



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EXPRESSÃO DE ENDOSTATINA MURINA RECOMBINANTE
EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE
HAMSTER CHINÊS**

ROSA MARIA CHURA CHAMBI

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

**Orientadora:
Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias**

**São Paulo
2004**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**EXPRESSÃO DE ENDOSTATINA MURINA RECOMBINANTE
EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS**

ROSA MARIA CHURA CHAMBI



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

Orientadora:
Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

"Exemplar revisado pelo autor"

São Paulo
2004

Dedico esse trabalho

Aos meus pais **Gregoria Chambi**
e **Ricardo Chura**, apesar da
distância sempre estão presentes
no meu coração.

Ao meu irmão **Roberto Chura**, pelo
incentivo e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Lígia Ely Morganti Ferreira Dias pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

À todos os colegas do Centro de Biologia Molecular do IPEN pelo auxílio e apoio.

Ao Dr. Jay Fox (University of Virginia Charlottesville, E.U.A.) pela realização do seqüenciamento N-terminal.

Ao Dr. Randall Kauffman (Howard Hughes Medical Institute, University of Michigan) pela doação do vetor de expressão utilizado no presente trabalho.

Ao Centro de Toxicologia Aplicada (Instituto Butantan) pela realização da espectrometria de massa.

Às amigas Antonia Medeiros, Débora Medeiros, Teresa Ferreira, Solange Lorenzetti, Katia Suzuki, Simone Alberigi, Magda Huarco e Lucy Zapata pela amizade sincera e pela colaboração em todo momento.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP pela concessão dos recursos financeiros para realização deste projeto (Auxílio à Pesquisa Processo nº 00/04658-0).

À todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

EXPRESSÃO DE ENDOSTATINA MURINA RECOMBINANTE EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS

Rosa Maria Chura Chambi

RESUMO

A endostatina, um fragmento C-terminal do colágeno XVIII, tem mostrado atuar como um agente antiangiogênico que inibe especificamente a proliferação de células endoteliais e o crescimento de vários tumores primários em camundongos. No presente estudo reportamos a expressão de endostatina murina e a proteína de fusão (his)₆-met-endostatina em células de ovário de hamster chinês (CHO). O cDNA da endostatina murina foi clonado no vetor de expressão dicistrônico pED e inserido a 5' do gene do marcador gênico amplificável diidrofolato redutase (DHFR). Após transfecção dos vetores de expressão, concentrações crescentes de metotrexato (MTX) foram adicionadas ao meio de cultura, promovendo a amplificação gênica e incremento dos níveis de expressão das proteínas de interesse. O nível de expressão da endostatina nativa foi de 78 mg/L enquanto a expressão de (his)₆-met-endostatina foi de 114 mg/L, para os melhores clones. A caracterização físico-química e atividade imunológica das proteínas foram realizadas utilizando SDS-PAGE e Western blotting. A atividade biológica da endostatina recombinante foi testada pelo ensaio de proliferação celular usando células endoteliais de artéria de bezerro (C-PAE). Tanto a endostatina recombinante quanto a (his)₆-met-endostatina inibiram, de modo dose-dependente, o crescimento das células C-PAE estimuladas pelo fator de crescimento vascular básico (bFGF).

EXPRESSION OF RECOMBINANT MURINE ENDOSTATIN IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS

Rosa Maria Chura Chambi

ABSTRACT

Endostatin, a carboxy-terminal fragment of collagen XVIII, has been shown to act as an anti-angiogenic agent, that specifically inhibits proliferation of endothelial cells and growth of various primary tumors. Here we describe the expression by chinese hamster ovary (CHO) cells of murine endostatin and of a tagged fusion protein, (his)₆-met-endostatin. A dicistronic mRNA-based plasmid expression vector was utilized in which endostatin cDNA was inserted upstream of the amplifiable marker gene, dihydrofolate reductase (DHFR). After transfection of the expression vectors, stepwise increments in methotrexate levels in the culture medium were applied, promoting gene amplification and increasing expression levels of the proteins of interest. The expression levels of secreted native endostatin was about 78 mg/L while the one for secreted (his)₆-met-endostatin was about 114 mg/L, for the best expressing clones. Characterization of physico-chemical and immunological activities of the proteins were performed using SDS-PAGE and Western blotting. The biological activities of recombinant endostatins were tested with a cow pulmonary artery endothelial (C-PAE) cell proliferation assay. Both recombinant endostatin and (his)₆-met-endostatin inhibited, in a dose-dependent fashion, growth of C-PAE cells stimulated by basic fibroblast growth factor (bFGF).

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Angiogênese.....	1
1.2. Endostatina.....	3
1.3. Vetor pED.....	7
1.4. Biohíbridos.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Materiais.....	11
3.1.1. Equipamentos e acessórios principais.....	11
3.1.2. Reagentes principais utilizados em procedimentos de Biologia Molecular.....	11
3.1.3. Vetores plasmídicos.....	12
3.1.4. Linhagens celulares.....	12
3.1.5. Reagentes utilizados na cultura celular.....	12
3.1.6. Outros.....	13
3.2. Métodos.....	14
3.2.1. Construção dos vetores de expressão pED-endo e pED-(his) ₆ -met-endo.....	14
3.2.1.1. Obtenção do gene da endostatina.....	14
3.2.1.2. Isolamento do DNA contendo seqüências para um peptídeo sinalizador e o cDNA da endostatina ou (his) ₆ -met-endostatina.....	14
3.2.1.3. Purificação dos fragmentos de DNA inserto.....	15
3.2.1.4. Digestão do vetor pED.....	15
3.2.1.5. Reação de ligação do gene da endostatina e (his) ₆ -met-endostatina no vetor pED.....	15
3.2.1.6. Transformação de bactérias eletrocompetentes, amplificação e purificação do produto da reação de ligação.....	16

3.2.2. Transfecção, amplificação gênica e expressão das proteínas recombinantes.....	16
3.2.2.1. Transfecção pelo método de fosfato de cálcio.....	16
3.2.2.2. Seleção e amplificação dos clones de células CHO transfectadas.....	17
3.2.2.3. Obtenção do meio condicionado.....	17
3.2.3. Caracterização e quantificação das proteínas recombinantes.....	18
3.2.3.1. SDS-PAGE.....	18
3.2.3.2. Western Blotting.....	19
3.2.3.3. Determinação dos níveis de expressão das proteínas recombinantes.....	19
3.2.3.4. Espectrometria de massa (MALDI-TOF) (ionização/desorção por laser matriz assistida).....	20
3.2.3.5. Sequenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal.....	21
3.2.4. Atividade biológica.....	21
3.2.4.1. Ensaio de proliferação das células C-PAE.....	21
3.2.5. Perfil de crescimento celular.....	22
3.2.6. Expressão de endostatina pelas células CHO (pED-(his) ₆ -met-endo) encapsuladas e mantidas em cultura.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Construção dos vetores de expressão pED-endo e pED-(his) ₆ -met-endo....	25
4.1.1. Análise de restrição de clones positivos de bactérias transformadas com os vetores pED-endo e pED-(his) ₆ -met-endo.....	26
4.2. Transfecção, seleção, amplificação gênica e expressão das proteínas recombinantes.....	27
4.2.1. Transfecção pelo método de fosfato de cálcio.....	27
4.2.2. Amplificação gênica dos clones positivos.....	27
4.3. Caracterização e quantificação das proteínas recombinantes.....	27
4.3.1. Meio condicionado.....	27
4.3.2. SDS-PAGE.....	28
4.3.3. Western Blotting.....	32

4.3.4. Níveis de expressão das proteínas recombinantes.....	33
4.3.5. Espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	34
4.3.6. Seqüenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal.....	39
4.4. Atividade biológica.....	39
4.5. Perfil de crescimento celular.....	40
4.6. Ensaio de cultura de células CHO expressando endostatina no dispositivo Theracyte "in vitro".....	43
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Angiogênese

A angiogênese é um processo fisiológico definido como a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes e é requerida nos ciclos reprodutivos femininos (ovulação, menstruação, gravidez) e na regeneração de órgãos e tecidos (30).

Várias evidências sugerem que a angiogênese é essencial para o crescimento e sobrevivência de tumores sólidos e suas metástases (22, 33, 45, 54). Esta teoria originalmente formulada por Judah Folkman têm impulsionado dramaticamente o estudo da angiogênese na área oncológica nas últimas décadas.

Em um estágio pré-vascular um tumor sólido raramente cresce mais do que 2 a 3 mm e pode conter alguns milhões de células. As células de tumores pré-vasculares podem proliferar tão rapidamente quanto aquelas de um tumor em expansão, no entanto, a taxa de crescimento de células em tumores sem neovascularização fica em equilíbrio com a sua taxa de mortalidade. Uma vez que o tumor se torna vascularizado, ele cresce exponencialmente. A infiltração de novos vasos sangüíneos supre as células tumorais de oxigênio e nutrientes e remove os produtos de seu metabolismo (21).

O aumento da população celular tumoral é precedido pela proliferação de novos capilares nas proximidade do tumor. A angiogênese pode facilitar a formação de metástases aumentando a saída de células tumorais do sítio primário e sua entrada na circulação sangüínea através destes capilares, que são mais permeáveis do que os vasos maduros normais (18, 30, 36).

As células tumorais presentes num tumor primário produzem e liberam fatores angiogênicos nos tecidos próximos ao tumor. Estes fatores se ligam a receptores celulares específicos encontrados nas superfícies das células endoteliais e em conseqüência, formando novos vasos sangüíneos que vão levar nutrientes e oxigênio para o tumor. Geralmente a migração celular ocorre em direção ao local de

origem das moléculas angiogênicas e as formações destes vasos são remodeladas progressivamente para suprir as necessidades fisiológicas locais (10). Os fatores pró-angiogênicos mais conhecidos são o fator de crescimento de fibroblastos (forma ácida ou aFGF e forma básica ou bFGF) (38, 33, 55) e o fator de crescimento de célula endotelial (VEGF) (5, 45), os quais apresentam ação mitogênica sobre as células endoteliais. Tanto o VEGF quanto bFGF apresentam expressão aumentada em células de vários tipos de tumores (46). A hipóxia das células tumorais leva a um aumento de expressão de VEGF (76). Estas duas famílias de fatores angiogênicos podem promover a neovascularização de uma maneira sinérgica (61). Entre outros reguladores positivos de angiogênese estão a angiotropina, angiogenina, o fator de crescimento epidérmico, citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e proteínas da matriz tais como colágeno e as integrinas (69).

Por outro lado, também foi verificado que muitos tumores primários liberam além de fatores angiogênicos, fatores inibidores da angiogênese (12) que incluem a angiostatina (57, 26), trombospondina (28) e endostatina (56, 2), os quais podem modular a angiogênese, tanto no tumor primário, quanto em suas metástases.

O fenótipo angiogênico de um tumor aparentemente é o resultado entre o balanço dos reguladores positivos e negativos da neovascularização (65, 28, 57, 59). Sendo que a angiogênese parece ser o resultado entre o balanço dinâmico entre os fatores proangiogênicos e antiangiogênicos, a elevação da concentração de inibidores endógenos da angiogênese deveria levar a um balanço a favor da inibição da neovascularização. Assim, sem um fluxo sanguíneo efetivo, as células tumorais, morreriam por falta de oxigênio e nutrientes.

A inibição da angiogênese torna-se, portanto, uma promissora via para o tratamento do câncer. Consideráveis esforços têm sido direcionados para utilizar a terapia antiangiogênica como uma nova modalidade de tratamento de câncer. Por ser a angiogênese um complexo processo de múltiplos estágios, um inibidor potencial pode atuar em diferentes estágios. Ele pode interferir na ativação das células endoteliais pelos fatores de crescimento, pela prevenção da degradação da

membrana basal do endotélio, progressão e migração, afetando a formação de novos vasos (70, 10, 9).

Vários inibidores da angiogênese têm sido desenvolvidos usando como alvo as células endotéliais vasculares a fim de bloquear a angiogênese tumoral ao invés das células tumorais em si. Esta é uma abordagem particularmente promissora, pois estas células são geneticamente estáveis e portanto menos aptas a sofrer mutações que as tornem capazes de desenvolver resistência às drogas, rapidamente (57).

Agentes têm sido desenvolvidos para ter como alvo diferentes estágios da angiogênese. Estes incluem drogas inibidoras da degradação da matriz extracelular, inibidores de metaloproteinases da matriz (MMPis), tais como marimastate, prinomastate, BMS27529, BAY12-9566, e neovastate que são drogas que bloqueiam a sinalização das células endoteliais via o fator de crescimento de célula endotelial vascular (VEGF) e seu receptor (VEGFR) incluindo rhuMAb VEGF, SU5416, SU6668, ZD6474, CP547, 632 e ZD4190 (77).

Dentre os inibidores endógenos de angiogênese mais promissores, para o tratamento de tumores sólidos humanos pode-se ressaltar a endostatina e a angiostatina (25, 46, 85, 14, 77, 79).

1.2 Endostatina

A endostatina, é um fragmento de 20 kDa da porção C-terminal do colágeno XVIII. Esta proteína descrita por O'Reilly e col. (1997) foi purificada do produto de secreção de uma linhagem celular murina de hemangioendotelioma e têm mostrado ser um inibidor específico de proliferação e migração de células endoteliais e angiogênese (16, 74).

A endostatina contém duas pontes dissulfídicas (Cys164–Cys304 e Cys266–296). Sua estrutura cristalográfica em 1.5 Å de resolução foi descrita por Hohenester (1998).

O grande interesse pela endostatina na área médica surgiu quando foi verificada sua capacidade de inibir tumores de tecido sólido "*in vivo*", suprimindo o fenótipo angiogênico, afetando a formação de vasos sanguíneos e o crescimento de

tumores. Trata-se por estes fatos de um agente com importante potencial terapêutico (2, 56, 68).

O tratamento com endostatina (20 mg/kg/dia) levou a quase completa regressão (estado de microtumores) de diferentes modelos de tumores primários (carcinoma pulmonar de Lewis, fibrosarcoma T241, hemangioendotelioma EOMA e melanoma B16F10) estabelecidos (56). O crescimento de metástases de tumor de pulmão de Lewis, após a remoção do tumor primário, foi quase completamente suprimido pela administração de endostatina enquanto nos camundongos tratados com solução salina, as metástases desenvolveram-se rapidamente (56).

Em um trabalho relacionado, Boehm e col. (1997) mostraram que ciclos repetitivos de endostatina administrados em camundongos portadores de tumores subcutâneos de diferentes tipos celulares, não produziram resistência ao tratamento, mesmo após 6 ciclos repetitivos de tratamento com endostatina. Os tumores se apresentaram em um estado de dormência prolongada ou permanecendo em um estado microscópico latente, mesmo após o término do tratamento.

A habilidade da endostatina em inibir a angiogênese também tem sido observada em numerosos estudos "*in vivo*" (73, 17). O tratamento com endostatina tem sido correlacionado à inibição da angiogênese em modelos animais, sem efeito colateral, toxicidade ou desenvolvimento de resistência à droga (4, 56, 2, 62).

O tratamento de tumores e metástases utilizando a endostatina, apresenta algumas vantagens sobre a quimioterapia convencional: o endotélio vascular é um alvo que pode ser facilmente atingido por agentes antiangiogênicos administrados sistemicamente; a endostatina é altamente específica para células endoteliais ativadas e sob condições fisiologicamente normais, com exceção dos órgãos reprodutores femininos, as células endoteliais não se dividem; possui baixa toxicidade; não causa resposta imunológica por se tratar de uma proteína endógena e apresenta ação sobre diferentes tipos de tumores pois sua atuação é sobre o endotélio e não sobre as células tumorais.

O mecanismo de ação da endostatina ainda não está totalmente esclarecido, mas trabalhos recentes demonstraram que a endostatina desencadeia a supressão de genes envolvidos na proliferação das células endoteliais, resultando

em um efeito antimigratório (75). Foi demonstrado também que a endostatina interage com a tropomiosina (proteína que estabiliza os filamentos de actina), resultando no rompimento da integridade dos microfilamentos, levando à inibição da mobilidade das células endoteliais e indução de apoptose (51). Foi reportado que a endostatina bloqueia a interação entre o VEGF (fator de crescimento da célula endotelial) e o receptor de superfície celular, KDR/Flk-1, inibindo a ligação do VEGF às células endoteliais resultando na inibição da proliferação e migração de células endoteliais (44). Foi descrito que a endostatina inibe a proliferação de células endoteliais bloqueando a atividade catalítica da enzima matriz metaloproteinase-2 (MMP), enzima envolvida na regulação da angiogênese e metástase tumoral (49).

A expressão de uma proteína de fusão, contendo a seqüência de aminoácidos MARRASVGTDHHHHHM seguida da endostatina murina insolúvel produzida em corpos de inclusão por *E. coli* transformadas foi obtida por O'Reilly e col. (1997). São bem descritas, no entanto, as dificuldades de solubilização e "refolding" a partir de proteínas produzidas em corpos de inclusão citoplasmáticos. Nesses processos geralmente são obtidos baixos rendimentos de proteína solúvel, com conformação correta, fato comprovado pela experiência no nosso laboratório em que foi seguido o protocolo de solubilização e refolding da endostatina descrito por Huang e col. (2000), obtendo-se baixos rendimentos de endostatina solúvel (dados não publicados); o mesmo resultado foi também observado por O'Reilly e col. (1997).

Foi também descrito por Xu e col. (2002) a expressão de endostatina recombinante secretada para o meio de cultura de *E. coli* transformadas, obtendo-se um rendimento da ordem de 40 mg de endostatina/L.

Dhanabal e col. (1999a e 1999b) descreveram a obtenção de endostatina humana e murina recombinantes por *Pichia pastoris* transfectadas (10-20 mg/L).

Foi obtida a transfecção estável de plasmídeo recombinante de endostatina recombinante utilizando células S2 de *Drosophila melanogaster* como hospedeiras. A produção de endostatina secretada para o meio de cultura em frascos de cultura foi da ordem de 0,5 mg/L.

Foi também descrita a transferência do gene da endostatina e sua expressão "*in vivo*" mediante utilização de vetores virais levando à supressão tumoral e prolongando a sobrevivência de animais (3, 74).

A expressão de genes heterólogos em células de mamíferos são sistemas nos quais proteínas recombinantes solúveis com uma correta conformação podem comumente ser obtidas. Além disso, meio de cultura livre de soro pode ser usado para se obter a expressão de altos níveis de proteínas recombinantes com baixos níveis de contaminantes. Ainda não foram descritas na literatura, transfecção estável de células de mamíferos com obtenção de altos níveis de endostatina murina recombinante.

O nível de expressão estável de genes eucarióticos introduzidos em células animais depende de vários fatores como o número de cópias do gene integradas ao cromossoma, sítio de integração, eficiência de transcrição, processamento, transporte e estabilidade do RNA mensageiro (mRNA), eficiência da tradução, processamento, transporte e estabilidade da proteína (42).

Altos níveis de expressão da proteína de interesse podem ser obtidos mediante seleção e posterior amplificação do DNA transfectado. Estudos extensivos sobre o mecanismo de amplificação gênica mostraram que existe a possibilidade de se amplificar genes exógenos transfectados juntamente com um determinado marcador (72). A amplificação gênica ocorre mais freqüentemente após seleção através de etapas com incrementos graduais na concentração de um agente seletivo. O gene amplificado poderá ser mantido ou perdido durante a propagação na ausência deste agente. Genes amplificados de forma estável são integrados ao cromossomo do hospedeiro e são freqüentemente associados com a expansão de regiões do cromossomo chamadas "regiões homoganeamente coradas"(42, 40).

Uma das linhagens celulares mais utilizadas para a expressão gênica estável de proteínas recombinantes em células de mamífero são as células de ovário de hamster chinês (CHO) (53). Essas células apresentam uma série de vantagens seus produtos apresentam uma comprovada similaridade com os equivalentes naturais, podem proporcionar níveis de produção elevados, se adaptam bem à ausência de soro e podem crescer tanto aderidas à superfície como em suspensão

(42). Uma outra vantagem é a possibilidade de se utilizar clones deficientes em diidrofolato redutase (DHFR) que é o caso do mutante DXB11.

1.3 Vetor pED

Este vetor foi utilizado para a expressão da endostatina recombinante e amplificação do gene da endostatina juntamente com o gene da DHFR.

A DHFR é uma enzima envolvida em processos essenciais de biossíntese celular, catalisa a conversão de folato a tetraidrofolato (FH_4). O tetraidrofolato é requerido na biossíntese de purinas. O metotrexato (MTX) é um análogo do ácido fólico, o qual se liga e inibe a enzima DHFR, levando à morte celular na ausência de nucleosídeos. Quando as células são selecionadas por aumentos graduais na concentração de MTX, a sua sobrevivência depende do aumento da síntese da DHFR, assim células sobreviventes passam a expressar concentrações crescentes de DHFR como consequência de um processo de amplificação gênica. Células altamente resistentes ao MTX podem conter mais de mil cópias do gene da DHFR, com consequente elevação dos níveis de DHFR expressa. Frequentemente, o grau de amplificação gênica é diretamente proporcional ao nível de expressão da DHFR (41, 42).

A ampla utilização do sistema de seleção baseado no DHFR se deve ao seu alto potencial de amplificação e à existência de mutantes de células CHO deficientes em DHFR (CHO-DXB11)(80). Esta linhagem deficiente requer timidina, glicina e hipoxantina presentes no meio de cultura para sobreviver. Na ausência desses nucleosídeos é necessário que tenham adquirido um gene DHFR funcional. Esta linhagem foi utilizada no presente trabalho.

No vetor pED o gene de interesse é introduzido na posição 5' e o gene de seleção/amplificação (DHFR) se encontra na posição 3' após o promotor. Um mRNA que codifica para 2 proteínas é denominado de RNA dicistrônico. No caso de um mRNA dicistrônico, a tradução do códon de iniciação a 5' (primeira proteína) é por volta de 100 vezes mais eficiente do que a tradução da segunda proteína (41). Devido à tradução ineficiente do gene do DHFR (segunda proteína), as células devem transcrever maiores níveis do mRNA dicistrônico para sobreviver à seleção.

pois a proteína expressa na posição 5' é traduzida preferencialmente. No vetor pED existe um sítio interno de ligação aos ribossomos, derivado do vírus da encefalomiocardite (EMC). A presença dessa sequência derivada do vírus da EMC antes do gene DHFR, torna a tradução dessa enzima mais eficiente diminuindo a possibilidade de deleção do gene de interesse. Esta construção possibilita a rápida e eficiente obtenção de altos níveis de expressão da proteína de interesse, após seleção e amplificação com MTX.

O sistema de expressão que utiliza células CHO deficientes em diidrofolato redutase (DHFR) e o gene DHFR de camundongo como marcador de seleção foi adotado na nossa estratégia de expressão por meio da transfecção do plasmídeo pED contendo o gene da endostatina em células CHO (CHO-DXB11) na tentativa de obtenção de altos níveis de endostatina murina.

1.4 Biohíbridos

A terapia por imunisolamento (ou uso de biohíbridos) se baseia no transplante de células alogênicas ou xenogênicas mantidas encapsuladas em uma barreira semipermeável que permite a passagem bidirecional de pequenas moléculas (oxigênio, nutrientes, metabólitos e secreções celulares bioativas) e restringindo a passagem de moléculas maiores e células do sistema imune do hospedeiro. Este tipo de dispositivo permite o transplante de células, que normalmente seriam rejeitadas pelo sistema imune do indivíduo, para produzirem altos níveis de proteínas com propriedades terapêuticas sem a necessidade de imunossupressão.

Normalmente ao redor dos dispositivos biohíbridos se forma uma camada de fibroblastos de aproximadamente 100µm. O tecido fibrótico aumenta a distância entre os vasos sanguíneos e o implante, levando à hipóxia das células no implante (13, 6). Foi no entanto recentemente descrita uma classe de membranas microporosas que induzem a neovascularização na interface material-tecido do hospedeiro (6, 37). Este tipo de membrana é composta de duas camadas, sendo que a membrana externa possui interstícios que possibilitam a infiltração das células inflamatórias do hospedeiro, provavelmente ocasionando a liberação de fatores

angiogênicos e/ou fatores que superam a inibição da vascularização. O efeito é de integração do biomaterial no tecido do hospedeiro, produzindo uma neovascularização ao redor do dispositivo. A camada interna, que fica em contato com as células apresenta poros menores ($0,4 \mu\text{m}$) utilizada para filtração de células, e moléculas de alto peso molecular (6). O processo de angiogênese leva de duas a três semanas para ser completado e aparentemente as estruturas vasculares permanecem indefinidamente (58).

A obtenção de células CHO que expressassem altos níveis da proteína antiangiogênica endostatina foi imprescindível para o cumprimento de um projeto em que se estudou o uso dessas células em dispositivos de imunisolamento (Theracyte) implantadas subcutaneamente em camundongos para tratamento de tumores sólidos. A liberação de endostatina pelas células em imunisolamento deveria possibilitar um suprimento persistente da proteína na circulação, com vantagem potencial sobre a administração intermitente da proteína, na qual se obtém picos de concentração da droga. Uma vantagem sobre a terapia gênica para produção de endostatina é a possibilidade de retirada das macrocápsulas no caso de efeitos colaterais graves.

2. OBJETIVOS

No presente estudo é nosso objetivo a obtenção de altos níveis de expressão de endostatina murina recombinante por meio da transfecção do plasmídeo pED contendo o gene da endostatina em células CHO (CHO-DXB11) deficientes em diidrofolato redutase (DHFR). Este é um sistema de expressão estável que permite a amplificação do gene de interesse.

A quantificação, caracterização bioquímica e de atividade biológica da proteína recombinante produzida também fazem parte dos objetivos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Equipamentos e acessórios principais

- Aparelho Mili-Q-plus, purificador de água, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.
- Autoclave, Kavoklave II, Blackburn, Inglaterra.
- Banho-maria, modelo 100, Fanem, São Paulo, Brasil.
- Balança analítica, modelo AW 220, Shimadzu, Japão.
- Contador Beta, modelo 1205, Wallac, E.U.A.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo 5818, Eppendorf, Alemanha.
- Eletroporador, modelo II, Invitrogen, San Diego, CA, E.U.A.
- Estufa de cultura de células, modelo 3158, Farma Scientific, Ohio, E.U.A.
- Espectrofotômetro, Ultrospec III, Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.
- Espectrometro ETTAN-MALDI-ToF Pro, 120 V, Amersham Biosciences, Suécia.
- Fluxo laminar modelo 2256, TROX, Curitiba, Brasil.
- Freezer -80 °C, modelo NV-65126, Nuaire, Japão.
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421, Tecnal, Brasil.
- Leitor de ELISA, modelo MR 4000, Dynatech Biotech, E.U.A.
- Microscópio invertido Nikon, modelo TMS, Japão.
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Thermolyne, Dubuque, IA, E.U.A.
- Sistema de eletroforese vertical, modelo SE250, Hoefer, Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, E.U.A.
- Sistema de eletroforese horizontal, modelo EPS 500/400, Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.
- Transiluminador modelo Macrouve, Hoefer, San Francisco, E.U.A.

3.1.2 Reagentes principais utilizados em procedimentos de Biologia Molecular

- Agarose, Gibco-BRL, Grand Island, NY, E.U.A.

- Ampicilina sódica, Bayer, São Paulo, Brasil.
- Ágar-ágar purificado para bacteriologia, Merck, São Paulo, Brasil.
- Bacto-triptona, Difco, São Paulo, Brasil.
- Clorofórmio p.a. Merck, São Paulo, Brasil.
- Enzimas de restrição, e tampões respectivos da Promega, Madison, E.U.A.
- Extrato de levedura para microbiologia, Difco, São Paulo, Brasil.
- Fragmento Klenow da DNA polimerase I, Amersham Pharmacia, Biotech.
- Marcador de peso molecular: DNA Lambda digerido com *Eco* RI, *Hind* III, Sigma Chemical, Steinheim, Alemanha.

3.1.3. Vetores plasmídicos

- Plasmídeos pSecTag2-endo e pSecTag2(his)₆-met-endo, essas construções foram realizadas num trabalho de pesquisa anterior ao nosso, e possuem seqüências que codificam uma seqüência sinalizadora de uma imunoglobulina murina da cadeia Kappa V-J2C seguido do cDNA de endostatina com ou sem 6 resíduos de histidinas.
- Vetor pED; foi gentilmente doado pelo Dr. R.J. Kauffman (Howard Hughes Medical Institute, University of Michigan), que possui o marcador gênico DHFR (diidrofolato redutase).

3.1.4. Linhagens celulares

- Células CHO (linhagem celular de ovário de hamster chinês) mutantes DXB11, gentilmente doados pelo Dr. L. Chasin (Columbia University, NY, E.U.A.), são deficientes do gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR).
- Células C-PAE (linhagem celular vascular de artéria de bezerro) foram adquiridas da ATCC (American Type Tissue Collection), Manassas, VA, E.U.A. (CCL-209).

3.1.5 Reagentes utilizados na cultura celular

- Antibióticos e antimicóticos, Gibco-BRL, Life technologies, Grand Island, NY, E.U.A.
- Bicarbonato de sódio, Gibco-BRL, Gathersburg, MD, E.U.A.
- Cloreto de cálcio, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.
- Dimetilssulfóxido (DMSO), MERCK, São Paulo.

- HEPES, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.
- Meio mínimo essencial com a presença de nucleosídeos (α -MEM), Cultilab, São Paulo, Brasil.
- Meio mínimo essencial (α -MEM) sem a presença de ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.
- Meio mínimo essencial *Eagle's* (E-MEM), Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil.
- Soro fetal bovino dialisado (SFBd), Gibco-BRL, Gathersburg, MD, E.U.A.
- Soro fetal bovino (SFB) Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.
- Tripsina, SIGMA, St. Louis, MO, E.U.A.

3.1.6. Outros

- Anticorpo policlonal anti-endostatina murina, Chemicon, Temecula, CA, E.U.A.
- Anticorpo anti-histidina, Amersham biosciences, Suécia.
- Cepa DH5 α : supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.
- Fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), doado pelo Dr. Paulo Lee Ho do Instituto Butantan.
- Dispositivo Theracyte, Baxter Healthcare, Deerfield, E.U.A.
- Kit para purificação de DNA, Qiagen, Hilden, Alemanha.
- Kit para a quantificação de endostatina murina, Accucyte, Cytimmune Sciences, Inc, College Park, MD, E.U.A.
- Material plástico estéril para cultura celular, Corning Costar Corp., Cambridge, MA, E.U.A.
- Marcador de peso molecular de proteínas, RPN 755, Amersham Life Science.
- Membrana de PVDF, Bio-RAD, Hercules, CA, EUA.
- Metotrexato (Amethopterin), Sigma Chemical, St. Luis, MO, E.U.A.
- Timidina triciada, TRK58, Amersham Pharmacia, Suécia.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Construção dos vetores de expressão pED-endo e pED-(his)₆-endo

3.2.1.1 Obtenção do gene da endostatina

Em um projeto de pesquisa anterior a este foi realizada a construção de dois vetores de expressão pSecTag2-endo e pSecTag2(his)₆-met-endo. As construções foram realizadas do seguinte modo: o cDNA da endostatina, obtido da ATCC (American Type Tissue Collection) foi clonado no vetor pSecTag2 da Invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.A.) contendo seqüências para um peptídeo sinalizador da cadeia kappa VJ2-C de uma imunoglobulina murina. Também foi realizada a remoção de nucleotídeos localizados entre a seqüência líder e o códon para o primeiro aminoácido da endostatina utilizando-se mutagênese sítio-específica (47). Foram obtidas duas construções: uma primeira contendo seqüências para um peptídeo sinalizador seguido do cDNA da endostatina murina e uma segunda construção contendo seqüências de DNA do um peptídeo sinalizador, 6 histidinas, uma metionina seguidos do cDNA da endostatina murina.

3.2.1.2 Isolamento do DNA contendo seqüências para um peptídeo sinalizador e o cDNA da endostatina ou (his)₆-met-endostatina

Os vetores de expressão para células de mamífero pSecTag2-endo e pSecTag2(his)₆-met-endo foram digeridos com a enzima de restrição *Xho* I por duas horas em banho maria a 37°C em tampão adequado e em seguida o DNA foi purificado e precipitado. O DNA foi ressuspensão e tratado com o fragmento de Klenow da DNA polimerase I para obtenção de extremidades cegas. Em seguida a enzima foi inativada pelo aquecimento a 65°C por 20 minutos e o DNA foi novamente digerido, desta vez com a enzima *Nhe* I. Obteve-se assim um fragmento de DNA contendo uma extremidade cega a 5' do gene e uma extremidade coesiva a 3' do gene. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%. A

visualização das bandas de DNA foi realizada mediante revelação com brometo de etídeo por exposição à luz ultravioleta.

3.2.1.3 Purificação dos fragmentos de DNA inserto

Os fragmentos de DNA contendo o gene da endostatina ou (his)₆-met-endostatina foram submetidos à purificação, a região contendo a banda de interesse foi recortada e o DNA presente foi extraído e purificado utilizando o kit para purificação da Qiagen (Hilden, Alemanha) seguindo-se o protocolo. A confirmação da purificação e quantificação aproximada dos fragmentos obtidos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo.

3.2.1.4 Digestão do vetor pED

O vetor de expressão em mamíferos pED foi utilizado para a clonagem do gene da endostatina e (his)₆-met-endostatina respectivamente. O vetor, pED, foi gentilmente doado pelo Dr. R.J. Kauffman .

O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *Sma* I, a qual gera extremidades cegas, e *Xba* I que gera extremidades coesivas compatíveis com aquelas obtidas por *Nhe* I. A digestão foi realizada por duas horas em banho maria a 37°C em tampão adequado. Após a digestão o fragmento obtido foi separado em eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, o fragmento do gel correspondente à banda de interesse foi cortado e purificado em kit adequado para purificação de DNA em gel de agarose (Qiagen). O fragmento purificado foi quantificado.

3.2.1.5 Reação de ligação do gene da endostatina e (his)₆-met-endostatina ao vetor pED.

As ligações entre o gene da endostatina ou (his)₆-met-endostatina e o vetor plasmidial pED foram efetuadas com a utilização da enzima T₄ DNA-ligase e o respectivo tampão de ligação, utilizando-se um total de 100 ng de DNA em 10 µL de reação e seguindo a proporção molar de 3:1 (inserto / vetor). As reações foram incubadas durante 16 horas a 4°C.

3.2.1.6 Transformação de bactérias eletrocompetentes, amplificação e purificação do produto da reação de ligação

As bactérias DH5 α eletrocompetentes foram submetidas à eletroporação (força do campo elétrico em cubeta de 0,1 cm = 15000V/cm) com os produtos da reação de ligação.

Clones selecionados em placas contendo ágar LB com ampicilina (100 μ g/mL) foram amplificados em meio LB líquido e em seguida purificados utilizando-se o kit Qiagen. Os DNAs resultantes foram submetidos à análise com enzimas de restrição apropriadas e eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, para confirmação da ligação do inserto no vetor. Alguns clones foram confirmados como sendo positivos para o vetor pED-(his)₆-met-endo e para o vetor pED-endo.

3.2.2 Transfecção, amplificação gênica e expressão das proteínas recombinantes

3.2.2.1 Transfecção pelo método de fosfato de cálcio

A linhagem celular mutante CHO-DXB11 (deficiente em DHFR), foi mantida em meio essencial mínimo α (α -MEM) contendo 10 mg/L de ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos) suplementado com 50 U/mL penicilina, 50 μ g/mL estreptomicina, 1.25 μ g/mL anfotericina B, 2 mM L-glutamina and 10% soro fetal bovino. Para a realização da transfecção foram semeadas 10⁶ células por placa de cultura celular de 10 cm de diâmetro, no dia anterior ao experimento. As células foram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. Transfecções de 20 μ g dos vetores purificados foram realizadas utilizando a técnica de precipitação com fosfato de cálcio (1). Para a reação foram utilizados 100 μ L de CaCl₂ 2,5 M e 1 mL de tampão Hepes-fosfato (Hepes 50 mN, Na₂HPO₄ 1,5 mM e NaCl 280mM). A reação foi realizada num tubo cônico de 15mL e a solução de CaCl₂ contendo o DNA foi adicionado sobre a solução de hepes fosfato gota a gota sob borbulhamento constante de ar. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos para que houvesse a formação dos microprecipitados de fosfato de

cálcio/DNA, os quais foram distribuídos sobre as células. Após 6 horas de incubação a 37°C em ambiente úmido com 5% de CO₂, o meio foi aspirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS (tampão fosfato-salina contendo NaCl 150mM e Na₃PO₄ 10mM pH 7,2). As células foram cultivadas por 24 horas em meio α -MEM contendo 2% SFB antes do início da seleção.

Foi realizada, também a transfecção do vetor pED fechado para ser utilizado como controle negativo.

3.2.2.2 Seleção e amplificação dos clones de células CHO transfectadas

A seleção dos clones transfectados foi realizada em meio seletivo α -MEM na ausência de ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos, suplementados com 10% SFB dialisado, antibióticos e L-glutamina a 37°C em estufa de CO₂. Após 2 semanas, alguns clones isolados, DHFR-positivos, foram transferidos a placas de 6-poços utilizando alças plásticas estéreis.

Os clones isolados foram submetidos a incrementos graduais de concentrações de metotrexato (MTX; 20, 80, 320 e 1280 nM) no meio de cultura para realizar a seleção dos clones que contenham cópias amplificadas dos genes da DHFR e da endostatina. Em cada passo de seleção, as células foram cultivadas pelo menos 14 dias antes de se incrementar a concentração de MTX.

3.2.2.3 Obtenção do meio condicionado

O meio condicionado, necessário para a caracterização e quantificação da endostatina e (his)₆-met-endostatina, foi obtido após a última etapa de amplificação (MTX, 1280 nM) dos clones que sobreviveram à seleção.

Cada clone foi semeado em 3 poços, em placas de 24-poços, com meio α -MEM sem ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos suplementado com antibióticos, L-glutamina, 10% soro fetal bovino dialisado e 1280 nM de MTX e mantido a 37°C em ambiente úmido com 5% de CO₂ até atingir a semiconfluência. Células de um poço foram tripsinizadas e contadas, para cada clone, considerando-se este valor como o número de células para o tempo zero. O meio de cultura dos outros dois poços foram trocados por meio de cultura α -MEM sem MTX com e sem e soro fetal

bovino. Após 24 horas, o meio condicionado foi coletado, centrifugado, o sobrenadante foi estocado a -80°C e o número de células para cada poço foi determinado por tratamento com tripsina e contagem. A média do número de células entre 0 e 24 horas foi calculada para cada condição.

Meios condicionados das diferentes etapas do tratamento com MTX foram obtidos dos sobrenadantes de um clone transfectado com o vetor de expressão pED-(his)₆-met-endostatina em todas as etapas de amplificação (MTX, 20, 80, 160, 320, 1280 nM). As células foram mantidas em meio meio α -MEM sem ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos suplementado com antibióticos, L-glutamina, 10% de soro fetal bovino dialisado com as respectivas concentrações de MTX ou sem MTX. Quando as células atingiram a semiconfluência o meio foi trocado por meio novo e foram incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas. Após 24 horas o meio destas células foi coletado, centrifugado e o sobrenadante foi estocado a -80°C . O número de células para cada poço foi determinado por tratamento com tripsina e contagem.

Também foi obtido meio condicionado de células CHO-DXB11 transfectadas com o vetor pED após sua última etapa de amplificação por tratamento com MTX.

3.2.3 Caracterização e quantificação das proteínas recombinantes

3.2.3.1 SDS-PAGE

Análise da endostatina e (his)₆-met-endostatina no meio condicionado foi realizada por eletroforese a 12% de gel SDS-poliacrilamida sob condições redutoras (48). Os volumes de meio aplicado nos géis foram normalizados para eliminar as variações na densidade das células. Desta maneira foi calculado o volume proporcional ao número de células. Amostras de meio condicionado dos clones a serem testados foram fervidas a 85°C por 5 minutos na presença de β -mercaptoetanol e foram aplicadas no gel. Como controle negativo foi utilizado o sobrenadante de células CHO-DXB11 não transfectadas ou transfectadas com o vetor fechado. Foi aplicado também um marcador de peso molecular e a corrida eletroforética foi realizada a 80 volts.

A revelação do SDS-PAGE foi efetuada imergindo o gel em uma solução com 0,25% de "Coomassie blue R-250", 45% metanol e 8% de ácido acético por aproximadamente 12 horas. A seguir o gel foi descorado em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido glacial acético, sendo realizadas trocas sucessivas.

3.2.3.2 Western Blotting

As amostras para serem analisadas no Western Blotting foram submetidas a SDS-PAGE, em seguida foi realizada a transferência das proteínas, do gel para uma membrana de nitrocelulose. A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do seguinte modo: colocaram-se 8 folhas de papel filtro pré-umedecido em tampão de transferência (0,3% glicina, 0,6% Tris-base, 0,04% SDS, 20% metanol) e em seguida, do polo positivo para o polo negativo, colocaram-se a membrana de nitrocelulose, o gel e mais 8 folhas de papel filtro pré-umedecidas. A corrente foi fixada de acordo com a área de gel (0,85mA por cm²) para a transferência total das proteínas. A transferência foi realizada por uma hora. A membrana foi lavada com tampão fosfato-salina (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado e liofilizado (Molico, São Paulo, Brasil) e então foi incubada por 10 horas com uma diluição de 1:150 do anticorpo policlonal anti-endostatina diluído em PBS contendo 5% de leite em pó. Após a incubação foram realizadas 5 lavagens com PBS-5% de leite. As reações foram detectadas com um anticorpo secundário conjugado a "horseradish-peroxidase" (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) usando um amplificador quimioluminescente (Amersham, Pharmacia Biotech) e autoradiografia.

3.2.3.3 Determinação dos níveis de expressão das proteínas recombinantes

A determinação dos níveis de expressão da endostatina recombinante e (his)₆-met-endostatina foi realizada no meio condicionado, utilizando-se o kit de ELISA para quantificação de endostatina murina seguindo instruções do fabricante.

Este ensaio emprega a técnica quantitativa de enzimaensaio com duplo anticorpo, sendo o segundo anticorpo anti-IgG de coelho pré-revestido na placa que tem a função de capturar um complexo específico: endostatina biotinizada,

amostra ou padrão e anticorpo anti-endostatina conjugado. A endostatina biotinizada (ligante competitivo) e a amostra ou o padrão competem pelos sítios de ligação do anticorpo específico anti-endostatina. Portanto, quanto maior a quantidade de endostatina nas amostras menor a quantidade de endostatina biotinizada capturada pelo anticorpo. O ensaio é lido em leitor de ELISA baseado na capacidade do conjugado de estreptavidina alcalina fosfatase em desenvolver coloração quando em contato com o agente cromogênico. A concentração de endostatina detectada em cada amostra é comparada com uma curva padrão de endostatina que demonstra uma relação inversa entre a densidade óptica (D.O.) e a concentração da proteína. A determinação da concentração das amostras de endostatina e (his)₆-endostatina foi feita lendo as densidades óticas das amostras em uma curva obtida com amostras padrão de concentrações conhecidas versus suas respectivas densidades óticas.

O ensaio foi realizado em duplicata. A geração de cor foi monitorada em leitor de ELISA lendo-se a 490nm até que o padrão de endostatina dose zero atingisse uma densidade ótica de 1,6-1,8.

3.2.3.4 Espectrometria de massa (MALDI-TOF)(Ionização/desorção por laser matriz assistida - análise de tempo de voo)

A espectrometria MALDI-TOF permite a análise de compostos de alto peso molecular com grande sensibilidade. O método usa uma matriz sólida onde a amostra é imobilizada e bombardeada por um feixe ionizante de laser. A formação dos íons é realizada direcionando o feixe de laser em uma amostra diluída ou apenas aplicada em uma matriz. A matriz absorve a energia do feixe de laser ocasionando a vaporização do material da matriz. As moléculas carregadas são direcionadas por lentes eletrostáticas da fonte ionizadora para o analisador de massa. Quando as moléculas do analito estão vaporizadas, a análise do tempo de voo (TOF) é realizada para separar os íons de acordo com a sua razão massa/carga (m/z).

Uma das muitas aplicações da espectrometria de massa é a determinação da massa molecular (MM). A MM de uma proteína é um importante parâmetro bioquímico para sua caracterização.

Para determinar a massa da endostatina e (his)₆-endostatina, as mesmas foram analisadas em espectrômetro ETTAN-MALDI-TOF. As análises foram feitas no CAT (Centro de Toxicologia Aplicada/Instituto Butantan). Amostras de meio condicionado das células CHO transfectadas (52 horas) contendo endostatina, e (his)₆-endostatina foram submetidas à espectrometria de massa para a determinação de sua massa molecular precisa. As mesmas, foram diluídas em 1 µL de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoroacético) para aplicação.

As condições de análise foram: voltagem de aceleração: 2000V, modo linear positivo, pulso do laser: 3 ns, com 20 pulsos por segundo. Os espectros foram analisados com o software ETTANS LWS.

3.2.3.5 Seqüenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal

Os sete primeiros aminoácidos da seqüência N-terminal da endostatina e (his)₆-met-endostatina foram determinados pelo método de degradação de fase sólida de Edman.

Amostras das proteínas recombinantes foram eletroeluídas de um gel de poliacrilamida (12%) e foram imobilizadas em uma membrana de PVDF. Após a transferência as proteínas presentes na membrana foram reveladas com Coomassie, sendo as proteínas de interesse recortadas, colocadas em sacos plásticos e enviadas para seu seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado na Universidade de Virginia, Charlottesville, E.U.A.

3.2.4 Atividade biológica

3.2.4.1 Ensaio de proliferação das células C-PAE

A linhagem celular C-PAE (célula endotelial de artéria do pulmão de bezerro) foi adquirida da ATCC e foi utilizada para testar a habilidade da endostatina e (his)₆-met-endostatina em inibir a proliferação de células endoteliais de artéria de bezerro (C-PAE) pela determinação da porcentagem de incorporação de ³H-timidina. As células foram mantidas em meio mínimo essencial "Eagle's" (EMEM) suplementado com 20% soro fetal bovino, 50 U/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2 mM L-glutamina e incubadas em ambiente úmido a 37°C, na

presença de 5% CO₂. As incubações foram realizadas em placas de 96-poços com um volume final de 200 µL/poço de EMEM contendo 2% soro fetal bovino, com concentrações iniciais de células de 5 x 10³ células/poço. Após 24 horas de incubação o meio foi trocado com EMEM fresco contendo 2% soro fetal bovino e 3 ng/mL de bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos) com ou sem endostatina. As células foram incubadas com 1 µCi [³H-timidina] por 24 horas, seguido pela lise das células e filtração em filtros de fibra de vidro. A radioatividade associada às células foi determinada usando um contador de cintilação líquida.

3.2.5 Perfil de crescimento celular

O perfil de crescimento da linhagem celular CHO-DXB11 transfectada ou não transfectada com o vetor de expressão pED-(his)₆-met-endo na ausência ou presença de MTX no meio de cultura foi avaliado.

Foram semeadas três placas de 24 poços com 5x10³ células por poço, a primeira placa contendo células CHO-DXB11 mantidas em meio α-MEM (com ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos), a segunda placa contendo células selecionadas transfectadas com o vetor de expressão pED-(his)₆-end mantidas em meio α MEM sem nucleosídeos e uma última placa contendo as mesmas células na presença de 1280 nM de MTX no meio de cultura. A cada 24 horas se procedeu a tripsinização e contagem das células. Foram contados 3 poços por placa para diminuir a margem de erro. Após cada contagem os poços foram desprezados. A troca de meio foi realizada a cada 72 horas.

A partir dos dados obtidos nas contagens foram construídas curvas de crescimento e foi calculado o tempo de duplicação para cada condição. A fórmula utilizada para o cálculo do tempo de duplicação foi a seguinte:

$$Dt = t_2 - t_1/n$$

Onde:

$$n = N^{\circ} \text{ de gerações} = 3,3 \times \log b/B$$

B = N^o de células no início da fase log

b = N^o de células no final da fase log

t1= tempo no início da fase log

t2=tempo no final da fase log.

3.2.6 Expressão de endostatina pelas células CHO (pED-(his)₆-met-endo) encapsuladas e mantidas em cultura

Os dispositivos Theracyte são compostos de camada dupla de membranas de politetrafluoroetileno (PVDF) soldadas por ultrassom que formam um lumem central com capacidade para 20µl, o qual pode ser preenchido por células (FIGURA 1). Uma membrana interna com poros de 0,4 micron de diâmetro impede a saída de células do dispositivo e é ligada a uma membrana externa com poros de 5 micron, que ajudam a formação de vasos sanguíneos quando implantados "*in vivo*". Um tubo de polietileno sai da membrana e serve como porta de aplicação das células. Este sistema fechado é utilizado para o encapsulamento de células.

Foram realizados dois ensaios em que se utilizou seringa tipo Hamilton para o implante de 1×10^7 células CHO (pED-(his)₆-Met-endo) nos dispositivos Theracyte de imunisolamento e em seguida a porta de aplicação foi selada com adesivo de silicone. O dispositivo foi subsequentemente colocado em meio de cultura contendo soro fetal bovino, em estufa de CO₂. O mesmo número de células foi semeado em garrafa de 75cm². Os meios de cultura da garrafa e da placa contendo o dispositivo foram trocados por meio sem soro fetal bovino (7ml para ambos) 4 horas após o implante, as culturas incubadas por 24 horas quando os sobrenadantes foram utilizados para a análise por Western blot. O meio foi posteriormente trocado para meio contendo 10% de soro fetal bovino e o dispositivo incubado por 3 semanas, após o qual foi fixado em formol a 4% para a preparação de lâminas de histologia. O mesmo procedimento foi realizado com um número

menor de células no dispositivo (2×10^6), sendo incubadas por um tempo maior (5 dias).

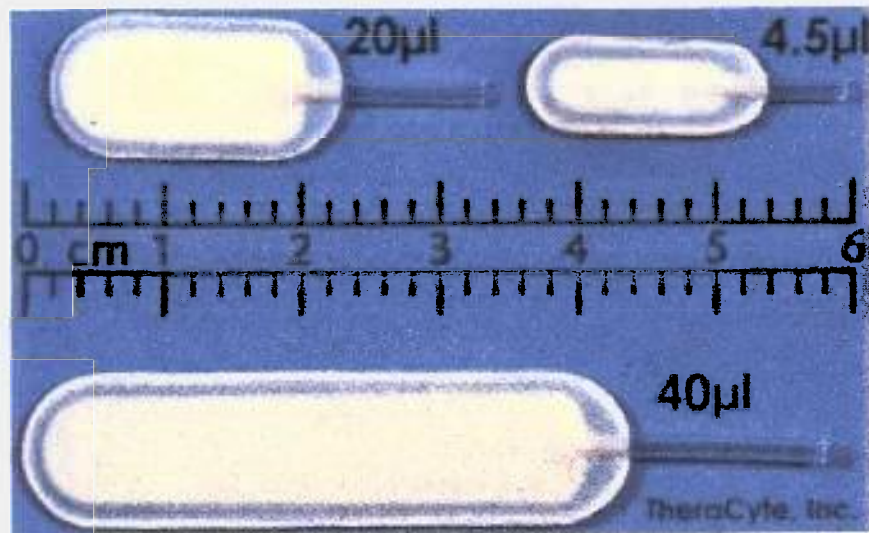


FIGURA - 1 Dispositivos de imunoisolamento TheraCyte® (Baxter, Round Lake, E.U.A).

4. RESULTADOS

4.1. Construção dos vetores de expressão pED-endo e pED-(his)₆-endo

Os vetores de expressão pED-endo e pED(his)₆-met-endo foram obtidos pela inserção de seqüências codificando para o peptídeo sinalizador seguido do cDNA da endostatina ou do cDNA da proteína de fusão((his)₆-met-endostatina) no sitio de policlonagem do vetor pED. Um diagrama da construção dos vetores de expressão contendo o gene da endostatina encontra-se representado na FIGURA 2.

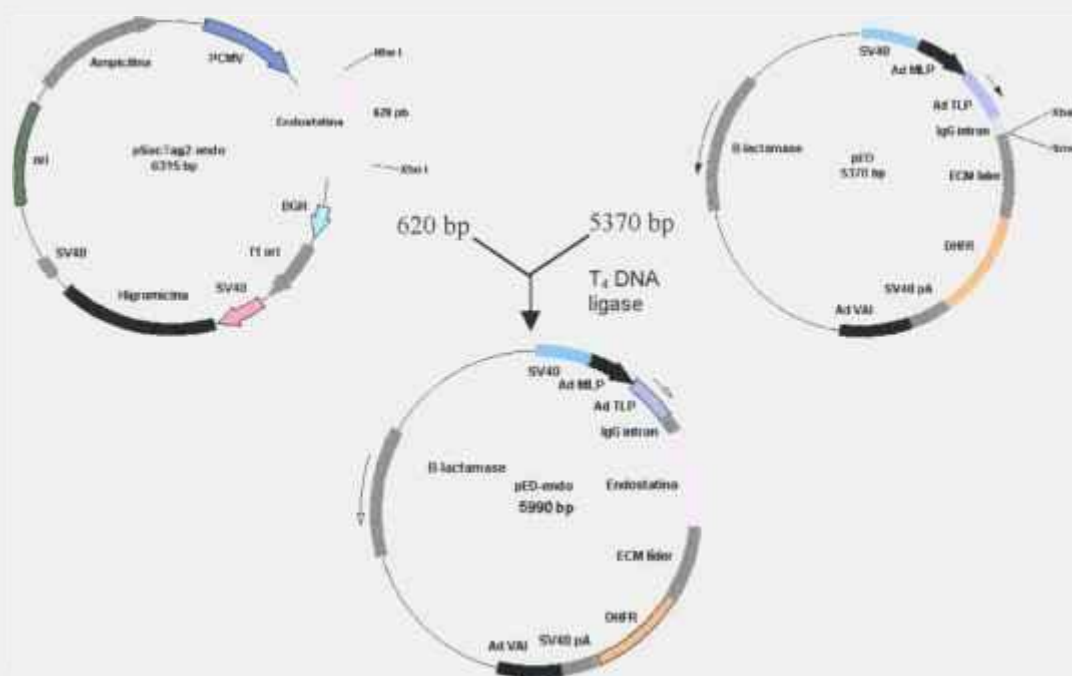


FIGURA 2 - Esquema de obtenção do vetor pED-endo. O vetor pED-endo possui como seus componentes principais: SV40, fragmento que contém a origem de replicação e o elemento ativador de transcrição (enhancer element) do "simian virus 40 (SV 40)"; Ad MLP, promotor derivado do adenovírus; Ad TPL, seqüência "leader" derivada de adenovírus; IgG íntron, um íntron híbrido composto pela seqüência 5' "leader" não traduzida derivada do adenovírus e de uma seqüência 3' do gene da imunoglobulina; endostatina, cDNA da endostatina ou (his)₆-met-endostatina; EMC-L, região 5' "leader" não traduzida do vírus da encefalomiocardite (EMC); DHFR, região que codifica a enzima diidrofolato redutase murina; SV40 pA, região de poliadenilação de SV40; AdVAI, gene do adenovírus VAI RNA que codifica a RNA polimerase III, potencializando a tradução de mRNA e β-lactamase, gene selecionável que confere resistência à ampicilina, útil para sua propagação em *E. coli*.

4.1.1. Análise de restrição de clones positivos de bactérias transformadas com os vetores pED-endo e pED-(his)₆-met-endo

Os produtos da reação de ligação foram submetidos à eletroporação em bactérias DH5 α , seguida de sua cultura em meio seletivo com antibiótico, gerando clones resistentes à ampicilina. DNAs plasmídicos purificados de alguns desses clones foram submetidos à análise de restrição com enzimas que flanqueiam o inserto clonado (*Eco* RI e *Bgl* II).

A análise de restrição de clones positivos para os vetores pED-endo e pED-(his)₆-met-endo, foi realizada em gel de agarose 1%. Foi obtido o padrão de bandas desejado para ambos vetores de expressão como pode ser observado na FIGURA 3.

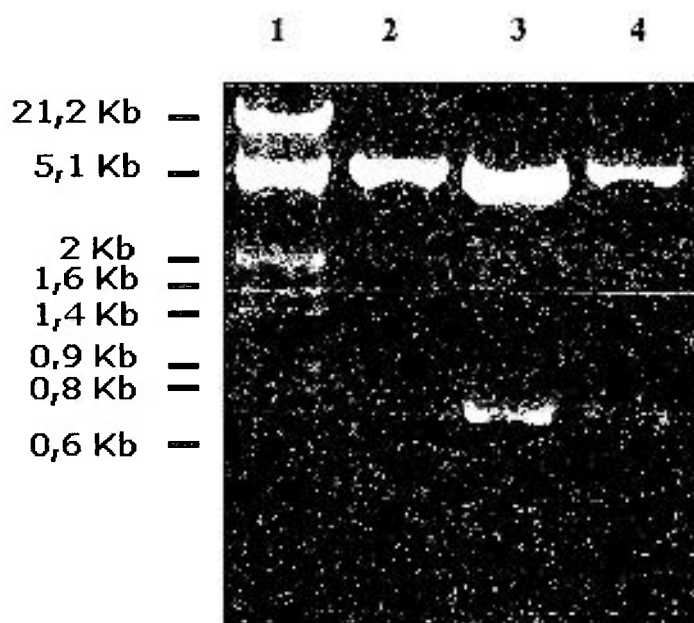


FIGURA 3 - Análise de restrição dos vetores de expressão pED-endo e pED-(his)₆-met-endo em gel de agarose 1%, com revelação utilizando-se brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de tamanho molecular em pares de bases (pb). Coluna 2, vetor pED (fragmento de 5,3 kb correspondente ao vetor pED linearizado). Colunas 3 e 4, vetor pED-(his)₆-met-endo e vetor pED-endo respectivamente (após digestão com a enzima *Eco* RI e *Bgl* II que resultou em dois fragmentos de 5,3 kb e 0,62 Kb, o último fragmento correspondente ao gene da endostatina).

4.2. Transfecção, seleção, amplificação gênica e expressão das proteínas recombinantes

4.2.1. Transfecção pelo método de fosfato de cálcio

Utilizando a técnica de transfecção pelo método de fosfato de cálcio, foram realizadas transfecções para cada vetor de expressão, foi também realizada a transfecção com vetor pED sem gene da endostatina. O método de transfecção foi eficiente, tendo sido obtidos vários clones positivos para cada vetor após a seleção dos clones transfectados em meio de cultura sem nucleosídeos. Um total de 12 clones isolados transfectados com os respectivos vetores foram transferidos e cultivados em poços (placas de 6 poços) e submetidos à amplificação do DNA de interesse por tratamento com MTX.

4.2.2. Amplificação gênica dos clones positivos

A amplificação dos genes da endostatina e do DHFR foi realizada pela adição de concentrações crescentes de MTX (20, 80, 320, 1280 nM MTX). O vetor pED foi também tratado da mesma maneira. Durante a amplificação alguns clones não se multiplicaram bem e morreram. Foram finalmente obtidos dois clones transfectados com o plasmídeo pED-endo, quatro clones transfectados com o plasmídeo pED-(his)₆-met-endo e dois clones transfectados com o plasmídeo pED.

Os clones que expressaram maiores níveis de endostatina e (his)₆-met-endostatina foram selecionados pela análise por SDS-PAGE e Western blotting (dados não mostrados) dos meios condicionados das células transfectadas com os respectivos vetores.

4.3 Caracterização e quantificação das proteínas recombinantes

4.3.1 Meio condicionado

A obtenção do meio condicionado dos clones expressando endostatina ou a proteína de fusão na presença ou ausência de soro fetal bovino, foi realizada para determinar se existe uma diferença significativa na expressão das proteínas recombinantes na presença ou ausência de soro fetal bovino. Para a análise por

SDS-PAGE e Western blot, o volume de meio condicionado foi normalizado de acordo com o número de células para eliminar variações na densidade celular.

O meio condicionado de um clone expressando a (his)₆-met-endostatina nas diferentes etapas de amplificação por MTX, foi coletado com o intuito de se verificar o incremento dos níveis de endostatina a cada passo de amplificação gênica por tratamento com MTX.

4.3.2. SDS-PAGE

Amostras do meio condicionado produzido pelos diferentes clones das células CHO-DXB11 transfectadas com o vetor pED-endo ou pED-(his)₆-endo, foram analisadas por SDS-PAGE, após o último passo de amplificação seqüencial (utilizando 1280 nM MTX), para a seleção dos clones que expressaram maiores níveis de endostatina e (his)₆-met-endostatina. Assim foram selecionados dois clones, um expressando endostatina e outro expressando (his)₆-met-endo com os quais se deu continuidade ao nosso trabalho.

Na FIGURA 4 é mostrado o SDS-PAGE de um clone selecionado expressando endostatina o qual foi tratado com concentrações crescentes de MTX. Enquanto a banda correspondente à endostatina não é visível nas colunas correspondentes às células não transfectadas e às células selecionadas com 20 nM MTX, esta pode ser observada quando maiores concentrações de MTX foram utilizadas: 80, 230, 1280 nM. O incremento dos níveis de endostatina no meio condicionado é devido à amplificação do número de cópias do gene da endostatina nos cromossomos das células transfectadas.

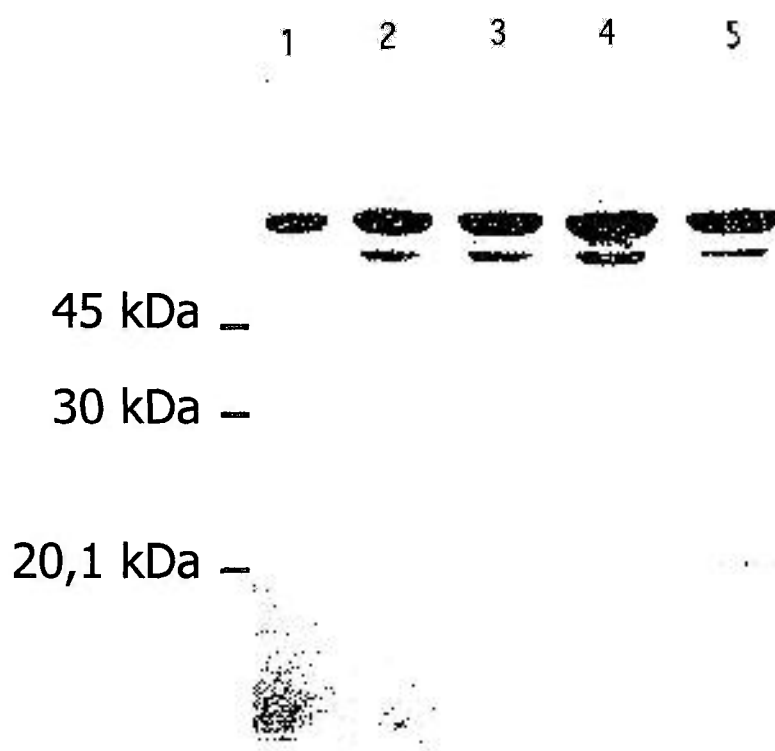


FIGURA 4 - Análise por SDS-PAGE (12%) da endostatina obtida no meio de cultura condicionado de 24 horas de células CHO-DXB11 transfectadas não tratadas ou tratadas com concentrações crescentes de MTX. Os volumes aplicados no gel (máximo de 20 μ l) foram normalizados para eliminar variações na densidade celular. Coluna 1, células não selecionadas. Coluna 2, células selecionadas com 20 nM de MTX. Coluna 3, células selecionadas com 80 nM de MTX. Coluna 4, células selecionadas com 320 nM de MTX. Coluna 5, células selecionadas com 1280 nM de MTX.

A análise de endostatina e (his)₆-met-endostatina por SDS-PAGE confirmou que a proteína de fusão tem um peso molecular ligeiramente maior que a proteína autêntica como podemos observar na FIGURA 5.

Células transfectadas cultivadas sem soro fetal bovino produziram endostatina e (his)₆-met-endostatina com baixos níveis de contaminantes os quais podem ser observados como bandas fracas de alto peso molecular (FIGURA 5).

Na FIGURA 5 as bandas de (his)₆-met-endostatina (coluna 2) e endostatina (coluna 3) contém aproximadamente 0,12 µg e 0,19 µg, respectivamente, determinados por ELISA.

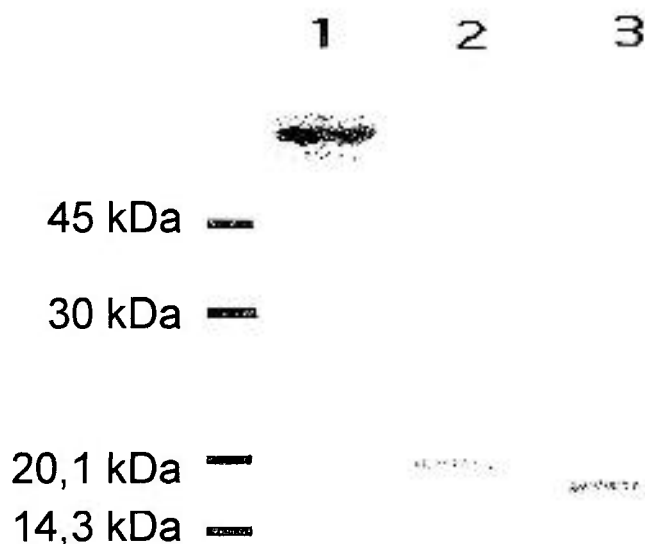


FIGURA 5 - Análise por SDS-PAGE (12%) corado por Coomassie blue R-250 de amostras obtidas do meio condicionado de 24 horas (o volume aplicado para cada amostra foi de 20 µL). Coluna 1, meio condicionado de células não selecionadas. Coluna 2, meio condicionado de um clone expressando (his)₆-met-endostatina. Coluna 3, meio condicionado de um clone expressando endostatina.

Na FIGURA 6 podemos observar os mesmos resultados que no gel anterior, com a diferença que foram utilizados como controles negativos as células CHO-DXB11 não transfectadas e células transfectadas com o vetor pED sem o gene da endostatina, o último após a última etapa de amplificação do gene da DHFR por tratamento com MTX (1280 nM). Ao passo que não se observa a presença de bandas nos controles negativos (colunas 1 e 2) há presença das mesmas na altura do peso molecular da endostatina (20 kDa) quando sobrenadantes de células transfectadas com os vetores de expressão pED-(his)₆-met-endo e pED-endo foram aplicados no gel (colunas 3 e 4 respectivamente).

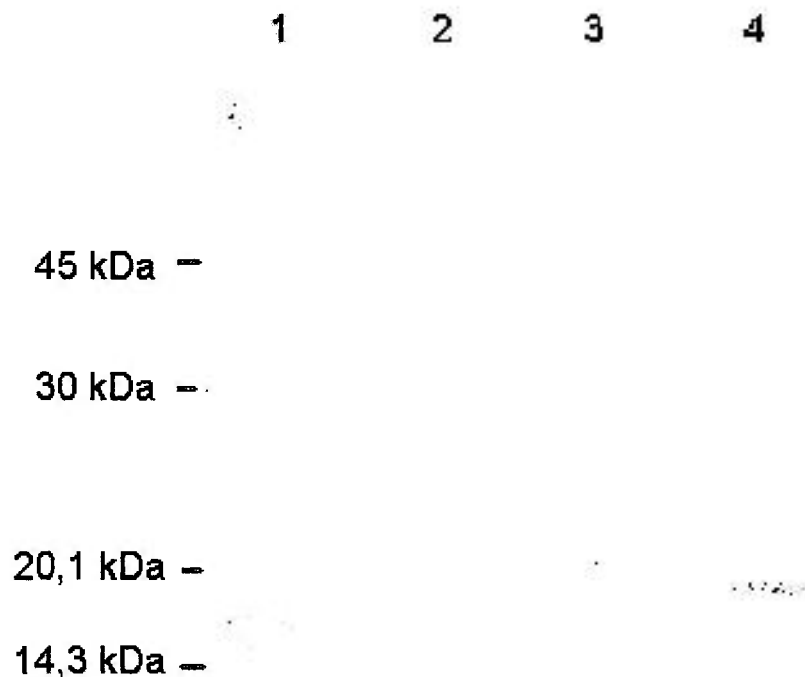


FIGURA 6 - Análise por SDS-PAGE (12%) corado por Coomassie blue R-250 de amostras obtidas do meio condicionado de 24 horas de células CHO-DXB11 não transfectadas ou transfectadas com o vetor de expressão contendo ou não o gene da endostatina. Coluna 1, meio condicionado de células não transfectadas. Coluna 2, meio condicionado de um clone transfectado com o vetor pED sem o gene da endostatina. Coluna 3, meio condicionado de um clone expressando (his)₆-met-endostatina. Coluna 4, meio condicionado de um clone expressando endostatina.

4.3.3. Western blotting

Utilizando-se amostras do meio condicionado de 24 horas das células transfectadas com os vetores pED-endo e pED-(his)₆-met-endo foi realizado um Western Blot. Foi utilizado como controle negativo o meio condicionado de 24 horas de células CHO-DXB11 não transfectadas.

Observou-se a expressão de endostatina recombinante e (his)₆-met-endostatina pelas células transfectadas, pela visualização de uma banda, para cada proteína recombinante, de aproximadamente 20 KDa, correspondente a massa molecular da endostatina como poder ser observado na FIGURA 7, confirmando a atividade imunológica das proteínas recombinantes secretadas pelos clones selecionados.

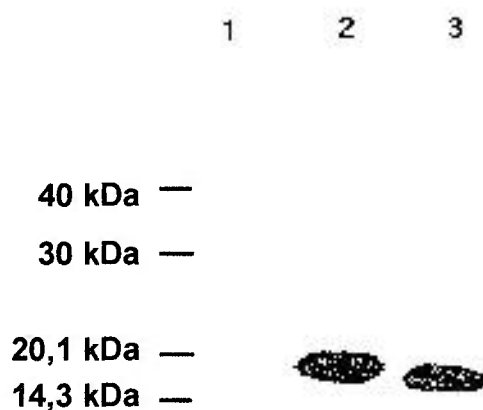


FIGURA 7 - Análise por Western-blot do meio condicionado dos clones selecionados com 1280 nM MTX. Coluna 1, células CHO não transfectadas. Coluna 2, clone expressando (his)₆-met-endostatina. Coluna 3, clone expressando endostatina.

4.3.4. Níveis de expressão das proteínas recombinantes

Os níveis de endostatina e (his)₆-met-endostatina secretados pela linhagem celular mutante CHO-DXB11 transfectadas com os correspondentes vetores de expressão e tratadas com 1280 nM de MTX, obtidos por ELISA, estão apresentados na TABELA 1.

TABELA 1

Níveis de expressão de endostatina e (his)₆-met-endostatina pelas células CHO transfectadas

	pED-endo (µg/10 ⁶ células)	pED-(his) ₆ -met-endo (µg/10 ⁶ células)
Meio com 10% SFB	19,2	28,8
Meio sem SFB	18,5	14,4
Células propagadas por um mês sem MTX	18,5	*

Os resultados mostram determinação por ELISA do meio condicionado de 24 horas.

* Dado não determinado

É interessante observar que ausência de soro fetal bovino no meio de cultura não afetou significativamente os níveis de endostatina no meio condicionado. No caso da (his)₆-met-endostatina houve uma queda maior nos níveis desta proteína.

A ausência de MTX no meio de cultura por um mês não afetou a expressão da endostatina, o que indica a estabilidade do vetor nas células transfectadas.

4.3.5. Espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Para se determinar a massa precisa das proteínas recombinantes endostatina e (his)₆-met-endostatina presentes no sobrenadante de células transfectadas com os respectivos vetores de expressão, amostras das mesmas foram submetidas à espectrometria de massa MALDI-TOF. A massa molecular obtida para endostatina recombinante foi de 20029 Da (FIGURA 8) compatível com o valor da endostatina nativa e para a proteína de fusão, (his)₆-endostatina, a massa molecular foi de 21094 Da (FIGURA 10), apresentando um peso molecular ligeiramente maior se comparado com a proteína autêntica como foi, também, observado na análise por SDS-PAGE. Os valores de massa molecular das proteínas recombinantes estão de acordo com os valores teóricos calculados de 20375 e 21330 respectivamente (EXPASY, <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>). Podemos ressaltar que esses cromatogramas foram obtidos de amostras não purificadas de meios condicionados e assim mesmo pode se observar claramente que os picos majoritários são das proteínas recombinantes de interesse. Como controles negativos foram utilizados o meio de cultura α -MEM sem ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos e o sobrenadante de células CHO-DXB11 não transfectadas. Em ambos casos, como esperava-se, não se observou a presença de picos correspondentes à massa molecular da endostatina (FIGURAS 11 e 9 respectivamente).

É interessante observar picos de aproximadamente 8300 e 4500 Da (FIGURAS 8, 9 e 10) que aparecem nos sobrenadantes das culturas CHO transfectadas ou não com os vetores contendo o gene da endostatina. Provavelmente se tratam de proteínas não relacionadas à endostatina e que são expressas por esta linhagem celular em cultura.

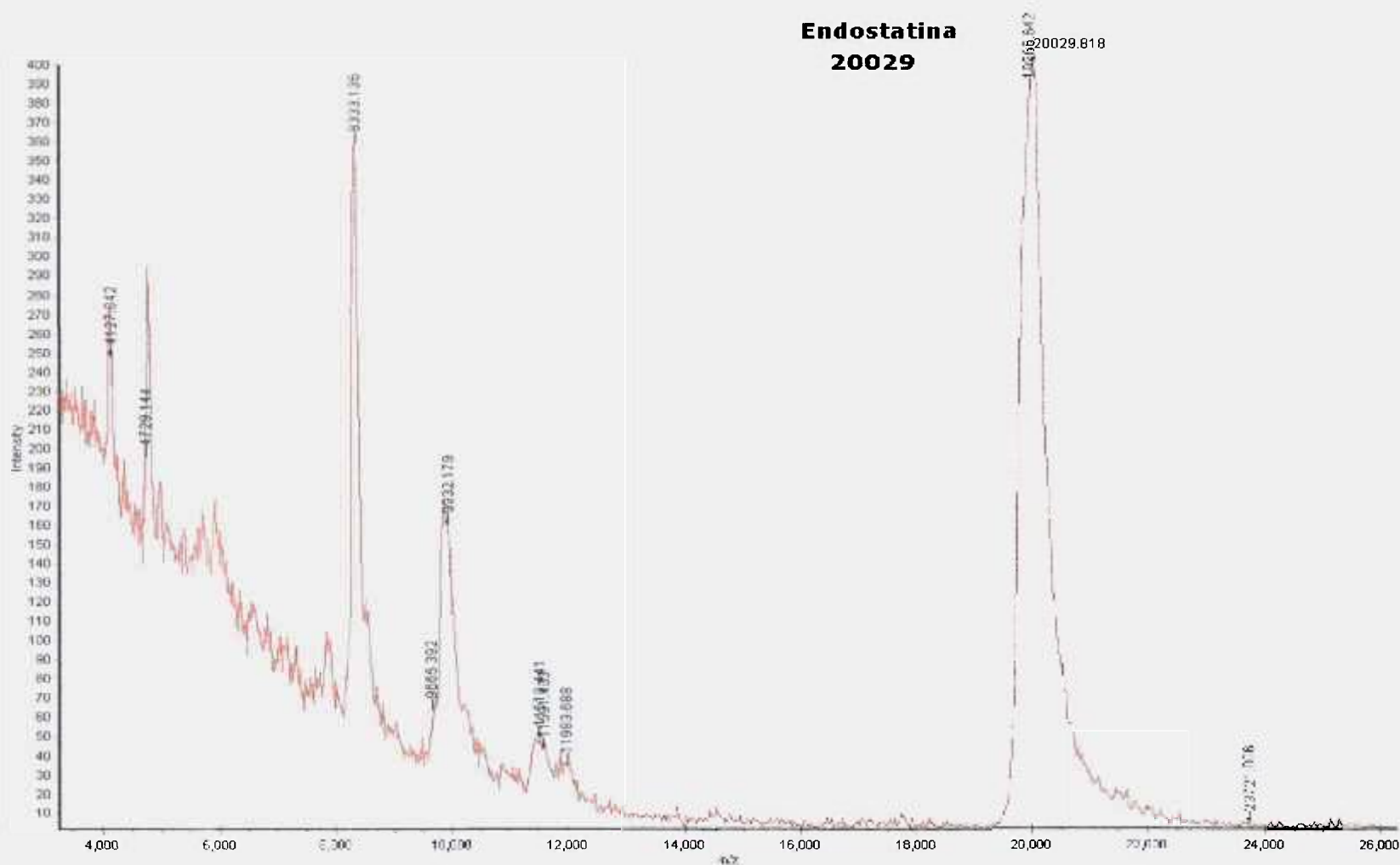


FIGURA 8 - Espectrometria de massa (MALDI-TOF) de uma amostra de endostatina recombinante. Os resultados são expressos como a razão massa/carga. O pico majoritário de 20029 Da corresponde à endostatina recombinante.

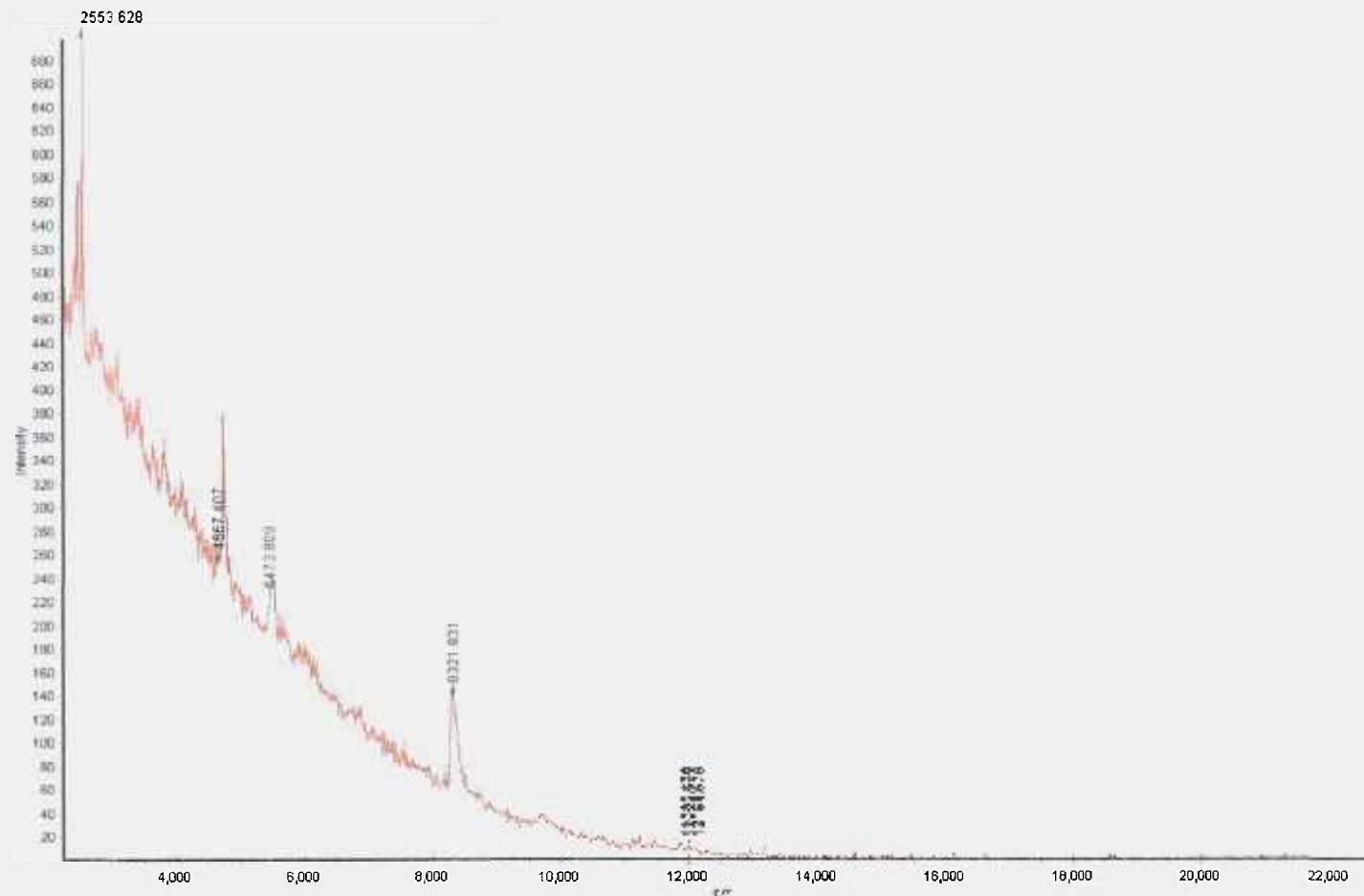


FIGURA 9 - Espectrometria de massa (MALDI-TOF) do sobrenadante de células CHO-DXB11 não transfectadas. Os resultados são expressos como a razão massa/carga (m/z).

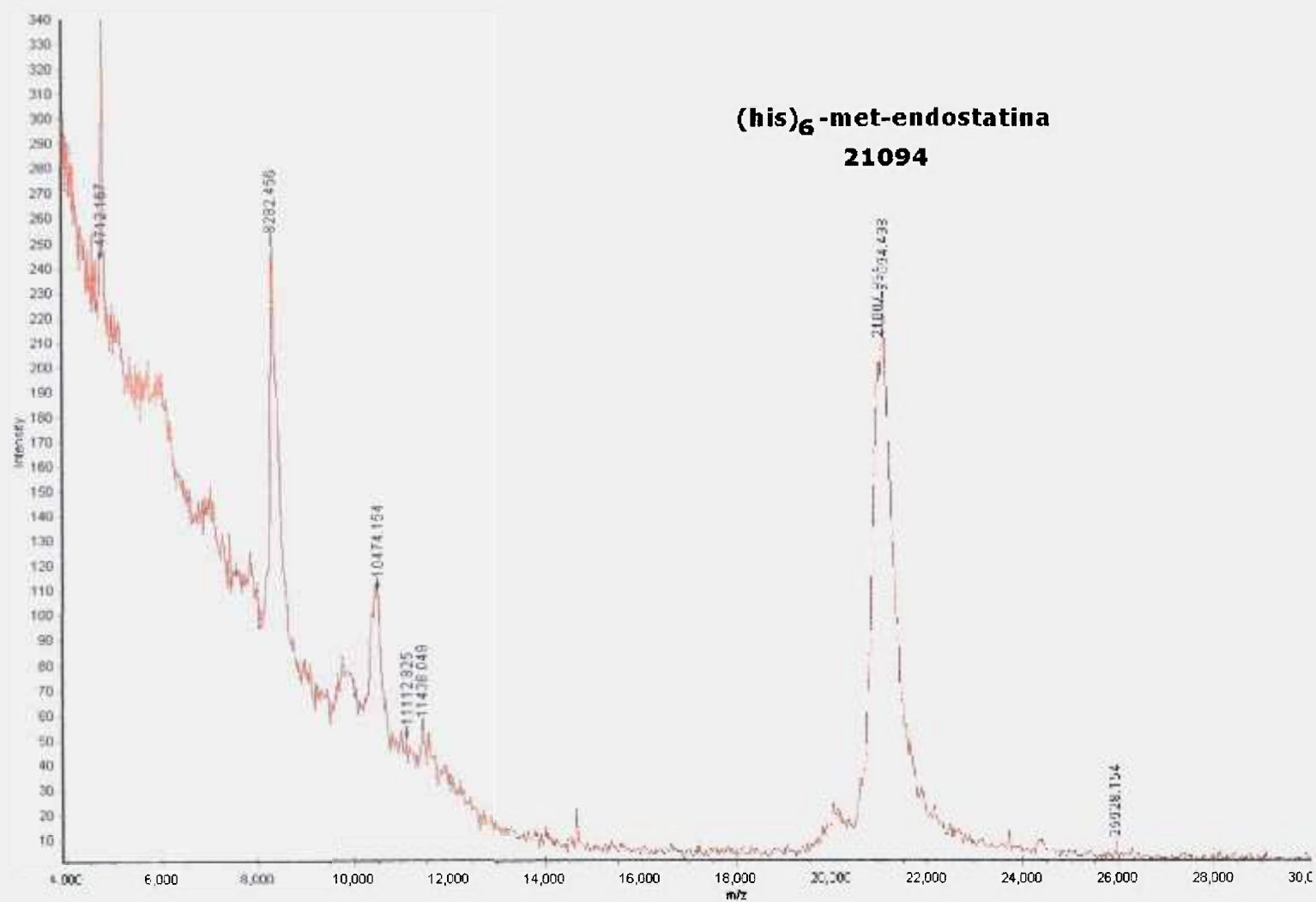


FIGURA 10 - Espectrometria de massa (MALDI-TOF) de uma amostra de (his)₆-met-endostatina. Os resultados são expressos como a razão massa/carga. O pico majoritário de 21094 Da corresponde à massa da proteína de fusão.

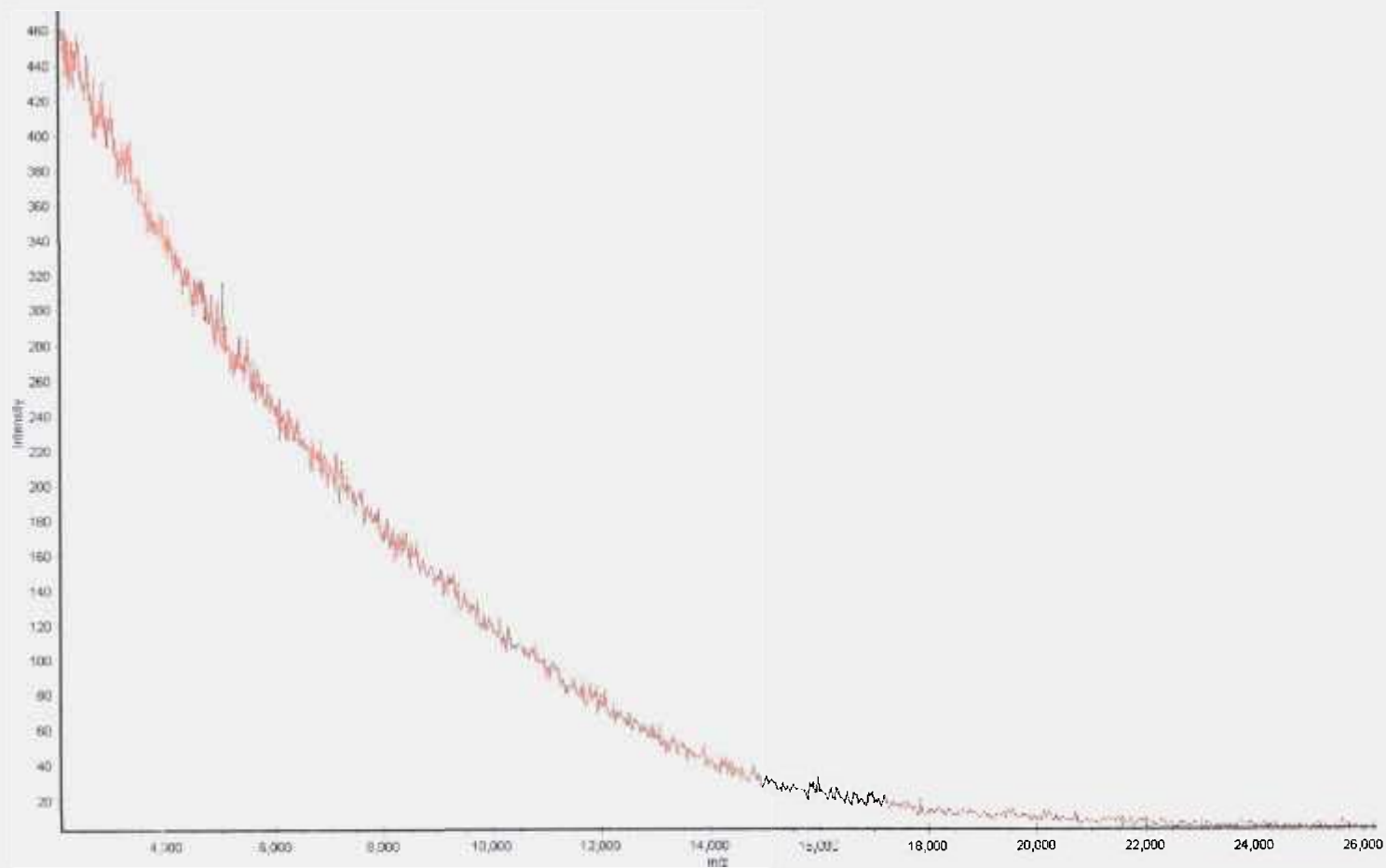


FIGURA 11 - Espectrometria de massa (MALDI-TOF) do meio de cultura α -MEM. Os resultados são expressos como a razão massa/carga (m/z).

4.3.6. Seqüenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal

Os primeiros aminoácidos N-terminais da endostatina determinados via degradação de Edman foram HTHQDFQ, iguais aos da proteína nativa. Para (His)₆-met endostatina, a seqüência N-terminal dos aminoácidos foi HHHHHH(H)M. A histidina adicional encontrada pode ser devida a um pico residual de ciclos prévios ou à dificuldade da leitura dos resíduos de histidina na membrana PVDF. Os resultados indicam que o peptídeo sinalizador foi corretamente clivado pela peptidase sinal.

4.4. Atividade biológica

A atividade biológica das preparações de endostatina foi determinada no meio condicionado produzido pelas células CHO pela sua atividade inibitória sobre a proliferação celular das células endoteliais C-PAE estimuladas com bFGF. Os efeitos inibitórios da endostatina e da tag-endostatina foram determinados pelo decréscimo da incorporação de timidina e são mostrados na FIGURA 12. As duas proteínas recombinantes inibiram a replicação das células endoteliais bovina de um modo dose-dependente e mostraram efeitos inibitórios similares. A extensão da inibição (de 0 a 91,4% do controle) foi proporcional ao incremento das concentrações de endostatina (de 0,8 a 114µg/mL). Com a finalidade de se eliminar a possibilidade de que a inibição do crescimento das células endoteliais fosse causada por um produto secretado pelas células CHO que não fosse a endostatina, o meio condicionado de células CHO transfectadas com o vetor pED sem o gene da endostatina e carregando cópias amplificadas do gene do DHFR foi testado, sendo de 8% a inibição do crescimento das células C-PAE.

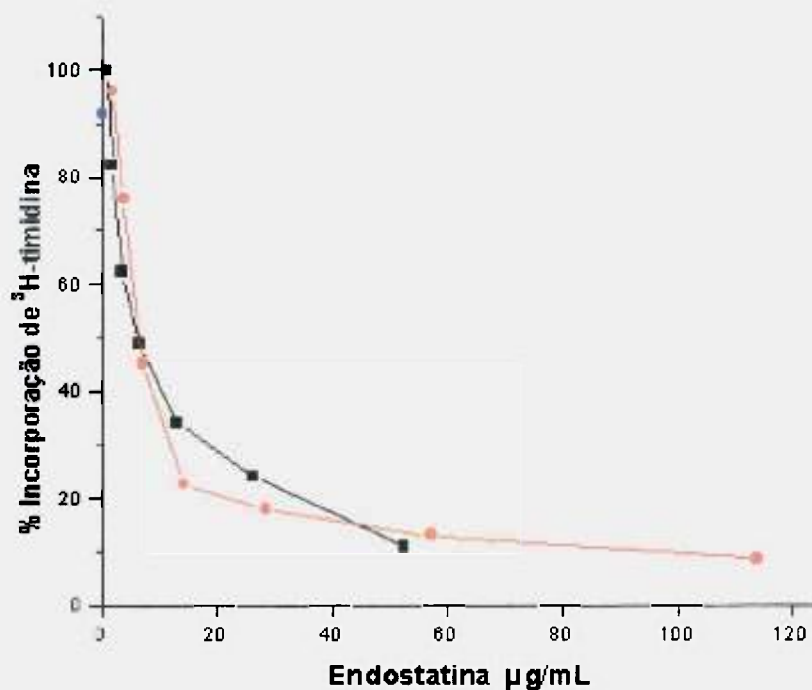


FIGURA 12 - Ensaio de proliferação celular. Endostatina murina recombinante (■) e (his)₆-met-endostatina (●) expressas pelas células CHO transfectadas foram testadas pela sua habilidade de inibir a porcentagem de incorporação de ³H-timidina às células C-PAE. Meio condicionado de células CHO que foram transfectadas com o vetor pED foi utilizado como controle(●).

4.5. Perfil de crescimento celular

Com o intuito de determinar se há modificações no perfil de crescimento das células não transfectadas ou transfectadas com os vetores de expressão, na presença ou ausência de MTX, foram construídas curvas de crescimento e foi determinado o tempo de duplicação para cada condição. A partir dos dados obtidos nas contagens foram construídas três curvas de crescimento e foi calculado o tempo de duplicação para cada condição. (FIGURAS 13, 14 e 15).

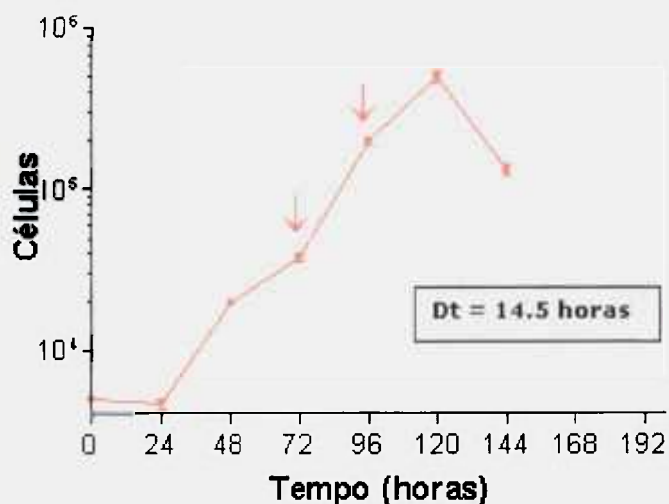


FIGURA - 13 Curva de crescimento da linhagem celular CHO-DXB11 não transfectada. As setas indicam os pontos entre os quais foi calculado o tempo de duplicação (Dt) e as barras mostram o desvio padrão das amostras.

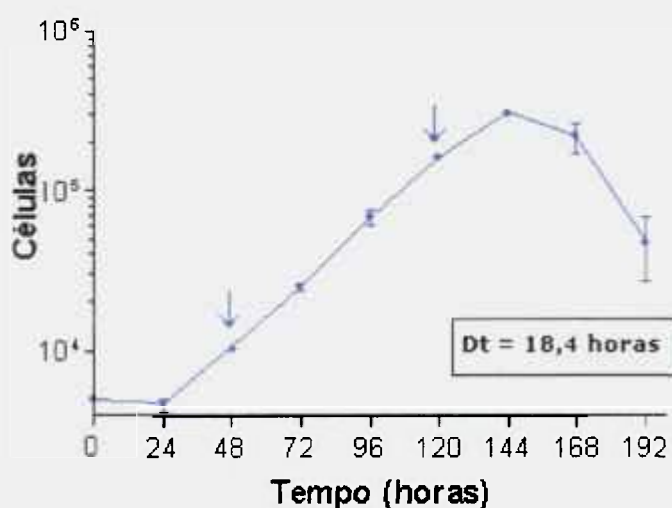


FIGURA 14 - Curva de crescimento do um clone transfectado com o vetor pED-(his)₆-met-endo já selecionado e na sua última etapa de amplificação por MTX (1280 nM) mantido na ausência do mesmo. As setas indicam os pontos entre os quais foi calculado o tempo de duplicação (Dt) e as barras mostram o desvio padrão entre as amostras.

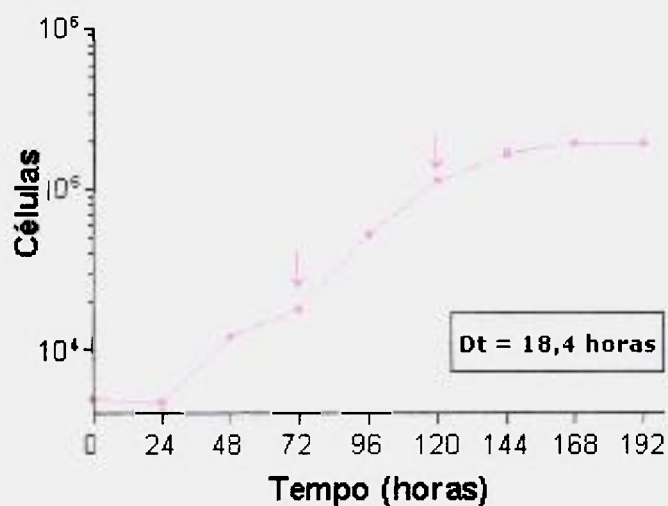


FIGURA 15 - Curva de crescimento de um clone transfectado com o vetor pED-(his)₆-met-endo selecionado e na sua última etapa de amplificação por MTX (1280 nM) mantido na presença de 1280 nM de MTX. As setas indicam os pontos entre os quais foi calculado o tempo de duplicação (Dt) e as barras mostram o desvio padrão das amostras.

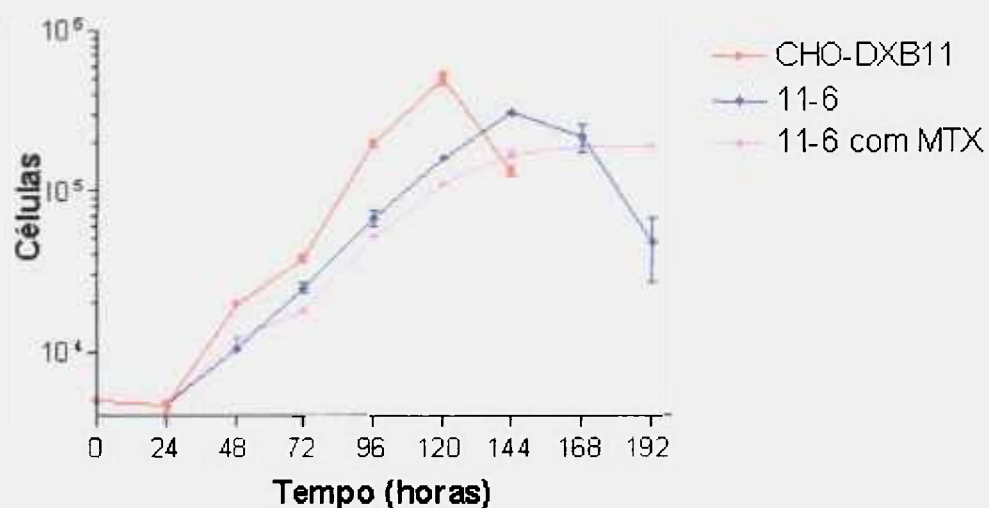


FIGURA 16 - Curvas de crescimento de células transfectadas ou não com o vetor de expressão pED-(his)₆-endo na presença ou ausência de MTX. O clone expressando (his)₆-met-endostatina foi denominado 11-6.

Os resultados mostram que as células CHO-DXB11 possuem um tempo de duplicação menor, de 14,5 horas, apresentando uma maior velocidade de crescimento se comparada com o clone transfectado na presença ou ausência de MTX, ambos com o mesmo tempo de duplicação, de 18,4 horas.

Na FIGURA 16 podemos observar os perfis de crescimento celular correspondentes às células CHO-DXB11 não transfectadas, um clone transfectado com o vetor pED-(his)₆-endo após a última etapa de amplificação por MTX (1280 nM) mantido na ausência de MTX e o mesmo clone mantido na presença de 1280 nM MTX. A velocidade de crescimento tanto na presença quanto na ausência de MTX não foi afetada, sendo os tempos de duplicação similares para ambos casos. Isto se deve ao fato que os DNAs amplificados são estáveis nas células transfectadas e selecionadas com MTX, sob propagação na ausência de MTX.

4.6 Ensaio de cultura de células CHO expressando endostatina no dispositivo Theracyte "in vitro"

Na FIGURA 17 pode-se observar o Western blot das amostras do sobrenadante da cultura das células incubadas no dispositivo e na garrafa. Nesta figura, não se pode observar a presença de endostatina no sobrenadante das células implantadas no dispositivo, enquanto o sobrenadante das células incubadas na garrafa mostra a presença de uma banda com atividade imunológica contra as 6 Histidinas. No segundo experimento, em que se implantou um número menor de células (2×10^6) e um tempo de incubação maior (5 dias), também não foi observada banda de endostatina no Western blot. Aparentemente as células não ficaram viáveis dentro do dispositivo de imunisolamento e por isso não se pode observar bandas de endostatina nas colunas correspondente às amostras dos sobrenadantes das células implantadas no dispositivo (colunas 3 e 4).

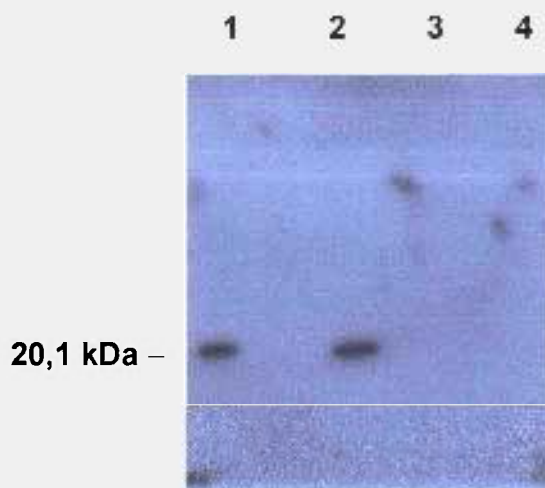


FIGURA 17 - Western blot dos sobrenadantes das células CHO(pED-(his)₆-met-endo). Coluna 1. Padrão de (his)₆-met-endostatina; Coluna 2. Meio condicionado (24 horas) de 1×10^7 células em garrafa. Coluna 3) Meio condicionado (24 horas) de 1×10^7 células no dispositivo; Coluna 4) Meio condicionado (120 horas) de 2×10^6 células no dispositivo.

Na FIGURA 18 se pode ver a fotografia da lâmina de histologia do dispositivo após 3 semanas de incubação *in vitro*. Não se podem observar células viáveis. Este dado não é de todo inesperado 3 semanas é um tempo muito grande para incubação de células em meio de cultura rico contendo SFB. No entanto, quando o experimento foi repetido com menos tempo (5 dias) os dados foram semelhantes, isto é, as células também não apresentavam núcleo.

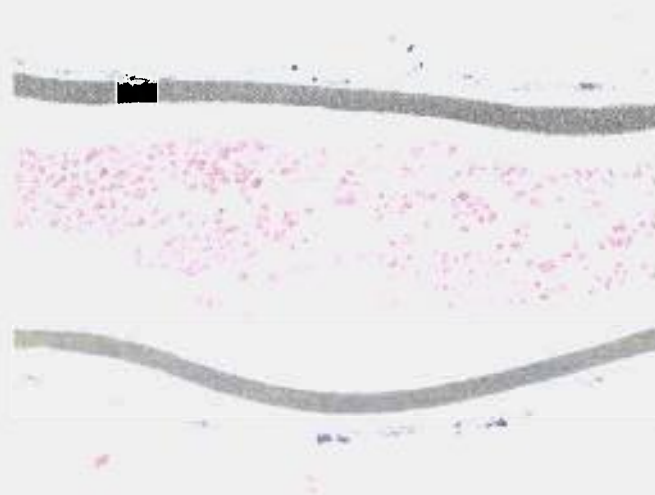


FIGURA 18 - Lâmina de corte histológico corado com hematoxilina eoxina de células CHO(pED-(his)₆-met-endo) incubadas em cultura no dispositivo Theracyste por 21 dias.

5. DISCUSSÃO

A expressão de altos níveis de endostatina recombinante, a partir de uma linhagem de células CHO estavelmente transfectadas com o gene da endostatina foi realizada a partir da utilização do vetor dicistrônico, pED, que contém como marcador gênico amplificável o gene da DHFR.

A escolha pela utilização de um vetor dicistrônico pED foi realizada com o objetivo de obter maiores níveis de expressão da endostatina recombinante, já que em um trabalho de pesquisa anterior a este foram obtidos níveis baixos da endostatina e (his)₆-met-endostatina mediante a transfecção de células murinas LM(TK-) com os vetores pSecTag2-endo e pSecTag2-(his)₆-met-endo e seleção dos clones resistentes à higromicina, o que resultou em clones expressando níveis de 380 ng de endostatina/10⁶ células/dia e 55 ng (his)₆-met-endostatina/10⁶ células/dia. Como esses níveis foram muito baixos, o vetor foi trocado pelo vetor pED, usando as células CHO-DXB11 deficientes em DHFR como hospedeiras para alcançar altos níveis de expressão de endostatina.

O vetor pED já foi utilizado para a transfecção de células CHO-DXB11 no Centro de Biologia Molecular, tendo sido obtidos bons níveis de expressão de prolactina e de hormônio tireotrófico humanos (30 mg/L e 3,5 mg/L respectivamente quando cultivados em placas de cultura e 150 mg/L e 20 mg/L respectivamente quando foi utilizado um biorreator tipo "hollow fiber"), conforme podem ser verificados nos trabalhos de Soares e col.(2000) e Peroni e col.(2002).

A linhagem celular CHO é uma das linhagens mais utilizadas como hospedeira para a expressão estável de proteínas recombinantes em células de mamífero (53) pois apresenta produtos com uma comprovada similaridade com os equivalentes naturais, níveis de produção elevados, adaptando-se bem à ausência de soro e crescendo tanto aderidas à superfície como em suspensão (42). Além disso células eucariotas possibilitam a obtenção de proteínas recombinantes na

forma solúvel e biologicamente ativas, enquanto que proteínas expressas em bactérias são freqüentemente obtidas na sua forma insolúvel e possivelmente inativas (27). Assim, o presente trabalho descreve altos níveis de síntese de endostatina e de sua proteína de fusão ((his)₆-met-endo). Uma estratégia de amplificação gênica usando como marcador selecionável e amplificável, o gene do DHFR foi seguida. A ampla utilização do sistema de seleção baseado no DHFR se deve ao seu alto potencial de amplificação e à existência de mutantes de células CHO deficientes em DHFR (CHO-DXB11)(80) que possibilitam uma seleção imediata das células transformadas em meio de cultura na ausência de nucleosídeos.

A utilização do vetor de expressão dicistrônico, pED, que contém um sítio interno de ligação aos ribossomos isolado do vírus da EMC (41), foi fundamental para alcançar uma eficiente amplificação gênica. Uma vantagem deste sistema é que a manutenção das condições de seleção não são imprescindíveis. A presença do fragmento EMC em construções dicistrônicas possibilita a obtenção de altos rendimentos proteicos que se mantêm estáveis mesmo na ausência dos respectivos agentes de seleção/amplificação (64). Foi demonstrado por Kaufman e cols (1991) que graças a esta modificação, os vetores construídos estão menos sujeitos a deleções ou rearranjos de DNA, sendo portanto mais úteis para a obtenção mais rápida de clones com altos níveis de expressão estável de genes heterólogos em células eucariotas (41). Vetores dicistrônicos que contêm a seqüência EMC foram utilizados na obtenção de altos níveis de expressão ($28\mu\text{g}/10^6$ células/dia) de uma imunoglobulina de cadeia pesada (82).

Células CHO transfectadas e selecionadas na presença de MTX utilizadas para amplificação de genes heterólogos têm provado ser estáveis sob propagação na ausência de MTX como foi comprovado no presente trabalho. Quando um clone expressando endostatina foi propagado durante um mês na ausência de MTX, os níveis de expressão da proteína recombinante foram similares aos obtidos pelo mesmo clone durante a última etapa de tratamento com MTX ($18,5\ \mu\text{g}/10^6$ células), o que indica estabilidade do vetor nas células transfectadas. A ausência dessa substância tóxica durante a produção de uma proteína para uso terapêutico contra o câncer é extremamente importante.

As células CHO DXB11 transfectadas com o vetor pED, na ausência do gene da endostatina e com passagens por todas as etapas de amplificação gênica por tratamento com MTX, foram utilizadas como controle negativo, juntamente com as células CHO-DXB11 não transfectadas.

O desempenho dos vetores foi confirmado experimentalmente e a secreção de endostatina e (his)₆-met-endostatina pelos clones mais produtivos de cada construção foi alta. Foram obtidos clones, os quais secretam 78 mg/L de endostatina e 114 mg/L de (his)₆-met-endostatina. Estes são os maiores níveis de expressão de endostatina recombinante descritos na literatura.

Altos níveis de expressão de endostatina murina recombinante mediante transfecção estável de células de mamíferos ainda não foram descritos na literatura, no entanto foi descrita a expressão de endostatina recombinante secretada para o meio de cultura de *E. coli* transformadas (40 mg/L) (83), Dhanabal e col. (1999a e 1999b) descreveram a obtenção de endostatina humana e murina recombinantes por *Pichia pastoris* transfectadas (10-20 mg/L) e também foi obtida a transfecção estável de um plasmídeo para a produção de endostatina recombinante utilizando células S2 de *Drosophila melanogaster* como hospedeiras (0,5 mg/L)(70).

A ausência de soro no meio de cultura não afetou significativamente os níveis de expressão da endostatina recombinante (18,5 µg/10⁶ células) como foi comprovado no nosso trabalho. A ausência do suplemento de soro no meio no qual a proteína de interesse é secretada é desejável pois facilita o processamento do produto e minimiza problemas relacionados ao uso desse componente heterogêneo.

A otimização da produção de endostatina num biorreator tipo "hollow fiber" poderia gerar uma proteína recombinante altamente concentrada, como já descrito na produção de prolactina humana usando tal sistema de expressão (78) com um incremento de acima de 30 vezes na concentração da prolactina quando comparada com a sua produção em placas de cultura.

Os clones transfectados com os vetores pED-endo e pED-(his)₆-met-endo mostraram um aumento significativo na secreção das proteínas recombinantes durante as sucessivas etapas de amplificação por tratamento com MTX. O incremento dos níveis das proteínas recombinantes no meio condicionado foi devido

à amplificação do número de cópias do gene da endostatina nos cromossomas das células transfectadas. Como é descrito na literatura, genes amplificados de forma estável são geralmente integrados ao cromossomo do hospedeiro e são freqüentemente associados com à expansão de regiões do cromossomo chamadas "regiões homogeneamente coradas" (40).

A presença de bandas com pesos moleculares correspondentes ao peso molecular da endostatina (20 kDa) no Western blot confirmou que as proteínas recombinantes são ativas imunologicamente.

O peptídeo sinalizador possibilita a secreção das proteínas recombinantes para o meio extracelular. A presença de seqüências para um peptídeo sinalizador nas construções vetoriais pED-endo e pED-(his)₆-met endo é imprescindível pois a endostatina é um fragmento C-terminal do colágeno XVIII e portanto não possui tal sinal.

De acordo com os dados obtidos pelo seqüenciamento N-terminal, o peptídeo sinalizador foi corretamente clivado durante a secreção das proteínas permitindo a produção e secreção de endostatina e (his)₆-met-endostatina.

As células C-PAE foram utilizadas para se avaliar o efeito antiproliferativo de endostatina sobre as células endoteliais. Esta linhagem celular foi descrita como uma das que permite uma resposta reprodutível da inibição da proliferação (16) sendo por este motivo utilizada no presente estudo.

Além da endostatina, a (his)₆-met-endostatina foi também produzida pois a tag histidina pode ser usada para a purificação da proteína de fusão por meio da utilização de resinas contendo metais imobilizados (IMAC). Outra vantagem da presença das 6 histidinas é o potencial uso de anticorpos anti-histidina para caracterização e quantificação da proteína de fusão. Tais anticorpos estão comercialmente disponíveis a preços menores que anticorpos específicos para a endostatina. Como indicado pelo ensaio de proliferação de células C-PAE, a atividade biológica da (his)₆-met-endostatina é comparável ao da proteína natural, sugerindo que a presença da histidina na endostatina pode ser usada, por exemplo, como marcador para experimentos "*in vivo*". (16).

A espectrometria de massa (MALDI-TOF) foi executada para se determinar a massa exata das proteínas recombinantes, obtendo-se picos majoritários com valores de 20029 e 21094 Da correspondentes à endostatina recombinante e (his)₆-met-endostatina respectivamente, estes valores estão de acordo com os valores teóricos calculados de 20375 e 21330 Da respectivamente (EXPASY, <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>). As análises foram realizadas em amostras não purificadas de meios condicionados, e mesmo assim, se observou claramente que os picos majoritários são os pertencentes às proteínas recombinantes de interesse. Podemos também observar a presença de picos minoritários de aproximadamente 4500 Da e 8300 Da que aparecem nos sobrenadantes das culturas de células CHO transfectadas ou não com os vetores contendo o gene da endostatina. É provável que sejam proteínas expressas por esta linhagem celular sem relação com a endostatina.

O perfil de crescimento celular da linhagem celular CHO-DXB11 transfectada ou não com o vetor de expressão, foi avaliado para verificar as possíveis modificações no mesmo, após a transfecção com os vetores de expressão. Verificou-se que a velocidade de crescimento foi diminuída após a transfecção, como observado pela aumento do tempo de duplicação para as células transfectadas com o vetor expressando (his)₆-met-endostatina. Também foi observado que a presença ou ausência de MTX no meio de cultura não afeta a velocidade de crescimento do clone transfectado com o vetor pED-(his)₆-met-endo já amplificado por tratamento com MTX. Estes dados portanto confirmam que as proteínas recombinantes obtidas após a transfecção de vetor pED, são expressas estavelmente e em altos níveis possibilitando processos de purificação e otimização de sua produção.

Em um projeto relacionado pretende-se implantar as células CHO secretando endostatina murina em dispositivos de imunisolamento para tratamento de camundongos com tumores sólidos. Para tanto foi imprescindível a obtenção de células de mamífero que apresentassem altos níveis de proteína secretada e com expressão estável, mesmo na ausência do agente de seleção.

A ausência de endostatina no sobrenadante da cultura de 10⁷ células CHO (pED-(his)₆-met-endo) implantadas nos dispositivos de imunisolamento foi

inesperada para nós. Segundo o trabalho de McKenzie e cols (2001) 2×10^6 células CHO implantadas no mesmo tipo de dispositivo e cultivadas “*in vitro*” sobreviveram bem em cultura por 4 dias, inclusive apresentando células em mitose, enquanto outros tipos celulares não sobreviveram tão bem. A mesma viabilidade das células CHO foi também observada pelos autores quando os dispositivos foram implantados em camundongos scid. Nosso experimento foi repetido com um número menor de células (2×10^6) a fim de reproduzir o experimento de McKenzie e cols (2001), mas o mesmo resultado foi observado: ausência de endostatina no sobrenadante e baixa viabilidade celular no dispositivo. Esse experimento deverá ser melhor estudado e possivelmente repetido.

6. CONCLUSÕES

Foram obtidos altos níveis de expressão de endostatina murina recombinante e da proteína de fusão ((his)₆-met-endostatina) após a transfecção do vetor de expressão pED na linhagem celular mutante CHO-DXB11.

As proteínas recombinantes apresentam pesos moleculares compatíveis com a proteína autêntica, com seqüenciamento N-terminal correto, e demonstrando ter atividade biológica e imunológica para ambas proteínas.

A ausência das condições de seleção não afeta a estabilidade da expressão das proteínas recombinantes nem o perfil de crescimento das células transfectadas, o que indica a estabilidade do vetor nas células transfectadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1988.
2. BERGERS, G., JAVAHERIAN, K., LO, K. M., FOLKMAN, J., AND HANAHAN, D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. **Science**, 284: 808-12, 1999.
3. BLEZINGER, P., WANG, J., GONDO, M., QUEZADA, A., MEHRENS, D., FRENCH, M., SINGHAL, A., SULLIVAN, S., ROLLAND, A., RALSTON, R. AND MIN, W. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. **Nature Biotechnology**, 17: 343-348, 1999.
4. BOEHM, T., FOLKMAN, J., BROWDER, T., AND O'REILLY, M.S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. **Nature**, 390: 404-407, 1997.
5. BOOCOCK, C. A., CHARNOCK, J. D., SHARKEY, A. M., MCLAREN, J., BARKER, P. J., WRIGHT, K. A., TWENTYMAN, P. R., AND SMITH, S. K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, 87: 506-516, 1995.
6. BRAUKER, J. H., CARR, B. V., MARTINSON, L. A., CRUDELE, J., JOHNSTON, W. D., AND JOHNSON, R. C. Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture. **J. Biomed. Mater. Res.** 29: 1517-1524, 1995.
7. CAO, Y.; O'REILLY, M.S.; MARSHALL, B.; FLYNN, E.; JI, R.; FOLKMAN, J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. **J. Clin. Invest.**, 101 (5): 1055-1063, 1998.
8. CAO, Y. Antiangiogenic cancer therapy. **Seminars in Cancer Biology**, 14: 139-145, 2004.
9. CAO, Y., Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. **Inst. J Biochem. Cell Biol.**, 33: 357-369, 2001.
10. CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**, 6: 389-335, 2000.
11. CARMELIET, P., E COLLEN, D. Transgenic mouse models in angiogenesis and

- cardiovascular disease. *Journal Pathology*, 190: 387-405, 2000.
12. CHEN, C., PARANGI, S., TOLENTINO, M.J. AND FOLKMAN, J. A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. *Cancer Res.*, 55: 4230-4233, 1995.
 13. COLTON, C.K. Engineering challenges in cell-encapsulation technology. *Trends. Biotechnol.* 14:158-162, 1996.
 14. CRISTOFANILLI, M., CHARNSANGAVEJ, C., HORTOBAGYI, G.N. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. *Nature Reviews*, 1: 415-425, 2002.
 15. DHANABAL, M., VOLK, R., RAMCHANDRAN, R., SIMONS, M., AND SUKHATME, V. P. Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 258: 345-352, 1999a.
 16. DHANABAL, M., RAMCHANDRAN, R., VOLK, R., STILLMAN, I. E., LOMBARDO, M., IRUELA, A. M., SIMONS, M., AND SUKHATME, V. P. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer. Res.*, 59: 189-197, 1999b.
 17. DIXELIUS, J., LARSSON, H., SASSAKI, T., HOLMQVIST, K., LU.L., ENGSTROM, A., WELSH, H., CLAESSION-WELSH, L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood*, 95: 3403-3411, 2000.
 18. DVORAK, H.F., BROWN, L.F., DETMAR, M., AND DVORAK, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 146: 1029-1039, 1995.
 19. FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Med.*, 777: 527-543, 1999.
 20. FOLKMAN, J. Antiangiogenic gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9064-9066, 1998.
 21. FOLKMAN, J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis [see comments]. *N. Engl. J. Med.*, 333: 1757-1763, 1995.
 22. FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 4-6, 1989.
 23. FOLKMAN, J., BACH, M., ROWE, J. W., DAVIDOFF, F., LAMBERT, P., HIRSCH, C., GOLDBERG, A., HIATT, H.H., GLASS J., HENSHAW, E. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 285, 1182-1186, 1971.

24. FRESHNEY, R.I., *Culture of animal cells*. 4. Ed. New York: Wiley-Liss, 2000.
25. GASPARINI, G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs*, 58: 17-38, 1999.
26. GATELY, S., TWARDOWSKI, P., STACK, M. S., PATRICK, M., BOGGIO, L., CUNDIFF, D. L., SCHNAPER, H. W., MADISON, L., VOLPERT, O., BOUCK, N., ENGHILD, J., KWAAN, H. C., AND SOFF, G. A. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res.*, 56: 4887-4890, 1996.
27. GEISSE, S., GRAM, H., KLEUSER, B. AND KOCHER, H.P. Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expression and Purification*, 8: 271-282, 1996.
28. GOOD, D. J., POLVERINI, P. J., RASTINEJAD, F., LE, B. M., LEMONS, R. S., FRAZIER, W. A., AND BOUCK, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 87: 6624-6628, 1990.
29. GRAHAM, F.L., VAN DER EB, A.G., Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 54: 536-539, 1973.
30. HANAHAN, D., AND FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86: 353-64, 1996.
31. HANAI, J., GLOY, J., KARUMANCHI, S.A, KALE, S., TANG, J., HU, G., CHAN, B., RAMCHANDRAN, R., JHA, V., SUKHATME, V.P., SOKOL, S. Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling. *J. Cell Biol.*, 158: 529-539, 2002.
32. HOHENESTER, E., SASAKI, T., OLSEN, B. R., and Timpl, R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *Embo Journal*, 17 (6): 1656- 1664, 1998.
33. HORI, A., SASADA, R., MATSUTANI, E., NAITO, K., SAKURA, Y., FUJITA, T., AND KOZAI, Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res.*, 51: 6180-6184, 1991.
34. HOWE, C. *Gene Cloning and Manipulation*. Cambridge University Press, 1995.
35. HUANG, X., WONG, M. K. K. Q., ZHU, Z., WANG, K. Z. Q. W., HUANG, N, YE C., GORELIK, E., AND LI, M. Soluble recombinant endostatin purified from *Escherichia coli*: Antiangiogenic activity and antitumor effect. *Cancer Res.*, 61: 478-481. 2001.

36. JONH, H., PREISSNER, K.T., FORSSMANN, W.G., AND STANDKER, L., Novel glycosylated forms of human Plasma endostatin and circulating endostatin-Related Fragments of collagen XV. *Biochemistry*, 38 (32): 10217-10224, 1999.
37. JOSEPHS, S. F., LOUDOVARIS, T., DIXIT, A., YOUNG, S. K., AND JOHNSON, R. C. In vivo delivery of recombinant human growth hormone from genetically engineered human fibroblasts implanted within Baxter immunoisolation devices. *J. Mol. Med.* 77: 211-214, 1999.
38. KANDEL, J., BOSSY, W. E., RADVANYI, F., KLAGSBRUN, M., FOLKMAN, J., AND HANAHAN, D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*, 66: 1095-1104, 1991.
39. KANE, S. E. High-level expression of foreign genes in mammalian cells. *Genetic Engineering*, 13: 167-182, 1991.
40. KAUFMAN, R.J. Amplification and expression of transfected genes in Mammalian cells. In: HELLEMS, R.E. (Ed) *Gene amplification in mammalian cells*. New York Marcel Dekker, 1992, p. 315-343, 1992.
41. KAUFMAN, R.J.; DAVIES, M.V.; WASLEY, L.C.; MICHNICK, D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use the untranslated leader sequence from EMC virus. *Nucleic Acids Research*, 19: 4485-4490, 1991.
42. KAUFMAN, R.J. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. *Meth. Enzymol.*, 185: 537-566, 1990.
43. KERBEL, R. AND FOLKMAN J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature*, 2: 727-739, 2002.
44. KIM, Y.M., HWANG, S., PYUN, B.J., KIM, T.Y., LEE, S.T., GHO, Y.S., KWON, Y.P. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Fl-1. *J. Biol. Chem.*, 277: 27872-27879, 2002.
45. KIM, K.J., LI, B., WINER, J., ARMANINI, M., GILLETT, N., PHILLIPS, H.S., AND FERRARA, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362: 841-844, 1993.
46. KONG, H. L., AND CRYSTAL, R. G. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 273-286, 1998.
47. KUNKEL, T.A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488-492, 1985.
48. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
49. LEE, S.J., JANG, J.W., KIM, Y.M., LEE, H.I., JEON, J.Y., KWON, Y.G., LEE, S.T. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS Lett.*, 519: 147-152, 2002.
50. LI, X, FU, G.H., FAN, Y.R., SHI, C.F., LUI, X.J., XU, G.X., WANG, J.J. Potent inhibition of angiogenesis and liver tumor growth by administration of na aerosol containing a transferrin-liposome-endostatin complex. *World J. Gastroenterol*, 9: 262-266, 2003.
51. MACDONALD, N.J.; SHIVERS, W.Y.; NARUN, D.L.; PLUM, S.M.; WINGARD, J.N.; FUHRMANN, S.R.; LIANG, H.; HOLLAND-LINN, J.; CHEN, D.H.T. AND SIM, B.K.L. Endostatin binds tropomyosin. *J. Biol. Chem.*, 276 (27): 25190-96, 2001.
52. MAKENZIE, A.W., GEORGIU, H.M., ZHAN, Y., BRADY, J.L., LEW, A.M. Protection of Xenografts by a combination of Immunoisolation and a single Dose of Anti-CD4 Antibody. *Cell Transplantation*, 10: 183-193, 2001.
53. MAKRIDES, S. C. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein expression and purification*, 17: 183-202, 1999.
54. MILLAUER, B., SHAWVER, L. K., PLATE, K. H., RISAU, W., AND ULLRICH, A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature*, 367: 576-579, 1994.
55. NGUYEN, M., WATANABE, H., BUDSON, A. E., RICHIE, J. P., HAYES, D. F., AND FOLKMAN, J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers [see comments]. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86: 356-361, 1994.
56. O'REILLY, M. S., BOEHM, T., SHING, Y., FUKAI, N., VASIOS, G., LANE, W. S., FLYNN, E., BIRKHEAD, J. R., OLSEN, B. R., AND FOLKMAN, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88: 277-285, 1997.
57. O'REILLY, M. S., HOLMGREN, L., SHING, Y., CHEN, C., ROSENTHAL, R.A., MOSES, M., LANE, W.S., CAO, Y., SAGE, E.H. AND FOLKMAN, J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79: 315-328, 1994.
58. PADERA, R. F., AND COLTON, C. K. Time course of membrane microarchitecture-driven neovascularization. *Biomaterials* 17: 277-284, 1996.
59. PARANGI, S., OREILLY, M., CHRISTOFORI, G., HOLMGREN, L., GROSFELD, J., FOLKMAN, J., AND HANAHAN, D. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 93: 2002-2007, 1996.

60. PARK, J.H., LEE, J.M. AND CHUNG, I.S. Production of recombinant endostatin from stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biotechnol Letters*, 21: 720-733, 1999.
61. PEPPER, M. S., FERRARA, N., ORCI, L., AND MONTESANO, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189: 824-831, 1992.
62. PERLETTI, G., CONCARI, P., GIARDINI, R., MARRAS, E., PICCINNI, F., FOLKMAN, J., AND CHEN, L. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Research*, 60: 1793-1796, 2000.
63. PERONI, C.N.; SOARES, C.R.J.; GIMBO, E.; MORGANTI, L.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by a dual-marker amplification strategy. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35: 19-26, 2002.
64. PU, H., CASHION, L.M., KRETSCHMER, P.J., LIU, Z. Rapid establishment of high-producing cell lines using dicistronic vectors with glutamine synthetase as the selection marker. *Mol. Biotechnol.* 10: 15-25, 1998.
65. RASTINEJAD, F., POLVERINI, P. J., AND BOUCK, N. P. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell*, 56: 345-355, 1989.
66. READ, T.A., SORENSEN, D.R., MAHESPARAN, R., ENGER, P., TIMPL, R., OLSEN, B.R., HJELSTUEN, M.H.B., HARALDSETH, O., AND BJERKVIG, R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nature Biotechnolog*, 19: 29-34, 2001a.
67. READ, T. A., FARHADI, M. BJERKVIG, R., OLSEN, B. R., ROKSTAD, A. M., HUSZTHY, AND VAJKOCZY, P. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by Alginate-encapsulated cells. *Cancer Research*, 61: 6830-6837, 2001b.
68. REN, B., HOTI, N., RABASEDA, X., WANG, Y.Z., WU, M., The antiangiogenic and therapeutic implications of endostatin. *Exp. Clin. Pharmacol.*, 25(3): 215-224, 2003.
69. RIBATTI, D., VACCA, A., PRESTA, M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gene. Pharmacol.*, 35(5): 227-231, 2000.
70. RISAU, W. Mechanics of angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674, 1997.
71. RISAU, W. Differentiation of endothelium. *FASEB J.*, 9: 926-933, 1995.

72. SCHIMKE, R.T. Gene amplification in cultured animal cells. *Cell*, 37: 705-771, 1984.
73. SASAKI, T., FUKAI, N., MANN, K., GOHRING, W., OLSEN, B. R., AND TIMPL, R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *Embo Journal*, 17 (15): 4249-4256, 1998.
74. SAUTER, B. V., MARTINET, O., ZHANG, W. J., MANDELI, J., AND WOO, S. L. C. Adenovirus mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Pnas*, 97 (9): 4802-4807, 2000.
75. SHICHIRI, M. AND HIRATA, Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J.*, 15: 1044-1053, 2001.
76. SHWEIKI, D., ITIN, A., SOFFER, D., AND KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* (359): 843-845, 1992.
77. SRIDHAR, S.S., SHEPHERD, F.A. Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in treatment of lung cancer. *Lung Cancer*, 42: s81-s91, 2003.
78. SOARES, C. R. J., MORGANTI, L., MILOUX, B., LUPKER, J. H., FERRARA, P., BARTOLINI, P. High-level synthesis of human prolactin in chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 32: 127-135, 2000.
79. TANDLE, A., BLAZER, D.G., LUBUTTI, S.K. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *Journal of Translational Medicine.*, 2 (22): 1-20, 2004.
80. URLAUB, G., AND CHASIN, L. A. Isolation of Chinese hamster cells mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 4216-4220, 1980.
81. WANG, X., LUI, F.K., LI, X., LI, J.S., XU, G.X. Retrovirus-mediated gene transfer of human endostatin inhibits growth of human liver carcinoma cells SMMC7721 in nude mice. *World J. Gastroenterol.*, 8: 277-285, 2002.
82. WOOD, C.R., MORRIS, G.E., ALDERMAN, E.M., FOUSER, L., KAUFMAN, R.J. An internal ribosome binding site can be used to select for homologous recombinants at an immunoglobulin heavy-chain locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8006-8010, 1991.
83. XU, R., DU, P., FAN, J.J., ZHANG, Q., LI, T.P., GAN, R.B. High-level expression

- and secretion of recombinant mouse endostatin by *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 24: 453-59, 2002.
84. YOU, W. K., SO, S. H., LEE, H., PARK, S. Y., YOON, M. R., CHANG, S. I., KIM, H. K., JOE, Y. A., HONG, Y. K., AND CHUNG, S. I. Purification and characterization of recombinant murine endostatin in *E. coli*. *Exp. Mol. Med.*, 31: 197-202, 1999.
85. ZETTER, B.R. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Ver. Med.*, 407-24, 1998.