

### **Análise dos resultados e cálculo da produtividade específica de fator IX**

Os dados obtidos após a leitura de absorvância das microplacas dos ensaios ELISA foram exportados para uma planilha em Excel. Quando traçado em escala bilogárítmica, os dados da curva padrão, de absorvância versus concentração de fator IX, apresentaram comportamento sigmoidal. Com o auxílio do programa Origin 6.1, foi ajustada uma curva sigmoidal aos dados. Na região linear da curva, foi feita uma regressão linear, obtendo-se a equação de uma reta para aquele trecho. Com os parâmetros da equação obtida, pôde-se calcular a concentração referente aos dados de absorvância obtidos para as amostras. As concentrações obtidas foram transformadas de µg/mL para pg/mL e a produtividade específica ou velocidade específica de produção, em pg/cel/dia, foi calculada de acordo com a equação (FOGOLÍN, 2002):



$$q_{\text{FIX}} = \frac{C_{\text{FIX}2} - C_{\text{FIX}1}}{(t_2 - t_1) (X_1 \cdot X_2)^{1/2}}$$

Onde:

$q_{\text{FIX}}$ : Produtividade de fator IX, em pg/cel/dia;

$\Delta C_{\text{FIX}} = (C_{\text{FIX}2} - C_{\text{FIX}1})$ : Diferença de concentração de fator IX no intervalo de tempo considerado, em pg/mL

$X_1$ : Concentração de células viáveis no tempo  $t_1$ , em Cel/mL;

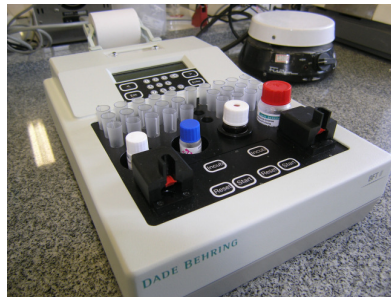
$X_2$ : Concentração de células viáveis no tempo  $t_2$ , em Cel/mL;

$\Delta t = (t_2 - t_1)$ : Intervalo de tempo ( $t_2 - t_1$ ), em dias.

#### 4.14.3. Análise de fator IX ativo por ensaio de coagulometria

Para analisar a atividade do fator IX funcional produzido, foi medida a atividade coagulante das amostras. Antes da realização do ensaio de coagulometria, as populações de células CHO confluentes, cultivadas em frascos T25, foram submetidas a uma troca de meio. Descartou-se 5 mL de meio velho contendo soro fetal bovino e, em seguida, após lavagem com meio sem soro, acrescentou-se 5 mL de meio sem soro com 5  $\mu\text{g/mL}$  de vitamina K (Kanakion MM da Roche) ao frasco T25. A literatura mostra que 5  $\mu\text{g/mL}$  é uma concentração ótima de vitamina K, pois acima deste valor o fator IX produzido mantém sua atividade constante (KAUFMAN *et al.*, 1986). Além disso, a ausência de vitamina K no meio não impede a detecção do fator IX por imunoenensaio do tipo ELISA, sendo sua utilização necessária somente para que o mesmo esteja presente na forma ativa e sua atividade coagulante seja determinada (KAUFMAN *et al.*, 1986). As células foram cultivadas a 37 °C por 24 horas. Após este tempo, foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada cultivo para serem submetidas à análise de fator IX funcional produzido.

O ensaio de coagulometria denominado de TTPa (Tempo de Tromboplastina Parcial ativada) consiste em mimetizar a coagulação sanguínea *in vitro*. Para isto, usam-se quatro reagentes na reação: o plasma deficiente no fator sanguíneo que se deseja analisar (VIII ou IX), uma solução de fosfolípidos, uma solução de  $\text{CaCl}_2$  para ser usado como fonte de  $\text{Ca}^{++}$  e a amostra de sobrenadante de células (ou o plasma padrão, no caso da curva padrão). Após a mistura de todos os componentes em uma cubeta contendo um agitador magnético, o processo de coagulação se iniciará e o tempo para atingir a coagulação depende da concentração de fator ativo na amostra. Este tempo é medido pelo equipamento denominado de coagulômetro (Figura 4.4). A atividade é medida em UI/mL ou em porcentagem de fator IX ativo, sendo que 1 UI/mL (ou 100%) corresponde à concentração de fator IX ativo no plasma normal.



**Figura 4.4.** Coagulômetro (BFT, Dade Behring) usado para determinar a atividade do fator IX.

Os ensaios de coagulometria foram realizados no coagulômetro da Dade Behring (Figura 4.4). Antes de começar o ensaio, o coagulômetro foi ligado com antecedência de pelo menos 20 minutos para a temperatura estabilizar em 37 °C. Tanto o plasma normal (Stago) quanto o deficiente de fator IX (Stago) utilizados estavam liofilizados, sendo necessário ressuspender ambos em água ultrapura e deixá-los a 37 °C por 20 minutos nos compartimentos apropriados presentes no coagulômetro. O ensaio é feito sempre em duplicata ou triplicata.

Utilizou-se 40 µL de cada reagente em uma reação, na seguinte sequência de ações: (1) adicionou-se o plasma deficiente em fator IX; (2) adicionou-se o plasma normal diluído (curva padrão) ou a amostra diluída; (3) adicionou-se a solução com fosfolípídeos (Cefalina-Pathrontin SL, Dade Behring); moveu-se a cubeta para dentro da área de leitura do equipamento; em seguida, iniciou-se a contagem do tempo de incubação; (4) após o tempo de incubação de dois minutos, adicionou-se o CaCl<sub>2</sub> (Dade Behring) para disparar a reação; (5) obteve-se o tempo de coagulação medido pelo aparelho, após o mesmo detectar que a amostra havia coagulado..

A curva padrão foi construída diluindo-se o plasma normal em tampão imidazol (11,7 g/L de NaCl + 6,8 g/L de imidazol, pH 7,35) contendo 8,15 mg/L de vermelho de fenol (concentração usada no meio de cultivo), pois foi verificado que esta substância interfere na determinação óptica do tempo de coagulação. A curva foi construída da seguinte forma: diluição 1:2 (100% ou 1 UI/mL), 1:4 (50%), 1:10 (20%), 1:20 (10%) e 1:200 (1%). O logaritmo decimal das atividades e dos tempos brutos medidos foi calculado e os dados foram usados para traçar uma curva padrão para a qual obteve-se a equação de uma reta. As amostras foram diluídas 1:2 em tampão imidazol, pois é prática dominante nos laboratórios de hemoterapia considerar 100% da curva padrão como correspondendo a uma diluição do plasma normal 1:2. A produtividade específica, desta vez em termos de fator IX funcional, foi determinada em UI de fator IX produzido pelas células em 24 horas (UI/cel/dia), segundo equação análoga à utilizada no cálculo relativo ao fator IX total. A atividade específica foi determinada em UI de fator IX produzido em relação à quantidade total de fator IX quantificada por ELISA (UI/µg).

Todas as amostras foram submetidas ao mesmo ensaio de coagulometria no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), obtendo-se resultados semelhantes. Contudo, o ensaio de coagulometria do HEMORIO

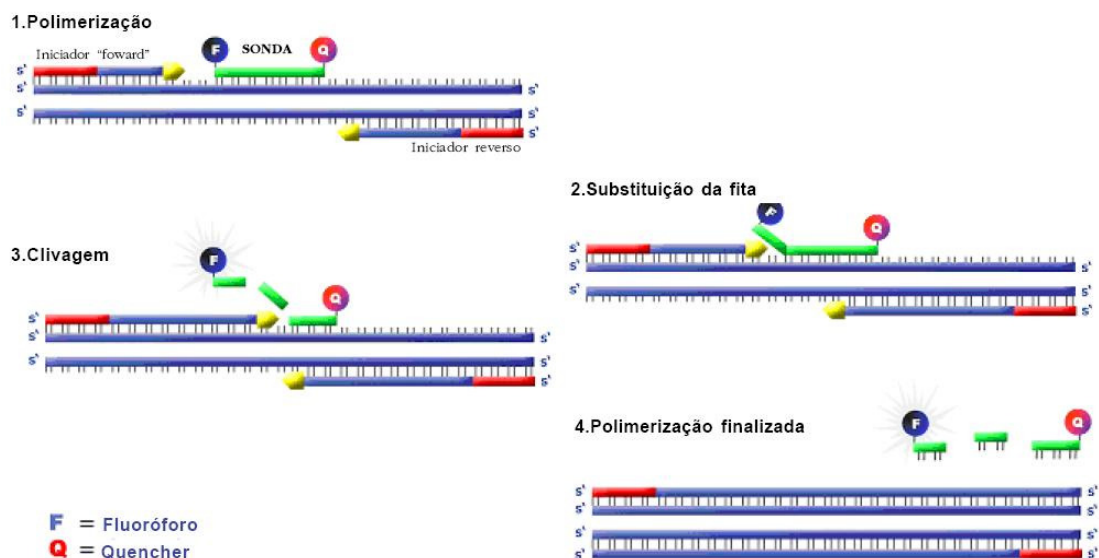
é realizado de maneira automática, não havendo interferência de erro do operador. Por isso os resultados do HEMORIO obtiveram um erro experimental menor.

#### **4.14.4. Análise da expressão dos genes inseridos nas células CHO Flp-In™ por PCR em tempo real**

A técnica de PCR em tempo real é atualmente a mais usada quando se pretende confirmar a expressão de um gene e comparar o nível de RNAm entre diferentes populações de células (BUSTIN, 2002). O método consiste em transformar o RNA extraído de células em cDNA através do uso da enzima transcriptase reversa (RT-PCR). Com este cDNA, realiza-se uma reação de PCR comum, acrescida de um componente capaz de emitir fluorescência quando um fragmento de DNA é amplificado, sendo possível quantificar o material amplificado com um detector de fluorescência acoplado ao equipamento de PCR em tempo real, tornando quantitativa a reação de PCR. O resultado da reação é analisado em relação ao ciclo da reação de PCR onde ocorre o início da fase exponencial de amplificação gênica, o  $C_t$  (t de *threshold*, ciclo limite em português). O  $C_t$  corresponde ao ciclo onde o detector reconhece que a fluorescência emitida ultrapassou a fluorescência basal, ou seja, a fluorescência passiva do fluoróforo utilizado na reação.

Os principais métodos de detecção de fluorescência são por agentes ligantes de DNA (SYBR Green) e por sondas de hidrólise (Taqman, Lux, Beacons, Scorpions). O SYBR Green é um ligante de DNA que emite fluorescência quando ligado ao DNA dupla fita. Conforme o DNA é amplificado pela *Taq* polimerase, a fluorescência da molécula do SYBR Green aumenta e, no fim da etapa de extensão de cada ciclo da reação de PCR, esta fluorescência é detectada, permitindo o monitoramento da reação pelo equipamento de PCR em tempo real. O SYBR Green tem a capacidade de se ligar a

qualquer DNA dupla fita, ou seja, pode também se ligar em produtos de PCR não específicos e em dímeros de iniciadores, sendo esta sua maior desvantagem. Entretanto, este reagente tem um custo mais baixo, sendo muito utilizado quando o número de amostras é grande. As sondas de hidrólise são específicas para a sequência alvo, descartando a possibilidade de detecção de produtos não específicos. Uma das sondas de hidrólise mais usada é a Taqman (Figura 4.5). Esta sonda consiste em um oligonucleotídeo com um corante fluoróforo repórter na extremidade 5' (como exemplo: 6-carboxifluoresceína ou FAM) e um *quencher* na extremidade 3'. *Quencher* é uma molécula capaz de absorver a energia do fluoróforo (ex.: 6-carboxitetrametilrodamina ou TAMRA). Quando a sonda Taqman está intacta, o *quencher* absorve a energia do fluoróforo impedindo que ocorra a emissão de fluorescência, devido à proximidade de ambos. Pela atividade 5'-exonuclease da *Taq* polimerase, a sonda é hidrolisada e o fluoróforo é separado do *quencher*, resultando no aumento da fluorescência. Apesar da sua alta especificidade, a sonda Taqman tem um alto custo (GIULIETTI *et al.*, 2001).



**Figura 4.5.** Funcionamento da sonda Taqman. Após ocorrer a ligação dos iniciadores e a hibridização da sonda no DNA fita simples, a polimerização se inicia. Quando a DNA polimerase atinge a sonda, ocorre uma hidrólise da mesma, separando o fluoróforo do *quencher* fazendo com que ocorra a emissão de fluorescência, que é detectada pelo aparelho de PCR em tempo real (NOVAIS *et al.*, 2004).

A reação de PCR em tempo real, devido ao número de amostras, foi realizada neste trabalho com o reagente SYBR Green (Applied Biosystems). Antes da reação de PCR em tempo real propriamente dita, o RNA das células transfectadas com o vetor pIRES e com o vetor pcDNA5/FRT, como também o das células não transfectadas, foi extraído com um *kit* comercial (*Pure Link micro-to-midi total RNA purification*, Invitrogen) e quantificado utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000. O mesmo foi transformado em cDNA por RT-PCR utilizando o *kit reverse transcriptase* da Applied Biosystem, sendo os componentes da reação: 10 µL do tampão Taqman RT; 22 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 20 µL de dNTPs; 5 µL de oligo dt (sequência de várias timinas que se anela à cadeia poli A do RNA mensageiro); 2 µL de inibidor de RNase; 2,5 µL de transcriptase reversa e um volume correspondente a 2 µg de RNA extraído, completando-se o volume para 100 µL com água ultrapura.

Todas as reações de PCR em tempo real ocorreram com as seguintes quantidades de reagentes: 5 µL do Mix SYBR Green (Applied Biosystems), 0,5 µL do iniciador senso (25 mM), 0,5 µL do iniciador antisense (25 mM), 1,5 µL de água ultrapura e 2,5 µL de cDNA alvo. Cada reação foi feita em duplicata. Sempre para cada cDNA, foram realizadas reações de PCR em tempo real com iniciadores dos genes alvo e iniciadores de um controle endógeno (gene da β-actina, constitutivo das células CHO). O termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems) foi programado da seguinte forma:

- incubação inicial a 94 °C por 5 minutos;
- 35 ciclos repetitivos (94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 30 s);
- incubação final a 72 °C por 5 minutos.

Os iniciadores usados estão mostrados no Anexo 1. Reações de PCR em tempo real preliminares, com cada combinação de iniciadores utilizadas no presente trabalho, foram realizadas com o objetivo de verificar se o método empregando o índice  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  poderia ser utilizado para analisar os dados (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Esta verificação procedeu-se realizando-se, com cada combinação de iniciadores, reações de PCR em tempo real com diferentes diluições de cDNA (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000, além do cDNA não diluído). Obteve-se um valor de  $\Delta C_t$  (média dos  $C_{ts}$  da amostra – média dos  $C_{ts}$  do controle endógeno) para cada diluição. Montou-se um gráfico  $\Delta C_t$  versus diluições do cDNA para cada combinação de iniciadores e realizaram-se regressões lineares. Segundo a literatura, o coeficiente angular da reta deve estar próximo de zero para que o método do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  possa ser utilizado (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Uma observação a ser feita é o fato de que os iniciadores foram construídos de maneira a ser amplificado o final de um éxon e o início do éxon seguinte de cada gene analisado, para ter certeza que durante a extração de RNA não ocorreu nenhuma contaminação de DNA, sendo amplificados fragmentos em torno de 100 pb, no máximo. Se o fragmento amplificado for maior que o esperado, no caso do gene do controle endógeno (o único que possui íntron), é porque houve contaminação de DNA, e isto pode ser visto fazendo-se uma reação de PCR comum com o cDNA formado.

Após concluídas as reações de PCR em tempo real para cada cDNA em questão, os dados foram analisados. Os resultados de PCR em tempo real da expressão do fator IX foram normalizados em relação à expressão de fator IX obtida pelas células CHO transfectadas com o vetor pIRES+fatorIX. Esta construção foi adotada como controle para o fator IX, uma vez que as células CHO não expressam endogenamente o fator coagulante. Como as análises de PCR em tempo real são sempre comparativas, decidiu-

se, portanto, adotar como parâmetro de comparação o tipo de vetor mais tradicional (integração aleatória) e a construção mais simples (fator IX sem nenhuma enzima auxiliar. No caso da expressão das enzimas, o controle utilizado foram as células CHO não transfectadas, pois as células CHO possuem expressão endógena das enzimas VKORC1,  $\gamma$ -carboxilase e PACE. O cálculo, baseado no método do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , foi realizado de acordo com a Tabela 4.9.

**Tabela 4.9.** Cálculo realizado para comparar a expressão do fator IX em células transfectadas com o vetor pcDNA5/FRT+fatorIX tendo como referência a expressão do fator IX em células transfectadas com o vetor pIRES+fatorIX.

Reações da referência (pIRES+fator IX)	C <sub>t</sub> do alvo	C <sub>t</sub> do controle endógeno	$\Delta C_t$	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
Reação 1	21,09	16,21	21,09 - 16,21 = 4,88		
Reação 2	20,99	16,26	20,99 - 16,26 = 4,73		
			Média = 4,81	4,81 - 4,81 = 0	1
Reações (pcDNA5/FRT+fatorIX)					
Reação 1	17,21	17,06	17,21 - 17,06 = 0,14		
Reação 2	17,14	16,99	17,14 - 16,99 = 0,15		
			Média = 0,14	0,14 - 4,81 = -4,67	25,1



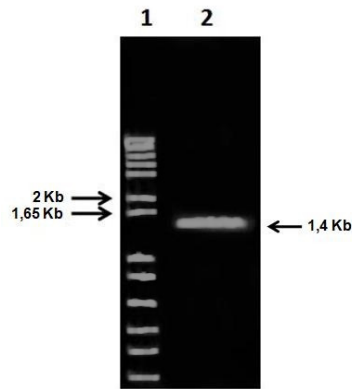
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Vetores construídos**

Em todas as clonagens foram realizadas reações de PCR para amplificação do cDNA do fator IX a partir do vetor original, para seleção de colônias e para confirmação dos vetores. Em todas estas reações foi feito um controle negativo, utilizando-se água ao invés de DNA molde, com o objetivo de identificar alguma contaminação. Nenhuma contaminação foi identificada, pois não houve amplificação nas reações de PCR realizadas ao longo de todo o trabalho utilizando água no lugar de DNA molde. Estes dados não foram mostrados nas figuras dos géis de agarose das reações de PCR.

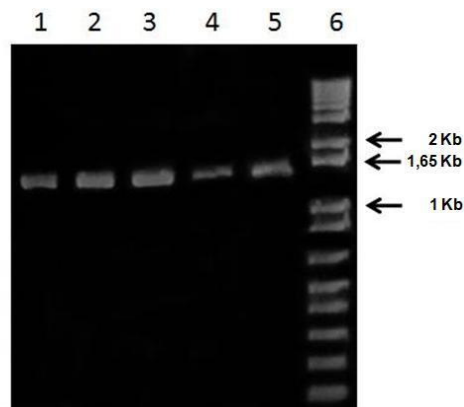
#### **5.1.1. Vetor pGEM-T Easy com o cDNA do fator IX**

O primeiro passo para efetuar a construção dos vetores desejados foi a amplificação do cDNA do fator IX (1,4 kb) por reação de PCR utilizando a enzima *pfx50* DNA polimerase (alta fidelidade). O cDNA estava clonado no vetor pCMV5FIX (adquirido da ATCC), e foi amplificado com os sítios das enzimas de restrição *XhoI* e *AscI*, localizados nas extremidades dos iniciadores FIX-fwr e FIX-rev, respectivamente (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Amplificação por reação PCR do cDNA do fator IX clonado no vetor pCMV5FIX com os iniciadores FIX-fwr-*Xho*I e FIX-rev-*Asc*I (raia 2). Na raia 1 está o padrão de tamanho de fragmento (1 kb DNA Ladder, Invitrogen).

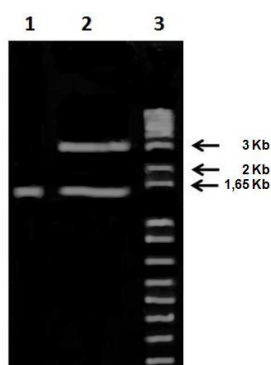
Logo após, o fragmento amplificado de 1,4 kb foi removido do gel e inserido no vetor de clonagem (pGEM-T Easy), que foi transformado em bactérias *E. coli*. Foram selecionadas 5 colônias e todas foram positivas, quando analisadas por PCR de colônia efetuado com o iniciador FIX-fwr e o iniciador universal Sp6 (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Eletroforese em gel de agarose 1% do PCR de colônia para a clonagem do gene do fator IX (1,4 kb) no vetor pGEM-T Easy. Raias 1 a 5; reações de PCR com 5 colônias selecionadas; raia 6: padrão de tamanho de fragmento (1 kb DNA Ladder, Invitrogen).

O plasmídeo pGEM-T Easy + fator IX foi extraído e purificado de uma das cinco colônias. Em seguida, a presença do gene do fator IX foi confirmada por reação de PCR com o vetor extraído como molde e com os iniciadores FIX-fwr e FIX-rev. Os

sítios de restrição inseridos também foram testados, realizando-se uma digestão com as endonucleases *XhoI* e *AscI*, para verificar se não houve nenhuma mutação nos sítios durante a amplificação com a DNA polimerase *pfx50* (Figura 5.3).



**Figura 5.3.** Confirmação da presença do cDNA do fator IX (1,4 kb) no vetor pGEM-T Easy e verificação da integridade dos sítios de restrição *XhoI* e *AscI*. Raia 1: reação de PCR com os iniciadores FIX-fwr e FIX-rev; raia 2: digestão com as endonucleases *XhoI* e *AscI*; raia 3: padrão de tamanho de fragmento de DNA (1 kb DNA Ladder, Invitrogen).

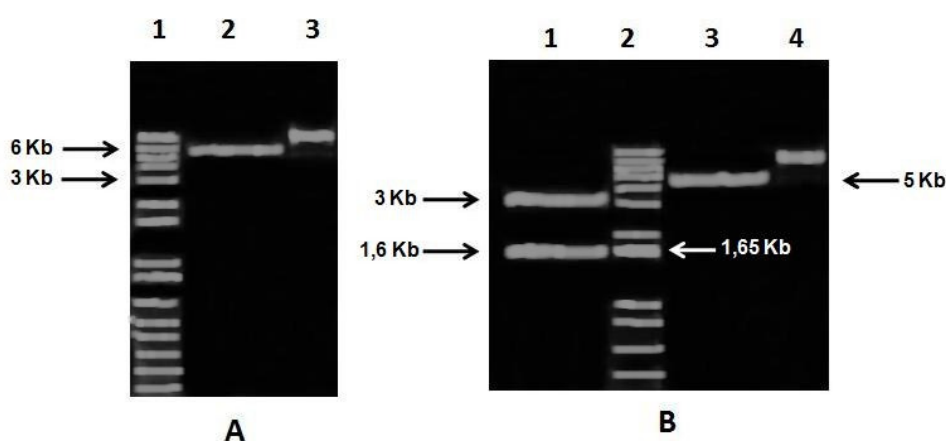
O vetor pGEM-T Easy + fator IX foi seqüenciado pela empresa Macrogen e o resultado confirmou que não ocorreu nenhuma mutação na sequência do fator IX e nem nos sítios de restrição.

### 5.1.2. Vetores pIRES+fator IX e pcDNA5/FRT+fator IX

O produto da digestão do cDNA do fator IX clonado no pGEM-T Easy com as enzimas de restrição *XhoI* e *AscI*, mostrada na Figura 5.3, foi também utilizado para a realização da ligação do cDNA do fator IX no sítio múltiplo de clonagem do vetor pIRES. Contudo, o cDNA do fator IX digerido com *XhoI* e *AscI* foi ligado ao vetor pIRES digerido com *XhoI* e *MluI* (Figura 5.4A), pois por motivos de estratégia de clonagem foi necessário utilizar enzimas de restrição diferentes, porém com sítios

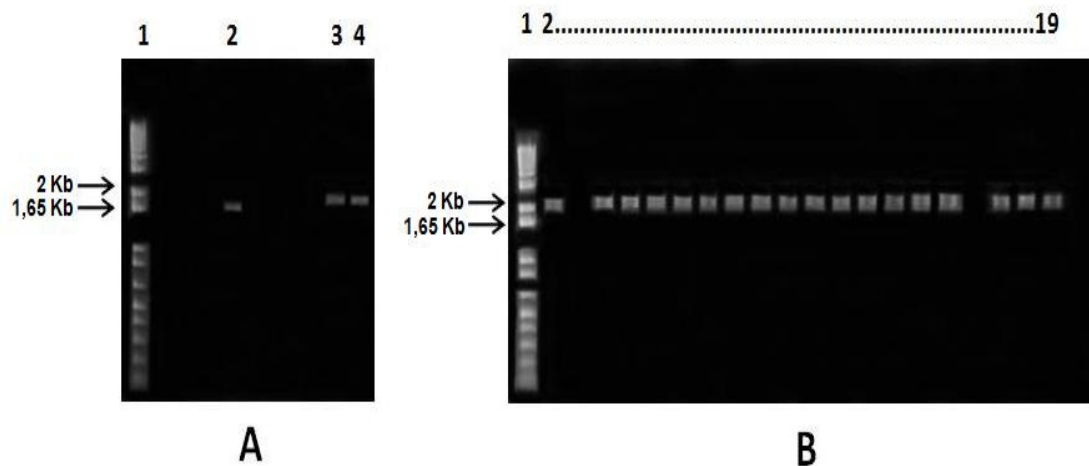
compatíveis, como *AscI* e *MluI*, já que a endonuclease *MluI* fragmentava a sequência do fator IX.

A ligação do cDNA do fator IX ao vetor pcDNA5/FRT foi realizada de maneira diferente da ligação ao pIRES. A reação de digestão do cDNA do fator IX, clonado no pGEM-T Easy, para clonagem no pcDNA5/FRT ocorreu com atuação de apenas uma enzima de restrição, *NotI*. O vetor pGEM-T Easy possui dois sítios da enzima de restrição *NotI*, que por consequência de suas posições faz com que a digestão com esta enzima retire um fragmento de DNA contendo o cDNA do fator IX (1,4 kb) intacto, porém a banda no gel apareceu com um tamanho maior (~1,6 kb). Isto era esperado, pois os sítios de restrição da enzima *NotI* estão 100 pb à jusante e 100 pb à montante do cDNA do fator IX. O vetor pcDNA5/FRT também foi digerido com a endonuclease *NotI*. Para confirmar que realmente houve linearização do vetor, o vetor circular (não digerido) foi aplicado no gel. O tempo de retenção no gel de agarose do vetor na forma circular é maior do que o tempo do mesmo vetor linearizado (Figura 5.4B).



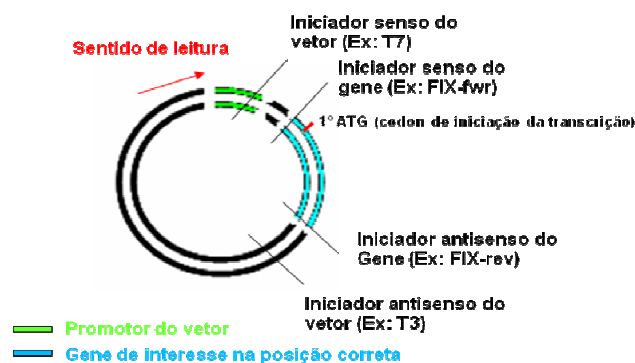
**Figura 5.4.** Eletroforese em gel de agarose 1%. Digestão do vetor pIRES (6,1 kb) com as endonucleases *XhoI* e *MluI* (raia 2A) seguido do vetor pIRES não digerido (raia 3A). Digestão do vetor pGEM-T Easy (3 kb)+fator IX (banda esperada de 1,6 kb) e do vetor pcDNA5/FRT (5 kb) com a endonuclease *NotI*, raia 1B e 3B, respectivamente. Na raia 4B está o vetor pcDNA5/FRT não digerido. Vetores não digeridos têm formas circulares diferentes, por isso o seu tempo de retenção no gel é maior em relação ao mesmo vetor linearizado. Nas raias 1A e 2B estão os marcadores de tamanho de fragmento (1 kb DNA Ladder, Invitrogen).

As reações de PCR de colônia para verificar se as colônias contendo os vetores pcDNA5/FRT+fator IX e pIRES+fatorIX eram positivas foram realizadas com os pares de iniciadores T7 (iniciador universal do pcDNA5/FRT) / FIX-rev e FIX-fwr / T3 (iniciador universal do pIRES), respectivamente. A amplificação com o iniciador T7 faz com que a banda amplificada referente ao cDNA do fator IX (1,4 kb) apareça com um tamanho de aproximadamente 1,5 kb, pois o iniciador T7 está 100 pb à jusante do códon de iniciação do cDNA do fator IX. A amplificação com os iniciadores FIX-fwr / T3 produziu um fragmento de 2 kb, pois o elemento IRES do vetor pIRES contém 0,6 kb e o cDNA do fator IX 1,4 kb. A eletroforese em gel de agarose desta reação de PCR de colônia pode ser visualizada na Figura 5.5.



**Figura 5.5.** Eletroforese em gel de agarose 1% da reação de PCR de colônia para a seleção das colônias positivas referente às clonagens do cDNA do fator IX com os vetores pcDNA5/FRT (A), e pIRES (B). O fragmento amplificado em (A), com os iniciadores T7/FIX-rev, foi de aproximadamente 1,5 kb, corroborando com o fato do iniciador T7 estar 100 pb à jusante do códon de iniciação do fator IX. No caso do gel (B), o fragmento obtido foi de aproximadamente 2 kb, justamente pelo fato do vetor pIRES possuir a sequência do elemento IRES de 0,6 kb, aproximadamente. Como foi utilizado o iniciador antisense universal do pIRES, T3, e o cDNA do fator IX foi clonado no primeiro cístron do vetor (MSCA), o fragmento amplificado foi a soma do cDNA do fator IX (1,4 kb) + o elemento IRES (0,6 kb). Raias 1A e 1B: padrão de tamanho de fragmento (1 kb DNA Ladder, Invitrogen).

A combinação de iniciadores da reação de PCR de colônia para o pcDNA5/FRT+fator IX foi escolhida de modo que fosse possível verificar a direção do cDNA do fator IX, pois no caso em que a ligação do inserto ao vetor foi realizada utilizando-se o mesmo sítio de restrição nas duas extremidades, no caso dois sítios da endonuclease *NotI*, pode ocorrer uma ligação no sentido contrário de leitura ou um religamento do vetor. Em ambos os casos, as colônias crescem normalmente em meio com antibiótico, sendo possível discriminá-las somente por reação de PCR. A Figura 5.6 mostra um esquema explicando como verificar o sentido de um gene em um vetor.



**Figura 5.6.** Neste caso, como o gene está na posição correta, as reações de PCR com a combinação dos iniciadores T7/FIX-rev ou T3/FIX-fwr serão positivas, ou seja, vai haver amplificação gênica. No entanto, se o gene de interesse estivesse na posição contrária, estas mesmas reações não funcionariam, pois os iniciadores estariam amplificando no mesmo sentido.

Depois de extraídos e purificados os vetores pcDNA5/FRT+fator IX e pIRES+fator IX, a presença do inserto foi confirmada por reações de PCR com a enzima Taq DNA polimerase (baixa fidelidade). A eletroforese em gel de agarose pode ser visualizada na Figura 5.7. A presença do cDNA do fator IX no pIRES foi verificada com as combinações dos iniciadores:

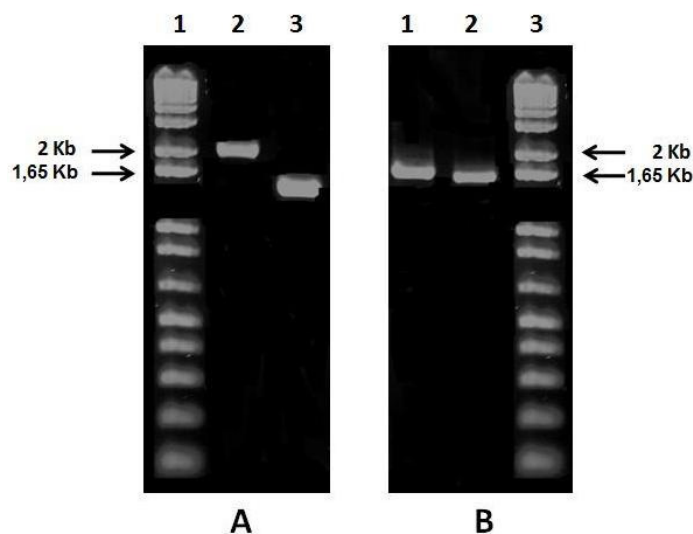
- T3/T7 (ambos universais para o vetor): a posição do fragmento esperado no gel era acima da banda de 2 kb (cDNA do fator IX de 1,4 kb + elemento IRES de 0,6 kb + algumas bases do próprio vetor pIRES);

- FIX-fwr / FIX-rev, sendo a posição do fragmento esperado no gel abaixo da banda de 1,5 kb (cDNA do fator IX de 1,4 kb).

Para confirmar a presença do fator IX no pcDNA5/FRT foram utilizadas as seguintes combinações de iniciadores:

- T7/BGH-r (iniciadores universais do vetor pcDNA5/FRT), com fragmento esperado de 1,5 kb (cDNA do fator IX de 1,4 kb + bases remanescentes do vetor pcDNA5/FRT);

- T7 / FIX-rev, com fragmento esperado ligeiramente abaixo da banda de 1,5 kb, porém um pouco acima da banda obtida na reação com os iniciadores FIX-fwr / FIX-rev.



**Figura 5.7.** Eletroforese em gel de agarose 1% das reações de PCR para confirmação da presença do cDNA do fator IX nos vetores pIRES (A) e pcDNA5/FRT (B). Raia 2A: reação de PCR com os iniciadores T3/T7; raia 3A: reação de PCR com os iniciadores FIX-fwr / FIX-rev; raia 1B: reação de PCR com os iniciadores T7 / BGH-r; raia 2B: reação de PCR com os iniciadores T7 / FIX-rev; raias 1A e 3B: padrão de tamanho de fragmento (1 kb DNA Ladder, Invitrogen).

Estes vetores construídos apenas com o cDNA do fator IX foram utilizados no trabalho para comparar a expressão do fator IX em células transfectadas com estes

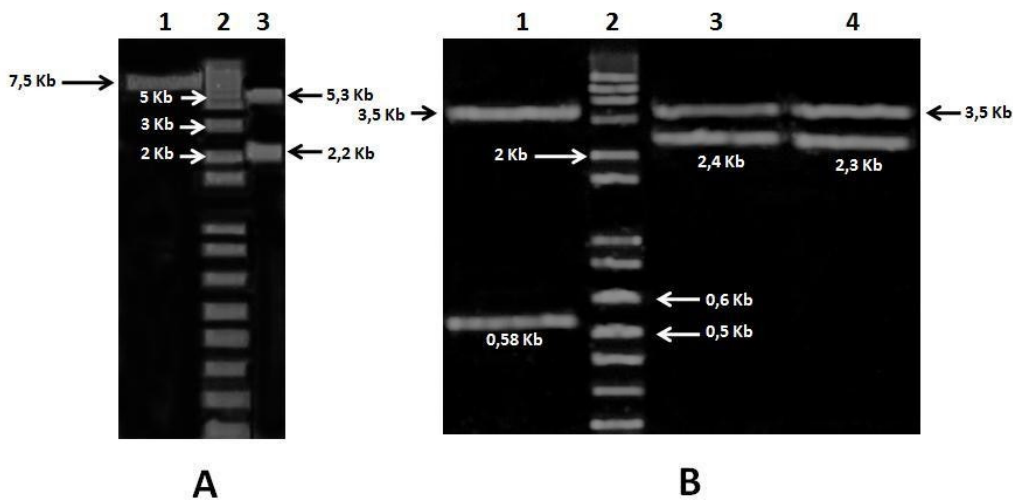
vetores e com os vetores bicistrônicos contendo o cDNA do fator IX e das enzimas ( $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE), como também para realizar uma comparação dos vetores propriamente ditos entre si.

Apesar de não terem sofrido nenhuma nova amplificação com a enzima DNA polimerase de alta fidelidade, é possível, porém com uma baixíssima probabilidade, que tenha ocorrido alguma mutação durante a manipulação dos fragmentos. Por exemplo, na visualização do gel com a luz ultravioleta, a irradiação do DNA com este tipo de luz, por um longo período, gera fotoprodutos no DNA, os fotodímeros de pirimidina (SOEHNGE *et al.*, 1997). Portanto, os vetores pIRES e pcDNA5/FRT contendo o cDNA do fator IX foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen e o resultado mostrou que a sequência do fator IX estava correta em ambos.

### **5.1.3. Vetores Fator IX+pIRES+enzimas ( $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE)**

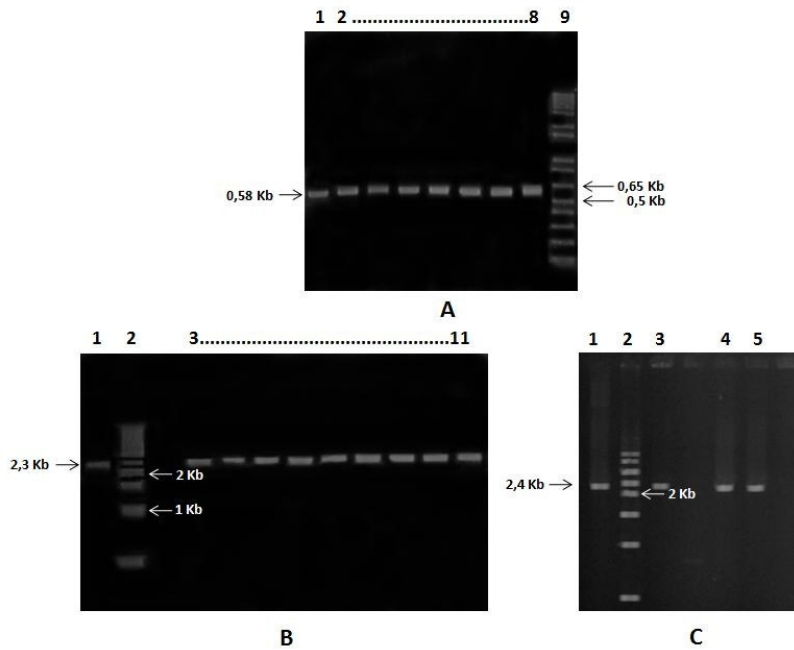
As sequências das enzimas  $\gamma$ -carboxilase (2,3 kb), VKORC1 (589 pb) e PACE (2,4 kb) estavam clonadas em três vetores pBLUNT com sítios das enzimas de restrição *XbaI* e *NotI*, inseridos nas extremidades dos três cDNAs. Estes vetores estavam devidamente sequenciados e pertenciam à coleção de plasmídeos do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC). Portanto, as três sequências foram obtidas por digestão com as endonucleases *XbaI* e *NotI* a partir do pBLUNT e o vetor pIRES+fator IX foi também digerido com as mesmas endonucleases (digestões confirmadas pelos dados obtidos na Figura 5.8).





**Figura 5.8.** Eletroforese em gel de agarose 1% das digestões realizadas para clonar os cDNAs das enzimas ( $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE) no pIRES+fator IX. Raia 1A: digestão do vetor pIRES+fator IX (7,5 kb) com as endonucleases *Xba*I e *Not*I; raia 3A: digestão do vetor pIRES+fator IX com *Xho*I e *Xba*I (esta digestão destacou o cDNA do fator IX e o elemento IRES do vetor pIRES e foi utilizada como referência de tamanho auxiliar); raia 1B: digestão do vetor pBLUNT+VKORC1 com as endonucleases *Xba*I e *Not*I, destacando do vetor a sequência da enzima VKORC1 (589 pb); raia 3B: digestão do pBLUNT+PACE com as endonucleases *Xba*I e *Not*I, destacando o cDNA da enzima PACE (2,4 kb); raia 4B: digestão do vetor pBLUNT+ $\gamma$ -carboxilase com as endonucleases *Xba*I e *Not*I, retirando o cDNA de 2,3 kb da enzima  $\gamma$ -carboxilase; raias 2A e 2B: marcador de tamanho de fragmento (1kb DNA Ladder, Invitrogen).

A ligação dos genes das enzimas ( $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE) foi realizada no segundo cístron do vetor pIRES+fator IX (MSCB). Como não havia problemas na direção do gene, já que a ligação foi realizada com sítios de restrição diferentes (*Xba*I e *Not*I), muitas colônias foram positivas em duas das três transformações realizadas (Figura 5.9). A transformação da ligação da sequência da enzima PACE ao vetor pIRES+fator IX não resultou em muitas colônias positivas, e provavelmente isto ocorreu devido ao tamanho final do vetor ser muito grande (~10 kb), causando alguma instabilidade, dificultando a ligação do inserto ao vetor.



**Figura 5.9.** Eletroforese em gel de agarose 1% das reações de PCR de colônia das ligações do vetor pIRES+fator IX com os genes da VKORC1 (A),  $\gamma$ -carboxilase (B) e PACE (C). Raias 1A, 1B e 1C: controle positivo para os cDNAs da VKORC1 (0,589 kb),  $\gamma$ -carboxilase (2,3 kb) e PACE (2,4 kb), respectivamente; raias 2A-8A, 3B-11B e 3C, 4C e 5C: bandas das respectivas colônias positivas de cada ligação; raia 9A: marcador de tamanho 1 kb da Invitrogen; raias 2B e 2C: marcador de tamanho 1 kb da LGC. As reações de PCR foram realizadas com as seguintes combinações de iniciadores: VKORC1-fwr / VKORC1-rev, Carb-fwr / Carb-rev e PACE-fwr / PACE-rev.

Ao final destas ligações, os vetores foram extraídos de uma colônia positiva e purificados pelo mesmo procedimento de todos os outros vetores intermediários. Foram obtidos, portanto, os seguintes vetores: (I) FatorIX+pIRES+VKORC1; (II) FatorIX+pIRES+ $\gamma$ -carboxilase e (III) FatorIX+pIRES+PACE.

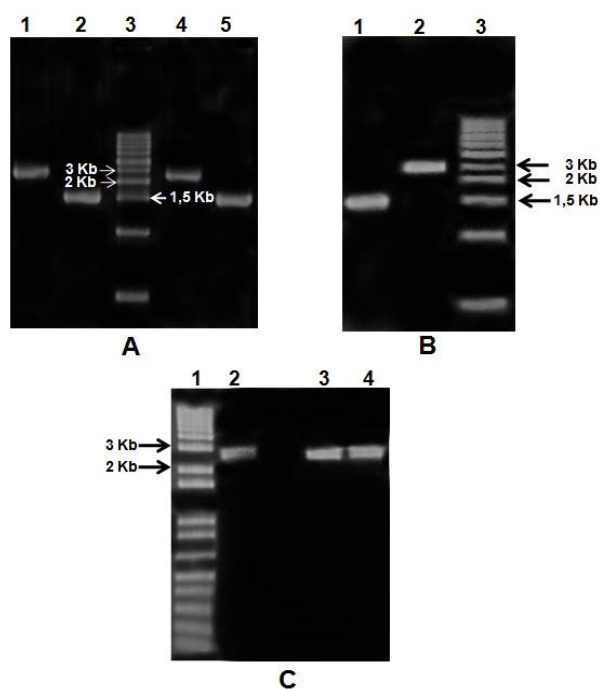
O vetor (I) foi confirmado por reação de PCR com a utilização dos iniciadores combinados: T3/T7, FIX-fwr/VKORC1-rev e T7/VKORC1-rev resultando em uma banda de aproximadamente 2,7 kb (1,4 kb do FIX + 0,6 kb do elemento IRES + 0,589 kb do gene da VKORC1) em cada reação.

O vetor (II) foi confirmado por quatro reações de PCR, com as combinações de iniciadores: T3/carb-fwr (banda esperada de 2,4 kb, aproximadamente), Carb-fwr/Carb-

rev (banda esperada de 2,3 kb), T7/FIX-rev (banda esperada de 1,5 kb, aproximadamente) e, por último, FIX-fwr/FIX-rev (banda esperada de 1,4 kb).

O vetor (III) foi confirmado com 2 reações de PCR com as combinações de iniciadores: T7/FIX-rev (tamanho esperado de 1,5 kb, aproximadamente) e PACE-fwr/T3 (tamanho esperado de, aproximadamente, 2,5 kb). A Figura 5.10 mostra a eletroforese em gel de agarose 1% das reações de PCR descritas acima.

Os vetores (II) e (III) não foram confirmados por reação de PCR com os iniciadores T3/T7, pois os fragmentos de 4,3 kb (vetor II) e 4,4 kb (vetor III) excedem a capacidade de amplificação da enzima DNA polimerase utilizada.

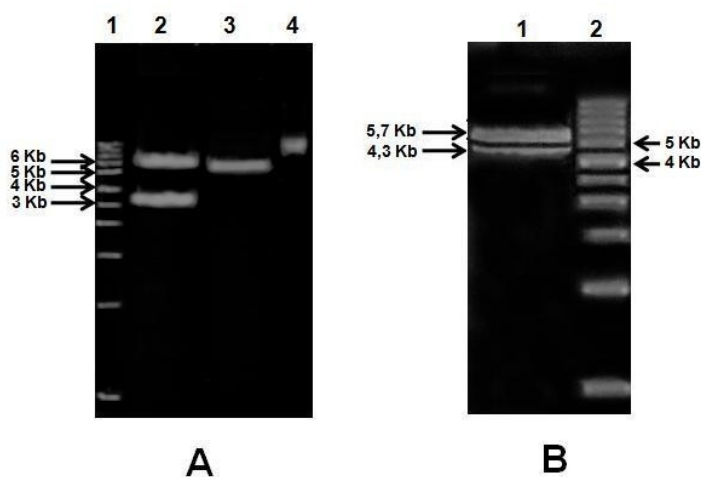


**Figura 5.10.** Eletroforese em gel de agarose 1% das reações de PCR para confirmar a formação dos vetores fatorIX+pIRES+ $\gamma$ -carboxilase (A), fatorIX+pIRES+PACE (B) e fatorIX+pIRES+VKORC1 (C). Raia 1A: iniciadores T3/carb-fwr; raia 2A: iniciadores T7/FIX-rev; raia 4A: iniciadores carb-fwr/Carb-rev ; raia 5A: iniciadores FIX-fwr/FIX-rev; raia 1B: iniciadores T7/FIX-rev; raia 2B: iniciadores PACE-fwr/T3; raia 2C, 3C, 4C: iniciadores T3/T7, FIX-fwr/VKORC1-rev e T7/VKORC1-rev, respectivamente; raias 3A e 3B: marcadores de tamanho 1kb da LGC; raia 1C: marcador de tamanho 1kb da Invitrogen.

O sequenciamento da empresa Macrogen mostrou que as sequências clonadas no vetor pIRES estavam corretas, com exceção da sequência da enzima PACE. Podem ter ocorrido mutações durante o processo de clonagem ou a qualidade do sequenciamento pode ter sido baixa devido à quantidade de vetor extraído ter sido baixa em todas as extrações realizadas com o *Kit Miniprep* da Invitrogen. Portanto, não se prosseguiu com a clonagem da enzima PACE no vetor pcDNA5/FRT. Mesmo com o sequenciamento de qualidade ruim as células transfectadas com o vetor pIRES contendo o cDNA da PACE foram posteriormente analisadas por PCR em tempo real, como as demais.

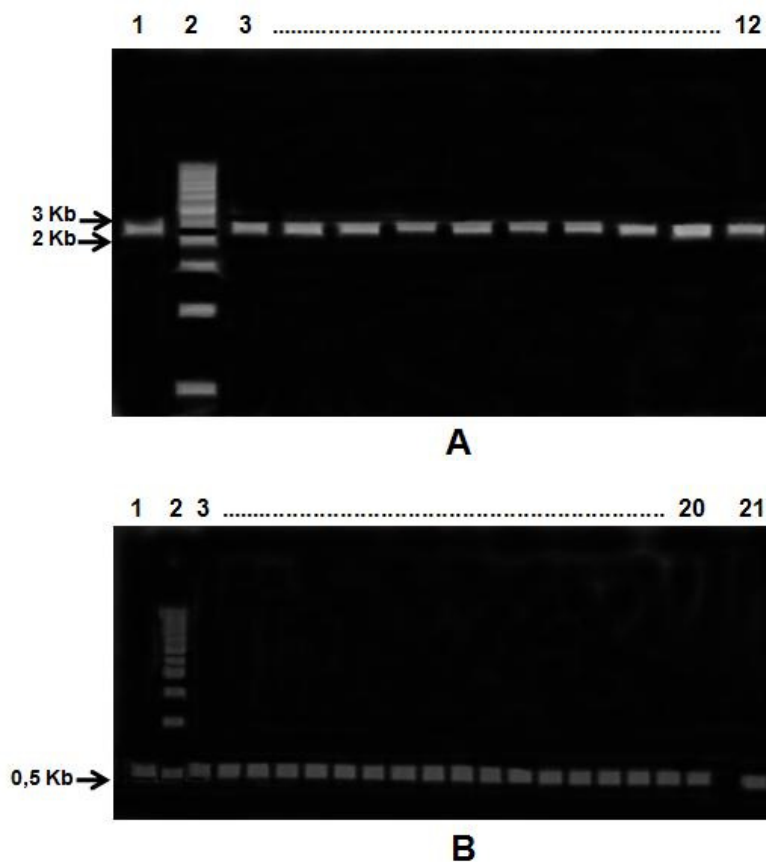
#### 5.1.4. Vetores Fator IX+IRES+enzimas (VKORC1 e $\gamma$ -carboxilase)/pcDNA5/FRT

Para realizar a clonagem das sequências fatorIX+IRES+VKORC1 (2,6 kb) e fatorIX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase (4,3 kb) no pcDNA5/FRT, primeiramente foram realizadas duas digestões com as endonucleases *NheI* e *NotI*, para retirar estas sequências inteiras do vetor pIRES, como pode ser visto na Figura 5.11.



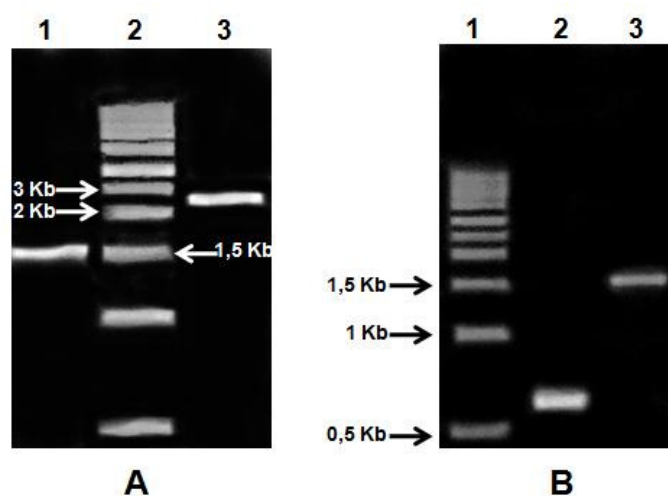
**Figura 5.11.** Eletroforese em gel de agarose 1% das digestões dos vetores fatorIX+pIRES+VKORC1(A) e fatorIX+pIRES+ $\gamma$ -carboxilase (B) com as endonucleases *NheI* e *NotI* para clonagem no pcDNA5/FRT. Raia 2A: digestão do vetor pIRES contendo as sequências do fator IX+IRES+VKORC1; raia 3A: digestão do vetor pcDNA5/FRT; raia 4A: vetor pcDNA5/FRT não digerido; raia 1B: digestão do vetor pIRES contendo as sequências do fator IX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase. Raias 1A e 2B: marcador de tamanho de fragmento (1 kb DNA Ladder, LGC).

As reações de PCR de colônia para seleção das colônias positivas foram realizadas com as combinações de iniciadores: carb-fwr/carb-rev para o vetor fatorIX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase/pcDNA5/FRT e VKORC1-fwr/VKORC1-rev para o vetor fator IX+IRES+VKORC1/pcDNA5/FRT. Mesmo formando vetores relativamente grandes, (~7,7 kb para o vetor contendo o gene da VKORC1 e ~9,3 kb para o vetor contendo o gene da  $\gamma$ -carboxilase), foram observadas muitas colônias positivas nas duas clonagens, como pode ser visto na Figura 5.12.



**Figura 5.12.** Eletroforese em gel de agarose 1% das reações de PCR de colônia para as clonagens dos insertos fatorIX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase (A) e fatorIX+IRES+VKORC1 (B) no vetor pcDNA5/FRT. Raia 1A: controle positivo (amplificação do cDNA da  $\gamma$ -carboxilase clonado no pBLUNT) , reação com os iniciadores carb-fwr/carb-rev (2,3 kb); raias 3A - 12A: colônias positivas para o vetor fatorIX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase/pcDNA5/FRT; raia 1B: controle positivo (amplificação do cDNA da VKORC1 clonado no pBLUNT), reação com os iniciadores VKORC1-fwr/VKORC1-rev (0,58 kb); raias 3B-21B: colônias positivas para o vetor fatorIX+IRES+VKORC1/pcDNA5/FRT; raias 2A e 2B: marcadores de tamanho (1kb DNA Ladder, LGC).

Para confirmar a presença dos insertos no vetor pcDNA5/FRT extraídos de colônias positivas, foram realizadas as seguintes reações de PCR (Figura 5.13): para confirmar o vetor fatorIX+IRES+VKORC1/pcDNA5/FRT, foram utilizadas as combinações de iniciadores T7/FIX-rev e VKORC1-fwr/BGH-r; para confirmar o vetor fatorIX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase/pcDNA5/FRT, foram utilizadas as combinações de iniciadores T7/FIX-rev e carb-fwr/BGH-r. As bandas dos géis de agarose da Figura 5.13 apareceram nos tamanhos esperados, confirmando os vetores.



**Figura 5.13.** Eletroforese em gel de agarose 1% das reações de PCR para confirmar a presença dos insertos fatorIX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase (A) e fatorIX+IRES+VKORC1 (B) no vetor pcDNA5/FRT. Raia 1A: reação com os iniciadores T7/FIX-rev (~1,5 kb); raia 3A: reação com os iniciadores carb-fwr/BGH-r (~2,4 kb); raia 2B: reação com os iniciadores VKORC1-fwr/BGH-r (~0,6 kb); raia 3B: reação com os iniciadores T7/FIX-rev (~1,5 kb); raias 1A e 1B: marcador de tamanho de fragmento (1 kb DNA Ladder, LGC).

Os vetores pcDNA5/FRT construídos foram devidamente sequenciados pela empresa Macrogen, porém o vetor pcDNA5 contendo o fatorIX+IRES+VKORC1 não foi extraído em grande quantidade, provavelmente por alguma contaminação no *kit* de extração comercial, não sendo possível confirmar este vetor através do sequenciamento.

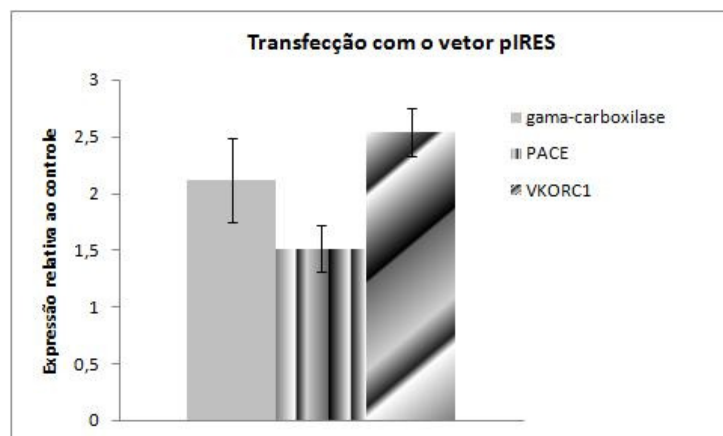
Neste trabalho, só foram mostrados os géis de agarose que obtiveram êxito, porém quase todas as clonagens tiveram que ser repetidas, em alguns casos mais de três

vezes. Isto ocorre devido à estocagem de reagentes de maneira incorreta, acarretando na degradação do mesmo como, por exemplo, enzimas de restrição e DNA polimerases. Além disso, qualquer contaminação pode acarretar no fracasso da clonagem. Outra questão que pode influenciar em uma clonagem é o método como são preparadas as bactérias competentes. Caso não estejam bem preparadas podem reduzir a eficiência das transformações, influenciando na clonagem.

## **5.2. Análise da expressão do gene do fator IX e das enzimas (VKORC1, $\gamma$ -carboxilase e PACE) por PCR em tempo real**

Nas células transfectadas com o vetor pIRES a diferença de expressão das enzimas VKORC1,  $\gamma$ -carboxilase e PACE em relação à expressão endógena das células CHO foi relativamente baixa, de no máximo 2,5 vezes, como pode ser visto na Figura 5.14. Contudo, pode-se observar uma diferença um pouco maior na expressão da enzima VKORC1. Isto pode ser devido ao tamanho do gene, pois o gene da VKORC1 possui apenas 0,589 kb enquanto que os genes das enzimas  $\gamma$ -carboxilase e PACE possuem 2,3 e 2,4 kb, respectivamente. Em suma, o uso do vetor pIRES contendo o elemento IRES do vírus ECM modificado parece não ter aumentado muito a expressão das enzimas VKORC1,  $\gamma$ -carboxilase e PACE em relação à expressão endógena das mesmas. As modificações na sequência do elemento IRES presente no vetor pIRES fazem com que o segundo gene seja menos expresso que o primeiro, já que, sem estas modificações, o segundo gene seria expresso em níveis muito mais altos que o primeiro (BOCHKOV & PALMENBERG, 2006). Isto pode ter contribuído para que o nível de expressão das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE não aumentasse mais em relação à produção endógena das mesmas em células CHO. Os componentes presentes no vetor pIRES (promotor, *enhancer* ou acentuadores) também podem ter influenciado

para esta baixa expressão. Contudo, a integração aleatória pode ser o maior influenciador para esta baixa expressão, pois enquanto algumas células podem ter integrado o DNA recombinante em uma região de alta atividade transcripcional, em muitas delas a integração pode ter ocorrido em regiões de silenciamento gênico, que são predominantes no genoma de células superiores. A comparação entre a expressão dos genes das enzimas (segundo gene) pode ser vista na Figura 5.14.



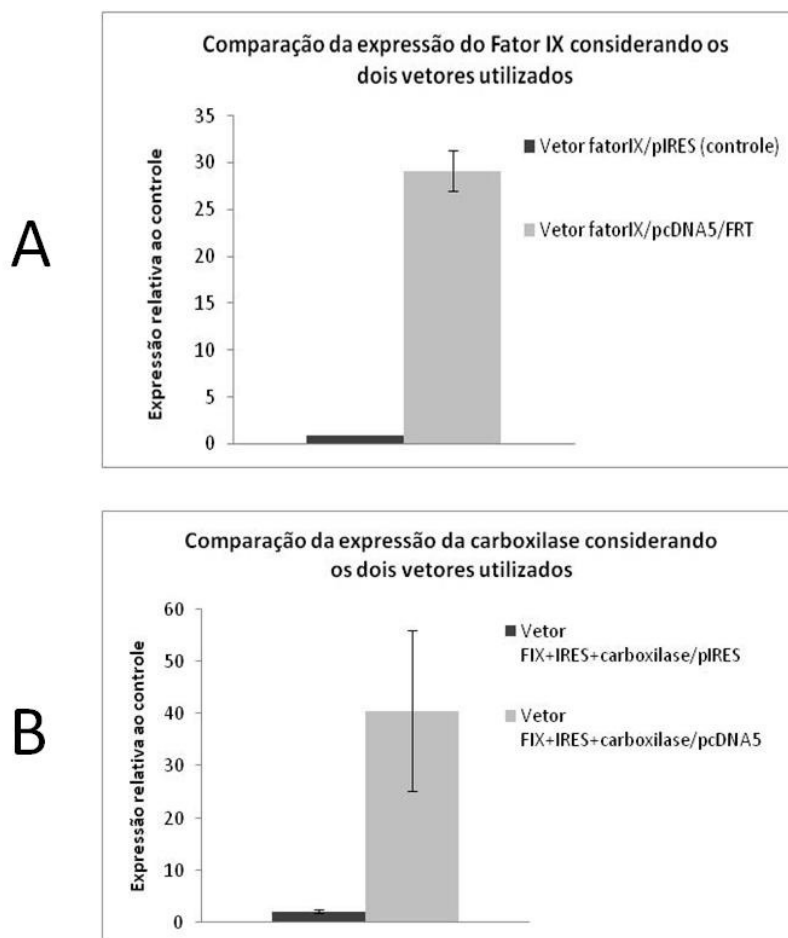
**Figura 5.14.** Análise por PCR em tempo real da expressão das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE em células transfectadas com o vetor pIRES. Pode-se observar que o aumento da expressão não foi significativo para nenhuma das enzimas, obtendo-se um aumento de no máximo 2,5 vezes em relação às células não transfectadas (controle), que já expressam as três enzimas endogenamente.

Para analisar comparativamente o desempenho dos dois vetores de expressão utilizados, foram avaliadas a expressão de fator IX a partir dos vetores fatorIX+pIRES e fatorIX+pcDNA5/FRT. Comparou-se, ainda, a expressão da  $\gamma$ -carboxilase a partir dos vetores fatorIX+ $\gamma$ -carboxilase+pIRES e fatorIX+ $\gamma$ -carboxilase+pcDNA5/FRT. Estes dados são mostrados na Figura 5.15.

Observa-se na Figura 5.15A que o sistema de integração sítio-dirigida (pcDNA5/FRT) aumentou em 33 vezes a expressão do fator IX em relação ao controle (células transfectadas com o vetor pIRES+fatorIX). Estes dados mostram a superioridade do sistema de integração sítio-dirigida em relação à integração aleatória,



especialmente neste caso em que se está trabalhando com transfectomas, ou seja, populações transfectadas que são altamente heterogêneas no caso do vetor de integração aleatória e bastante homogêneas no caso do vetor de integração sítio-dirigida. Para se obter altos níveis de expressão com vetores aleatórios, geralmente se faz necessário empregar técnicas demoradas e laboriosas de isolamento e seleção de clones.



**Figura 5.15.** Comparação da expressão determinada por PCR em tempo real do fator IX (A) e da enzima  $\gamma$ -carboxilase (B) entre transfecções com os vetores pIRES e pcDNA5/FRT. Pode-se observar que a eficiência do sistema Flp-In é muito maior do que o sistema de integração aleatória. O controle utilizado para comparar a expressão da carboxilase foi a expressão endógena em células não transfectadas. O controle utilizado para comparar a expressão do fator IX foram células transfectadas com o vetor pIRES/fatorIX.

A superioridade do sistema de integração sítio-dirigida foi confirmada para a expressão da  $\gamma$ -carboxilase (Figura 5.15B), onde o aumento de expressão foi de cerca de

40 vezes para o vetor pcDNA5/FRT, contra cerca de duas vezes no caso do vetor pIRES. Na análise de ambos os vetores contendo esta enzima, o controle usado foram células não transfectadas que possuem expressão endógena da enzima  $\gamma$ -carboxilase.

Entretanto, trabalhos da literatura mostraram que, utilizando o vetor ZEM228, de integração aleatória, para expressar fator IX e  $\gamma$ -carboxilase em células BHK, o aumento na expressão da  $\gamma$ -carboxilase foi de 40 a 70 vezes em relação às células não transfectadas (BERKNER & PUDOTA, 1998; HALLGREN *et al.*, 2002). Os resultados de expressão, considerando o RNAm produzido, obtidos no presente trabalho com o vetor pcDNA5/FRT contendo o fator IX e a enzima  $\gamma$ -carboxilase são, contudo, comparáveis com a literatura (BERKNER & PUDOTA, 1998; HALLGREN *et al.*, 2002). Enquanto esses autores observaram aumento de expressão da  $\gamma$ -carboxilase de 40 a 70 vezes, no presente trabalho o aumento da expressão em termos de RNAm produzido foi de 40 vezes para o sistema de integração sítio-dirigida. O mesmo não ocorreu para o vetor de integração aleatória usado no presente trabalho. Isto pode ser por dois motivos: o vetor de integração aleatória usado na literatura pode ser mais eficiente ou o método de seleção dos transfectomas pode ser mais eficiente. Entretanto, o presente trabalho utilizou células CHO e não BHK.

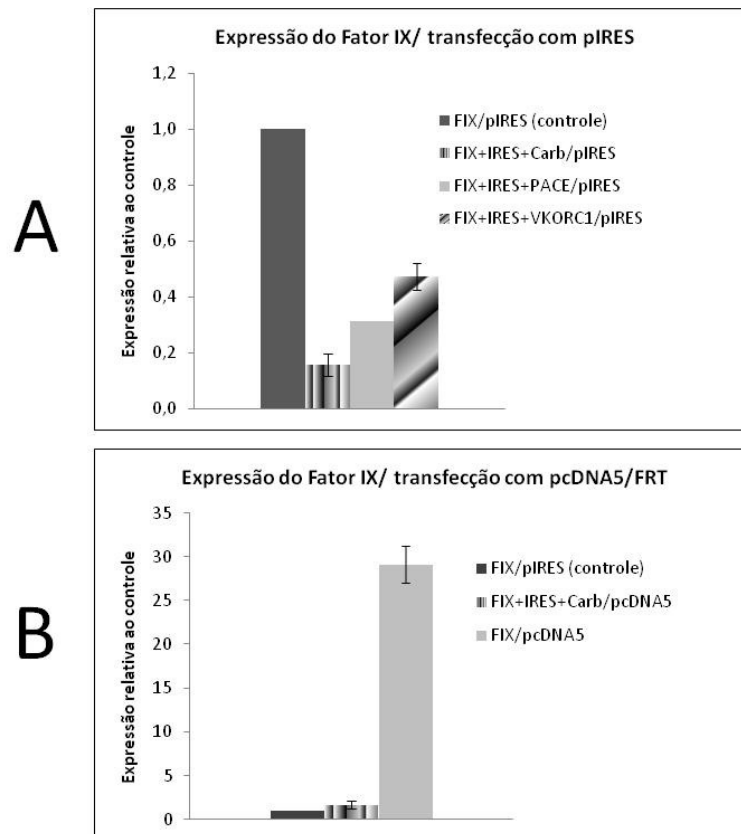
No trabalho realizado por Rehemtulla, a expressão da  $\gamma$ -carboxilase bovina em células CHO aumentou em 16 vezes a atividade desta enzima em relação à produção endógena da mesma (REHEMTULLA *et al.*, 1993). No presente trabalho não foi determinada a atividade da enzima  $\gamma$ -carboxilase. Somente foi determinada a expressão a partir do RNA mensageiro produzido. Em alguns casos o aumento da quantidade de RNA mensageiro reflete em aumento proporcional da atividade da proteína superexpressa. Com base nesta afirmação, é possível que a expressão da  $\gamma$ -carboxilase

em células CHO utilizando-se o sistema FRT (~40 vezes), realizado neste trabalho, tenha obtido resultados mais expressivos que os reportados na literatura para a expressão da  $\gamma$ -carboxilase bovina em células CHO. Contudo, é necessário avaliar a atividade da  $\gamma$ -carboxilase para confirmar esta hipótese.

Na Figura 5.16, é mostrada a expressão do fator IX isoladamente ou em conjunto com as enzimas em questão, para ambos os vetores utilizados no presente estudo.

É possível observar na Figura 5.16 que a construção com apenas um gene (somente o gene do fator IX, no primeiro cóstron) promoveu uma expressão bem maior do gene do fator IX, nas transfecções com o vetor pIRES e com o vetor pcDNA5/FRT. Quando havia um gene clonado no segundo cóstron a expressão do fator IX diminuiu nas transfecções com ambos os vetores (pIRES e pcDNA5). O tamanho do segundo gene parece que também influenciou na expressão do fator IX, pois quando o gene do fator IX foi co-expresso com o gene da enzima VKORC1, a expressão do gene do fator IX foi maior em relação à co-expressão com os genes da  $\gamma$ -carboxilase e PACE

De todas as transfecções realizadas, a única população de células CHO que não apresentou expressão do fator IX foi aquela em que foi utilizado o vetor pcDNA5/FRT, contendo o cDNA do fator IX e da VKORC1 intermediados pelo IRES defectivo do vírus EMC. Provavelmente, pode ter ocorrido algum problema de recombinação durante o processo de obtenção de uma população estável ou talvez o vetor não estivesse em boa qualidade, portanto esta população foi descartada.



**Figura 5.16.** Expressão por PCR em tempo real do fator IX em células transfectadas com os vetores pIRES (A) e pcDNA5 (B). O controle utilizado para comparação da expressão do fator IX foram células transfectadas com o vetor pIRES/fatorIX.

Um fato interessante é que, quando o gene do fator IX foi expresso sozinho, ou seja, sem atuação do elemento IRES defectivo, a expressão do fator IX foi bem mais alta em relação às construções onde havia co-expressão das enzimas (Figura 5.16 A e B). Entretanto, isto pode ser devido à presença do elemento IRES, o que estaria de acordo com alguns trabalhos publicados na literatura. Um deles compara diferentes elementos IRES de picornavírus e é possível observar que o vetor controle utilizado, ou seja, sem a presença do segundo gene após o elemento IRES, possui uma expressão maior do primeiro gene quando comparada com a expressão deste mesmo gene em vetores bicistrônicos intermediados por diferentes elementos IRES (BORMAN *et al.*, 1995).

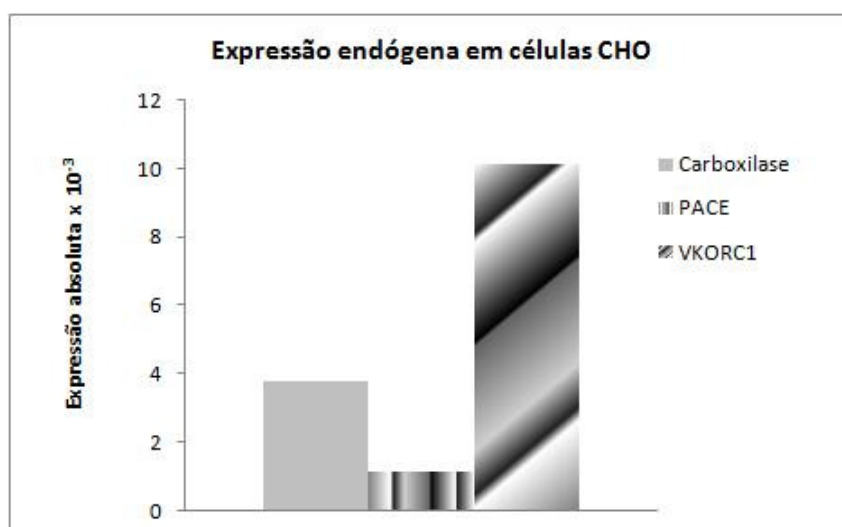
Como já foi discutido acima, a expressão de fator IX isoladamente foi muito superior para o vetor pcDNA5/FRT do que para o vetor pIRES. O mesmo foi observado e discutido acima também para a expressão da  $\gamma$ -carboxilase. A eficiência do sistema FRT foi tão superior que a expressão do fator IX co-expresso com a  $\gamma$ -carboxilase no vetor pcDNA5/FRT foi aproximadamente 2 vezes maior do que a expressão do fator IX no sistema controle pIRES/FatorIX (Figura 5.16 B). Isto é relevante, pois, como já foi dito anteriormente, a literatura mostra que, quando um gene é expresso sozinho, sem a presença do segundo gene após o elemento IRES, o nível de expressão deste gene pode ser bem mais alto em comparação com a expressão deste mesmo gene em um vetor bicistrônico contendo o elemento IRES (BORMAN *et al.*, 1995; BOCHKOV & PALMENBERG, 2006).

Entretanto, apesar da presença do elemento IRES poder ter prejudicado a expressão do fator IX, isto não impede uma comparação do efeito, sobre a expressão do fator IX, das diferentes enzimas entre si. Como pode ser visto na Figura 5.16A, dentre os ensaios de co-expressão das enzimas, a maior expressão de fator IX foi obtida na presença da enzima VKORC1. Os piores desempenhos, em termos de expressão de fator IX, foram verificados no caso da co-expressão da  $\gamma$ -carboxilase e da PACE. Contudo, o erro experimental é mais acentuado em populações transfectadas com vetores de integração aleatória. Seria necessário realizar mais réplicas para confirmar esta diferença de expressão de fator IX. Não é descartada a possibilidade de também ter havido erro experimental durante a realização da reação de PCR em tempo real. Isto pode ter sido o motivo pelo qual o erro experimental da análise da expressão da enzima  $\gamma$ -carboxilase em células CHO Flp-In<sup>TM</sup>, transfectadas com o vetor pcDNA5/FRT de integração sítio-dirigida, ter sido relativamente alto (Figura 5.15A).

Apesar dos dados obtidos para a expressão do fator IX co-expresso com a enzima PACE serem imprecisos, devido à falta de réplicas, vale ressaltar que resultados obtidos na literatura mostraram que quando a PACE é co-expressa com o fator IX, aparentemente, ocorre um estresse menor do retículo endoplasmático. Isto foi verificado por Pellegrini, pois quando o fator IX foi co-expresso com a enzima PACE o nível de expressão da chaperona Bip, regulador-chave dos transdutores de sinal de estresse do retículo endoplasmático, diminuiu. Segundo os autores da pesquisa, provavelmente isto ocorreu pelo fato da co-expressão da PACE favorecer direta ou indiretamente a secreção do fator IX, evitando o acúmulo de fator IX no retículo endoplasmático (PELLEGRINI *et al.*, 2007). Este menor estresse poderia favorecer uma maior expressão do fator IX co-expresso com a PACE do que co-expresso com a  $\gamma$ -carboxilase, pois esta enzima, ao contrário da PACE, parece aumentar o acúmulo de fator IX no retículo endoplasmático (HALLGREN *et al.*, 2002).

Para possibilitar uma análise mais completa dos dados, a expressão endógena das enzimas também foi analisada (Figura 5.17), considerando as reações de PCR em tempo real realizadas com o RNA extraído das células não transfectadas. Observou-se que, em células CHO, a expressão da PACE é baixa em relação à expressão das outras enzimas testadas ( $\gamma$ -carboxilase e VKORC1), o que já havia sido observado em experimentos com células CHO produtoras de fator IX (WASLEY *et al.*, 1993). Entretanto, a enzima PACE parece ser de relevância visto que a co-expressão desta enzima aumentou em 3 vezes a atividade específica do fator IX secretado (REHEMTULLA *et al.*, 1993), razão pela qual o gene da versão solúvel desta enzima (PACE-SOL) foi transfectado nas células CHO usadas pela Genetics Institute/Wyeth na produção do Benefix<sup>®</sup> (HARRISON *et al.*, 1998). Devido à importância das células CHO para o mercado de biofármacos, o gene da PACE-SOL foi testado, recentemente,

com o objetivo de melhorar o processamento do pró-peptídeo da proteína rhBMP-2 (proteína morfogênica do osso) produzida por estas células (DOOLAN *et al.*, 2008). A alta expressão endógena da enzima VKORC1 mostra que as células CHO selvagens já possuem uma relativa capacidade de realizar a  $\gamma$ -carboxilação, assim como demonstrado recentemente para células BHK (WAJIH *et al.*, 2005a e b). No entanto, não há artigos comparando a expressão endógena das enzimas VKORC1,  $\gamma$ -carboxilase e PACE em células CHO e BHK. Apesar do mais alto nível de expressão endógena da VKORC1, foi para esta enzima que se obteve o maior aumento de expressão da mesma (Figura 5.14) e o maior aumento de expressão de fator IX (Figura 5.16A). Não há como afirmar precisamente, mas é possível que o fato da VKORC1 ser um gene menor do que os genes da  $\gamma$ -carboxilase e da PACE fez com que a célula tivesse menos dificuldade de expressar a VKORC1. Provavelmente, a expressão maior de fator IX co-expresso com a VKORC1 em relação à expressão do mesmo co-expresso com a  $\gamma$ -carboxilase e a PACE, foi pelo fato do RNA mensageiro, contendo as sequências do fator IX+IRES+VKORC1, ser menor e consequentemente mais estável.



**Figura 5.17.** Expressão endógena absoluta (número adimensional) das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE em células CHO. Dentre as enzimas analisadas a PACE aparenta ter a menor expressão em células CHO e a VKORC1 a maior.

### 5.3. Ensaio de avaliação da produção de fator IX total

Como discutido anteriormente, as células CHO Flp-In™ foram transfectadas com os vetores: fatorIX/pIRES, fatorIX+IRES+VKORC1/pIRES, fatorIX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase/pIRES e fatorIX+IRES+PACE/pIRES. As transfecções foram realizadas em triplicata e as células foram cultivadas em frascos T25. Portanto, esperava-se obter 12 cultivos em frasco T25, porém uma das populações transfectadas com o vetor fatorIX+IRES+PACE/pIRES não sobreviveu ao antibiótico, sendo descartada. A Figura 5.18 mostra os frascos T25 no qual as células transfectadas foram propagadas.



**Figura 5.18.** Células CHO flp-In transfectadas com o vetor pIRES cultivadas em frascos T25. São 11 cultivos e um controle negativo.

Em relação à transfecção com os vetores construídos no pcDNA5/FRT, foram utilizados os vetores: fatorIX/pcDNA5, fatorIX+IRES+VKORC1/pcDNA5 e fatorIX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase/pcDNA5. Contudo, como já foi dito no item anterior, apenas uma população de células CHO transfectada com o vetor fatorIX+IRES+VKORC1/pcDNA5 formou um transfectoma estável, sobrevivendo ao antibiótico. No entanto, os resultados de PCR em tempo real não detectaram expressão do gene do fator IX, descartando-se esta população. A Figura 5.19 mostra os transfectomas que sobreviveram ao antibiótico.





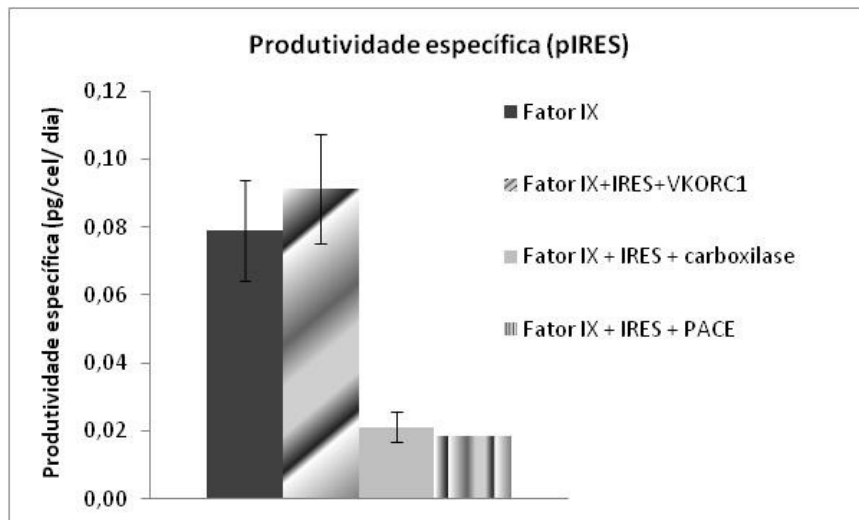
**Figura 5.19.** Frascos T25 das células estáveis transfectadas com o vetor pcDNA5/FRT. Uma delas foi descartada (fatorIX+IRES+VKORC1) devido ao resultado negativo na análise por PCR em tempo real.

Dos frascos contendo os transfectomas estáveis, foram coletadas amostras de sobrenadante, nas quais o teor de fator IX foi medido por ELISA. A produtividade de fator IX nas células CHO transfectadas com as construções realizadas no pIRES ficou de acordo com os resultados obtidos no PCR em tempo real, pois as células que expressavam o gene do fator IX em maiores níveis (vetores: fatorIX/pIRES e fatorIX+IRES+VKORC1/pIRES) tiveram a maior quantidade de fator IX total secretado (Figura 5.20). No entanto, embora o vetor contendo o gene da enzima VKORC1 tenha apresentado uma expressão de fator IX, por análise de PCR em tempo real, menor do que o vetor que possuía somente o gene do fator IX, a produtividade de fator IX obtido no sobrenadante das células que co-expressavam a VKORC1 foi igual à produtividade das células que somente expressavam o fator IX. Isto indica que, provavelmente, a co-expressão da VKORC1 facilitou a secreção do fator IX em células CHO. Estes dados são diferentes dos obtidos na literatura para células BHK, pois, quando a enzima VKORC1 foi superexpressa nestas células, o fator IX total secretado não aumentou em relação às células BHK somente transfectadas com o gene do fator IX (WAJIH *et al.*, 2005b).

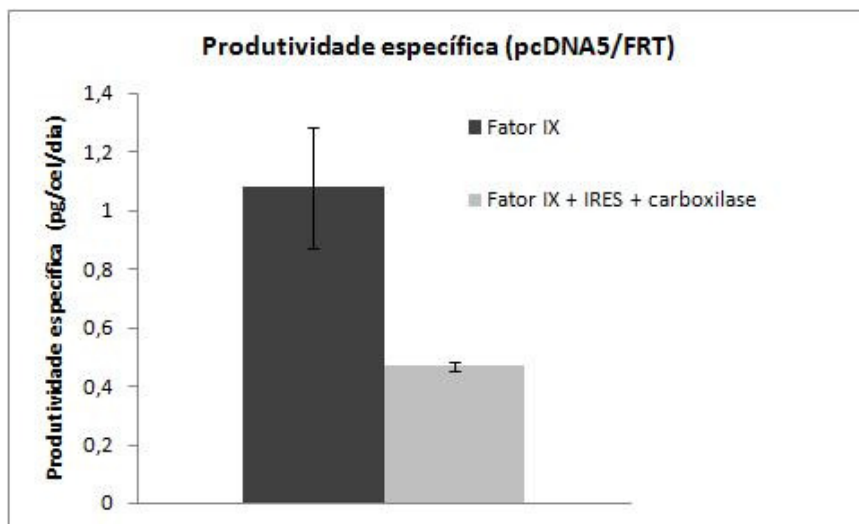
Por outro lado, de acordo com a literatura, a superexpressão da  $\gamma$ -carboxilase em células CHO produtoras de fator IX acarretou em uma redução do fator IX secretado, o que não ocorreu quando a enzima PACE foi superexpressa neste tipo de célula (REHEMTULLA *et al.*,1993). Nos resultados obtidos no presente trabalho, a produção de fator IX total secretado pelas células CHO expressando o gene da  $\gamma$ -carboxilase foi equivalente ao produzido por células expressando o gene da enzima PACE. Portanto, levando-se em consideração os dados encontrados na literatura, esta equivalência na secreção do fator IX pode ser devido ao fato da população de células não ser homogênea, pois o vetor pIRES se integra de maneira aleatória ao genoma da célula aumentando o erro da análise.

As diferenças encontradas entre os efeitos reportados na literatura para a co-expressão da PACE e da  $\gamma$ -carboxilase e os efeitos observados para as mesmas enzimas no presente trabalho podem ter diferentes causas: o uso de vetores bicistrônicos neste trabalho, levando à co-expressão dos genes heterólogos em uma mesma região do genoma; o uso de uma sub-linhagem diferente de células CHO (Flp-In versus CHO-dhfr<sup>r</sup>); e, principalmente, o uso de uma população clonal na literatura versus um transfectoma no presente trabalho, onde o transfectoma oriundo do uso do vetor pIRES representa uma população heterogênea, de modo que os níveis de fator IX secretado são valores médios de uma população.

Em relação à produtividade específica em termos de fator IX secretado apresentada pelos diferentes transfectomas, o vetor pcDNA5/FRT confirmou sua superioridade, como pode ser visto na comparação entre as Figuras 5.20 e 5.21.



**Figura 5.20.** Produtividade específica de fator IX em células CHO Flp-In™ transfectadas com o vetor pIRES determinadas por imunoenensaio do tipo ELISA.



**Figura 5.21.** Produtividade específica de fator IX total determinada por imunoenensaio do tipo ELISA para as células CHO transfectadas com os vetores pcDNA5/FRT.

A produtividade de fator IX em células CHO transfectadas com o vetor fatorIX/pcDNA5/FRT foi bem maior (1,1 pg/cel/dia) que a produtividade em células CHO transfectadas com o vetor fator IX + pIRES (0,08 pg/cel/dia). Apesar disto, esta produtividade ainda é baixa para que o processo de produção seja economicamente viável. A co-expressão do gene do fator IX com o gene da DHFR e subsequente

amplificação gênica através de tratamento com o inibidor da DHFR, o metotrexato (ASSELBERG & WIDMER, 1995), mostrou ser capaz de aumentar a expressão do fator IX em 500 vezes (KAUFMAN et al., 1986). Como o gene é localizado logo após o gene do fator IX, somente são selecionados clones altamente produtores, pois só irão sobreviver ao metotrexato os clones que superexpressam a enzima diidrofolato redutase (DHFR) e conseqüentemente o gene do fator IX.

Apesar da expressão do fator IX em células transfectadas com o vetor pcDNA5/FRT+fator IX ser 40 vezes maior que a expressão do mesmo em células transfectadas com o vetor pIRES+fator IX, a produtividade específica somente aumentou aproximadamente 10 vezes. Isto ocorreu, pois a expressão foi determinada em termos de RNAm produzido e não necessariamente todo o fator IX que é expresso será secretado no meio, já que antes de ser secretado o fator IX sofre várias modificações enquanto está no interior da célula. Portanto, durante a permanência do fator IX na célula podem ocorrer erros na síntese da proteína, acarretando, na maioria dos casos, na não secreção da proteína.

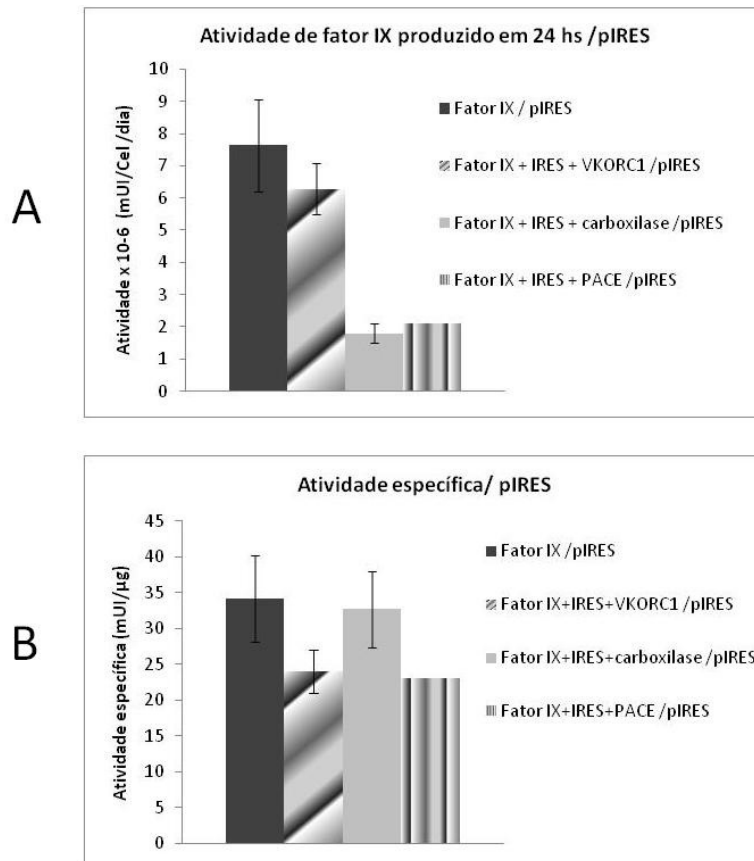
Dados da literatura mostram que a secreção do fator IX é prejudicada quando a  $\gamma$ -carboxilase é superexpressa, pelo fato desta enzima formar um complexo de ligações fortes com o fator IX (HALLGREN *et al.*, 2002). Como há pouco co-fator (vitamina K reduzida) sendo produzido pela enzima VKORC1, indicada pela literatura como sendo o fator limitante da  $\gamma$ -carboxilação (HALLGREN *et al.*, 2006), a molécula do fator IX tem maior dificuldade em ser liberada da enzima  $\gamma$ -carboxilase, pois não está completamente  $\gamma$ -carboxilada. A relação da produtividade do fator IX em células CHO Flp-In transfectadas com o vetor fator IX/pcDNA5 e em células CHO Flp-In transfectadas com o vetor fatorIX+IRES+ $\gamma$ -carboxilase/pcDNA5/FRT (Figura 5.21) tem um

comportamento semelhante às mesmas construções realizadas no vetor pIRES (Figura 5.20), confirmando a hipótese da literatura que o excesso de  $\gamma$ -carboxilase no retículo endoplasmático dificulta a liberação do fator IX para o exterior da célula (HALLGREN *et al.*, 2002). Entretanto, é necessário avaliar a atividade específica do fator IX para confirmar esta hipótese.

#### **5.4. Avaliação da atividade do fator IX produzido**

Para determinar a atividade do fator IX produzido pelos transfectomas foram utilizados ensaios de coagulometria. Foram utilizados para cálculo da atividade os dados de coagulometria obtidos no HEMORIO, pois o erro experimental foi menor.

Em relação aos transfectomas obtidos após a transfecção com o vetor pIRES, as células que continham os vetores fatorIX/pIRES e fatorIX+IRES+VKORC1/pIRES apresentaram atividades de fator IX produzido semelhantes, considerando o erro experimental (Figura 5.22A). As atividades do fator IX para os transfectomas que co-expressavam as enzimas  $\gamma$ -carboxilase e PACE foram mais baixas em relação às outras construções e iguais entre si. Este resultado era esperado, já que os transfectomas que produziram mais fator IX total foram os transfectomas que continham os vetores fatorIX/pIRES e fatorIX+IRES+VKORC1/pIRES. Contudo, a atividade específica, que corresponde à atividade do fator IX em relação ao total de fator IX produzido pela célula, foi praticamente igual para todas as células transfectadas com o vetor pIRES, em torno de 30 mUI/ $\mu$ g (Figura 5.22B).



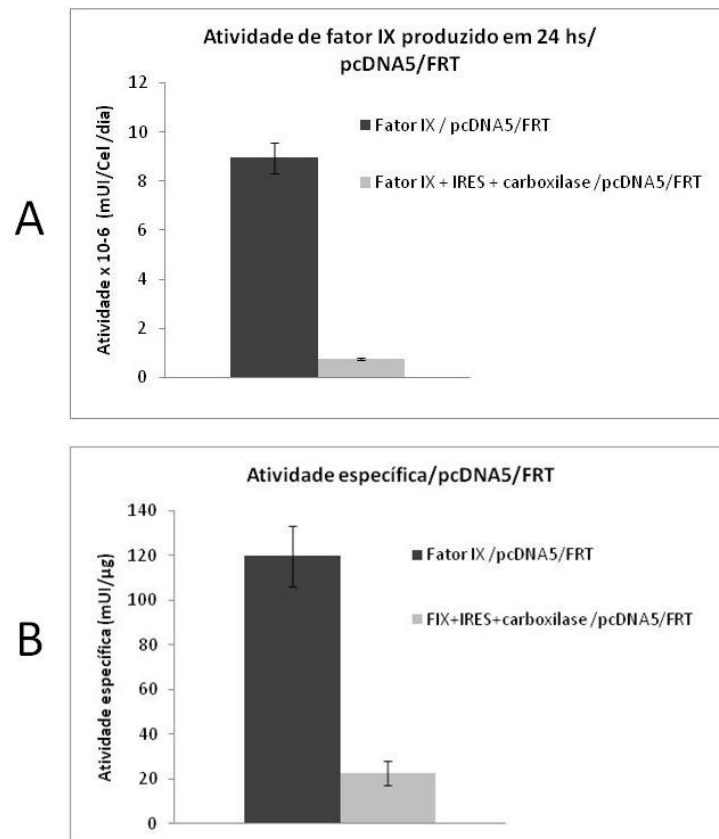
**Figura 5.22.** Comparação da atividade (A) e da atividade específica (B) do fator IX produzido pelas células CHO transfectadas com o vetor pIRES.

O fato da atividade específica ter sido igual para todas as construções, inclusive para o fator IX expresso isoladamente no vetor pIRES, mostra que, aparentemente, a co-expressão das enzimas não afetou a produção do fator IX funcional, quando foi utilizado o vetor pIRES para expressar os genes do fator IX e das enzimas. Estes resultados estão de acordo somente com os dados obtidos por Rehemtulla para a co-expressão da enzima  $\gamma$ -carboxilase bovina em células CHO, onde a atividade específica não foi alterada em relação ao controle, porém o fator IX foi menos secretado quando co-expresso com a enzima  $\gamma$ -carboxilase bovina (REHEMTULLA *et al.*, 1993). A superexpressão da enzima PACE em células produtoras de fator IX aumentou em 2 vezes a atividade específica do fator IX (REHEMTULLA *et al.*, 1993), o que não ocorreu no presente trabalho. Em relação à co-expressão da VKORC1, esperava-se obter um aumento na

atividade específica, já que quando esta enzima foi superexpressa em células BHK, houve um aumento de 2,2 vezes na taxa de  $\gamma$ -carboxilação de fator IX *in vivo* (HALLGREN *et al.*, 2006), e um aumento de 3 vezes na produção do fator IX funcional (WAJIH *et al.*, 2005b). Contudo, a similaridade entre os resultados de atividade específica obtidos no presente trabalho pode ter sido influenciada pelo fato das células transfectadas com o vetor pIRES expressarem uma quantidade muito baixa tanto de fator IX quanto das enzimas em questão, pelo fato de serem transfectomas (população heterogênea de clones, a maioria com baixa produtividade de fator IX) e não clones selecionados (clones com alta produtividade de fator IX). Por este motivo, a produção de fator IX funcional talvez não tivesse sido comprometida, pois a célula não se encontrava sobrecarregada.

Para as células transfectadas com o vetor pcDNA5/FRT, a expressão do fator IX isoladamente foi mais alta (~30 vezes) quando comparada com a expressão do fator IX em células transfectadas com o vetor pIRES, assim como a expressão da  $\gamma$ -carboxilase (aumento de ~40 vezes em relação à expressão endógena da mesma). Provavelmente por este motivo, a diferença nas análises de atividade e atividade específica para o fator IX produzido pelas células transfectadas com o vetor pcDNA5/FRT foram mais significativas em relação à influência da co-expressão da enzima  $\gamma$ -carboxilase (Figura 5.23). Os resultados de atividade específica mostraram que, quando a  $\gamma$ -carboxilase foi co-expressa com o fator IX, utilizando-se o vetor pcDNA5/FRT, a atividade específica do fator IX diminuía bastante. Isto indica que a superexpressão da  $\gamma$ -carboxilase afeta a secreção do fator IX funcional, acarretando em uma menor atividade específica. Isto não foi observado na literatura quando esta enzima foi co-expressa em células CHO produtoras de fator IX (REHEMTULLA *et al.*, 1993). Entretanto, o nível de expressão da  $\gamma$ -carboxilase pode ter influenciado no resultado. Como não foram utilizados vetores

bicistrônicos contendo o elemento IRES nos trabalhos da literatura, não é possível garantir que todas as células produtoras de fator IX expressem a mesma quantidade de  $\gamma$ -carboxilase.



**Figura 5.23.** Comparação da atividade (A) e da atividade específica (B) do fator IX produzido pelas células CHO transfetadas com o vetor pcDNA5/FRT.

Pesquisas recentes descobriram que, quando o gene da proteína calumenina é silenciado, a produção de fator IX funcional aumenta, aumentando também a atividade da  $\gamma$ -carboxilase e da VKORC1. Com a co-expressão do fator IX e da enzima VKORC1 acrescido do silenciamento da proteína calumenina em 78%, células BHK produziram 80% de fator IX funcional, enquanto que células BHK que co-expressavam as mesmas proteínas, porém sem ter o gene da calumenina silenciado, produziram 50% de fator IX funcional (WAJIH *et al.*, 2006). Este mesmo grupo supõe que haja outras enzimas envolvidas na  $\gamma$ -carboxilação que limitam o processamento de todo o fator IX produzido



pela célula. Uma delas seria a proteína dissulfeto isomerase (PDI), porém, até o momento, somente há uma suspeita da participação desta enzima na  $\gamma$ -carboxilação (WAJIH *et al.*, 2007).

O empenho de pesquisadores para melhorar a produção do fator IX funcional mostra a importância de um bom clone produtor para o processo de produção do fator IX em larga escala. O aumento da produção de fator IX funcional pela célula pode aumentar muito o rendimento final do processo.

## 6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

No presente trabalho, foi comprovado que o sistema de integração sítio-dirigida (vetor pcDNA5/FRT) é mais eficiente que o sistema de integração aleatória (vetor pIRES). Portanto, o sistema FRT é uma ferramenta promissora para aumentar a expressão de proteínas recombinantes.

Observou-se também que a utilização do elemento IRES defectivo prejudicou a expressão do fator IX em vetores bicistrônicos, quando este foi localizado no primeiro cístron, em relação à expressão do fator IX isoladamente. A literatura mostra que esta deficiência na expressão ocorre também para outras proteínas. Contudo, a utilização do elemento IRES normal aumentou a expressão de algumas proteínas, quando estas foram localizadas no segundo cístron (BOCHKOV & PALMENBERG, 2006). Portanto, para aumentar a expressão do fator IX, sugere-se localizá-lo após o elemento IRES normal e utilizar o vetor de expressão pcDNA5/FRT de integração sítio-dirigida. Sugere-se, também, testar diferentes sequências de elementos IRES.

Os resultados obtidos no presente trabalho para a produção do fator IX co-expresso com a enzima VKORC1 não foram muito significativos, pois somente foi possível estudar sua influência em células transfectadas com o vetor pIRES. Como as células contendo o vetor pIRES obtiveram uma expressão muito baixa de fator IX, não foi percebido nenhum efeito da superexpressão da enzima VKORC1. Para se obter melhores resultados de produção de fator IX funcional sugere-se expressar a enzima VKORC1 em vetores de expressão mais eficientes, como o pcDNA5/FRT, o que não foi realizado com êxito neste trabalho. Contudo, seria válido realizar uma comparação entre um vetor bicistrônico com o elemento IRES defectivo, com o cDNA da VKORC1 no segundo cístron e o cDNA do fator IX no primeiro, e um vetor bicistrônico com o

elemento IRES normal, com o cDNA da VKORC1 no primeiro cístron e o cDNA do fator IX no segundo.

A superexpressão da enzima  $\gamma$ -carboxilase parece prejudicar a secreção do fator IX. Quando sua expressão aumenta muito, provavelmente, a taxa de  $\gamma$ -carboxilação diminui tanto que a célula acaba secretando muitas moléculas de fator IX inativas, já que a oferta de co-fator (a vitamina K reduzida) é baixa, acarretando a secreção de muitas moléculas de fator IX parcialmente  $\gamma$ -carboxiladas. Portanto, parece que a expressão da  $\gamma$ -carboxilase endogenamente é suficiente para suprir as necessidades da célula.

As células CHO apresentaram uma expressão endógena baixa da enzima PACE. Provavelmente, a baixa expressão desta enzima acarreta a secreção de grande quantidade de fator IX imaturo (com o pró-peptídeo). Entretanto, no presente trabalho, não foi determinada a quantidade de fator IX imaturo secretado. Portanto, sugere-se realizar imunoenaios do tipo ELISA com anticorpos que se liguem apenas no pró-peptídeo (BRISTOL *et al.*, 1993). Como alguns artigos mostraram que é possível construir vetores tricistrônicos (FUSSENEGGER *et al.*, 1998; LI & ZHANG, 2004; DOUIN *et al.*, 2004), apesar da provável instabilidade do vetor, sugere-se construir um vetor de expressão tricistrônico com os genes do fator IX, da VKORC1 e da PACE e expressá-lo em células CHO.

A dificuldade em aumentar a produtividade do fator IX funcional deve-se ao fato de existirem várias proteínas envolvidas nos processos de modificações pós-traducionais. Contudo, a linhagem de células animais escolhida pode influenciar na produção de fator IX funcional. Por isso, sugere-se fazer um estudo comparativo entre várias linhagens de células animais para determinar qual delas processa o fator IX com

mais eficiência. Quando o gene da proteína calumenina foi silenciado em células BHK, a produção de fator IX funcional aumentou significativamente (WAJIH *et al.*, 2006). Porém, não foi determinada a influência do silenciamento da calumenina em células CHO. Portanto, sugere-se silenciar o gene da calumenina em células CHO Flp-In<sup>™</sup> transfectadas com o cDNA do fator IX clonado no pcDNA5/FRT.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AREZI, B., XING, W., SORGE, J. A., *et al.*, 2003, “Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases”, *Analytical biochemistry*, v. 321, pp. 226-235.
- ARNHEIM, N., ERLICH, M., 1992, “Polymerase chain reaction strategy”, *Annual review of biochemistry*, v. 61, pp. 131-156.
- ARRUDA, V. R., HAGSTROM, J. N., DEITCH, J., *et al.*, 2001, “Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX”, *Blood*, v. 97, pp. 130-138.
- ASSELBERG, F. A. M., WIDMER, R., 1995, “Use of *Escherichia coli* chromosomal DHFR gene as selection mark in mammalian cells”, *Journal of Biotechnology*, v. 43, pp. 135-138.
- ASTERMARK, J., BJORK, I., OHLIN, A. K., *et al.*, 1991, “Structural requirements for  $\text{Ca}^{2+}$  binding to the  $\gamma$ -carboxyglutamic acid and epidermal growth factor-like regions of factor IX”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, pp. 2430-2437.
- ASTERMARK, J., HOGG, P. J., STENFLO, J., 1994, “The  $\gamma$ -carboxyglutamic acid epidermal growth factor-like modules of factor IX $\alpha\beta$ ”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, pp. 3682-3689.

- BANDYOPADHYAY, P. K., 2008, "Vitamin K-dependent  $\gamma$ -glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification", *Vitamins and Hormones*, v. 78, pp. 157-184.
- BARR, P.J., 1991, "Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases", *Cell*, v. 66, pp. 1-3.
- BELL, R. G., MATSCHINER, J. T., 1970, "Vitamin K activity of phylloquinone oxide", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 141, pp. 473-476.
- BELL, R. G., MATSCHINER, J. T., 1972, "Warfarin and the inhibition of vitamin K activity by an oxide metabolite", *Nature*, v. 237, pp. 32-33.
- BERKNER, K. L., 2005, "The vitamin K-dependent carboxylase", *Annual Review of Nutrition*, v. 25, pp. 127-49.
- BERKNER, K. L., 2008, "Vitamin K-dependent carboxylation", *Vitamins and Hormones*, v. 78, pp. 131-156.
- BERTHOLD, G. D., BOEDEKER, PH. D., 2001, "Production process of licensed recombinant factor VIII preparations", *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 27, pp. 385-394.
- BEUTLER, F., 2006, "Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder" *Acta Paediatrica Supplement*, v. 95, pp. 103-109.

- BIGGS, R., DOUGLAS, A. S., MACFARLANE, R. G., *et al.*, 1952, “Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia”, *British medical journal*, v. 2, pp. 1378-1382.
- BINKLEY, S. B., MCKEE, R. W., THAYER, S. A., *et al.*, 1940 “The constitution of vitamin K<sub>2</sub>”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 133, pp. 721-729.
- BJORKMAN, S., SHA-PIRO, A. D., BERNTORP, E., 2001, “Pharmaco kinetics of recombinant factor IX in relation to age of patient: implications for dosing in prophylaxis”, *Haemophilia*, v. 7, pp. 133-139.
- BLOSTEIN, M., CUERQUIS, J., LANDRY, S., *et al.*, 2008, “The carboxylation efficiency of the vitamin K-dependent clotting factors: studies with factor IX”, *Haemophilia*, v. 14, pp. 1063-1068.
- BOCHKOV, Y. A., PALMENBERG, A. C., 2006, “Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location” *BioTechniques*, v. 41, pp. 283-292.
- BOLLATI-FOGOLÍN, M., COMINI, M. A., 2008, “Clonagem e expressão de proteínas heterólogas em células animais”. In: Moraes, A.M., Augusto E.F.P. & Castilho, L.R., *Tecnologia de cultivo de células animais de biofármacos a terapia gênica*, 1º ed., capítulo 3, São Paulo, SP, Roca Ltda.
- BOND, M., JANKOWSKI, M., PATEL, H., *et al.*, 1998, “Biochemical characterization of recombinant factor IX”, *Seminars in Hematology*, v. 35, pp. 11-17.

- BOND, M. D., PATEL, H., HUBERTY, M. C., *et al.*, 1995, "Structural and biological characterization of Gla-related isoforms of recombinant human factor IX shows that Gla36 and Gla40 are not essential for *in vitro* clotting activity", *Journal of Thombosis Haemostasis.*, v. 73, pp. 1167-1168.
- BORMAN, A. M., BAILLY, J-L., GIRARD, M., *et al.*, 1995, "Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation *in vitro*", *Nucleic Acids Research*, v. 23, pp. 3656-3663.
- BRISTOL, J. A., FURIE, B. C., FURIE, B., 1993, "Propeptide processing during factor IX biosynthesis", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 268, pp. 7577-7584.
- BROWN, T. A., 2006, *Gene cloning & DNA analysis*, 5<sup>o</sup> ed., Malden, USA, Blackwell.
- BUSTIN, S. A., 2002, "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems", *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 29, pp. 23-39.
- BUTENAS, S., MANN, K. G., 2002, "Blood coagulation", *Biochemistry (Moscow)*, v. 67, pp. 3-12.
- BUTLER, M., 2005, "Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals", *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 68, pp. 283-291.



- CAMIRE, R. M., LARSON, P. J., STAFFORD, D. W., *et al.*, 2000, “Enhanced gamma-carboxylation of recombinant factor X using a chimeric construct containing the prothrombin propeptide”, *Biochemistry*, v. 39, pp. 14322-9.
- CHEN, C., FANG, X. D., ZHU, J., *et al.*, 1999, “The gene expression of recombinant factor VIII in mammalian cells”, *Thrombosis Research*, v. 95, pp. 105-115.
- CHOO, K. H., GOULD, K. G., REES, D. J. G., *et al.*, 1982, “Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX”, *Nature*, v. 299, pp. 178-180.
- DAHBACK, B., 2005, “Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases”, *Journal of Internal Medicine*, v. 257, pp. 209-223.
- DOOLAN, P., MELVILLE, M., GAMMELL, P., *et al.*, 2008, “Transcriptional profiling of gene expression changes in a PACE-transfected CHO DUKX cell line secreting high levels of rhBMP-2”, *Molecular biotechnology*, v. 39, pp. 187-199.
- DOUIN, V., BORNES, S., CREANCIER, L., *et al.*, 2004, “Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors”, *BMC Biotechnology*, v. 4, pp.1-12.
- DU, M., YE, L., LIU, J., *et al.*, 2008, “Enhancement of GFP expression by Kozak sequence + 4G in HEK 293 cells”, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, v. 24, pp. 491-494.

DUARTE, A., BATISTA, A. C., LEANDRO J., *et al.*, 2003, “Aplicações da engenharia genética: organismos geneticamente modificados, aplicações industriais”. Monografia, Universidade nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Portugal.

EDWARDS, J., KIRBY, N., 1999, “Recombinant coagulation factor IX (Benefix<sup>®</sup>)”. In: Walsh, G. and Murphy, B., *Biopharmaceuticals and Industrial Perspective*, 1<sup>o</sup> ed., chapter 3, Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers.

FOGOLÍN, M. R. B., 2002, *Expresión de proteínas recombinantes de terapéutico en células eucariontes*, Tese de D.Sc., Universidad Nacional del Litoral , Santa Fe, Argentina.

FRANCO, R. F., 2001, “Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise”. In: *Simpósio de Hemostasia e trombose*, v. 34, pp. 229-237, Ribeirão Preto, SP.

FRIBOURG, C., MEIJER A. B., MURTENS K., 2006, “The interface between the EGF2 domain and the protease domain in blood coagulation factor IX contributes to factor VIII binding and factor X activation”, *Biochemistry*, v. 45, pp. 10777-10785.

FURIE, B., BOUCHARD B. A., FURIE B. C., 1999, “Vitamin K-dependent biosyntheses of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid”, *Blood*, v. 93, pp. 1798-1808.

FUSSENEGGER, M., MOSER S., BAILEY J. E., 1998, “pQuattro vectors allow one-step multigene metabolic engineering and auto-selection of quarcístronic artificial mammalian operons”, *Cytotechnology*, v. 28, pp. 229-235.

- GARCIA, A. A., REITSMA P. H., 2008, "VKORC1 and the vitamin K cycle", *Vitamin and Hormones*, v. 78, pp. 23-33.
- GENTRY, P. A., 2004, "Comparative aspects of blood coagulation", *The Veterinary Journal*, v. 168, pp. 238-251.
- GIULIETTI, A., OVERBERGH L., VALCKX D., *et al.*, 2001, "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression", *Methods*, v. 25, pp. 386-401.
- GRIFFITHS, A. J. F., GELBART, W. M., MILLER, J. H., *et al.*, 2001, "Genética Moderna", ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
- GOMPERTS, E., LUNDBLAD, R., ADAMSON, R., 1992, "The manufacturing process of recombinant factor VIII Recombinate", *Transfusion Medicine Reviews*, v. 4, pp. 247-251.
- GOUW, S. C., VAN DER BOM, J. G., AUERSWALD, G., 2007, "Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study", *Blood*, v. 109, pp. 4693-4697.
- HALLGREN, K. W., HOMMEMA, E. L., MCNALLY, B. A., *et al.*, 2002, "Carboxylase overexpression effects full carboxylation but poor release and secretion of factor IX: implications for the release of vitamin K-dependent proteins", *Biochemistry*, v. 41, pp. 15045-15055.

HALLGREN, K. W., QIAN, W., YAKUBENKO, A. V., 2006, “r-VKORC1 expression in factor IX BHK cells increases the extent of factor IX carboxylation but is limited by saturation of another carboxylation component or by a shift in the rate-limiting step”, *Biochemistry*, v. 45, pp. 5587-5598.

HAMILTON, D. L., ABREMSHI, K., 1984, “Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites”, *Journal of Molecular Biology*, v. 178, pp. 481-486.

HARRISON, S., ADAMSON, S., BONAM, D., *et al.*, 1998, “The manufacturing process for recombinant factor IX”, *Seminars in Hematology*, v. 35, pp. 4-10.

HOFFMAN, M., 2004, “Remodeling the blood coagulation cascade”, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 16, pp. 17-20.

HOUDEBINE, L. M., ATTAL, J., 1999, “Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use”, *Transgenic Research*, v. 8, pp. 157-177.

INVITROGEN MANUALS, 2009a, *pcDNA 3.1™ (+/-)*. Disponível em: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com), acessado em: 10 de janeiro de 2009.

INVITROGEN MANUALS, 2009b, *Flp-In™ system*. Disponível em: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com), acessado em: 10 de janeiro de 2009.

- JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H., BERG, P., 1972, "Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phases genes and galactose operon of *Escherichia coli*", *Proceedings of the National Academic of Sciences*, v. 69, pp. 2904-2909.
- JIANG, R., MONROE, T., MCROGERS, R., *et al.*, 2002, "Manufacturing challenges in the commercial production of recombinant coagulation factor VIII", *Haemophilia*, v. 8, pp. 1-5.
- JORGENSEN, M. J., CANTOR, A. B., FURIE, B. C., *et al.*, 1987, "Recognition site directing vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation resides on the propeptide of factor IX", *Cell*, v. 48, pp. 185-191.
- KAUFMAN, R. J., WASLEY, L. C., FURIE, B. C., *et al.*, 1986, "Expression, purification, and characterization of recombinant  $\gamma$ -carboxylated factor IX synthesized in chinese hamster ovary cells", *Journal of Biological Chemistry.*, v. 261, pp. 9622-9628.
- KEOHAVONG, P., THILLY W. G., 1989, "Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification", *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA*, v. 86, pp. 9253-9257.
- KERRER, P., GEIGER, A., 1939, "Vitamin K aus alfalfa", *Helvetica Chimica Acta*, v. 22, pp. 945-951.

- KURACHI, K., DAVIE, E. W., 1982, "Isolation and characterization of cDNA coding for human factor IX", *Proceedings of the National Academic of Sciences*, v. 79, pp. 6461-6465.
- KURACHI, K., KURACHI, S., FURUKAWA, M., *et al.*, 1993, "Biology of factor IX", *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 4, pp. 953-974.
- KWON, M. J., YOO, K. Y., KIM, H. J., *et al.*, 2008, "Identifications of mutations in the F9 gene including exon deletion by multiplex ligation-dependent probe amplification in 33 unrelated Korean patients with haemophilia B", *Haemophilia*, v. 14, pp. 1069-1075.
- LEYTUS, S. P., FOSTER, D. C., KURACHI, K., *et al.*, 1986, "Gene for human factor X: a blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IX and protein C", *Biochemistry*, v. 25, pp. 5098-5102.
- LI, T., ZHANG, J., 2004, "Stable expression of three genes from tricistronic retroviral vector containing a picornavirus and 9-nt cellular internal ribosome entry site elements", *Journal of Virological Methods*, v. 115, pp. 137-144.
- LIN, P. J., STRAIGHT, D. L., STAFFORD, D. W., 2004, "Binding of factor IX  $\gamma$ -carboxyglutamic acid domain to the vitamin K-dependent  $\gamma$ -glutamyl carboxylase active site induces an allosteric effect that may ensure processive carboxylation and regulate the release of carboxylated product", *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, pp. 6560-6566.

- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D., 2001, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method”, *METHODS*, v. 25, pp. 402-408.
- LUNDBERG, K. S., SHOEMAKER, D. D., ADAMS, M. W., 1991, “High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *pyrococcus furiosus*”, *Gene*, v. 108, pp. 1-6.
- MAKRIDES, S. C., 1999, “Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells”, *Protein Expression and Purification*, v. 17, pp. 183-202.
- MARAFINO, B. J. JR, PUGSLEY M. K., 2003, “Commercial development considerations for biotechnology – derived therapeutics”, *Cardiovasc toxicol*, v. 3, pp. 5-12.
- MEHTA, A. K., MASUMDAR, S. S., ALAM , P., *et al.*, 2009, “Epigenetic regulation of cytomegalovirus major Immediate-early promoter activity in transgenic mice”, *Gene*, v. 428, pp. 20-24.
- MELLADO, M. C. M., CASTILHO, L.R., 2008, “Proteínas recombinantes terapêuticas”. In: Moraes, A.M., Augusto, E.F.P. & Castilho, L.R., *Tecnologia do cultivo de células animais de biofármacos a terapia gênica*, 1º ed., capítulo 16, São Paulo, SP, Roca Ltda.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005, *Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias*, Coordenação da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados. Disponível em: [www.dtr2001.saude.gov.br/sas/cpnsh/manual%20coagulopatias\\_final.doc](http://www.dtr2001.saude.gov.br/sas/cpnsh/manual%20coagulopatias_final.doc), acessado em 13 de fevereiro de 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008, *Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil – 2007*, editora MS, Brasília, DF. Disponível em: [www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/perfil\\_coagulopatias\\_hereditarias\\_brasil\\_2007.pdf](http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_2007.pdf), acessado em 15 de fevereiro de 2009.

MUKHERJEE, S., SAHA, A., BISWAS, P., *et al.*, 2008, “Structural analysis of factor IX protein variants to predict functional aberration causing haemophilia B”, *Haemophilia*, v. 14, pp. 1076-81.

NAKAYAMA, K., 1997, “Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of wide variety of precursor proteins”, *Biochemical Journal*, v. 327, pp. 625-635.

NEW ENGLAND BIOLABS, 2009, *Restriction endonucleases*. Disponível em: [www.neb.com](http://www.neb.com), acessado em 20 de janeiro de 2009.

NOVAIS, C. M., PIRES-ALVES, M., 2004, “PCR em tempo real”, *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 33, pp. 10-13.

OLDENBURG, J., BEVANS, C. G., MÜLLER, C. R., *et al.*, 2006, “Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle”, *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, pp. 347-353.

OLDENBURG, J., MARINOVA, M., MÜLLER-REIBLE, C., *et al.*, 2008, “The vitamin K cycle”, *Vitamins and Hormones*, v. 78, pp. 35-62.



- OLDENBURG, J., WATZKA, M., ROST, S., *et al.*, 2007, “VKORC1: molecular target of coumarins”, *Journal of Trombosis and Haemostasis*, v. 5, pp. 1-6.
- PALOMARES, L.A., ESTRADA-MONDACA, S., RAMÍREZ O. T., 2004, “Production of recombinant proteins”, *Methods in Molecular Biology*, v. 267, pp. 15-52.
- PAN, G., LUETKE, K., SADOWSKI, P. D., 1993, “Mechanism of cleavage and ligation by Flp recombinase: classification of mutations in Flp proteins by *in vitro* complementation analysis”, *Molecular and Celular Biology*, v. 13, pp. 3167-3175.
- PELLEGRINI, M. P., OTAZU, I. B., BETENBAUGH, M. J., *et al.*, 2007, “Produção de fator IX em células CHO: impacto da co-expressão de enzimas envolvidas no seu processamento pós-traducional”. *XVI Sinaferm*, BMB0634, Curitiba, PR, Brasil.
- PERERA, L., DARDEN, T. A., PEDERSEN, L. G., 2001, “Modeling human zymogen factor IX”, *Journal of Trombosis and Haemostasis*, v. 85, pp. 596-603.
- PRESNELL S. R., STAFFORD D. W., 2002, “The vitamin K-dependent carboxilase”, *Journal of Trombosis and Haemostasis*, v. 87, pp. 937-46.
- PRIMROSE, S. B., TWYMAN R. M., 2006, “Principles of gene manipulation and genomics”, 7 ed, Malden, Blackwell.
- PURRELLO, M., ALHADEFF, B., ESPOSITO, D., *et al.*, 1985, “The human genes for haemophilia A and haemophilia B flank the X chromosome fragile site at Xq27.3”, *The EMBO Journal.*, v. 4, pp. 725-729.

- REHEMTULLA, A., ROTH, D. A., WASLEY, L. C., *et al.*, 1993, "In vitro and in vivo functional characterization of bovine vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylase expressed in Chinese hamster ovary cells", *Proceedings of the National Academic of Sciences*, v. 90, pp. 4611-1615.
- REHEMTULLA, A., DORNER A. J., KAUFMAN, R. J., 1992, "Regulation of PACE propeptide-processing activity: requirement for a post-endoplasmic reticulum compartment and autoproteolytic activation", *Cell Biology*, v. 89, pp. 8235-8239.
- RIDDEL, J. P., AOUIZERAT, B. E., MIASKOWSKI, C., *et al.*, 2007, "Theories of blood coagulation", *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, v. 24, pp. 123.
- RISHAVY, M. A., BERKNER K. L., 2008, "Insight into coupling mechanism of the vitamin K-dependent carboxylase: mutation of histidine 160 disrupts glutamic acid carbanion formation and efficient coupling of vitamin K epoxidation to glutamic acid carboxylation", *Biochemistry*, v. 47, pp. 9836-9846.
- ROTH, D. A., KESELER, C. M., PASI, K. J., *et al.*, 2001, "Human recombinant factor IX: safety and efficacy studies in hemophilia B patients previously treated with plasma-derived factor IX concentrates", *Blood*, v. 98, pp. 3600-3606.
- SADOWSKI, P. D., 1995, "The Flp recombinase of the 2-Hum plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*", *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, v. 51, pp. 53-91.
- SHAIKH, A. C., SADOWSKI P. D., 2000, "Chimeras of Flp and Cre recombinases: test of the mode of cleavage by Flp and Cre", *Journal of Molecular Biology*, v. 302, pp. 27-48.

- SHAO, L., LUO, Y., MOLONEY, D. J., HALTIWANGER, R. S., 2002, "O-glycosylation of EGF repeats: identification and characterization of a UDP-glucose: protein O-glucosyltransferase", *Glycobiology*, v. 12, pp. 763-770.
- SHAPIRO, A. D., PAOLA, J., COHEN, A., *et al.*, 2005, "The safety and efficacy of recombinant human blood coagulation factor IX in previously untreated patients with severe or moderately hemophilia B", *Blood*, v. 105, pp. 518-525.
- SOEHNGE, H., OUKTIT, A., ANANTHASWAMY, O. N., 1997, "Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation", *Frontiers of Bioscience*, v. 2, pp. 538-551.
- STAFFORD, D. W., 2005, "The vitamin K cycle", *Journal of Trombosis and Haemostasis*, v. 3, pp. 1873-1878.
- STANLEY, T. B., JIN, D. Y., LIN, P. J., 1999, "The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase", *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, pp. 16940-16944.
- STENFLO, J., 1974, "Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. IV. Isolation of peptides containing prosthetic groups from normal prothrombin and the corresponding peptides from dicoumarol-induced prothrombin", *Journal of Biological Chemistry*, v. 249, pp. 5527-5535.
- STENFLO, J., FERNLUND, P., EGAN, W., *et al.*, 1974, "Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin", *Proceedings of the National Academic of Sciences*, v.71, pp. 2730-2733.

- STENFLO, J., 1991, "Structure-function relationships of epidermal growth factor modules in vitamin K-dependent clotting factors", *Blood*, v. 78, pp. 1637-1651.
- SUNNERHAGEN, M., DRAKENBERG, T., FORSEN, S., *et al.*, 1996, "Effect of Ca<sup>2+</sup> on the structure of vitamin K-dependent coagulation factors", *Haemostasis*, v.26, pp. 45-53.
- TIE, J-K., NICCHITTAS, C., HEIJNE, G. V., *et al.*, 2005, "Membrane topology mapping of vitamin K epóxido reductase by *in vitro* translation/cotranslocation" *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, pp. 16410-16416.
- TIE, J-K., STAFFORD D. W., 2008, "Structure and function of vitamin K epoxide reductase", *Vitamins and Hormones*, v. 78, pp. 103-130.
- TIE, J.K, WU, S. M., JIN, D. Y., *et al.*, 2000, "A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase", *Blood*, v. 96, pp. 973-978.
- WAJIH, N., OWEN, J., WALLIN R., 2008, "Enhancer functional recombinant factor VII production by HEK 293 cells stably transfected with VKORC1 where the gamma-carboxylase inhibitor calumenin is stably suppressed by shRNA transfection", *Thrombosis Research*, v. 122, pp. 405-410.
- WAJIH, N., SANE, D. C., HUTSON, S. M., *et al.*, 2005a, "Engineering of a recombinant vitamin K-dependent gamma-carboxylation system with enhanced gamma-carboxy glutamic acid forming capacity: evidence for a functional CXXC redox center in the system", *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, pp. 10540-10547.

- WAJIH, N., HUTSON, S. M., OWEN, J., *et al.*, 2005b, "Increased production of functional recombinant human clotting factor IX by baby hamster kidney cells engineering to overexpress VKORC1, the vitamin K 2,3-epoxide-reducing enzyme of the vitamin K cycle", *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, pp. 31603-31607.
- WAJIH, N., HUTSON, S. M., WALLIN R., 2006, "siRNA silencing of calumenin enhances functional factor IX production", *Blood*, v. 108, pp. 3757-3760.
- WAJIH, N., HUTSON, S. M., WALLIN R., 2007, "Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmatic reticulum" *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, pp. 2626-2635.
- WAJIH, N., SANE D. C., HUTSON, S. M., *et al.*, 2004, "The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system: characterization of the system in normal and warfarin resistant rats", *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, pp. 25276-25283.
- WALLIN, R., HUTSON, S. M., 2004, "Warfarin and the vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation system", *TRENDS in Molecular Medicine*, v. 10, pp. 299-302.
- WALLIN, R., HUTSON, S. M., CAIN, D., *et al.*, 2001, "A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in rat", *The FASEBJ Journal.*, v. 15, pp. 2542-2544.
- WALLIN, R., SANE, D. C., HUTSON S. M., 2002, "Vitamin K 2,3-epoxide reductase and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system", *Thrombosis Research*, v. 8, pp. 221-226.

- WALLIN, R., WAJIH, N., HUTSON, S. M., 2008, "VKORC1: a warfarin-sensitive enzyme in vitamin K metabolism and biosynthesis of vitamin K-dependent blood coagulation factors", *Vitamins and Hormones*, v. 78, pp. 227-246.
- WALSH, G., 2002, "Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature", *European Journal of Pharmaceuticas. Science*, v. 15, pp. 135-138.
- WALSH, G., 2003a, "Biopharmaceutical benchmarks – 2003", *Nature Biotechnology*, v. 21, pp. 865-878.
- WALSH, G., 2003b, "Biopharmaceuticals – Biochemistry and Biotechnology", 2<sup>a</sup> ed., John Wiley and Sons, Chichester.
- WALSH, G., 2005, "Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions" *TRENDS in Biotechnology*, v. 23, pp. 553-558.
- WASLEY, L. C., REHEMTULLA, A., BRISTOL, J. A., *et al.*, 1993, "PACE/Furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway", *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, pp. 8458-8465.
- WIRTH, M., BODE J., ZETTLMEISSL, G. *et al.*, 1988, "Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure", *Gene*, v. 73, pp. 419-426.
- WU, S. M., CHEUNG, W. F., 1991, "Cloning and expression of cDNA for human gamma-glutamyl carboxilase", *Science*, v. 254, pp. 1634-6.

YOSHITAKE, S., SCHACH, B. G., FOSTER, D. C., *et al.*, 1985, "Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B)", *Biochemistry*, v. 24, pp. 3736-3750.

## ANEXO 1

### INICIADORES UTILIZADOS

<b>Iniciadores usados nas reações de PCR</b>		
Identificação	Sequência (5'-3')	Tm (°C)
FIX-fwr	( <i>Xho</i> I-CTC GAG) ATG CAG CGC GTG GAA CAT	52
FIX-rev	( <i>Asc</i> I-GGC GCG CCG) GAA AGT GAT TAG T	54
Carb-fwr	( <i>Xba</i> I-TCT AGA) CAA TGG CGG TGT CTG	55
Carb-rev	( <i>Not</i> I-GCG GCC) GCC CCT TCA GAA CTC TGA GTG	55
VKORC1-fwr	( <i>Xba</i> I-TCT AGA) GGA GAT AAT GGG CAG CAC	55
VKORC1-rev	( <i>Not</i> I-GCG GCC) GCT CATCAG TCC CTC TTA GCC	55
PACE-fwr	( <i>Xba</i> I-TCT AGA) GTC CCA GCC ACC TGT C	58
PACE-rev	( <i>Not</i> I-GCG GCC) GCG GGC TCA TCA	58
T7	Universal	50
T3	Universal	50
BGH-r	Universal	50
Sp6	Universal	50

<b>Iniciadores usados no PCR em tempo real</b>		
Identificação	Sequência (5'-3')	Tm (°C)
<b>Gene do Fator IX</b>		
FIX 6R	ATG TTC GTG TAT TCC TTG TCA GC	56.6
FIX 940 F	CAT GAC ATT GCC CTT CTG GAA	55
<b>Gene da g-carboxilase</b>		
Carb 2F	CCC ACT GCC ACT TGA CTG GAT GTA	60.8
Carb 2R	ACA CAG CTT ATC CGG TAG CAC AGG	60.7
<b>Gene da VKORC1</b>		
VKORC1 2F	ATC AGC TGT TCG CGC GTC TTC TC	61.7
VKORC1 2R	GCT GTT GGA TTG ATT GAG GAT GCT GT	59.6
<b>Gene da PACE</b>		
PACE 2F	TGA CGG CAA GAC AGT GGA TGG G	61.6
PACE 2R	TCC CCG AGG CCC AGA CAA AGA T	62.7
<b>Controle endógeno para células CHO-β-actina</b>		
β-actina F	GCT GAC CGG ATG CAG AAG GAG AT	61
β-actina R	GGA GCC ACC GAT CCA CAC AGA G	61.8



<b>Iniciadores usados no sequenciamento</b>		
<b>Identificação</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>Gene do Fator IX</b>		
FIX 3F	GAA AAC CAG AAG TCC TGT GAA CC	58.4
FIX 5F	AAC TGG ACG AAC CCT TAG TGC	57.8
FIX 4R	ACG GGT GAG CTT AGA AGT TTG TG	58.4
FIX-fwr	( <i>Xho</i> I-CTC GAG) ATG CAG CGC GTG GAA CAT	52
FIX-rev	( <i>Asc</i> I-GGC GCG CCG) GAA AGT GAT TAG T	54
BGH-r	Universal	50
sp6	Universal	50
T7	Universal	50
<b>Gene da <math>\gamma</math>-carboxilase</b>		
Carb-fwr	( <i>Xba</i> I-TCT AGA) CAA TGG CGG TGT CTG	55
Carb-rev	( <i>Not</i> I-GCG GCC) GCC CCT TCA GAA CTC TGA GTG	55
Carb 2F	CCC ACT GCC ACT TGA CTG GAT GTA	60.8
Carb 2R	ACA CAG CTT ATC CGG TAG CAC AGG	60.7
Carb 3F	GGA CGG TCT GCT GAA TG	53.1
Carb 3R	AGG GCT AGG TGA TGT CGT	55.5
T3	Universal	50
BGH-r	Universal	50
<b>Gene da VKORC1</b>		
VKORC1-fwr	( <i>Xba</i> I-TCT AGA) GGA GAT AAT GGG CAG CAC	55
VKORC1-rev	( <i>Not</i> I-GCG GCC) GCT CATCAG TCC CTC TTA GCC	55
VKORC1 2F	ATC AGC TGT TCG CGC GTC TTC TC	61.7
VKORC1 2R	GCT GTT GGA TTG ATT GAG GAT GCT GT	59.6
BGH-r	Universal	50
T3	Universal	50
<b>Gene da PACE</b>		
PACE-fwr	( <i>Xba</i> I-TCT AGA) GTC CCA GCC ACC TGT C	58
PACE-rev	( <i>Not</i> I-GCG GCC) GCG GGC TCA TCA	58
PACE 2F	TGA CGG CAA GAC AGT GGA TGG G	61.6
PACE 2R	TCC CCG AGG CCC AGA CAA AGA T	62.7
T3	Universal	50

## SEQUÊNCIAS DOS GENES UTILIZADOS

### **FATOR IX (Genbank – NM-000133)**

ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATCACCATCTGCCTTTT  
AGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAA  
TTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAAC  
CTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGA  
AAACACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGT  
CCAATCCATGTTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGG  
TGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAA  
TGCCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTA  
CTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCA  
TGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCC  
TGATGTGGACTATGTAATTTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAA  
GCACCCAATCATTTAATGACTTCACGCGTGTGTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGT  
CAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTAT  
CGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTGTGCCCCTGTGTTGAAACTGGTGTTAAAATTA  
CAGTTGTCGCCGGCGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAGCGAAAT  
GTGATTCGAATTATTCCTCACCACAACACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGA  
CATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTT  
GCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGT  
GGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGT  
TCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACA  
TGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGA  
CCCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGA  
AGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACT  
GGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTAATGAAAGATGGATTTCCAAGGTAAATTCATT  
GGAATTGAAAATTAACAGGCGGNCGCTTTTCTGAATTCAGCACACTGGCGGCC

### **$\gamma$ -CARBOXILASE (Genbank – NM-000821)**

ATGGCGGTGTCTGCCGGGTCCGCGCGGACCTCGCCCAGCTCAGATAAAGTACAGAAAGA  
CAAGGCTGAACTGATCTCAGGGCCCAGGCAGGACAGCCGAATAGGGAAACTCTTGGGTT  
TTGAGTGGACAGATTTGTCCAGTTGGCGGAGGCTGGTGACCCTGCTGAATCGACCAACG  
GACCCCTGCAAGCTTAGCTGTCTTTCGTTTTCTTTTTGGGTTCTTGATGGTGTGCTAGACAT  
TCCCCAGGAGCGGGGCTCAGCTCTCTGGACCGGAAATACCTTGATGGGCTGGATGTGTG  
CCGCTTCCCCTTGCTGGATGCCCTACGCCACTGCCACTTGACTGGATGTATCTTGTCT  
ACACCATCATGTTTCTGGGGGCACTGGGCATGATGCTGGGCCTGTGCTACCGGATAAGC  
TGTGTGTTATTCCTGCTGCCATACTGGTATGTGTTTCTCCTGGACAAGACATCATGGAA  
CAACCACTCCTATCTGTATGGGTTGTTGGCCTTTCAGCTAACATTCATGGATGCAAACC

ACTACTGGTCTGTGGACGGTCTGCTGAATGCCCATAGGAGGAATGCCACGTGCCCTT  
TGGAACATATGCAGTGCTCCGTGGCCAGATCTTCATTGTGTACTTCATTGCGGGTGTGAA  
AAAGCTGGATGCAGACTGGGTTGAAGGCTATTCCATGGAATATTTGTCCCGGCACTGGC  
TCTTCAGTCCCTTCAAACCTGCTGTTGTCTGAGGAGCTGACTAGCCTGCTGGTCTGCAC  
TGGGGTGGGCTGCTGCTTGACCTCTCAGCTGGTTTCCTGCTCTTTTTTGTATGTCTCAAG  
ATCCATTGGACTGTTCTTTGTGTCTACTTCCACTGCATGAATTCCCAGCTTTTCAGCA  
TTGGTATGTTCTCCTACGTCATGCTGGCCAGCAGCCCTCTCTTCTGCTCCCCCTGAGTGG  
CCTCGGAAGCTGGTGTCTACTGCCCCCGAAGGTTGCAACAACCTGTTGCCCTCAAGGC  
AGCCCCTCAGCCCAGTGTTCCTGTGTGTATAAGAGGAGCCGGGGCAAAGTGGCCAGA  
AGCCAGGGCTGCGCCATCAGCTGGGAGCTGCCTTACCCTGCTCTACCTCCTGGAGCAG  
CTATTCCTGCCCTATTCTCATTTTTCTCACCCAGGGCTATAACAACCTGGACAAATGGGCT  
GTATGGCTATTCTCCTGGGACATGATGGTGCCTCCCGCTCCCACCAGCAGCTGAAGATCA  
CCTACCGTGATGGCCGCACTGGCGAAGTGGGCTACCTTAACCCTGGGTATTTACACAGA  
GTCGGCGATGGAAGGATCATGCAGACATGCTGAAGCAATATGCCACTTGCCTGAGCCGC  
CTGCTTCCCAAGTATAATGTCACTGAGCCCCAGATCTACTTTGATATTTGGGTCTCCAT  
CAATGACCGCTTCCAGCAGAGGATTTTTGACCCTCGTGTGGACATCGTGCAGGCCGCTT  
GGTCACCCTTTCAGCGCACATCCTGGGTGCAACCACTCTTGATGGACCTGTCTCCCTGG  
AGGGCCAAGTTACAGGAAATCAAGAGCAGCCTAGACAACCACACTGAGGTGGTCTTCAT  
TGCAGATTTCCCTGGACTGCACTTGGAGAATTTTGTGAGTGAAGACCTGGGCAACACTA  
GCATCCAGCTGCTGCAGGGGGAAGTGAAGTGGAGCTTGTGGCAGAACAGAAGAACCAG  
ACTCTTCGAGAGGGGAGAAAAAATGCAGTTGCCTGCTGGTGAGTACCATAAGGTGTATAC  
GACATCACCTAGCCCTTCTTGCTACATGTACGTCTATGTCAACACTACAGAGCTTGCAC  
TGGAGCAAGACCTGGCATATCTGCAAGAATTAAGGAAAAGGTGGAGAATGGAAGTGAA  
ACAGGGCCTTACCCCCAGAGCTGCAGCCTCTGTTGGAAGGGGAAGTAAAAGGGGGCCC  
TGAGCCAACACCTCTGGTTCAGACCTTTCTTAGACGCCAACAAAGGCTCCAGGAGATTG  
AACGCCGGCGAAATACTCCTTTCCATGAGCGATTCTTCCGCTTCTTGTGCGAAAGCTC  
TATGTCTTTTCGCCGCACTTCCCTGATGACTTGTATCTCACTTCGAAATCTGATATTAGGC  
CGTCTTCCCTGGAGCAGCTGGCCCAGGAGGTGACTTATGCAAACCTGAGACCCTTTGA  
GGCAGTTGGAGAACTGAATCCCTCAAACACGGATTCTTCACATTCTAATCCTCCTGAGT  
CAAATCCTGATCCTGTCCACTCAGAGTTCTGA

## **VKORC1 (Genbank – NM-024006)**

TCTAGAGGAGATAATGGGCAGCACCTGGGGGAGCCCTGGCTGGGTGCGGCTCGCTCTTT  
GCCTGACGGGCTTAGTGCTCTCGCTCTACGCGCTGCACGTGAAGGCGGCGCGCCCGG  
GACCGGGATTACCGCGCGCTCTGCGACGTGGGCACCGCCATCAGCTGTTGCGCGTCTT  
CTCCTCCAGGTGGGGCAGGGGTTTCGGGCTGGTGGAGCATGTGCTGGGACAGGACAGCA  
TCCTCAATCAATCCAACAGCATATTCGGTTGCATCTTCTACACACTACAGCTATTGTTA  
GGTTGCCTGCGGACACGCTGGGCCTCTGTCTGATGCTGCTGAGCTCCCTGGTGTCTCT  
CGCTGGTTCTGTCTACCTGGCCTGGATCCTGTTCTTCGTGCTCTATGATTTCTGCATTG  
TTTGTATCACCACTATGCTATCAACGTGAGCCTGATGTGGCTCAGTTTCCGGAAGGTC  
CAAGAACCCCAGGGCAAGGCTAAGAGGCACTGATGAGCGGCCCTGAATCTGCAGATA  
TCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAG

## PACE (Genbank – NM-002569)

CGAGGCCCTGTGACCAGGCCAAGGAGACGGGCGCTCCAGGGTCCCAGCCACCTGTCCCC  
CCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACAGGAACCTTGGTCTT  
GCTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAAGGTCTTCACCAACACGTGGGCTGTGCGCATCC  
CTGGAGGCCCAGCGGTGGCCAACAGTGTGGCACGGAAGCATGGGTTCCTCAACCTGGGC  
CAGATCTTCGGGGACTATTACCACTTCTGGCATCGAGGAGTGACGAAGCGGTCCCTGTC  
GCCTCACCGCCCGCGGCACAGCCGGCTGCAGAGGGAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGAAC  
AGCAGGTGGCAAAGCGACGGACTAAACGGGACGTGTACCAGGAGCCACAGACCCCAAG  
TTTCCTCAGCAGTGGTACCTGTCTGGTGTCACTCAGCGGGACCTGAATGTGAAGCGGC  
CTGGGCGCAGGGCTACACAGGGCACGGCATTGTGGTCTCCATTCTGGACGATGGCATCG  
AGAAGAACCACCCGGACTTGGCAGGCAATTATGATCCTGGGGCCAGTTTTGATGTCAAT  
GACCAGGACCCTGACCCCCAGCCTCGGTACACACAGATGAATGACAACAGGCACGGCAC  
ACGGTGTGCGGGGGAAGTGGCTGCGGTGGCCAACAACGGTGTCTGTGGTGTAGGTGTGG  
CCTACAACGCCCGCATTGGAGGGGTGCGCATGCTGGATGGCGAGGTGACAGATGCAGTG  
GAGGCACGCTCGCTGGGCCTGAACCCCAACCACATCCACATCTACAGTGCCAGCTGGGG  
CCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGGGCCAGCCCGCCTCGCCGAGGAGGCCTTCT  
TCCGTGGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGGGTGGGCTCCATCTTTGTCTGGGCCTCGGG  
AACGGGGGCCGGAACATGACAGCTGCAACTGCGACGGCTACACCAACAGTATCTACAC  
GCTGTCCATCAGCAGCGCCACGCAGTTTTGGCAACGTGCCGTGGTACAGCGAGGCCTGCT  
CGTCCACACTGGCCACGACCTACAGCAGTGGCAACCAGAATGAGAAGCAGATCGTGACG  
ACTGACTTGCGGCAGAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCCTCTGCCCCCTT  
AGCAGCCGGCATCATTGCTCTCACCCCTGGAGGCCAATAAGAACCTCACATGGCGGGACA  
TGCAACACCTGGTGGTACAGACCTCGAAGCCAGCCACCTCAATGCCAACGACTGGGCC  
ACCAATGGTGTGGGCCGGAAGTGAGCCACTCATATGGCTACGGGCTTTTGGACGCAGG  
CGCCATGGTGGCCCTGGCCCAGAATTGGACCACAGTGGCCCCCAGCGGAAGTGCATCA  
TCGACATCCTCACCGAGCCCAAAGACATCGGGAAACGGCTCGAGGTGCGGAAGACCGTG  
ACCGCGTGCCTGGGCGAGCCCAACCACATCACTCGGCTGGAGCACGCTCAGGCGCGGCT  
CACCCCTGTCTATAATCGCCGTGGCGACCTGGCCATCCACCTGGTCAGCCCCATGGGCA  
CCCCTCCACCCTGCTGGCAGCCAGGCCACATGACTACTCCGCAGATGGGTTTTAATGAC  
TGGGCCTTCATGACAACTCATTCTGGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGGTCTTAGA  
GATTGAAAACACCAGCGAAGCCAACAACCTATGGGACGCTGACCAAGTTCACCCCTCGTAC  
TCTATGGCACCGCCCCTGAGGGGCTGCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACC  
CTCACGTCCAGTCAGGCCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTTCTCCCTGCACCAGAAGAG  
CTGTGTCCAGCACTGCCCTCCAGGSTTCGCCCCCAAGTCTCGATACGCACTATAGCA  
CCGAGAATGACGTGGAGACCATCCGGGCCAGCGTCTGCGCCCCCTGCCACGCCTCATGT  
GCCACATGCCAGGGGCCGGCCCTGACAGACTGCCTCAGCTGCCCCAGCCACGCCTCCTT  
GGACCCTGTGGAGCAGACTTGCTCCCGGCAAAGCCAGAGCAGCCGAGAGTCCCCGCCAC  
AGCAGCAGCCACCTCGGCTGCCCCCGGAGGTGGAGGCGGGGCAACGGCTGCGGGCAGGG  
CTGCTGCCCTCACACCTGCCTGAGGTGGTGGCCGGCCTCAGCTGCGCCTTCATCGTGCT  
GGTCTTCGTCACTGTCTTCTGGTCTGTCAGCTGCGCTCTGGCTTTAGTTTTCGGGGG  
TGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTCATCTCTTACAAGGGGCTGCCCCCTGAAGCC  
TGGCAGGAGGAGTGCCCGTCTGACTCAGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGAGAGGACCGC  
CTTTATCAAAGACCAGAGCGCCCTCTGATGAGCC