



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**SÍNTESE DE PROLACTINA HUMANA EM CÉLULAS DE
OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO)**

CARLOS ROBERTO JORGE SOARES

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

**Orientador:
Dr. Paolo Bartolini**

**São Paulo
2000**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
Autarquia Associada a Universidade de São Paulo

**SÍNTESE DE PROLACTINA HUMANA EM CÉLULAS DE
OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO)**

CARLOS ROBERTO JORGE SOARES

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientador: Dr. PAOLO BARTOLINI

São Paulo

2000



Dedico esse trabalho

Aos meus pais, **João Jorge Soares** e
Maria Senhora Soares, pelo carinho que
sempre tiveram,

Ao meu irmão e grande amigo
Claudemir,

À **Eleonora**, pela paciência e
compreensão.

*“Jamais considere seus
estudos como uma obrigação,
mas como uma oportunidade
invejável para aprender
a conhecer a influência
libertadora da beleza do reino
do espírito,
para seu próprio prazer
pessoal e para proveito da
comunidade
à qual seu futuro trabalho
pertencer”
(Albert Einstein)*

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do TB pela participação e apoio na realização deste trabalho;

À Ligia pela colaboração;

À Cibele pela revisão e sugestões;

À Teresa pelo apoio nas mais diversas situações;

Ao IPEN-CNEN/SP pela oportunidade de desenvolver este trabalho;

À Sanofi Recherche pelo estágio de especialização;

Ao CNPq pela concessão de recursos financeiros e de bolsa de especialização no exterior;

À FAPESP pela concessão de recursos financeiros;

Ao Dr. Paolo Bartolini meu especial agradecimento, não só pela orientação, mas por todo apoio e incentivo que sempre demonstrou;

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

SÍNTESE DE PROLACTINA HUMANA EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO)

Carlos Roberto Jorge Soares

RESUMO

Três vetores de expressão eucarióticos diferentes, baseados no mesmo gene marcador de seleção (dhfr), foram utilizados na transfecção de células CHO dhfr- para isolamento de linhagens celulares capazes de secretar altos níveis de prolactina humana recombinante (rec-hPRL).

Dois vetores, um codificando a prolactina humana (p658-hPRL) e o outro a tag-prolactina (p658-tagPRL), contêm o gene completo do vírus-X da hepatite B (HBV-X) que codifica um transativador viral e uma sequência derivada do fator estimulador de formação de colônias granulócito-macrófago (GM-CSF), a qual produz uma degradação seletiva do RNA mensageiro da enzima dhfr. Esses vetores apresentam a vantagem da rápida obtenção de linhagens celulares estáveis por não ser necessária a amplificação com metotrexato. Os maiores valores de secreção obtidos com esses vetores foram da ordem de $10 \mu\text{g hPRL}/10^6$ células/dia.

O outro vetor (pEDdc-hPRL) é baseado em um sistema de expressão dicistrônico contendo um sítio interno de ligação ao ribossomo isolado do vírus da encefalomiocardite (EMC). Esse vetor antes da amplificação apresentou uma expressão pelo menos 10 vezes inferior àquela obtida com os outros dois vetores. Entretanto, após três passos de amplificação com metotrexato, foram obtidos clones capazes de secretar até $\sim 30 \mu\text{g hPRL}/10^6$ células/dia.

Esta é a primeira vez que são apresentados dados relativos à produção e purificação de rec-hPRL derivada de células CHO, os níveis de secreção obtidos sendo os maiores já reportados para esse hormônio em sistemas eucarióticos. A rec-hPRL derivadas de células CHO mostrou conter aproximadamente 10 % da forma glicosilada, um valor que não é discrepante quando comparado com aqueles reportados para hPRL purificada da hipófise ou de células murinas (C-127) transformadas. A rec-hPRL obtida em células CHO foi purificada com bons rendimentos, alcançando também uma ótima resolução entre forma não glicosilada e glicosilada. Esta última, quando sua potência foi determinada mediante ensaio biológico "in vitro", provou ser aproximadamente 47% menos ativa. Uma análise qualitativa e quantitativa destas formas foi também possível mediante a padronização de uma técnica de HPLC em fase reversa, pela primeira vez aplicada a este hormônio. Altas concentrações de prolactina foram obtidas em biorreator tipo "hollow fiber", embora com a presença de uma considerável quantidade do fragmento hPRL₁₁₋₁₉₉, aparentemente o resultado de um processo proteolítico.

SYNTHESIS OF HUMAN PROLACTIN IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS (CHO)

Carlos Roberto Jorge Soares

ABSTRACT

Three different eukaryotic expression vectors, based on the same selectable gene marker (dhfr), have been used for dhfr^r CHO cells transfection to rapidly isolate stable cell lines capable of secreting high levels of recombinant human prolactin (rec-hPRL).

Two vectors, one codifying a human prolactin (p658-hPRL) and the other a tag-prolactin (p658-tagPRL), contain the complete hepatitis B virus-X (HBV-X) gene coding for a viral transactivator and a sequence derived from the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) that mediates selective dhfr mRNA degradation. These vectors have the advantage of rapidly obtaining stable cell lines without methotrexate amplification. The highest secretion obtained by these vectors was of approximately 10 µg hPRL/10⁶ cells/day.

The other vector (pEDdc-hPRL) is based on a dicistronic expression system, containing an internal ribosome entry site isolated from the encephalomyocarditis (EMC) virus. This vector before amplification provided secretion levels at least 10 fold lower than that obtained with the other two vectors. However, after three steps of methotrexate amplification, it provided some clones able to secrete up to 30 µg hPRL/10⁶ cells/day.

This is the first report describing the production and purification of rec-hPRL from CHO cells, obtaining secretion levels with both vectors higher than those reported so far for this hormone in other eukaryotic systems. CHO-derived rec-hPRL contained approximately 10 % of the glycosylated form, a value that is consistent with results reported for hPRL purified from the pituitary or from transformed murine C-127 cells. CHO-derived rec-hPRL was purified with good yield, obtaining also a good resolution between non-glycosylated and glycosylated prolactin. The latter, when its potency was determined via an in vitro bioassay, presented a 47 % lower bioactivity. A qualitative and quantitative analysis of these forms was also possible thanks to the setting up of a reversed-phase HPLC technique, for the first time applied to this hormone. A pilot production in a hollow fiber bioreactor provided a highly concentrated medium, though with the presence of considerable amounts of hPRL₁₁₋₁₉₉ fragments, apparently the result of a proteolytic process.

Lista de abreviaturas

aa	= aminoácidos
AZT	= azidotimidina
amp	= ampicilina
BSA	= albumina de soro bovino
ca	= cerca de
CHO	= ovário de hamster chinês
Con A	= Concanavalina A
CV	= coeficiente de variação
dhfr	= diidrofolato redutase
DNA	= ácido desoxirribonucleico
EMC	= encefalomioocardite
FPB	= tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, pepstatina A 2 μ M, 5 % de n-butanol e 5 % de elitenoglicol
GH	= hormônio de crescimento
G-hPRL	= prolactina humana glicosilada
GM-CSF	= fator estimulador de formação de colônias granulócito-macrófago
h	= horas
HBV-X	= transativador viral do vírus X da hepatite B
hFSH	= hormônio folículo estimulante humano
hLH	= hormônio luteotrófico humano
hGH	= hormônio de crescimento humano
hPRL	= prolactina humana
HPSEC	= cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular
HPLC	= cromatografia líquida de alta eficiência
hTSH	= tireotrofina humana
IRMA	= ensaio imunorradiométrico
KDa	= kilo Dalton
mRNA	= RNA mensageiro
MTX	= metotrexato
NG-hPRL	= prolactina humana não glicosilada
NTA	= ácido nitrilotriacético

pb	= par de bases
PCR	= reação de polimerase em cadeia
PBS	= tampão fosfato salina
PL	= hormônio lactogênio placentário
PRL	= prolactina
RIE	= radioimunoensaio
rec-hPRL	= prolactina humana recombinante
RNA	= ácido ribonucleico
RP-HPLC	= cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SDS-PAGE	= eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	= soro fetal bovino
SFBd	= soro fetal bovino dialisado
SPHP	= SP-Sepharose High Performance
SPFF	= SP-Sepharose Fast Flow
sPRL	= prolactina de símio
WB	= Western Blotting
T_a	= temperatura ambiente
TGF-β	= fator beta transformador de crescimento
T_R	= tempo de retenção
T_{RR}	= tempo de retenção relativo
WHO	= Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Objetivos do trabalho	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1. Materiais	11
2.1.1. Equipamentos e acessórios principais	11
2.1.2. Linhagens celulares	13
2.1.3. Resinas cromatográficas	13
2.1.4. Padrões, antissoros e outros reagentes para imunoenaios ...	13
2.1.5. Reagentes principais.....	14
2.1.5.1. Reagentes utilizados na cultura celular	14
2.1.5.2. Outros reagentes	15
2.1.6. Diversos.....	15
2.2. Métodos	17
2.2.1. Reação de PCR	17
2.2.2. Isolamento e purificação dos fragmentos de DNA	18
2.2.3. Transformação e extração do DNA das bactérias	19
2.2.4. Preparação de plasmídios em larga escala	19
2.2.5. Meios utilizados para cultura de células	20
2.2.5.1. Meio de cultura (MEM 5% SFB)	20
2.2.5.2. Meio de seleção (α - MEM 10% SFBd)	20

2.2.6. Cultura de células CHO dhfr-	20
2.2.7. Transfecção	21
2.2.7.1. Transfecção transiente pelo método do DEAE-Dextran	21
2.2.7.2. Transfecção estável pelo método do fosfato de cálcio	21
2.2.8. Seleção dos clones	22
2.2.9. Amplificação com metotrexato (MTX)	22
2.2.10. Dosagem de prolactina	23
2.2.11. Estudo da cinética de expressão	23
2.2.11.1. Determinação da eficiência de expressão de acordo com Monaco e colaboradores	23
2.2.11.2. Determinação da eficiência de expressão de acordo com Miloux e colaboradores	24
2.2.12. SDS-PAGE e Western Blotting (WB)	24
2.2.12.1. SDS-PAGE	24
2.2.12.1.1. Revelação do SDS-PAGE com "Coomassie Brilliant Blue R-250"	25
2.2.12.1.2. Revelação do SDS-PAGE com nitrato de prata	25
2.2.12.1.3. Densitometria	26
2.2.12.2. Western Blotting (WB)	26
2.2.13. Produção em biorreator	27
2.2.14. Dosagem de lactato	28
2.2.15. Dosagem de glicose	28
2.2.16. Purificação	28
2.2.16.1. Purificação de rec-hPRL utilizando material produzido em biorreator	29
2.2.16.2. Purificação de rec-hPRL utilizando material produzido em placas de cultura	29
2.2.17. Produção e purificação da tagPRL	30
2.2.18. Bioensaio "in vitro"	31
2.2.19. Seqüenciamento de aminoácidos	32

2.2.20. Análise por HPLC	32
2.2.20.1. Análise por HPLC em fase reversa (RP-HPLC)	33
2.2.20.2. Análise por HPLC de exclusão molecular (HPSEC)	33
3. RESULTADOS	34
3.1. Construção de diferentes vetores de expressão para células CHO...	34
3.1.1. Construção do vetor pEDdc-hPRL	34
3.1.2. Construção do vetor p658-hPRL	35
3.1.3. Construção do vetor p658-tagPRL	37
3.2. Análise comparativa da funcionalidade das diferentes construções mediante transfecção transiente	41
3.3. Análise comparativa da funcionalidade das diferentes construções mediante transfecção permanente	41
3.4. Amplificação com metotrexato (MTX)	43
3.5. Análise por Western Blotting do produto derivado de linhagens estáveis de CHO transformadas	45
3.6. Utilização de diferentes meios de cultura na expressão de hPRL	47
3.7. Determinação da proporção de G-hPRL e NG-hPRL no produto secretado	48
3.8. Padronização da produção de hPRL em biorreatores do tipo “hollow fiber” e identificação da forma clivada hPRL ₁₁₋₁₉₉	50
3.8.1. Produção no biorreator utilizando o meio α -MEM	50
3.8.2. Produção no biorreator utilizando o meio CHO-S-SFM II	53
3.8.3. Identificação da forma 22k mediante seqüenciamento N- terminal	57
3.9. Purificação da hPRL obtida em biorreator	57
3.10. Purificação de hPRL obtida em garrafas	62
3.10.1. Produção em garrafas	61
3.10.2. Purificação do material obtido em garrafas	61

3.11. Obtenção da tagPRL	64
3.12. Caracterização físico-química da prolactina obtida	66
3.12.1. Análise por HPLC em fase reversa (RP-HPLC)	66
3.12.1.1. Comparação dos tempos de retenção de diferentes prolactinas	66
3.12.1.2. Análise por RP-HPLC de diferentes formas de rec-hPRL obtida em células CHO	69
3.12.2. Análise por HPLC de exclusão molecular (HPSEC)	71
3.13. Determinação da atividade biológica “in vitro” de G-hPRL, NG-hPRL e tagPRL	72
4. DISCUSSÃO	74
5. CONCLUSÕES	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio proteico primariamente produzido pela hipófise anterior, mas também por outros órgãos e tecidos. É melhor conhecida pela sua capacidade em estimular a lactação e sua ação reguladora no crescimento e diferenciação da glândula mamaria (12, 14), mas um amplo espectro de atividades biológicas tem sido atribuído a esse hormônio. Há relatos de mais de 100 diferentes funções em vertebrados (7, 8, 79), incluindo a regulação da reprodução e lactação, a osmorregulação (14), a modificação do comportamento, o crescimento e maturação de oócitos (34) e a regulação do sistema imunológico (88; 98). Ao nível celular a PRL pode exercer atividades mitogênica, morfogênica ou secretória (4).

A prolactina junto com o hormônio de crescimento (GH) e o hormônio lactogênio placentário (PL) pertencem a uma família de hormônios derivados de um gene ancestral que sofreu uma duplicação gênica, possivelmente 500 milhões de anos atrás (79). O gene que a codifica está localizado no cromossomo 6, é composto de cinco exons e quatro introns e possui um comprimento médio de 10kb. O cDNA da prolactina humana (hPRL) contém 681 nucleotídeos codificando um pré-hormônio de 227 aminoácidos (aa), incluído seu peptídeo sinalizador de 28 aa.

Até recentemente a hPRL madura foi considerada formada por uma simples cadeia proteica de 23kDa, composta por 199 aa, incluídas 6 cisteínas responsáveis por três pontes dissulfeto intra-moleculares (4-11, 58-174, e 191-199). Na última década porém foi mostrado que a hPRL possui um significativo polimorfismo molecular, resultado de modificações pré e pós-traducionais. As variantes estruturais da prolactina e seus respectivos significados fisiológicos foram recentemente revisados (79). Estas modificações incluem glicosilação, fosforilação, dimerização e processos proteolíticos específicos, promovendo alterações no tamanho molecular bem como na carga.

As duas formas predominantes são a glicosilada (G-hPRL) e a não glicosilada (NG-hPRL). Na hipófise existe uma porcentagem variável da forma glicosilada num intervalo de 13 a 25%, próxima àquela encontrada no plasma humano (30, 79). O significado biológico dessas formas na circulação não está clara, entretanto diferentes proporções entre elas foram demonstradas durante a gravidez, lactação e estados de hiperprolactemia. Além disso, diferentes proporções podem também ser associadas a diferentes patologias (67). Algumas isoformas de PRL apresentam ações biológicas absolutamente inesperadas, como por exemplo, a inibição da proliferação de células do endotélio capilar na angiogênese por parte da isoforma 16kDa (11). Provavelmente essa heterogeneidade da PRL pode estar relacionada com suas diferentes funções (8, 10). Parece que muitas das ações estabelecidas no passado para a hPRL são resultado dos efeitos combinados da forma fundamental do hormônio e de suas variantes.

A dificuldade de obtenção destas formas purificadas tem impedido progressos para delinear diferenças funcionais entre essas moléculas, assim como para compreender a regulação da expressão gênica da hPRL. A produção e separação dessas formas, com um nível de pureza satisfatório, pode portanto ajudar a esclarecer muitos mecanismos ainda pouco conhecidos. Destaca-se assim a importância de desenvolver adequados procedimentos para isolar e purificar preparações homogêneas de hPRL e de suas isoformas permitindo assim avaliar a ação deste hormônio em geral e a relação estrutura-função em particular.

Com relação ao aspecto clínico, algumas disfunções associadas a hPRL são bem documentadas. Altos níveis de hPRL no soro, por exemplo, podem ser associados com galactorréia, anovulação com amenorréia, hipoestrogenismo e infertilidade na mulher (6, 53) e com impotência e incompetência na ejaculação no homem (59). Essas e outras desordens associadas a níveis anormais de hPRL no sangue periférico fazem desse hormônio um dos mais freqüentemente determinados na rotina de ensaios diagnósticos.

A hPRL apresenta ainda envolvimento clínico relativos a outras enfermidades que precisam ser melhor esclarecidos. Podemos citar como exemplos o câncer de mama (87), artrite reumatóide, fibrose cística e câncer colo-retal (4).

Embora aplicações terapêuticas da hPRL ainda não tenham sido estabelecidas, recentes estudos indicam sua possível utilização no tratamento de mulheres com deficiência na lactação associada com isquemia hipofisária temporária (89, 96) e na restauração das características normais do esperma em homens inférteis por hipoprolactinemia (84). Estudos recentes mostram que a forma de 16KDa de hPRL apresenta substancial capacidade de inibir a angiogênese potencializando sua aplicação terapêutica no tratamento do câncer, por inibição da vascularização e por consequência o do desenvolvimento de tumores em geral (11, 16, 17) e do câncer de mama em particular (22).

A administração de hPRL também parece ser potencialmente útil para tratamento de infecções e da imunodepressão. Recentemente, experimentos em camundongos mostraram que a PRL apresenta um efeito protetor contra infecções patógeno-induzidas (50) e pode restaurar a imunossupressão induzida por choque hemorrágico, sem efeitos hemodinâmicos adversos (99). Em outro estudo, realizado utilizando experimentos "in vivo" com azidotimidina (AZT), os autores sugerem que esse hormônio é clinicamente útil na reversão da supressão da medula induzida por AZT ou por outra terapia mielo-ablativa (93). Em outro trabalho, esse mesmo grupo avalia o potencial uso clínico de hormônios neuroendócrinos (hormônio de crescimento e prolactina) após transplante de medula óssea (92). Estudos "in vitro" recentes têm mostrado também que a hPRL recombinante (rec-hPRL) pode reverter efeitos anti-proliferativos do fator beta transformador de crescimento (TGF- β) que, quando produzido em excesso em doenças como AIDS e câncer, pode gerar uma supressão na resposta imunológica. Isto sugere a possível utilização da rec-hPRL como agente imunoterápico na infecção por HIV (70). Em consequência de tudo quanto exposto acima, um importante aumento na demanda de rec-hPRL pode ser previsto.

Quanto ao aspecto econômico ressaltamos que a hPRL comercializada no momento, obtida a partir de hipófises humanas, é um dos hormônios mais caros existentes no mercado, podendo alcançar preços de até US\$ 30 por micrograma (Sigma, cat. N. L7009).

A Indústria Farmacêutica Genzyme é a única empresa que já desenvolveu um processo para a obtenção de rec-hPRL. Parte de suas pesquisas estão direcionadas para o uso desse hormônio como imunoestimulante, com potencial indicação clínica na recuperação imunológico-hematopoética de pacientes mielossuprimidos e imunocomprometidos, outra possibilidade sendo sua utilização como adjuvante de vacina (internet, <http://www.genzyme.com>).

A prolactina humana tem sido extraída e purificada com rendimentos muito baixos e após exaustivos procedimentos a partir de hipófises (73). Técnicas de DNA recombinante são importantes alternativas e elas têm sido usadas especialmente a partir de bactérias (*E. coli*) transformadas, levando à obtenção de rec-hPRL citoplásmica (64). Além do fato dos sistemas de expressão procarióticos não produzirem proteínas glicosiladas, é bem conhecido que a solubilização e renaturação de corpos de inclusão citoplásmicos, formados por metionil derivados da proteína de interesse, normalmente proporciona baixos rendimentos, além de proteínas agregadas e alteradas. Outros trabalhos levaram à produção de proteínas quiméricas citoplásmicas contendo toda a seqüência de aminoácidos da hPRL seguida da β -galactosidase (21) ou com uma porção da proteína A ligada na extremidade N-terminal (29). Para chegar à obtenção de hPRL autêntica, pesquisas realizadas em nosso laboratório foram direcionadas à produção de rec-hPRL com secreção no espaço periplásmico da bactéria *E. coli*. Um primeiro produto foi uma forma bioativa compreendendo um peptídeo N-terminal denominado tagPRL e cuja estrutura é: Ala-Ser-(His)₆-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL (55). Mais recentemente, foi também obtida a forma autêntica de prolactina recombinante, sempre mediante secreção periplásmica, porém com níveis de expressão relativamente baixos (56).

A síntese de hPRL em células eucarióticas e mais especificamente em células de mamífero é também interessante. Além destas células constituírem um sistema com um alto potencial de secreção, o produto obtido é similar à prolactina humana hipofisária, apresentando também a forma glicosilada e possivelmente outras modificações pós-traducionais. Essas características são fundamentais para estudos fisiológicos, visando possíveis aplicações clínicas e terapêuticas. Somente dois grupos obtiveram a expressão de hPRL em células de mamíferos: Hirooka e cols. (30) e Price e cols. (67). Os primeiros transfectaram três diferentes linhagens celulares (COS-1, GH3 e CHO), comparando a cinética de secreção de G-hPRL e NG-hPRL, porém não estudando níveis de expressão ou rendimentos de purificação, enquanto que Price e cols. obtiveram 97% de produto puro a partir da linhagem murina C127. Todas essas linhagens celulares, entretanto, conforme dados da literatura, produzem glicoproteínas recombinantes nas quais a estrutura dos carboidratos é relativamente diferente daquela natural. A presença de cadeias de carboidratos diferentes é crítica nas aplicações clínicas, principalmente com relação à resposta antigênica que pode secundariamente se direcionar contra a molécula nativa (1, 62, 86). A demonstração de ausência de anticorpo, após uma administração crônica de eritropoetina derivada de CHO (23, 81), é um fato importante a favor da utilização dessas células.

A supervisão de Radioensaio do Departamento de Bioengenharia do IPEN/CNEN-SP durante os últimos anos tem direcionado parte do seu trabalho no desenvolvimento e obtenção de hormônios hipofisários utilizando técnicas de engenharia genética (2, 3, 15, 55, 56, 61, 69). Entre esses hormônios o primeiro a ser obtido foi o hormônio de crescimento humano (hGH). Além do hGH outros hormônios como prolactina (hPRL), tireotrofina (hTSH), hormônio folículo estimulante (hFSH) e hormônio luteotrófico (hLH) também estão sendo desenvolvidos.

No caso específico da prolactina, estudos estão em andamento tanto no sentido de melhorar a expressão em bactérias como no desenvolvimento de sistemas de expressão utilizando células de mamíferos, enfoque principal desse trabalho.

O sistema de expressão escolhido neste trabalho utiliza células CHO que, por apresentarem uma série de vantagens, se tornaram a linhagem celular de primeira escolha na síntese de glicoproteínas humanas para uso clínico. Estas células, cujos produtos apresentam uma comprovada similaridade com os equivalentes naturais (23, 36, 44, 74, 100), podem proporcionar níveis de produção considerados elevados, acima de 10 e até 110 $\mu\text{g}/10^6$ células/dia (18, 28, 32, 35, 40, 48, 51, 58, 60, 62, 63, 66, 90, 91). As células CHO também apresentam a vantagem de se adaptarem bem à ausência de soro e de poderem crescer tanto aderidas à superfície como em suspensão (19, 38).

O nível de expressão de genes eucarióticos introduzidos em células animais depende de vários fatores como 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 em si (39, 51).

Altos níveis de expressão da proteína de interesse podem ser obtidos mediante seleção e posterior amplificação do DNA transfetado. Estudos extensivos sobre o mecanismo de amplificação gênica mostraram que este apresenta a propriedade de amplificar genes exógenos transfetados juntamente com um determinado marcador (75). A amplificação gênica ocorre mais freqüentemente após seleção através de etapas com incrementos graduais na concentração de um agente seletivo, o uso de uma única etapa possibilita a obtenção da resistência através de outro mecanismo. O gene amplificado poderá ser mantido ou perdido durante a propagação na ausência deste agente. Freqüentemente, quando as células são recém selecionadas, os genes são instáveis e com o maior tempo de exposição à droga, devido à contínua seleção, a amplificação dos genes se torna estável. A amplificação dos genes de forma instável está freqüentemente associada com pequenos elementos extracromossomais identificados como "double minute chromosomes", os quais não possuem centrômero e em conseqüência apresentam, durante a mitose, uma segregação aleatória e desigual, o que possibilita a sua perda. Genes amplificados de forma estável são geralmente integrados ao cromossoma do hospedeiro e são freqüentemente associados com a expansão de regiões do

cromossoma chamadas "regiões homogeneamente coradas". O tamanho e estrutura da unidade amplificada pode ser variável e pode mudar com o tempo durante a propagação em cultura (5, 36, 39).

Um sistema de expressão muito conhecido é aquele que utiliza células CHO-dhfr e o gene dhfr de camundongo como marcador de seleção (51), sendo também o adotado na nossa estratégia de seleção. A enzima diidrofolato redutase (dhfr) catalisa a conversão do folato para tetraidrofolato (FH 4). O FH 4 é necessário para biossíntese das purinas. O metotrexato (MTX) é um análogo do ácido fólico, o qual se liga e inibe a dhfr, levando à morte celular. Quando as células são selecionadas por aumentos graduais na concentração de MTX, a célula para sobreviver tem de aumentar a síntese de dhfr. Em consequência temos também o aumento da expressão da proteína de interesse quando o gene que a codifica se encontra na mesma região ("locus") do cromossoma, resultando na amplificação gênica desejada. Frequentemente, o grau de amplificação gênica é diretamente proporcional ao nível de expressão de dhfr. Células altamente resistentes podem conter níveis de dhfr milhares de vezes mais elevados.

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 que são deficientes em dhfr (85). Essas células deficientes para sobreviverem requerem timidina, glicina e hipoxantina. Na ausência desses nucleosídeos é necessário que tenham adquirido um gene dhfr funcional para poderem crescer. As linhagens dhfr mais utilizadas são o DG44 e o DUKX-B11 (DXB11), essa última utilizada no presente trabalho.

Três diferentes vetores de expressão para células eucarióticas, baseados no mesmo gene de seleção (dhfr), serão utilizados para transfectar células CHO dhfr com o objetivo de isolar linhagens de células estáveis capazes de secretar altos níveis de hPRL. Um deles é baseado no vetor de expressão dicistrônico pEDdc, no qual o mesmo mRNA expressa duas proteínas. Nesse vetor a proteína de interesse está na posição 5' e o gene de seleção/amplificação na posição 3' (37). Sua vantagem em relação a outros vetores de expressão dicistrônicos da geração anterior é a utilização de um sítio ribossomal interno, isolado do vírus da

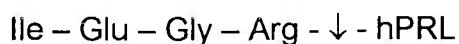
encefalomiocardite (EMC). A inserção dessa seqüência líder do vírus da EMC, antes do gene dhfr, torna a tradução dessa enzima mais eficiente e menos dependente da seqüência codificadora localizada "upstream", correspondente ao gene de interesse, o que não ocorre nos outros vetores dicistrônicos. Esta construção possibilita portanto a rápida e eficiente obtenção de altos níveis de expressão, após seleção e amplificação com MTX, diminuindo enormemente a possibilidade de deleção do gene de interesse.

Os outros dois sistemas de expressão são baseados no vetor p658 (51). Este compreende um sistema no qual é possível o isolamento de células altamente produtivas utilizando uma única etapa de amplificação. Este sistema é baseado na seleção do gene de interesse em combinação com o enfraquecimento do mRNA do gene de seleção (dhfr). Isto aumenta a pressão de seleção, possibilitando a eliminação das várias etapas de amplificação. A expressão do gene de interesse é reforçada pela presença do transativador viral do vírus X da hepatite B (HBV-X), inserido antes do promotor SV40 (p SV40). O enfraquecimento do gene de seleção ocorre pela inserção, logo após o gene do dhfr, da seqüência rica em A + T derivada da região 3' não traduzida do fator estimulador de formação de colônias de macrófago-granulócito (GM-CSF UTR), que deixa o mRNA instável. A diferença entre esses dois vetores derivados do p658 é que um contém o cDNA da hPRL enquanto o outro o cDNA da tagPRL.

Nos três casos descritos o peptídeo sinalizador é composto por 28 aminoácidos, o mesmo da prolactina humana.

Como já mencionado anteriormente, a tagPRL é uma prolactina que apresenta 12 aminoácidos a mais na sua porção N-terminal. Essa proteína de fusão apresenta a vantagem de ser facilmente purificada devido sua maior afinidade à resina Ni-NTA-agarose. A alta afinidade é devida à especificidade da interação entre os resíduos de histidina e os íons de níquel (Ni^{++}) presos à resina de NTA (ácido nitrilotriacético). A resina NTA ocupa 4 dos 6 sítios de ligação na esfera de coordenação do íon Ni^{++} , deixando 2 sítios livres para interagir com as histidinas da "tag". Uma outra característica dessa construção é a presença de um sítio de clivagem para o fator de

coagulação Xa, uma protease que reconhece, com um alto grau de especificidade, a seqüência de aminoácidos:



A clivagem dessa seqüência ativa o substrato natural protrombina para trombina. Entretanto, no nosso caso, essa clivagem geraria a prolactina humana autêntica. Uma construção similar, utilizada porém em bactérias, é descrita por Morganti e cols. (55). Nesse caso a digestão com o fator Xa foi parcial, provavelmente devido a um impedimento estérico.

1.2. Objetivos do trabalho

Pretendemos desenvolver a construção de vetores de expressão eficientes que permitam a rápida obtenção de linhagens de células de mamífero (CHO) geneticamente modificadas capazes de secretar altos níveis de rec-hPRL, realizando um estudo comparativo entre mecanismos diferentes de expressão. Ressaltamos que a produção de hPRL em células (CHO) ainda não foi descrita.

Após transfecção de células CHO dhfr-, seleção e amplificação do gene de interesse, os melhores clones foram escolhidos para viabilizar uma produção em escala laboratorial utilizando placas de cultura e em biorreatores do tipo "hollow fiber" (41, 42, 43, 97).

Determinar a proporção da G-hPRL e NG-hPRL secretadas no meio de cultura e desenvolver um processo de purificação capaz de separar cada uma dessas duas isoformas.

Realizar a caracterização físico-química e biológica das isoformas obtidas. Para isso foram padronizadas técnicas de HPLC em fase reversa (15) e determinação de bioatividade "in vitro", em células de linfoma de rato, Nb2 (82).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1. Equipamentos e acessórios principais

- Agitador/incubador "series 25", New Brunswick Scientific CO, Edison, NJ, EUA;
- Agitador magnético modelo 258, Fanem, São Paulo, Brasil;
- Agitador rotatório tipo Vortex, Modelo 162, Marconi, São Paulo, Brasil;
- Aparelho Accu-Check III para dosagem de glicose, Boeringher, Mannheim, Alemanha;
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10A, acoplado a um detetor de UV SPD-10AV e a um programa de computador Class VP, Shimadzu, MD, EUA;
- Aparelho Milli-Q-plus, purificador de água, Millipore, Bedford, MA, EUA;
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar São Paulo, Brasil;
- Balança analítica, modelo H20T, com precisão de 0,01 mg, Mettler, Zurique, Suíça;
- Banho-maria, modelo 112, Fanem, São Paulo, Brasil;
- Biorreator tipo "hollow fiber", modelo Cellmax-Quad, Spectrum, Laguna Hills, CA, EUA;
- Bomba peristáltica modelo P-1, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia;
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, Sorvall, Newtown, Connecticut, EUA;
- Coletor de frações, modelo FRAC-200, Pharmacia, Uppsala, Suécia;
- Coluna de exclusão molecular TSK G2000 SW (60cm x 7,5mm D.I.), diâmetro dos poros de 125 Å e diâmetro das partículas de 10 µm e pré-coluna SW (7,5 cm x 7,5 mm D.I.), Tosohaas, Montgomeryville, PA, EUA;
- Coluna C4 Vydac 214 TP 54 (25 cm x 4,6 mm ID), diâmetro dos poros de 300 Å e diâmetro das partículas de 5 µm e pré-coluna 214 FSK54 (1,0 cm x 4,6 mm D.I.), Vydac, Hesperia, EUA;

- Colunas cromatográficas XK 26/70 (70 cm x 2,6 cm D.I.), XK 26/40 (40 cm x 2,6 cm D.I.), XK 16/40 (40 cm x 2,6 cm D.I.), Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia;
- Contador gama tipo “poço”, modelo Cobra auto-gamma, com troca automática de amostra, cuja eficiência aproximada para ^{125}I é de 80%, Packard Instrument Company, Illinois, EUA;
- Densitômetro modelo CS-9301 da Shimadzu, MD, EUA;
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil;
- Espectrofotômetro, modelo PMQ II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha;
- Estufa de cultura de células, modelo 3159, Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA;
- Fluxo laminar classe II A/B3, modelo 1140, Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA
- Fonte de alta tensão modelo ECPS 3000/150, Pharmacia, Uppsala, Suécia;
- Freezer -80 °C, modelo 8425, Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA;
- Medidor digital de pH, modelo 420 A, Orion, Boston, MA, EUA;
- Micro-centrífuga, modelo 5415 C, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha;
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha;
- Pré-coluna SW (7,5 cm x 7,5 mm), Tosohaas, Montgomeryville, PA, EUA;
- Pré-coluna FSK 54, Vydac, Hesperia, CA, EUA;
- Refrigerador para cromatografia com duas portas de vidro, modelo 2201 combicoldrac II, LKB, Bromma, Suécia;
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Locator Jr., Thermolyne, Dubuque, IA, EUA;
- Sistema de eletroforese vertical modelo 220, Bio-Rad, Ca, EUA;
- Termociclador para realização da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction): Thermal Reactor – Hybaid, Londres, Inglaterra;

2.1.2. Linhagens de células

- células CHO (linhagem tumoral de ovário de hamster chinês) mutantes DXB-11 (85), gentilmente doadas pelo Dr. L. Chasin (Columbia University, NY, EUA), são deficientes do gene da enzima diidrofolato redutase (dhfr-) que está presente nos

vetores pEDdc e p658, proporcionando assim um mecanismo de seleção e amplificação gênica das células transformadas;

- células de linfoma de rato Nb2, gentilmente doadas pelo Dr. P. Gout (British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Canadá). A proliferação dessas células depende de hormônios lactogênicos, como a prolactina, que atuam como fator de crescimento. Sua resposta mitogênica na presença desses hormônios é mediada por receptores específicos de superfície, sendo utilizadas no bioensaio de prolactina.

2.1.3. Resinas cromatográficas

- SP-Sepharose Fast Flow (SP-FF), Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia;
- Sephacryl S-100 high resolution, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia;
- Sephadex G-100 e G-150, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia;
- SP-Sepharose High Performance, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia;
- Resina Ni-NTA, Qiagen, Chatsworth, CA, EUA.

2.1.4. Padrões, antissoros e outros reagentes para imunoenaios

- 3º Padrão Internacional de Prolactina Humana (WHO 84/500), contendo 2,5 µg (53 mUI) de hPRL por ampola, usado como padrão de referência;
- NIDDK-hPRL – RP - I (AFP – 2312C), padrão de hPRL para RIE, gentilmente fornecido pelo “National Hormone and Pituitary Program”, NIDDK, Rockville, MD, EUA;
- hPRL-R (atividade imunológica, 26,4 UI/mg), preparação altamente purificada de hPRL utilizada para radiodação fornecida pelo Dr. A. Bulatov, National Research Center for Endocrinology, Moscou, Russia;
- Preparação interna de referência de G-hPRL, produzida em células CHO, purificada no IPEN-CNEN/SP a partir de meio de cultura obtido em placas, analisada por SDS-PAGE e western blotting (WB).

- Segundo anticorpo anti-IgG de coelho preparado em carneiro, IPEN-CNEN/SP.
- Soro de coelho normal, IPEN-CNEN/SP.
- Antissoro anti-prolactina humana produzido em coelho do NIDDK-NIH, lote AFP C11580, Bethesda, MD, EUA.
- Controles de qualidade para imunoensaio baseados em sangue humano (Dade Tri-level), Baxter Diagnostic, Deerfield, IL, EUA;

2.1.5. Reagentes principais

2.1.5.1. Reagentes utilizados na cultura celular

- Anfotericina B, Fungizone ®, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Anti-PPLO Agent (100 x), Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Bicarbonato de sódio, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Cloreto de cálcio, Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- Cloroquina, Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- DEAE-dextran, Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- Dimetilssulfóxido (DMSO), Merck, São Paulo;
- Gentamicina, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Glicose p.a., Merck, São Paulo;
- HEPES, Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- Penicilina-estreptomicina, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Meio de Fisher, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Meio CHO-S-SFM II, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Meio mínimo essencial sem a presença de nucleosídeos (α MEM), Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- 2-Mercaptoetanol, Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- Metotrexato (MTX), Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- Soro de cavalo castrado, gentilmente doado pelo Dr. P. Gout (British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Canada);

- Soro fetal bovino (SFB), Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Soro fetal bovino dialisado (SFBd), Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Tripsina, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;

2.1.5.2. Outros reagentes

- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA;
- Agarose, Gibco –BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Albumina de soro bovino (BSA), RIA grade (fração V), Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- Ágar purificado para bacteriologia, Merck, São Paulo, Brasil;
- Ampicilina, Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- Bicarbonato de amônio, p.a., Riedel-de Haen, Seelze, Alemanha;
- Extrato de levedura, Difco, Detroit, MI, EUA;
- Na¹²⁵I, livre de carreadores e oxidantes, fornecido pela Nordion Europe S. A. (Fleurus, Bélgica), com atividade específica de 11100-22200 MBq/mL (300-600 mCi/mL);
- N-propanol, grau HPLC, Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA;
- Pepstatina A, Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- Proteína A, Pharmacia, Uppsala, Suécia;
- TEMED, Sigma, St Louis, MO, EUA;
- Triptona, Difco, Detroit, MI, EUA;
- Os demais reagentes utilizados nos experimentos foram grau p.a.

2.1.6. Diversos

- Cilindro de CO₂, tipo 2,8, White Martins, São Paulo, Brasil;
- Enzimas de restrição e de modificação da Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA), da Pharmacia (Uppsala, Suécia) ou da New England Biolabs (Beverly, MA, EUA);

- Filmes de raios-X Kodac X-OMAT (Kodac, St. Louis, MO, EUA) para autoradiografias do WB;
- Fitas Haemo-glukotest, Boeringher, Mannheim, Alemanha;
- Material plástico estéril para cultura celular, Corning Costar Corp., Cambridge, MA, EUA, e Nalgene Company, Rochester, NY, EUA;
- Membranas de filtração de 0,22 μm , Millipore, Bedford, MA, EUA;
- Membrana de nitrocelulose (Hybond-C), 0,45 Micron, RPN303C, Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra;
- Membrana de PVDF, 0,2 micron, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA;
- Oligonucleotídeos, fornecidos pela Sanofi Recherche, Toulouse, França:
 - a) 5'- TTGGAGGATCCTTATTAGCAGTTGTTGTTGTGGA -3' (34-MERO), "antisense", correspondente à porção C-terminal da hPRL e sítio Bam HI.
 - b) 5'- CAACCAAGCTTGCCACCATGAACATCAAAGGATCGCC -3' (37-MERO), "sense", correspondente ao sítio Hind III, ATG e início do peptídeo sinalizador natural da hPRL.
 - c) 5'- ACCTACCAGAGCGTGGCCCCGCTAGTCATCACCATCACCA -3' (41-MERO), "sense" correspondente ao sítio PflM I e primeiros aminoácidos da tag-hPRL.
 - d) 5'- ATCCTGGAATGAGCCTCTG -3' (19-MERO), utilizado no seqüenciamento do DNA da hPRL e tag-hPRL obtidos por PCR.
- Kit para extração de DNA em larga escala, "Qiagen Plasmid Maxi", Qiagen, Hilden, Alemanha;
- Kit para extração de DNA em pequena escala, "Wizard Minipreps DNA", Promega, Madison, WI, EUA;
- Kit para purificação de DNA, QIAquick, Qiagen, Hilden, Alemanha;
- Kit para dosagem de lactato, "Lactate Reagent", Sigma, St. Louis, MO, EUA;
- Tubos de poliestireno para imunoenensaio (7,5 x 1,2 cm), Emtel, São Paulo;
- Tubos eppendorf, Hamburgo, Alemanha;

2.2. Métodos

2.2.1. Reação de PCR

A reação de PCR seguiu o protocolo abaixo. Depois da reação os fragmentos foram digeridos para se obter as duas extremidades coesivas desejadas, para em seguida serem purificados.

Reagentes	Volume (quantidade)
Matriz (plasmídeo ou seqüência)	1 μ L (100-300 ng)
oligo "sense"	1 μ L (100 ng)
oligo "antisense"	1 μ L (100 ng)
* tampão BIP V2 (10 x)	5 μ L
H ₂ O destilada e deionizada	42 μ L
Enzima TAQ polimerase	0,5 μ L (5u/ μ L)

* Tampão BIP V2:

Tris 1 M pH 8,8	3,35 mL
Sulfato de amônio.....	109,5 mg
β -Mercaptoetanol	3,5 μ L
Gelatina	10 mg
Triton X-100	75 μ L
EDTA 500 mM	0,68 μ L
MgCl ₂ 1M	100 μ L
dATP 100 mM	100 μ L
dCTP 100 mM	100 μ L
dGTP 100 mM	100 μ L
dTTP 100 mM	100 μ L
Água (deionizada)..... qsp.....	5 mL

Centrifugar após uma rápida agitação e submeter aos ciclos de polimerização como se segue:

15 ciclos

Temperatura	tempo de duração
Denaturação 94 °C	1 minuto
* Hibridização X °C	1 minuto
Polimerização 72 °C	1 minuto

* X = T_m mais baixo menos 5 °C (Máximo = 70 °C)

O T_m é calculado para cada oligonucleotídeo pela seguinte fórmula:

$T_m = (GC \times 4) + (AT \times 2)$, onde:

GC = número de Guaninas + número de Citosinas

AT = número de Adenosinas + número de Timidinas

Observação: no cálculo do T_m são considerados somente as bases que hibridizam.

2.2.2. Isolamento e purificação dos fragmentos de DNA

Após digestão do DNA com enzimas de restrição específicas, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%. A visualização das bandas de DNA foi realizada mediante revelação com brometo de etídio por exposição à luz ultra-violeta.

Para realizar a purificação do fragmento de DNA, a região do gel contendo a banda de interesse foi recortada e o DNA presente extraído e purificado utilizando o Kit QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemanha).

2.2.3. Transformação e extração do DNA das bactérias

Os fragmentos de DNA purificados foram submetidos à reação de ligase: 100 ng de DNA total, 1 μ L da enzima DNA ligase, 2 μ L do tampão 5x (fornecido junto com a enzima), H₂O para completar o volume de 10 μ L e incubação “overnight” a 4 °C. Em seguida células competentes, (*E.coli*, cepa DH5 α) foram transformadas pelo método do cloreto de cálcio (49). Por esse método a introdução do DNA na bactéria é realizada por choque térmico. As bactérias transformadas foram semeadas em placas de LB-Amp (extrato de levedura 0,5%, bacto-triptona 1% e NaCl 1%, ampicilina 100 μ g/mL) com 1,5% de agar. Após incubação “overnight” em estufas a 37 °C algumas das colônias obtidas foram semeadas em meio LB-Amp e incubadas “overnight” a 37 °C com agitação rotacional. O DNA plasmídico das bactérias transformadas foi extraído e purificado utilizando o sistema comercial Wizard Minipreps DNA que usa mini-colunas de afinidade após lise alcalina das bactérias.

Os plasmídios obtidos foram submetidos a análise de restrição e os clones aprovados foram utilizados para produção de plasmídio em larga escala.

2.2.4. Preparação de plasmídios em larga escala

As cepas transformadas e aprovadas na análise de restrição foram utilizadas na produção do DNA em larga escala. Um inóculo com 50 mL de meio LB-Amp foi incubado por aproximadamente 8 h, em agitador rotacional (200 RPM), a 37 °C. Em seguida 25 mL do inóculo foram transferidos para 1 frasco com 250 mL de LB-Amp, seguindo outra incubação nas mesmas condições por aproximadamente 16 h. O plasmídio foi extraído e purificado com o uso do Kit QIAGEN 500, que utiliza mini-colunas de afinidade após lise alcalina das bactérias.

2.2.5. Meios utilizados para cultura de células

2.2.5.1. Meio de cultura (MEM 5% SFB)

- 400 mL MEM (meio mínimo essencial)
- 4 mL "anti-PPLÒ agent" (anti-micoplasma)
- 0,8 mL Gentamicina 10 mg/mL
- 20 mL de soro fetal bovino (SFB)

2.2.5.2. Meio de seleção (α - MEM 10% SFBd)

- 900 mL de meio α -MEM (sem a presença de nucleosídeos)
- 100 mL de soro fetal bovino dialisado (SFBd)
- 2,0 mL de gentamicina 10 mg/mL (Gibco-BRL)
- 0,5 mL de penicilina (10.000 UI/ mL) e estreptomicina (10.000 μ g/ mL)

2.2.6. Cultura de células CHO dhfr-

As células CHO foram cultivadas em meio de cultura (MEM, 5% SFB), a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Para a subcultura, as células foram repassadas duas vezes por semana, diluindo 1:10. Para desprender as células aderidas (tripsinização) primeiro lavam-se as células com 5 mL de 0,1 g/L de tripsina em solução fosfato-salina com 0,2% EDTA, a seguir as células são incubadas por 5 min em cerca de 0,5 mL dessa mesma solução e por fim ressuspensas em 10 mL de meio de cultura.

2.2.7. Transfecção

Foram utilizadas duas técnicas: primeiro foi realizada uma transfecção transiente usando DEAE-dextran (80) para uma comparação inicial das diferentes construções; depois foi feita a transfecção permanente baseada no método do fosfato de cálcio (24).

2.2.7.1. Transfecção transiente pelo método do DEAE-dextran

A transfecção transiente pelo método DEAE-dextran (80) foi realizada em células CHO DXB11, as quais foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (3×10^5 células/poço) no dia anterior à transfecção. Em cada poço foram preparados 0,9 mL de meio de cultura sem soro, 6 μ g de DNA do vetor de interesse, 0,1 mL de DEAE-dextran 10 mg/mL e 1 μ L de cloroquina 100 μ M.

O meio de cultura foi aspirado e as células lavadas uma vez com tampão fosfato salina (PBS). Adicionou-se 1 mL da mistura DEAE-dextran/DNA por poço e incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. Os poços foram lavados duas vezes com PBS e incubados por 3 dias em meio de cultura com 2% SFB. Em seguida, os meios de cada poço foram coletados para determinação da eficiência de expressão de prolactina.

2.2.7.2. Transfecção estável pelo método do fosfato de cálcio

As células CHO DBX11 foram semeadas em placas de cultura de 10 cm (10^6 células/placa) no dia anterior à transfecção a ser realizada pelo método do fosfato de cálcio (24). Em cada placa foram aplicados 2 mL de tampão HEPES pH 7,05, 20-24 μ g do DNA de interesse e 100 μ l de cloreto de cálcio 2,5 M.

A reação foi realizada em tubo cônico de 15 mL e a solução de cloreto de cálcio foi adicionada gota a gota sob agitação. A mistura foi incubada a temperatura

ambiente por 30 minutos, permitindo a formação dos microprecipitados de fosfato de cálcio/DNA. Em seguida foi distribuída sobre as células. Após incubação por 5-6 h a 37 °C na estufa de CO₂, o meio foi aspirado e substituído pelo meio de cultura com 2% SFB e as células foram incubadas por 2 dias, antes do início da seleção.

2.2.8. Seleção dos clones

A seleção dos transformantes dhfr⁺ foi realizada em meio seletivo α -MEM com ausência de nucleosídeos suplementado com 10% de SFBd. Dois dias após a transfecção, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em meio seletivo e distribuídas em placas de 10 cm de diâmetro (10 mL com 5×10^5 células, por placa). As placas foram incubadas na estufa a 37 °C com 5% de CO₂, mudando o meio duas vezes por semana e observando o desenvolvimento das colônias. As colônias positivas foram isoladas após 10-15 dias de incubação utilizando-se cilindros de clonagem e as células foram propagadas em placas de 6 poços até atingir a confluência. As células foram transferidas respectivamente para placas de 6 e 10 cm de diâmetro visando a obtenção de um número suficiente para amplificação (5×10^5 células).

Para avaliar a produção de cada clone as células foram tripsinizadas, contadas e diluídas em meio seletivo (1×10^5 células/ mL) e distribuídas em placas de 6 poços, utilizando 2 amostras para cada clone. Após 3 dias o sobrenadante foi coletado para dosagem da prolactina.

2.2.9. Amplificação com metotrexato (MTX)

Para seguir com a amplificação foram escolhidos os clones que apresentaram maior produção da proteína de interesse. A amplificação consiste basicamente em selecionar clones através do aumento progressivo da concentração de MTX no meio (20 nM, 50 nM, 100 nM e 200 nM) (38, 91). Após cada etapa, que leva em média de

15 a 20 dias, foi determinada a produção de prolactina. A amplificação termina quando não ocorre mais aumento significativo da expressão com aumento de MTX.

2.2.10. Dosagem de prolactina

A dosagem da prolactina inicialmente foi realizada utilizando um kit para ensaio imunorradiométrico (IRMA): "Prolactin-immunoradiometric Assay" (Immunotech, Marselha, França). Os estudos de expressão e o acompanhamento da purificação foram realizados por radioimunoensaio (RIE) em fase líquida, com duplo anticorpo, padronizado em nosso próprio laboratório conforme descrito por Morganti e cols. (56). Controles de qualidade baseados em soro humano (Dade ® Tri-level; Baxter Diagnostics Inc., Deerfield, IL, USA) foram utilizados para cada curva padrão.

2.2.11. Estudo da cinética de expressão

O estudo da cinética de expressão consiste basicamente em avaliar a quantidade de prolactina secretada no meio de cultura por célula por dia de incubação, após semear uma quantidade conhecida de células. Com esses resultados foi possível estimar de forma mais precisa a eficiência de expressão de cada clone em $\mu\text{g} / 10^6 \text{células/dia}$. Foram utilizados os protocolos descritos por Monaco e cols. (54) e por Miloux e cols. (51).

2.2.11.1. Determinação da eficiência de expressão de acordo com Monaco e colaboradores

As células em exame foram diluídas até uma concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL e 1 mL desta suspensão foi semeado em duplicata em placas de 24 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado e as células foram novamente

incubadas por 24 h, sendo em seguida o meio coletado para dosagem de hPRL e as células tripsinizadas e contadas para o cálculo da eficiência de expressão.

2.2.11.2. Determinação da eficiência de expressão de acordo com Miloux e colaboradores

O clone a ser analisado foi tripsinizado e 10 mL de meio de cultura, contendo 1×10^6 células, incubados em placas de 10 cm de diâmetro. Amostras do meio foram coletadas a cada dia por três dias consecutivos. A produção de prolactina foi estimada dividindo-se a quantidade total da prolactina presente pelo número de dias de incubação, o resultado sendo expresso em μg de hPRL/ 10^6 células/dia (51).

2.2.12. SDS-PAGE e Western Blotting (WB)

Foram realizadas análises qualitativas e semiquantitativas da prolactina produzida utilizando-se as técnicas de SDS-PAGE (45) e Western Blotting (WB) (9).

2.2.12.1. SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12 % (com 2 mm de espessura) na presença de 0,1 % de dodecil sulfato de sódio (45), sob condições redutoras e não redutoras. Durante a corrida eletroforética (4 a 5 horas) a intensidade de corrente foi de 20 mA. As proteínas presentes no gel foram fixadas utilizando uma solução de metanol a 40% e ácido acético glacial a 10%, mergulhando o gel nessa solução por pelo menos uma hora.

Preparação do gel de poliacrilamida 12% para corrida eletroforética:

SOLUÇÕES	GEL DE APLICAÇÃO volume (mL)	GEL DE SEPARAÇÃO volume (mL)
Acrilamida/Bisacrilamida*	1,40	8,00
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,50	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	5,00
SDS 20%	0,05	0,10
Água destilada	6,80	6,80
TEMED**	0,03	0,03
Persulfato de amônio 10%	0,10	0,10

*Solução com 30% de acrilamida e 0,8 % de bisacrilamida em água.

**TEMED = N, N, N', N' tetrametil etilenodiamina

2.2.12.1.1. Revelação do SDS-PAGE com "Coomassie Brilliant Blue R-250".

A revelação foi efetuada imergindo o gel fixado em uma solução com 0,25% de "Coomassie Blue R-250"; 45% metanol e 8% ácido acético, mantendo sob agitação por aproximadamente 8 horas. A seguir o gel foi descorado em uma solução com 40% metanol e 10% ácido acético glacial, sendo realizadas trocas sucessivas, até ser obtida a claridade desejada. O gel foi conservado em uma solução de 1% glicerol em água.

2.2.12.1.2. Revelação do SDS-PAGE com nitrato de prata

A técnica utilizada foi baseada naquela descrita por Wray e cols. (94). Após a fixação, o gel foi submetido a 3 ciclos de lavagem alternando-se água destilada e deionizada com 50% metanol, sob agitação e com duração de 5 a 10 minutos para cada lavagem. Após a última lavagem com água destilada e deionizada o gel foi incubado por 15 minutos sob agitação na solução de nitrato de prata (nitrato de prata 0,8%, NaOH 0,2 N e NH₄OH 0,2N) recém preparada. Ao final da incubação o gel foi lavado novamente duas vezes com água destilada e deionizada e em seguida mergulhado na solução reveladora (0,005% ácido cítrico, 0,05% formaldeído) recém

preparada. A partir desse momento a agitação passa a ser manual observando-se cuidadosamente as bandas que devem surgir gradativamente (6 a 8 minutos). Quando a intensidade desejada das bandas é atingida o gel é imediatamente mergulhado na solução fixadora para cessar a reação. Após a revelação, o gel é lavado 2 vezes ou mais com solução de 50% metanol, 10% ácido acético e conservado em solução com 40% metanol, 1% glicerol.

2.2.12.1.3. Densitometria

As leituras densitométricas foram realizadas em densitômetro modelo CS-9301 da Shimadzu.

2.2.12.2. Western Blotting (WB)

Para a realização do WB, seguiu-se basicamente a técnica de transferência semi-seca, utilizando o antissoro anti-prolactina humana produzido em coelho do NIDDK-NIH (Bethesda, MD, USA) lote AFP C11580, diluído 1:62500 (9, 20, 46, 83).

As amostras para serem analisadas no WB foram submetidas a SDS – PAGE, em seguida sendo realizada uma transferência semi-seca para uma membrana de nitrocelulose (22 μm). A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do seguinte modo: colocaram-se 7 folhas de papel de filtro 3MM pré-umedecido em tampão de transferência (0,3% glicina, 0,6% Tris-báse, 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 7 folhas de papel 3MM pré-umedecidas. A corrente foi fixada de acordo com a área do gel, sendo calculada da seguinte forma: corrente aplicada (mA) = área (cm^2) x 0,85. A transferência foi realizada em 1 hora.

Após a transferência, a membrana foi tratada por 10 minutos com tampão fosfato-salina (PBS) contendo 5 % de leite em pó desnatado e liofilizado (Molico, São Paulo, Brasil), sendo incubada por 18 h a temperatura ambiente (T_a) com 50 mL de

de antissoro diluído em PBS contendo 5 % de leite em pó. Após a incubação com o antissoro, foram realizadas 5 lavagens com PBS-5 % de leite. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com 50 mL de uma solução PBS-5 % de leite contendo 200.000 cpm/mL de proteína A (Pharmacia, Uppsala, Suécia) marcada com ^{125}I (^{125}I -Prot. A). Ao final dessa incubação, a membrana foi lavada com PBS contendo 0,01 % de Tween 20 por pelo menos 6 vezes. Na seqüência, foi deixada em Ta até secar, sendo posteriormente envolvida numa folha transparente de PVC, estando assim pronta para a autoradiografia. A exposição autoradiográfica, utilizando telas intensificadoras, foi realizada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, o tempo dependendo da intensidade da resposta desejada, da atividade específica da ^{125}I -Prot. A, da afinidade e título dos anticorpos e da riqueza em produto a ser analisado.

2.2.13. Produção em biorreator

O clone que apresentou melhor expressão foi escolhido para uma primeira produção laboratorial de hPRL recombinante. Essa produção foi realizada em um biorreator do tipo "hollow fiber" da marca Cellco, modelo CELLMAXTM QUAD (Spectrum, Laguna Hills, EUA). Esse sistema se baseia na cultura de células em cartuchos que utilizam capilares artificiais, por onde é bombeado continuamente o meio de cultura apropriado (meio intracapilar). Do espaço extracapilar, onde são cultivadas as células produtoras, coleta-se periodicamente o hormônio secretado por estas células (41, 42, 43, 97).

Os meios intracapilares utilizados foram α -MEM e CHO-S-SFM II, sendo este último um meio de cultura especialmente formulado para uso em biorreatores, com baixa quantidade de proteínas e sem soro. Isto propicia uma eficiente nutrição às células facilitando o processo de purificação. Esses meios foram suplementados com MTX (100 nM), penicilina (50 UI/mL), estreptomicina (50 $\mu\text{g/mL}$), gentamicina (40 $\mu\text{g/mL}$) e anfotericina B (0,25 $\mu\text{g/mL}$), além de glicose (4 mg/mL) no caso do α -MEM. Os frascos de 1 L de meio foram trocados em média a cada 7 dias, considerando-se que a concentração de glicose presente não deve atingir um valor inferior a 50% da

inicial. O consumo de glicose pelas células foi verificado com o aparelho Accu-Chek III e fitas Haemo-Glukotest.

O meio extracapilar utilizado foi α -MEM acrescido de 10 % SFBd, MTX (100 nM) e dos antibióticos citados acima, sendo que os ca 7 mL desse meio foram trocados a cada intervalo de 1-3 dias para a determinação da expressão de hPRL em $\mu\text{g/mL/dia}$. Quando a expressão se torna estável após atingir um valor máximo é iniciada a produção, utilizando meio extracapilar sem SFBd.

2.2.14. Dosagem de lactato

O ácido láctico é um sub-produto do metabolismo dos carboidratos. No nosso caso está relacionado principalmente com o consumo da glicose presente no meio de cultura.

A dosagem de lactato foi realizada por um ensaio enzimático colorimétrico baseado em um composto com absorção máxima no comprimento de onda de 540nm. Os reagentes foram fornecidos por um kit da Sigma denominado "Lactate Reagent", catálogo n^o: 735-10.

2.2.15. Dosagem de glicose

Para acompanhar o consumo de glicose pelas células foi utilizado o aparelho Accu-Chek III e fitas Haemo-Glukotest (20 - 800 R) da Boehringer Mannheim.

2.2.16. Purificação

A purificação da prolactina produzida em células CHO e a separação de suas principais isoformas, glicosilada (G-hPRL) e não glicosilada (NG-hPRL), foram

baseadas no trabalho de Price e cols. (67) desenvolvido para hPRL recombinante produzida em células C127, tendo sido introduzidas importantes modificações.

2.2.16.1. Purificação de rec-hPRL utilizando material produzido em biorreator

A purificação pode ser dividida em 2 etapas. Na primeira etapa um "pool" de amostras coletadas do biorreator foi aplicado numa coluna de Sephacryl S-100 (exclusão molecular). O volume máximo aplicado foi de 40 mL respeitando-se as dimensões da coluna, de forma a não comprometer a resolução final. O tampão utilizado foi bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 8,0. O "pool" coletado da Sephacryl foi submetido a uma diálise em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 com 2 μ M de pepstatina A, seguida de uma incubação "overnight" com o mesmo tampão adicionado de 25% de etilenoglicol e 5% de n-butanol.

A seguir esse material foi aplicado em coluna de SP-Sepharose High Performance equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0, 2 μ M de pepstatina A, 5% de etilenoglicol e 5% de n-butanol (tampão FPB). Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com FPB contendo 200 mM de cloreto de sódio para remover contaminantes. A prolactina glicosilada foi eluída da coluna com tampão FPB contendo 300 mM de cloreto de sódio. A prolactina não glicosilada foi eluída a seguir com tampão tricina 25 mM, pH 8,5 adicionado de 5% de etilenoglicol e 5% de n-butanol.

2.2.16.2. Purificação de rec-hPRL utilizando material produzido em placas de cultura

A purificação da prolactina obtida nas placas ou garrafas seguiu basicamente a mesma metodologia descrita no item anterior. A principal alteração foi a introdução de uma coluna de troca catiônica (SP-Sepharose Fast Flow) como primeira etapa,

usada também para concentração da amostra antes da filtração em gel de exclusão molecular (Sephacryl).

O "pool" das diferentes coletas, utilizando o meio sem soro, foi descongelado, teve o pH ajustado para 5,0 com ácido acético glacial e foi centrifugado à 5000 rpm por 10 minutos. O volume total (500 mL em média) foi aplicado na coluna SP-Sepharose Fast Flow (SPFF) previamente ambientada com tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0 com 0,01% de Tween 80. Foi realizada uma lavagem com esse mesmo tampão acrescido de NaCl até uma concentração de 90 mM. A eluição da prolactina foi realizada com tampão HEPES 25 mM, pH 8,0 com 0,01 % de Tween 80. Na seqüência foram utilizadas as colunas de Sephacryl e SP-Sepharose High Performance (SPHP) como descrito anteriormente.

2.2.17. Produção e purificação da tagPRL

A tagPRL foi produzida em placas de cultura utilizando meio α -MEM, 10% de SFBd e 2% de gentamicina. Foram realizadas coletas diárias sendo as amostras armazenadas a -80° C.

A tagPRL foi purificada com o uso de ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA)-agarose, uma resina que apresenta afinidade à seqüência tag-histidina. Uma amostra de 50 mL de meio de cultura foi dialisada "overnight" contra tampão fosfato de sódio 50 mM/300 mM NaCl, pH 8,0, para remover traços de EDTA. A resina (100 μ L) foi adicionada à amostra dialisada e incubada em misturador rotatório por 2 h a 4°C. Na seqüência, a resina foi coletada por centrifugação e lavada duas vezes com o tampão de diálise contendo 20 mM de imidazol com incubação de 30 min a 4°C. O procedimento de lavagem foi repetido com tampão contendo imidazol 100 mM e 200 mM. As frações obtidas em cada etapa foram analisadas por SDS-PAGE e WB (55).

2.2.18. Bioensaio “in vitro”

A atividade lactogênica das formas G-PRL e NG-PRL foi determinada utilizando o ensaio de proliferação de células de linfoma de rato Nb2 (82) cuja sensibilidade é da ordem de 10-20 pg. Estas células tumorais de ratos são dependentes de prolactina e sua multiplicação dependerá da quantidade deste hormônio presente na amostra. Foi utilizado como padrão de referência o 3º Padrão Internacional de Prolactina Humana (WHO 84/50 de 1988) com atividade específica de 21,2 UI/mg. O protocolo da reação é apresentado abaixo.

Composição dos meios:

	Meio de Crescimento (mL)	Meio do Pré-ensaio (mL)	Meio de Ensaio (mL)
Soro fetal bovino	10	1	-
Soro de cavalo castrado	10	10	10
Meio de Fisher	76	85	85,5
Penicilina (5000 U/mL)/ estreptomicina (5000 µg/mL)	1	1	1
HEPES (1 M, pH 7,2)	-	-	1,5
Bicarbonato de Sódio (7,5 %)	1	1	-
2-mercaptoetanol (5 mM)	2	2	2

Protocolo da reação:

1. As células Nb2 são mantidas no meio de crescimento, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. O tempo de duplicação das células deve ser cerca de 13 horas, não devendo atingir concentrações maiores que 9×10^5 células/ mL.
2. Centrifugar as células por 4 minutos a 350 g e ressuspendê-las no meio do pré-ensaio na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/ mL.
3. Incubar cerca de 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. É esperada uma concentração final de $6-7 \times 10^5$ células/mL.
4. Lavar as células para eliminar hormônios lactogênicos extracelulares (por exemplo, bPL, bPRL) usando para isso o meio de ensaio. A lavagem é realizada pela centrifugação das células (como acima). São realizadas 3 lavagens, e por

fim as células são ressuspensas na concentração de $2,2 \times 10^5$ células/ mL em meio de ensaio.

5. Distribuir alíquotas de 0,9 mL por poço, em placas de cultura com 24 poços.
6. Adicionar as soluções padrão de prolactina e as amostras (100 μ L por poço) em diluições seriadas. Os pontos de curva padrão devem apresentar valores entre 0,0039 e 0,25 ng de PRL/mL.
7. As placas foram incubadas durante 72 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.
8. Homogeneizar as células nos poços e contar.
9. Construir a curva dose-resposta prolactina padrão (ng/mL) versus número de células por mL e usá-la para determinar a atividade lactogênica das amostras.

2.2.19. Seqüenciamento de aminoácidos

A determinação da seqüência de aminoácidos N-terminal das proteínas de interesse foi realizado pelo Departamento de Biotecnologia da Universidade de British Columbia, Vancouver, Canadá. As amostras foram purificadas mediante a transferência das proteínas, após SDS-PAGE em condições não redutoras, para uma membrana de PVDF de 0,2 micron (Biorad, Hercules, CA, EUA). Após a transferência as proteínas presentes na membrana foram reveladas por Coomassie, sendo as proteínas de interesse recortadas, colocadas em saco plástico e enviadas pelo correio.

2.2.20. Análise por HPLC

O sistema de HPLC utilizado foi um Shimadzu Modelo SCL-10 A acoplado a um detetor de UV SPD-10AV (Shimadzu, MD, USA), utilizando o software Class VP, também da Shimadzu.

2.2.20.1. Análise por HPLC em fase reversa (RP-HPLC)

A coluna utilizada foi uma C4 Vydac 214TP 54 (25 cm x 4.6 mm D.I.), diâmetro dos poros de 300Å e diâmetro das partículas de 5 µm com um protetor de coluna ("guard column") Vydac 214 FSK 54 colocado entre o injetor da amostra e a coluna principal. Além disso, foi instalada entre a bomba e o injetor uma coluna de sílica "Si 60", com partículas de 7,9 a 12,4 µm, para funcionar como saturadora do tampão.

A fase móvel consistiu de 71,5 % tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) e 28,5 % n-propanol. Esta foi filtrada em membrana 0,22 µm e degaseificada. O fluxo foi de 0,5 mL/min e o comprimento de onda de 220 nm, a temperatura da coluna sendo mantida a 45°C e o volume de amostra entre 25-200 µL (15, 71).

2.2.20.2. Análise por HPLC de exclusão molecular (HPSEC)

Foi utilizada uma coluna de aço inoxidável TSK G2000 SW, 60 cm x 7,5 mm D.I.. Entre o injetor e a coluna, usou-se uma pré-coluna TSK SW de 7,5 cm x 7,5 mm D.I.. A fase móvel foi constituída por bicarbonato de amônio 25 mM, pH 7,0 ajustado com ácido fosfórico 2%, filtrada em membrana de 0,22 µm e degaseificada. O fluxo foi de 1,0 mL/min. Injetaram-se volumes de amostra entre 10 e 200 µL (15, 72).

3. RESULTADOS

3.1. Construção de diferentes vetores de expressão para células CHO

3.1.1. Construção do vetor pEDdc-hPRL

O vetor pEDdc-hPRL foi obtido em nosso laboratório pela inserção do gene da hPRL no único sítio Eco RI presente no plasmídeo pEDdc, gentilmente doado pelo Dr. Wood (Genetics Institute, Cambridge, MA, EUA). O gene da hPRL foi obtido do pBluescript SK+hPRL cDNA (também construído em nosso laboratório), após uma digestão parcial com Eco RI (55). A análise de restrição desse vetor pode ser vista na Fig. 1, e o seu mapa na Fig. 7A.

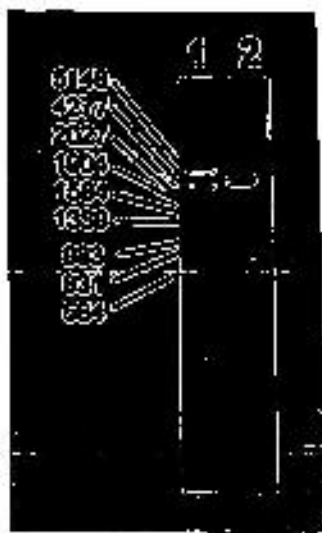


Fig. 1. Análise de restrição do vetor pEDdc-hPRL em gel de agarose 1%, com revelação mediante brometo de etídio. Linha 1, padrões de tamanho molecular em par de bases (pb); linha 2, vetor após digestão parcial com a enzima Eco RI, resultando no gene da prolactina com 858 pb, seus fragmentos de 218 e 640 pb, o vetor linearizado com e sem o gene da prolactina e suas formas não digeridas.

3.1.2. Construção do vetor p658-hPRL

O plasmídeo p658-hPRL é derivado de dois vetores preparados na Sanofi Recherche (Toulouse, França). Um deles é o p658, análogo do p7055, sem o gene da IL-2, o outro é o p4047 (51). Os genes da hPRL e da tagPRL foram obtidos por PCR a partir do vetor pEDdc-hPRL e p3SN8-PRL-2 respectivamente (Fig. 2), sendo compostos pelo cDNA da prolactina humana com e sem a seqüência "tag", pelo peptídeo sinalizador natural de 28 aa e pelos sítios de restrição Hind III e Bam HI ou PflMI e Bam HI, nas extremidades 5' e 3' respectivamente. O esquema de construção do p658-hPRL e um cromatograma em gel de agarose apresentando os 3 fragmentos (3010 pb, 3258 pb e 680 pb) utilizados na reação de ligase-tripla podem ser observados na Fig. 3 e Fig. 4A, respectivamente.

Após a reação de ligase, transformação e análise de restrição, um dos clones selecionados foi seqüenciado e confirmou ausência de mutações. Na Fig. 4B observamos um exemplo de análise de restrição do plasmídeo escolhido.

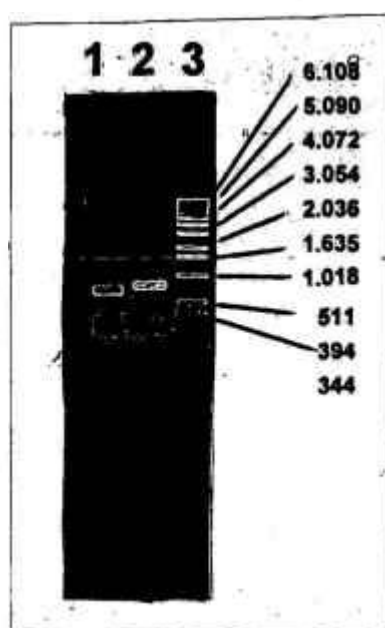


Fig. 2. Análise em gel de agarose 1%, com revelação mediante brometo de etídio, dos genes obtidos por PCR. Linha 1, gene incompleto da tag-PRL contendo parte do seu peptídeo sinalizador natural (520 pb); linha 2, gene da hPRL (680 pb); linha 3, padrões de tamanho molecular com indicação do número de par de bases (pb) relativo a cada fragmento.

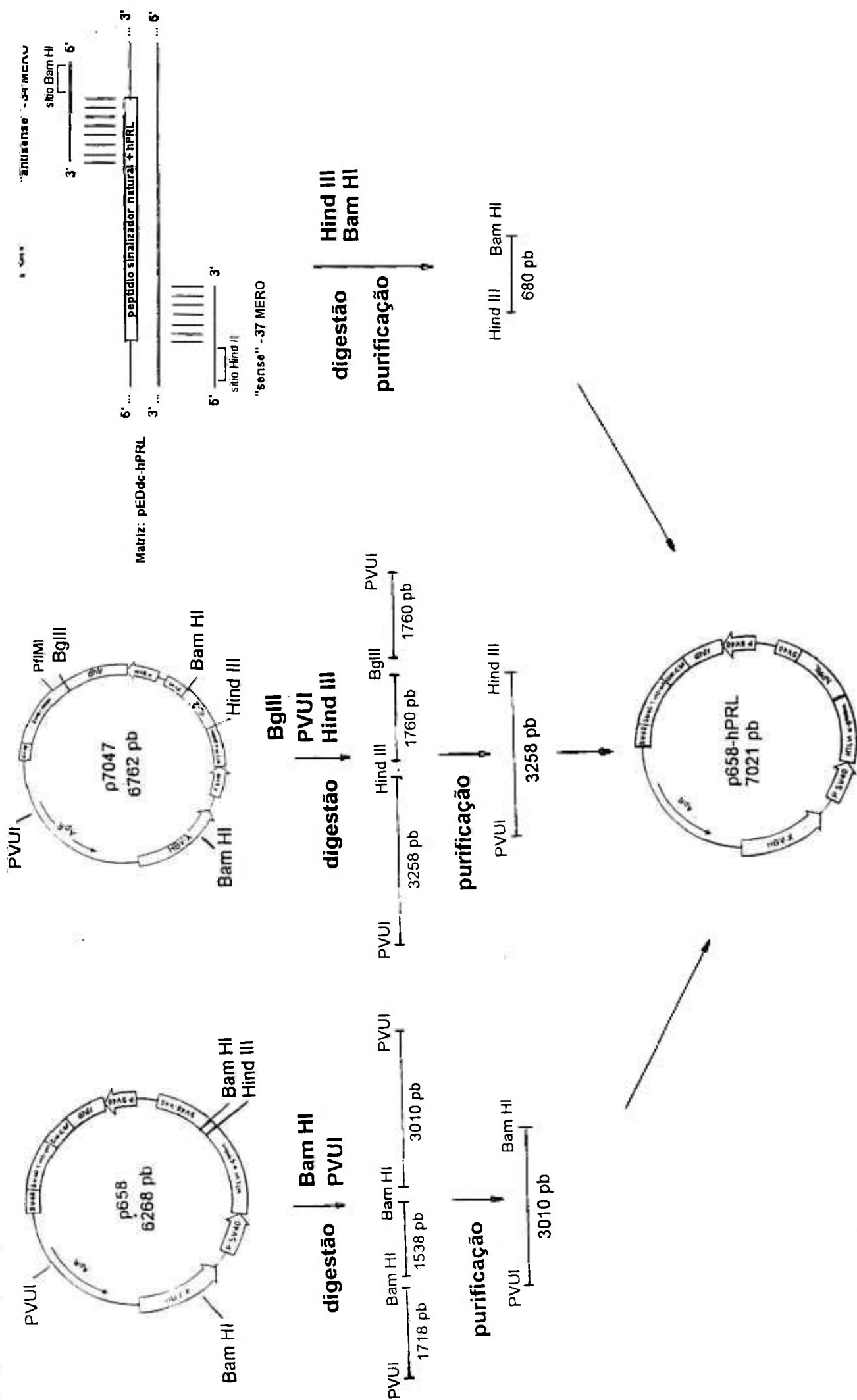


Fig. 3. Esquema de construção do p658-hPRL. Esse vetor resultou de uma ligação tripla. O primeiro fragmento com 3010 pb foi obtido a partir do p658 após digestão com PVUI e Bam HI, o segundo com 3258 pb foi obtido do p7047 após digestão com Pvu I e Hind III e o último com 680 pb resultou da reação de PCR a partir do pEDdc-hPRL digerido pelas enzimas Hind III e Bam HI.

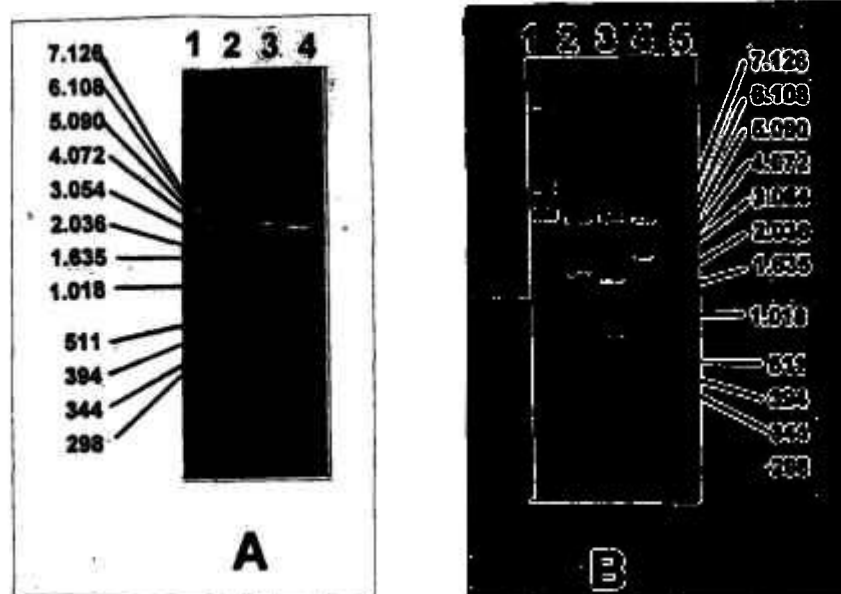


Fig. 4. Análise em gel de agarose 1%, com revelação mediante brometo de etídio.

A. Fragmentos de DNA purificados e utilizados na construção do p658-hPRL. Linha 1, padrões de tamanho molecular (pb); linha 2, gene da hPRL obtido por PCR (680 pb); linha 3, fragmento de 3258 pb; linha 4, fragmento de 3010 pb.

B. Análise de restrição do vetor p658-hPRL após reação de ligase. Linha 1, plasmídeo obtido da maxi-prep (sem digestão), utilizado para seqüenciamento de DNA e transformação de células CHO; linha 2, digestão parcial do mesmo plasmídeo com as enzimas Eco RI e Bam HI, devendo gerar os fragmentos de 480 pb, 1718 pb e 4726 pb; linha 3, digestão parcial com as enzimas Hind III e Bam HI, devendo gerar os fragmentos de 680 pb, 1538 pb e 4726 pb; linha 4, digestão parcial com a enzima Bam HI, devendo gerar os fragmentos de 2218 pb e 4726 pb; linha 5, padrões de tamanho molecular.

3.1.3. Construção do vetor p658-tagPRL

O plasmídeo p658-tagPRL é derivado do vetor p658-hPRL. O gene incompleto da tag-prolactina contendo parte do seu peptídeo sinalizador natural foi obtido por PCR (Fig. 2) a partir do vetor 3SN8-PRL2 (51), sendo inserido entre os sítios de restrição das enzimas PflMI (região 5') e Bam HI (região 3'), o primeiro já existente no peptídeo sinalizador e o segundo criado mediante reação de PCR como parte da estratégia de construção. Um esquema da construção do p658-tagPRL pode ser observado na Fig. 5.

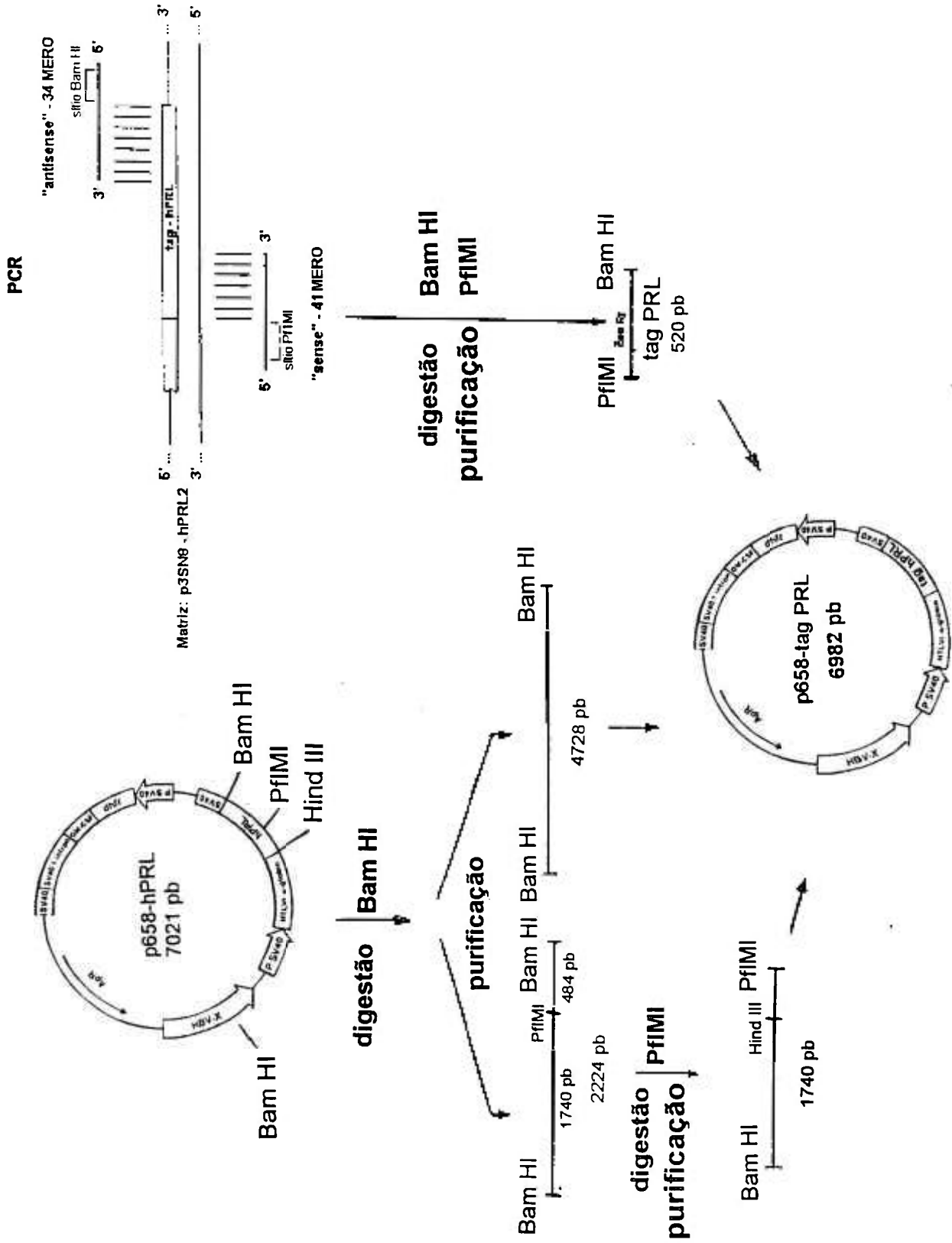


Fig. 5. Esquema de construção do plasmídeo p658-tagPRL. Esse vetor resultou de uma ligação tríplice dos fragmentos de 1740 pb, 4728 pb e 520 pb. Os dois primeiros foram obtidos do p658-hPRL após digestão com Bam HI e PflMI e o terceiro obtido por PCR e digerido com as mesmas enzimas.

A estratégia utilizada para a seleção dos clones contendo p658-tagPRL com a seqüência correta foi inicialmente a mesma aplicada na construção anterior, porém a análise de restrição, que se mostrou eficiente na confirmação da estrutura correta do p658-hPRL (Fig. 4B), neste caso não forneceu um resultado conclusivo. De fato uma eventual contaminação com o vetor p658-hPRL não pode ser diferenciada por essa análise de restrição, pois os 12 aminoácidos a mais da tagPRL correspondem a uma diferença de apenas 36 pares de bases, muito difícil de ser visualizada por essa técnica. Foi portanto realizada uma reação de PCR com os mesmos oligonucleotídeos usados para obtenção do gene da tag-PRL, porém utilizando como matriz os clones já obtidos e aprovados na análise de restrição. A reação só deve ocorrer nos clones onde existe a segmento de DNA correspondente à tagPRL. Na Fig. 6. é apresentado o resultado dessa análise com um único clone positivo, o clone 8 (linha 5). Esse clone foi seqüenciado e não apresentou nenhuma mutação devida à reação de PCR.

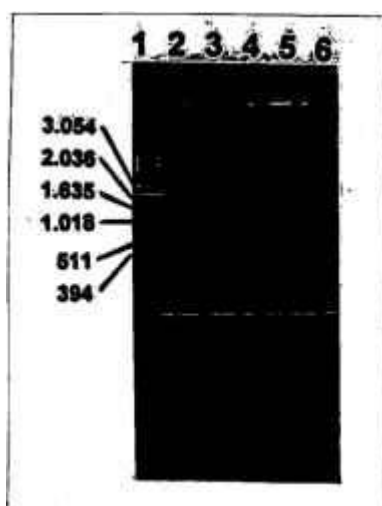


Fig. 6. Gel de agarose 1%, com revelação mediante brometo de etídio. As reações de PCR foram utilizadas para confirmação da seqüência correta do p658-tagPRL. Linha 1, padrões de tamanho molecular; linha 2, controle negativo, utilizando p658-hPRL como matriz; linha 3 a 6, reações de PCR dos clones 6, 7, 8 e 9 respectivamente.

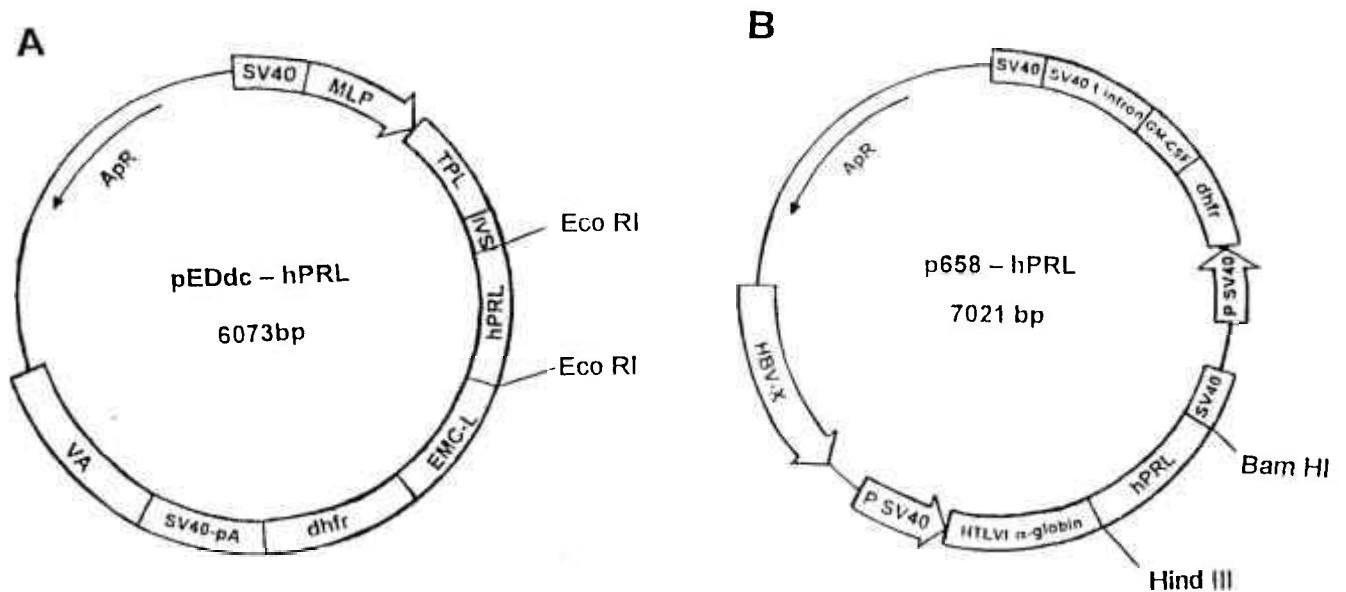


Fig. 7. Mapa dos vetores pEDdc-hPRL e p658-hPRL.

A. O vetor pEDdc-hPRL é um vetor dicistrônico derivado do PUC 18. Os seus componentes principais são: SV40, fragmento que contém a origem de replicação e o elemento ativador (“enhancer element”) do “simian virus 40” (SV40); MLP, promotor derivado do adenovírus; TPL, seqüência “leader” de adenovírus; IVS, um intron híbrido composto pela seqüência 5’ “leader” não traduzida derivada do adenovírus e de uma seqüência 3’ do gene da imunoglobulina; hPRL, cDNA da prolactina humana; EMC-L, região 5’ “leader” não traduzida do vírus da encefalomiocardite (EMC); dhfr, região que codifica a enzima diidrofolato redutase murina; SV40-poliA, região de poliadenilação do SV40; VA, gene do adenovírus VAI RNA que codifica a RNA polimerase III, potencializando a tradução do mRNA; ApR, gene da β -lactamase, que confere resistência à ampicilina, útil para amplificação em *E. coli* (37).

B. O vetor p658-hPRL é derivado do p7055 (51), que por sua vez é similar ao pSE1 (52). Os seus componentes principais são: HBV-X, gene que codifica um transativador viral do vírus X da hepatite B; pSV40, promotor do SV40; HTLV1, corresponde a região 5’ não traduzida do vírus das células linfotróficas humanas tipo 1 acrescida de um intron sintético contendo sítios de processamentos alternativos (“splice sites”) de um intron do gene da α -globina de camundongo; hPRL, cDNA da prolactina humana ou da tag-prolactina, no caso do vetor p658-tagPRL; SV40, sítio de poliadenilação do SV40; dhfr, seqüência que codifica a enzima diidrofolato redutase murina; GM-CSF, região rica nas seqüências A+T derivada da região 3’ não traduzida do fator estimulador de formação de colônias granulócito-macrófago; ApR, gene da β -lactamase.

3.2. Análise comparativa da funcionalidade das diferentes construções mediante transfecção transiente

Os primeiros estudos de expressão dos três vetores foram em células CHO, realizando duas transfecções transientes para cada vetor. Uma análise comparativa é mostrada na Tabela I.

Podemos observar que, juntamente com uma boa reprodução inter-transfecção, os três vetores confirmaram secreção de prolactina imunoativa. Já nesse primeiro teste observamos uma maior expressão dos clones derivados do p658 em relação ao pEDdc-hPRL. Esses dados nos habilitaram a seguir com esses vetores na realização de transfecções permanentes.

TABELA I - Expressão transiente de hPRL em células CHO dhfr⁻, utilizando os três diferentes vetores.

Vetor ^a	Transfecção 1	Transfecção 2	média
	(ng de hPRL/ mL ^b ± CV %)		
pEDdc-hPRL	16 ± 8,2	17 ± 11,2	16,5 ± 4,2
p658-hPRL	1.325 ± 8,0	1.000 ± 2,7	1.162 ± 19,8
p658-tag PRL	365 ± 1,9	425 ± 2,4	395 ± 10,7

^a Os vetores estão descritos na Fig. 7.

^b As células CHO dhfr⁻ da linhagem DXB11 (85) foram transfectadas com o plasmídeo específico usando o método do DEAE-dextran (80). Três dias após a transfecção, a quantidade de prolactina acumulada no meio foi avaliada por IRMA. Cada valor corresponde à média de duplicatas intraensaio.

3.3. Análise comparativa da funcionalidade das diferentes construções mediante transfecção permanente

Os níveis de expressão permanente de hPRL obtidos mediante transfecção pelo método do fosfato de cálcio, de células CHO dhfr⁻ sem amplificação, para os três vetores (p658-hPRL, p658-tagPRL e pEDdc-hPRL) são mostrados na Tabela II. Podemos observar que enquanto os clones derivados do p658 chegam a expressar

níveis de quase 10 μg de hPRL/ 10^6 células/dia (p658-hPRL) e de aproximadamente 3,0 μg de tagPRL/ 10^6 células/dia (p658-tagPRL), aqueles transformados com pEDdc-hPRL apresentam valores sempre inferiores a 1 μg hPRL/ 10^6 células/dia.

TABELA II - Níveis de expressão de rec-PRL obtidos com os vetores p658-hPRL, p658-tagPRL e pEDdc-hPRL em células CHO dhfr- transfectadas pelo método do fosfato de cálcio, sem amplificação com MTX.

número do clone	p658-hPRL	P658-tagPRL	pEDdc-hPRL
	(μg/ 10^6 células/dia) ^a		
1	1,17	3,42	0,50
2	0,15	0,18	0,32
3	1,13	0,74	0,37
4	2,83	1,44	0,05
5	6,33	0,03	0,72
6	0,03	1,43	0,50
7	1,10	0,41	0,43
8	0,93	0,30	0,50
9	0,12	0,03	0,43
10	0,05	0,14	0,42
11	0,15	0,03	0,83
12	2,67	0,46	0,45
13	1,27	0,03	0,05
14	0,02	0,46	0,30
15	0,80	0,92	0,50
16	9,33	1,67	0,28
17	0,03	0,50	0,45
18		0,64	0,47
19			0,03
20			0,55
21			0,47
22			0,27
23			0,45
24			0,72

^a hPRL imunoativa

3.4. Amplificação com metotrexato (MTX)

O vetor pEDdc, que foi planejado especificamente para amplificação com metotrexato (MTX) utilizando como marcador de amplificação o gene dhfr, após três etapas de amplificação com 20, 50 e 100 nM de MTX apresentou clones com um aumento significativo de expressão. Na Tabela III pode ser observado o incremento de expressão para os diferentes clones em cada passo da amplificação, assim como o tempo necessário para cada etapa. A Tabela IV apresenta uma estatística inter-ensaio relativa à determinação radioimunológica dos níveis de secreção de hPRL para os dois melhores clones do pEDdc-hPRL e p658-hPRL. Na hora de escolher os melhores clones, além de considerar a produtividade em prolactina foi também considerada a viabilidade celular dos mesmos.

TABELA III - Análise das várias etapas de amplificação com MTX dos melhores clones obtidos com o vetor pEDdc-hPRL^a.

Clones	0 nM ^b	20 nM ^b	50 nM ^b	100 nM ^b	200 nM ^b
	µg hPRL/10 ⁶ células/dia				
5	0,72	2,9	11,6	31,6	-
9	0,43	2,7	9,6	21,4	26,2
11	0,83	3,1	16,7	25,4	25,6
12	0,45	4,3	15,3	19,5	21,2
18	0,47	6,1	>16,6	29,7	25,6
20	0,55	3,3	14,2	24,4	18,4
dias após transfecção	27	38	52	67	80
duração da etapa em dias	27	11	14	15	13

^a 5 x 10⁵ células de cada clone foram semeadas em placas de 6 cm de diâmetro com 5 mL de meio seletivo e após 3 dias a prolactina presente no meio foi quantificada por radioensaio.

^b concentração de metotrexato

TABELA IV – Análise estatística dos níveis de expressão de hPRL obtidos com os dois melhores clones em células CHO dhfr- transformadas com o vetor p658-hPRL (sem amplificação) e pEDdc-hPRL após amplificação com MTX (100 nM).

Ensaio	Vetor p658-hPRL		Vetor pEDdc-hPRL		
	Clone 5	Clone 16	Clone 5	Clone 18	
($\mu\text{g}/10^6$ células/dia) ^a					
1	9,5	9,4	28,6*	21,4*	
2	10,3	12,6	44,3*	31,3*	
3	9,0	8,5	33,0*	22,4*	
4	7,6	13,4	22,6*	19,8*	
5	10,4	6,8	25,0	27,0	
6	8,8	9,9	39,1	21,2	
7	9,6	10,8	31,6	29,7	
9,3 \pm 10,4%		10,2 \pm 22,5%		32,0 \pm 23,9%	
				24,7 \pm 18,6%	

^a hPRL determinada por radioimunoensaio.

* Valores de expressão determinados conforme protocolo descrito por Miloux e cols. (51), os demais valores foram obtidos segundo protocolo de Monaco e cols., (54).

Dois clones derivados do p658-hPRL também foram amplificados com MTX, apesar de já expressarem níveis considerados altos de hPRL e de terem sido projetados para uso sem amplificação. Os resultados da TABELA V confirmam que o vetor p658-hPRL, ao contrário do vetor pEDdc-hPRL, não respondeu eficientemente à amplificação com MTX.

TABELA V - Análise das várias etapas de amplificação com MTX dos melhores clones obtidos com o vetor p658-hPRL.

Clones	0 nM ^a	10 nM ^a	20 nM ^a	50 nM ^a	100 nM ^a
	(µg hPRL /10 ⁶ células/dia) ^b				
5	5,0	5,6	7,0	10,0	-
16	6,6	7,8	0,09	0,86	2,72

^a concentração de metotrexato.

^b Valores de expressão (determinados por radioimunoensaio) conforme protocolo descrito por Monaco (54).

3.5. Análise por Western Blotting do produto derivado de linhagens estáveis de CHO transformadas

A partir de amostras de meio de cultura, obtidas durante o estudo da cinética de expressão, foi realizado um WB para uma análise qualitativa e semiquantitativa da prolactina produzida (Fig. 8). Como podemos observar, além da banda correspondente a NG-hPRL (23KDa) é visível outra banda, provavelmente correspondente a G-hPRL (25KDa). Há também indicação que o vetor pEDdc-hPRL está expressando níveis maiores de hPRL. O vetor p658-tagPRL é o que apresenta menor expressão e a tag-PRL apresenta claramente um peso molecular maior que a hPRL, reflexo do aumento de massa devido aos 12 aminoácidos que possui a mais.

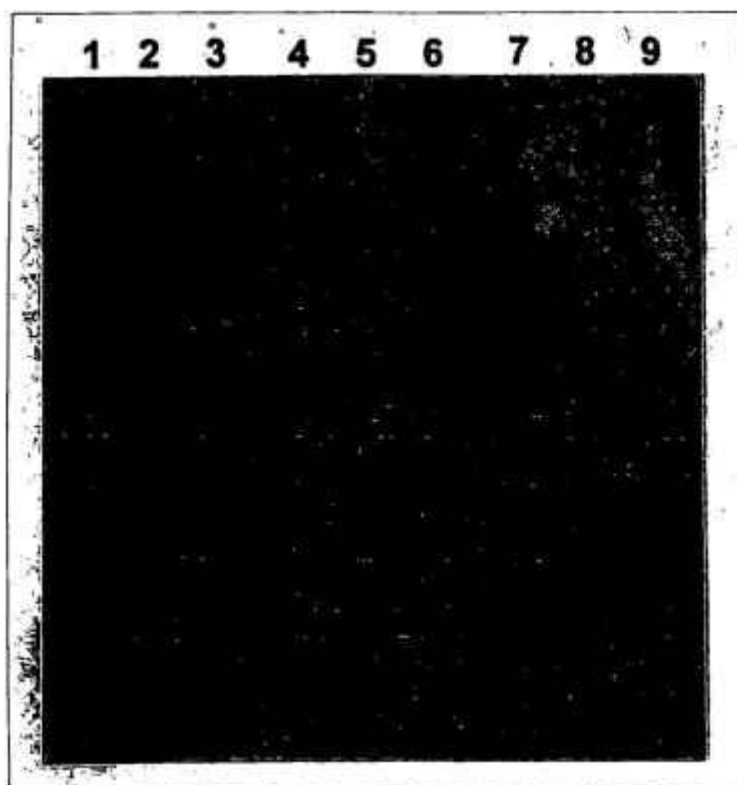


Fig. 8. Western Blotting obtido utilizando antissoro anti-hPRL e analisando diferentes clones após diferentes tempos de incubação. Foram aplicados 25 μ L de meio de cultura. 1, prolactina padrão (200 ng); 2 e 3, células CHO transformadas com p658-tagPRL, segundo e quarto dia de incubação respectivamente; 4 e 5, células CHO transformadas com p658-PRL segundo e quarto dia de incubação respectivamente; 6 e 7, células CHO transformadas com pEDdc-hPRL, clone 18-100nM de MTX, segundo e quarto dia de incubação; 8 e 9, células CHO transformadas com vetor pEDdc-hPRL clone 5-100nM de MTX, segundo e quarto dia de incubação.

3.6. Utilização de diferentes meios de cultura na expressão de hPRL

Foi realizado um estudo comparativo da produção de hPRL em diferentes meios de cultura. Os meios utilizados foram α -MEM, α -MEM com 10% de SFBd, CHO-S-SFM II e CHO-S-SFM II com 10% de SFBd. Nesse estudo, realizado em placas, foram avaliados dois aspectos: a concentração final de hPRL obtida, independente do número de células finais, e a produção por célula (TABELA VI). Os resultados (derivados de uma média de 4 experimentos) evidenciam a influência do SFBd e do meio CHO-S-SFM II no incremento de secreção da hPRL em células CHO.

TABELA VI – Estudo comparativo de produção de hPRL utilizando diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	$\mu\text{g hPRL/mL}$	$\mu\text{g hPRL}/10^6\text{células/dia}$
α -MEM	3,0	11,6
α -MEM + 10% SFBd	7,7	22,5
CHO-S-SFM II	8,3	18,3
CHO-S-SFM II + 10% SFBd	12,3	32,1

3.7. Determinação da proporção de G-hPRL e NG-hPRL no produto secretado

A determinação da porcentagem de forma glicosilada secretada foi realizada diretamente no meio de cultura. Para isso foi utilizado meio α -MEM sem soro fetal bovino dialisado (SFBd). Nessa condição a quantidade de hPRL presente representa uma importante porcentagem da proteína total possibilitando sua melhor visualização por SDS-PAGE. A intensidade das bandas de G-hPRL e NG-hPRL foi avaliada mediante a comparação densitométrica de diluições seriadas da mesma amostra. A proporção de forma glicosilada sobre o total de prolactina presente foi estimada mediante uma série de determinações independentes. O valor médio relativo à porcentagem de G-hPRL obtido em 9 determinações densitométricas utilizando 7 diferentes amostras derivadas de culturas diferentes foi $X = 10,3\%$ (CV = 19,2%).

Um exemplo de cálculo é mostrado na Fig. 9. A linearidade da resposta densitométrica demonstrou-se bastante satisfatória. Para o experimento reportado na figura, foi calculado um coeficiente de correlação (r) = 0,987 ($P < 0,01$) relativo à curva dose resposta obtida empregando as 4 bandas correspondentes a NG-hPRL.

Uma informação importante que pode ajudar na identificação da forma glicosilada no SDS-PAGE, principalmente na ocorrência de outras bandas próximas, é o RM, uma relação entre o deslocamento da banda correspondente a G-hPRL e o deslocamento da banda correspondente a NG-hPRL, sempre considerando o ponto de partida como sendo o início do gel. No nosso caso, SDS-PAGE 12%, o RM da G-hPRL resultou ser $0,8698 \pm 2,3 \%$ ($n = 12$).

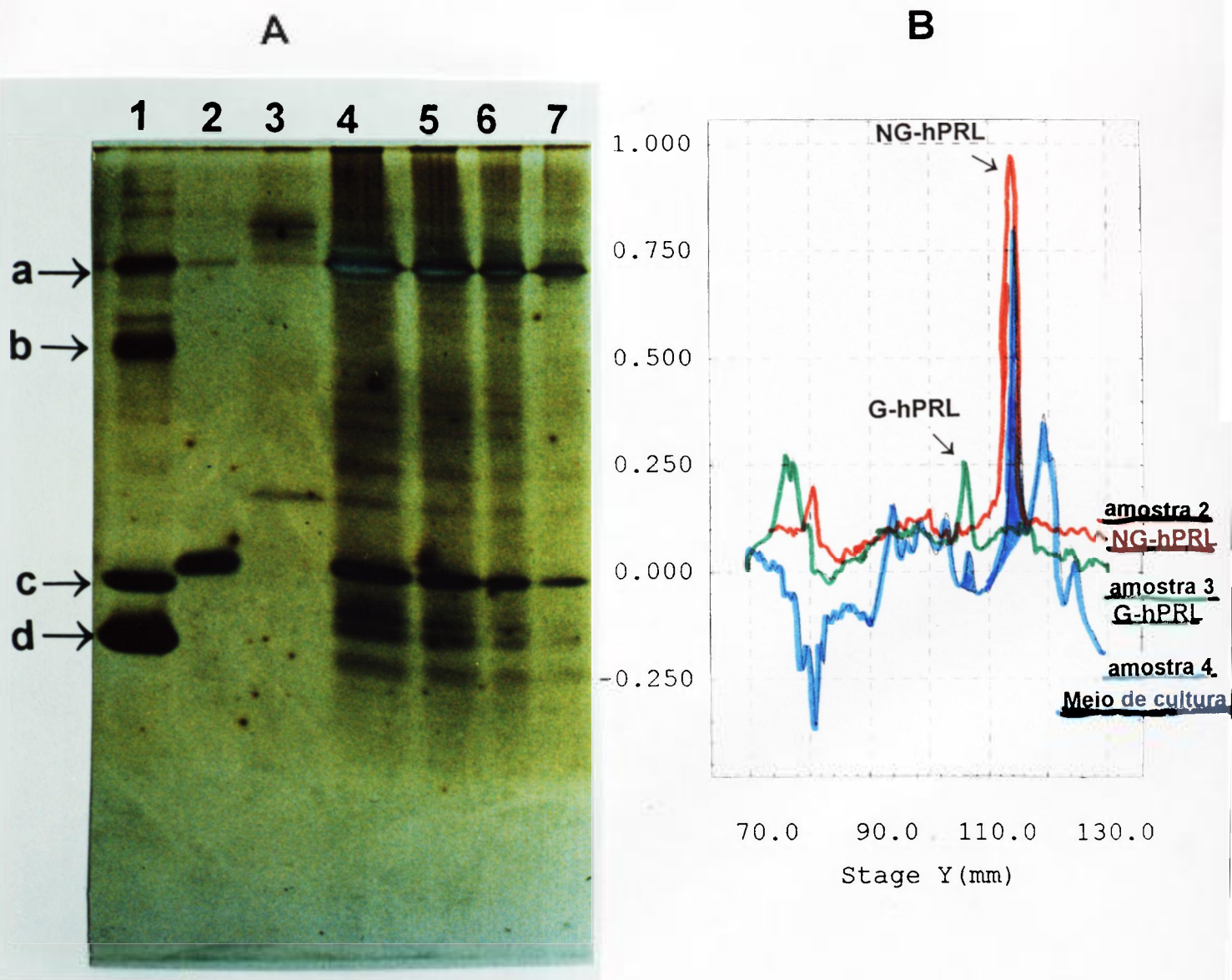


Fig. 9. Exemplo de cálculo da porcentagem de G-hPRL sobre o total de hPRL.

A - Gel de eletroforese (SDS-PAGE) revelado pelo método do nitrato de prata. Linha 1, padrões de peso molecular: a, BSA (66 KDa); b, ovalbumina (45 KDa); c, rec-hGH-IPEN (22 KDa); d, mioglobina (17 KDa). Linha 2, prolactina hipofisária (200 ng). Linha 3, preparação interna de referência de G-hPRL. Linhas 4, 5, 6 e 7: o mesmo meio de cultura em placa, aplicado em diferentes diluições (1:1; 1:2; 1:4 e 1:8), respectivamente.

B - Perfil densitométrico da amostra 4 e dos padrões de G-hPRL e NG-hPRL utilizados para confirmar a posição dos picos de interesse.

3.8. Produção de hPRL em biorreator do tipo “hollow fiber” e identificação da forma clivada hPRL₁₁₋₁₉₉

3.8.1. Produção no biorreator utilizando o meio α -MEM

Nos estudos iniciais em biorreator, o meio intracapilar utilizado era composto por: α -MEM, metotrexato (100nM), glicose (4mg/mL), penicilina (50 UI/mL), estreptomicina (50 μ g/mL), gentamicina (20 μ g/mL), anfotericina B (1,25 μ g/mL), sendo o frasco (1 litro) trocado em média uma vez por semana.

É importante ressaltar que o meio descrito foi improvisado na tentativa de substituir o CHO-S-SFM II da GibcoBRL, um meio de cultura sem soro e com baixa quantidade de proteínas, portanto mais recomendado para biorreatores e para posterior purificação, porém muito mais caro e de mais difícil obtenção e com o agravante de possuir um prazo de validade de apenas 6 meses.

Uma análise visual do cartucho, mesmo após um mês de cultura, mostrou a existência de grandes espaços vazios. As células eram distribuídas por todo o cartucho, porém em colônias isoladas, sugerindo que esse meio não é adequado para um completo crescimento das células no espaço extracapilar.

Um exemplo de produção no biorreator, em μ g de hPRL/dia, é mostrado na Fig. 10. Este gráfico, mesmo não sendo de fácil interpretação, mostrou que existe uma tendência à diminuição da produção de prolactina quando se utiliza no espaço extracapilar o α -MEM sem SFBd e que a produção torna a aumentar quando durante o fim de semana se adiciona soro ao meio. A quantidade de prolactina produzida por dia chegou até 2 mg, com concentrações da ordem de 200 a 300 μ g de hPRL/mL, ou seja, concentrações de 10 a 20 vezes maiores que as produzidas em garrafas utilizando o mesmo meio.

Um Western Blotting (WB) de algumas amostras obtidas em biorreator é apresentado na Fig. 11, onde podemos notar melhor a presença de uma certa quantidade de forma glicosilada, um pouco acima da banda correspondente à hPRL. Neste WB derivado de um SDS-PAGE com redução é difícil visualizar uma banda logo abaixo da prolactina não glicosilada (NG-hPRL). No entanto na Fig. 12, relativa a um SDS-PAGE sem redução, é observada de forma mais nítida uma banda mais intensa que a banda fundamental de hPRL, com aproximadamente o mesmo peso molecular do hGH e com atividade imunológica de hPRL (Fig. 13B). Essa isoforma de hPRL que por enquanto denominaremos 22K (K indicando kDa) nunca surge antes do 3^o dia de funcionamento do biorreator.

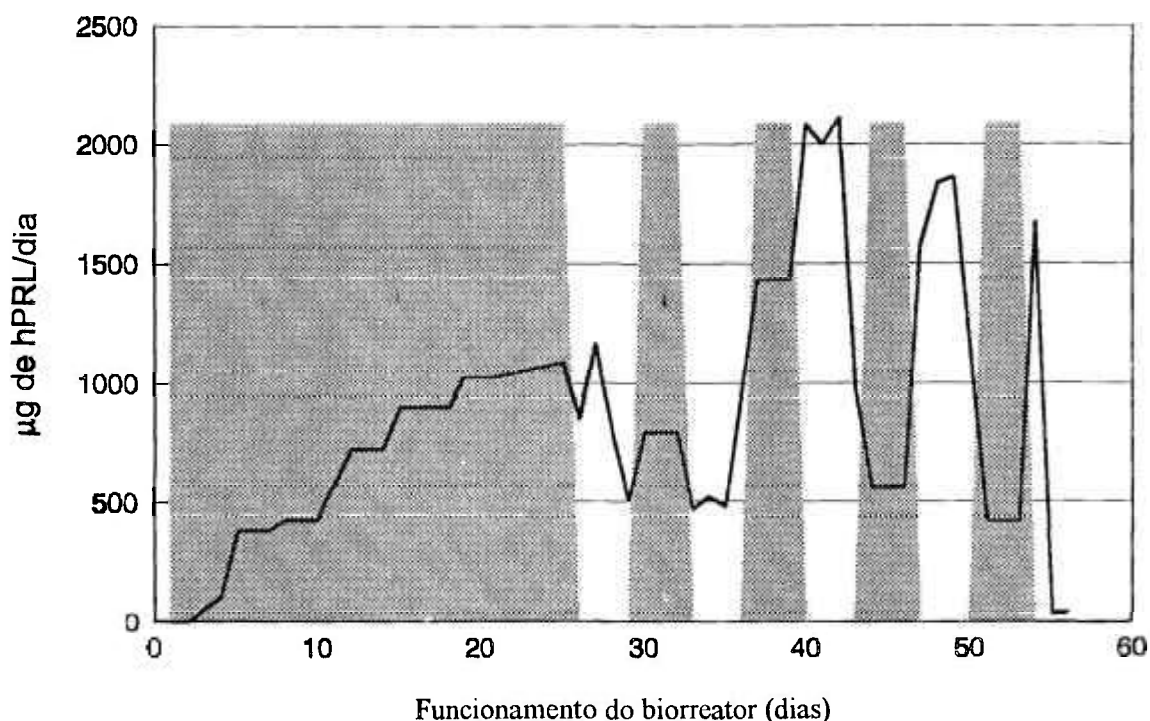


Fig. 10. Produção de hPRL no biorreator. A região em cinza corresponde à presença no meio extracelular de 10% de soro fetal bovino dialisado (SFBd).

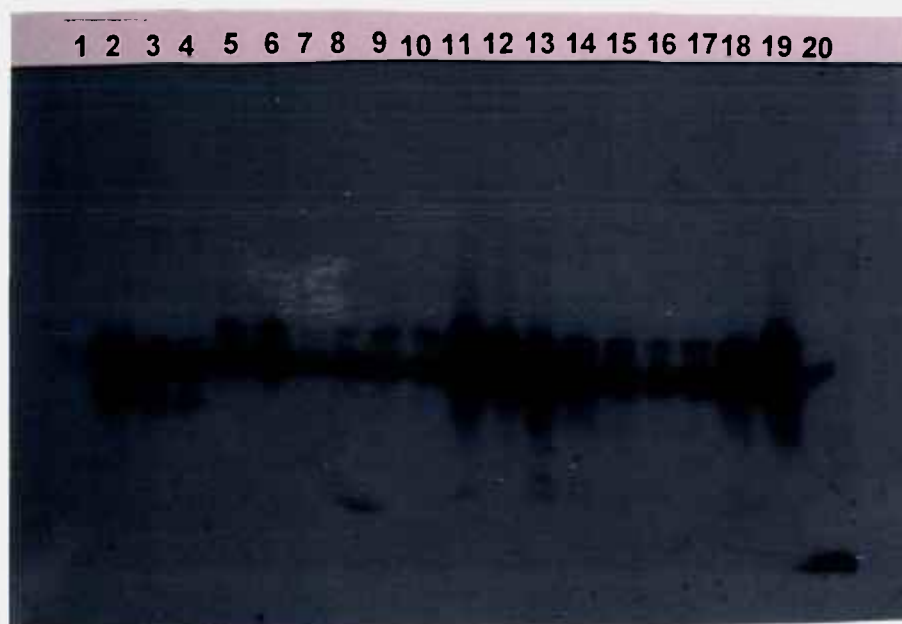


Fig. 11. Western Blotting, após eletroforese em SDS-PAGE 12% em presença de agentes redutores. Foram aplicados 10 μ L de meio de cultura de biorreator (α -MEM no espaço intra e extracapilar), sendo utilizado o clone 18-100nM MTX do pEDdc-hPRL. Linha 1, meio intracapilar utilizado no biorreator (1^o controle negativo); linhas 2, 3 e 4, hPRL hipofisária, 200, 100 e 50 ng respectivamente; linhas 5 e 6, amostras obtidas em placas de cultura de 6 cm de diâmetro (com SFBd); linhas 7 e 8, meios de cultura sem SFBd (produção em garrafas de 162 cm²); linhas 9 à 19, amostras obtidas do espaço extracapilar do biorreator nos dias 3, 8, 15, 22, 27, 32, 34, 35, 36, 49 e 53 respectivamente; linha 20, meio de cultura com SFBd antes de ser injetado no espaço extracapilar (2^o controle negativo).

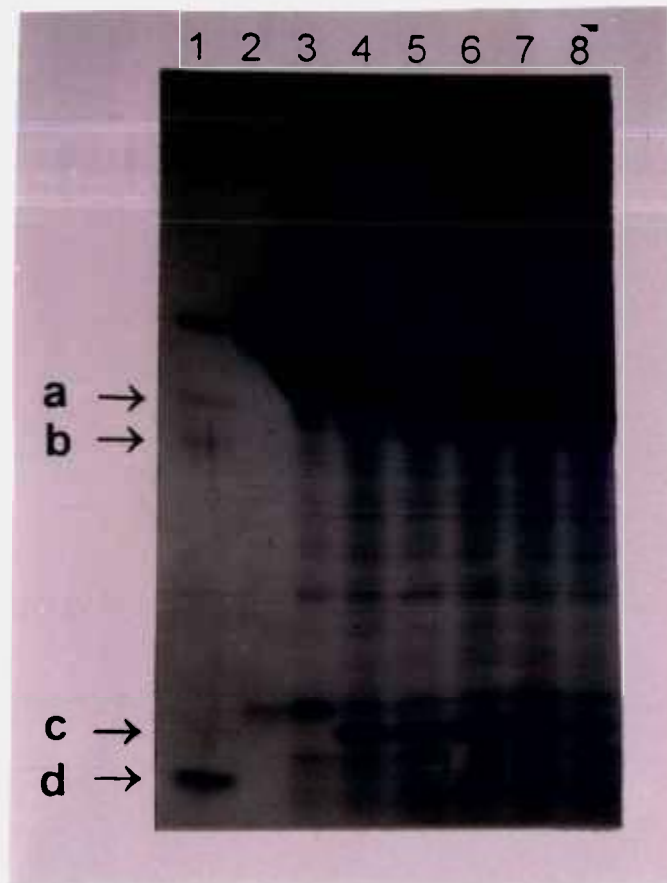


Fig. 12. SDS-PAGE, em condições não redutoras, revelado com Coomassie blue. São analisadas amostras coletadas nos primeiros dias de funcionamento do biorreator utilizando α -MEM no espaço intra e extracapilar, este último com SFBd. Linha 1, padrões de peso molecular: a, BSA (66 KDa); b, ovalbumina (45 KDa); c, rec-hGH-IPEN (22 KDa); d, mioglobina (17 KDa). Linha 2, padrão de hPRL hipofisária (1 μ g). Linhas 3, 4, 5, 6, 7 e 8, coletas do biorreator correspondentes ao 3^o, 6^o, 7^o, 8^o, 12^o e 14^o dias respectivamente.

3.8.2. Produção no biorreator utilizando o meio CHO-S-SFM II

O meio CHO-S-SFM II, mais apropriado para uso em biorreatores (25, 26, 76, 95), foi utilizado na tentativa de obter uma maior produção de prolactina e a possível eliminação desta forma 22K de hPRL. Os primeiros resultados desse estudo podem ser visualizados na Tabela VII e na Fig. 13. Alguns cuidados devem ser tomados durante a cultura das células para evitar que a concentração de glicose fique abaixo de 2,2 g/L e que o lactato não atinja concentração superior a 2 g/L, caso contrário

pode ocorrer um comprometimento das células. Uma produção aproximada de 1 g/dia de lactato seria ideal. Podemos observar na tabela alguns dados relativos ao consumo de glicose e produção de lactato. Observa-se que com o aumento do número de células temos uma aceleração no consumo de glicose, e em consequência uma maior produção de lactato. No entanto com a retirada do SFBd esse ritmo de consumo parece ter diminuído, observando-se também uma diminuição na produção de hPRL. A comparação entre SDS-PAGE e RIE é interessante no sentido que a primeira técnica, apesar de menos precisa, se mostrou capaz de discriminar a forma 22K de hPRL. Os valores obtidos com as duas técnicas se mostraram relativamente discrepantes. Temos que considerar porém que estas se baseiam em princípios totalmente diferentes, sem mencionar que as diferentes formas de PRL podem não apresentar a mesma resposta imunológica. Por esse experimento não foi observado um aumento significativo da produção de hPRL em relação ao meio α -MEM, utilizado anteriormente, mesmo tendo agora a presença de um número bem maior de células.

Confirmando o que foi observado no mesmo biorreator com o meio α -MEM, a forma 22 K de hPRL começou a surgir após o 3^o dia de funcionamento (Fig. 13). Outro fato interessante, que deve ser mencionado, é que a proporção da forma 22K de hPRL em relação à NG-hPRL diminuiu no primeiro dia após a troca do meio intracapilar (coleta do 12^o dia, linha 8-Fig.13), voltando a aumentar na coleta seguinte (coleta do 13^o dia, linha 9). Esse fato sugere que uma troca mais freqüente do meio intracapilar pode atenuar ou até mesmo eliminar a forma 22K. O mesmo efeito não foi observado na primeira troca do meio intracapilar, realizada logo após a coleta do 7^o dia, linha 5. Isso talvez se deva ao fato que nesse caso a coleta seguinte ocorreu somente 3 dias após a troca, período longo o suficiente para um grande acúmulo da forma 22K (coleta do 10^o dia, linha 6).

TABELA VII – Estudo da produção de hPRL no biorreator utilizando o meio CHO-S-SFM II. Foram realizadas análises do consumo de glicose e produção de lactato, assim como dosagens de prolactina por RIE. A tabela também apresenta dados baseados em SDS-PAGE relativos às diferentes formas de PRL encontradas.

Coleta	Dias	Presença de SFBd	Glicose			Lactato		Análise com base no SDS-PAGE			Análise com base no RIE
			presente (g/L)	utilizada (g/dia)	presente (g/L)	produzido (g/dia)	hPRL				
							total (µg/mL)	íntegra (%)	forma clivada (%)	hPRL total (µg/mL)	
0	0	SIM	4,0	-	0	-	0	-	-	0	
1	3	SIM	3,85	0,05	0,205	0,07	100	100	0	69,9	
2	5	SIM	3,03	0,41	0,384	0,08	145	80	20	107,2	
3	7	SIM	2,7	0,165	0,960	0,29	290	30	70	123,7	
TROCA DE MEIO INTRACAPILAR											
4	10	SIM	1,9	0,7	2,125	0,7	360	3	97	197,5	
5	11	SIM	1,25	0,65	2,51	0,38	165	10	90	155,7	
TROCA DE MEIO INTRACAPILAR											
6	12	SIM	2,5	1,5	1,21	1,21	250	45	55	-	
7	13	NÃO	2,03	0,47	-	0,52	170	12	88	-	
8	14	NÃO	1,51	0,52	2,25	0,52	140	7	93	-	

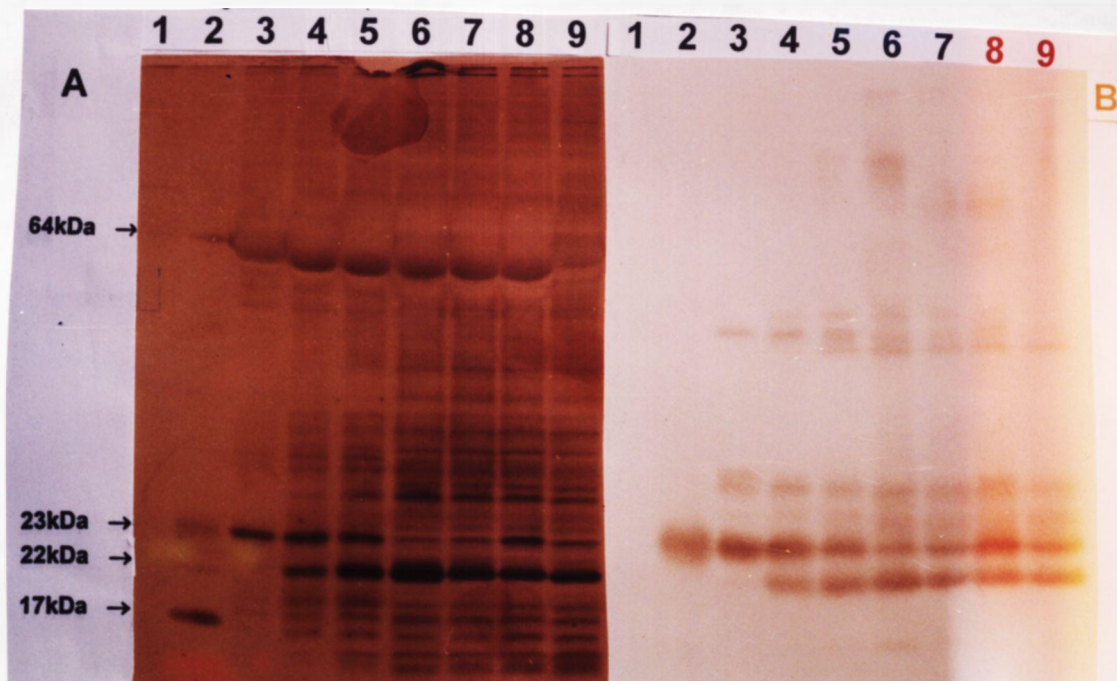


Fig. 13. SDS-PAGE, em condições não redutoras e revelado por nitrato de prata (A) e WB correspondente (B) de amostras coletadas do biorreator com meio intracápsula CHO-S-SFM II. Foram aplicados 10 μ L de cada amostra. Linha 1, meio CHO-S-SFM II (controle negativo). Linha 2, padrões de peso molecular: a, BSA (66 KDa); b, ovalbumina (45 KDa); c, hPRL hipofisária (23 KDa); d, rec-hGH-IPEN (22 KDa); e, mioglobina (17 KDa). Linhas 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 correspondem às coletas do 3^o, 5^o, 7^o, 10^o, 11^o, 12^o e 13^o dia respectivamente. O meio intracápsula foi trocado logo após as coletas do 7^o e 11^o dia.

3.8.3. Identificação da forma 22k mediante seqüenciamento N-terminal

Com o objetivo de identificar essa isoforma de prolactina, uma amostra dessa proteína juntamente com a suposta forma 23k foram purificadas e seqüenciadas na extremidade N-terminal. O resultado confirmou que essa proteína de aproximadamente 22 kDa, é na realidade prolactina humana sem os primeiros 10 aminoácidos, enquanto ficou confirmado que a forma 23K era prolactina humana autêntica (Tabela VIII).

TABELA VIII - Determinação da seqüência N-terminal das formas 23K e 22K de rec-hPRL, secretadas por células CHO, em comparação com a seqüência da prolactina humana ^a.

proteína	seqüência N-terminal ^a															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
PRL humana	L	P	I	C	P	G	G	A	A	R	C	Q	V	T	L	R
Forma 23 K	L	P	I	C	P	G										
Forma 22K											C	Q	V	T	L	R

^a Os aminoácidos são indicados pelo código de letras simples.

3.9. Purificação da hPRL obtida em biorreator

A purificação do produto proveniente do biorreator pode ser dividida em 2 etapas. Na primeira etapa, o material coletado (ca. 40 mL) é aplicado numa coluna de exclusão molecular (Sephacryl S-100). Um perfil desta etapa cromatográfica com a respectiva varredura por RIE é mostrada na Fig. 14A, enquanto uma análise por SDS-PAGE das diferentes frações pode ser vista na Fig. 14B, onde se observa um deslocamento do pico da G-hPRL em relação ao pico da NG-hPRL.

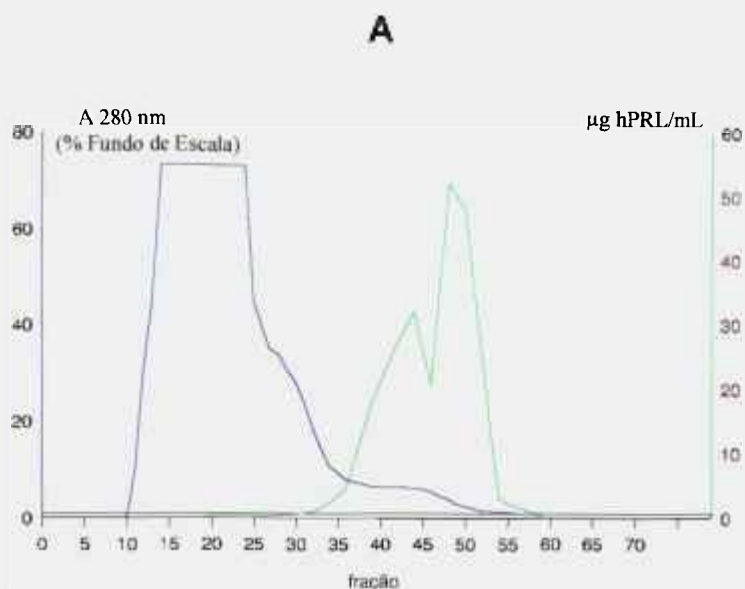


Fig. 14.

A – Perfil da primeira etapa da purificação em coluna de Sephacryl S-100 (70 x 2,6 cm DI, fluxo de 70 mL/h) a partir do produto de biorreator, tendo sido utilizado α -MEM como meio intracapilar. A posição de eluição da hPRL foi confirmada por RIE.

B - Análise em SDS-PAGE, em condições redutoras, mostrando a primeira etapa de purificação de rec-hPRL. Linhas 1-13, frações eluídas da Sephacryl S-100 correspondentes à região de prolactina imunoativa. Linha 14, "pool" das frações eluídas da sephacryl S-100. Linha 15, hPRL hipofisária (600 ng). Linha 16, padrões de peso molecular: a, BSA (66kDa); b, rec-hGH (22 kDa); c, mioglobina (17kDa).

Na segunda etapa de purificação o “pool” coletado da Sephacryl é submetido a uma diálise em tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,0, pepstatina A 2 μ M, seguida de uma incubação “overnight” em solução com 25% de etilenoglicol e 5% de n-butanol e aplicação em coluna de troca catiônica SP-Sepharose High Performance. O perfil desta etapa cromatográfica é mostrado na Fig. 15.

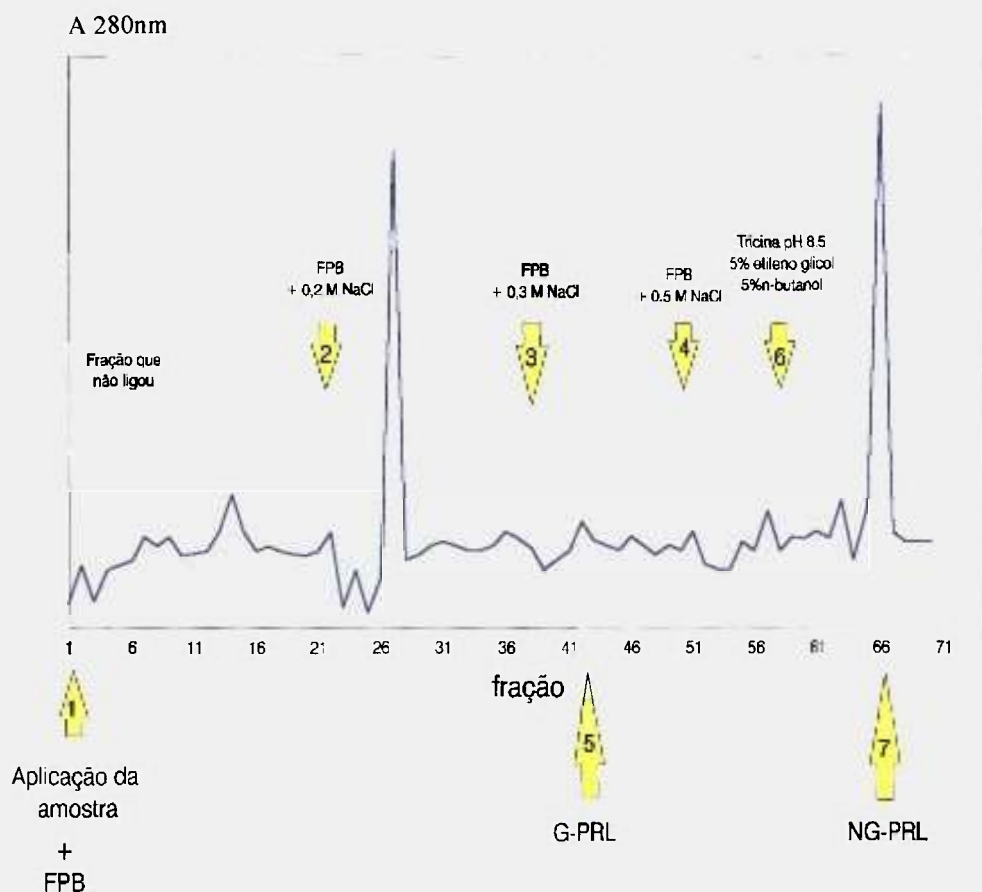


Fig. 15. Segunda etapa da purificação responsável pela separação da G-hPRL e NG-hPRL. Foi utilizada a coluna SP-Sepharose High Performance (23 x 1,6 cm DI, fluxo de 120 mL/h). O “pool” obtido da Sephacryl S-100 foi aplicado nesta coluna após diálise. A primeira lavagem foi feita com tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,0, pepstatina A 2 μ M, 5% de etilenoglicol e 5% de n-butanol (tampão FPB) contendo cloreto de sódio 200 mM para remover contaminantes. A G-hPRL (seta 5) foi eluída com FPB contendo cloreto de sódio 300 mM. A NG-hPRL (seta 7) foi eluída da coluna com tampão tricina 25 mM (pH 8,5), 5% etileno glicol e 5% de n-butanol. As forma G-hPRL e NG-hPRL foram confirmadas por RIE, SDS-PAGE e WB.

A Fig.16 apresenta uma análise por SDS-PAGE e WB das frações obtidas durante este processo de purificação. Percebe-se claramente durante todas as etapas a presença da hPRL₁₁₋₁₉₉ (G e NG), forma essa não observada no meio proveniente da cultura em placas (linha 2).

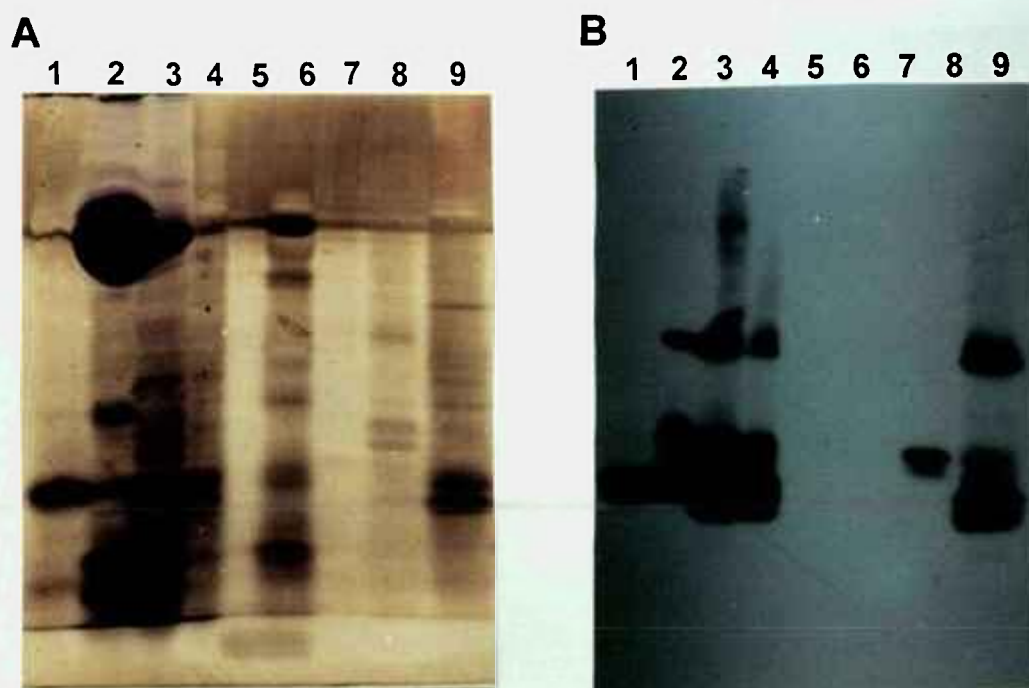


Fig. 16. SDS-PAGE, em condições não redutoras (A) e WB correspondente (B) das frações obtidas durante o processo de purificação do produto obtido em biorreator utilizando α -MEM como meio intracapilar. Linha 1, hPRL hipofisária (200 ng). Linha 2, meio de cultura obtido em placas. Linha 3, meio de cultura obtido no biorreator. Linha 4, pool da Sephacryl S-100. Linhas 5, 6, 7, 8, 9, frações 14, 26, 36, 42 (G-hPRL) e 66 (NG-hPRL) eluidas da SP-Sepharose High Performance.

3.10. Purificação de hPRL obtida em garrafas

3.10.1. Produção em garrafas

Como opção para substituir o biorreator foi testada a produção de prolactina em placas de cultura, que embora menos prática, possui a vantagem de não apresentar a forma hPRL₁₁₋₁₉₉. O meio inicial foi complementado com SFBd (10%) para permitir a melhor adesão das células na placa, este componente sendo retirado após as células atingirem uma confluência de 50%. Foram realizadas coletas diárias, e o material coletado congelado a -80°C . O principal ponto negativo dessa técnica é o grande volume de material necessário para se atingir uma quantidade mínima de prolactina suficiente para poder iniciar a purificação (400 mL de meio para partir com aproximadamente 5 mg de hPRL). A análise por SDS-PAGE deste meio de cultura pode ser observado na Fig. 17 (linha 4), a concentração de hPRL determinada por RIE sendo de 6 $\mu\text{g/mL}$.

3.10.2. Purificação do material obtido em garrafas

A purificação da prolactina obtida em garrafas seguiu em grande parte a mesma metodologia já discutida. A principal alteração foi a introdução de uma coluna de troca catiônica SP-Sepharose Fast Flow como primeira etapa cromatográfica. Nessa coluna a eluição da prolactina foi efetuada com o tampão HEPES 25 mM pH 8,0, com 0,01 % de Tween 80, o que proporcionou uma concentração de 12 a 15 vezes com relação à concentração inicial. Na seqüência foram utilizadas as colunas de Sephacryl S-100 e SP-Sepharose High Performance (SPHP) como descrito anteriormente.

Na Tabela IX, apresentamos o acompanhamento das várias etapas de purificação e os respectivos rendimentos. A recuperação pode ser considerada satisfatória com rendimentos em geral acima de 80% antes da última etapa: separação da G-hPRL e NG-hPRL. Os rendimentos em G-hPRL e NG-hPRL após a última coluna foram relativamente baixos com 3 % e 18 % respectivamente, apresentando porém um mínimo de contaminação recíproca. Na Fig. 17 podemos observar muito claramente a presença da G-hPRL e NG-hPRL no meio de cultura inicial (G-hPRL representa 10,3 % do total), o enriquecimento em prolactina obtido nas duas etapas de purificação e, especialmente, a pureza e total ausência da forma clivada (hPRL₁₁₋₁₉₉) nos dois produtos obtidos. Somente há uma pequena contaminação de G-hPRL no produto final de NG-hPRL, inferior a 0,5 % do total.

Sempre em relação ao meio inicial observamos a alta concentração de prolactina, sobre o total de proteína (linha 4), especialmente neste caso em que não há adição de soro fetal.

TABELA IX - Rendimento das várias etapas de purificação do produto obtido em garrafas utilizando α -MEM com base na análise por SDS-PAGE.

Amostra	Volume do "pool" (mL)	hPRL (μ g /mL)	hPRL total (mg)	Rendimento %
Meio de cultura	610,0	6,0	3,7	100,0
SPFF	32,1	100,0	3,1	85,0
Sephacryl	45,0	62,5	2,8	76,0
SPHP G-PRL	21,0	0,6	0,011	3,0*
SPHP NG-PRL	10,0	60,0	0,6	18,0*

* cálculo com base na quantidade inicial da isoforma presente no meio de cultura (10,3 % de G-hPRL e 89,7 % de NG-hPRL).

Testes realizados utilizando o meio CHO-S-SFM II em garrafas mostraram que, apesar da maior expressão (Tabela VI), durante a purificação na coluna de Sephadryl S-100 a amostra obtida com esse meio apresentou uma pior resolução, comprometendo a sua utilização nestas condições.

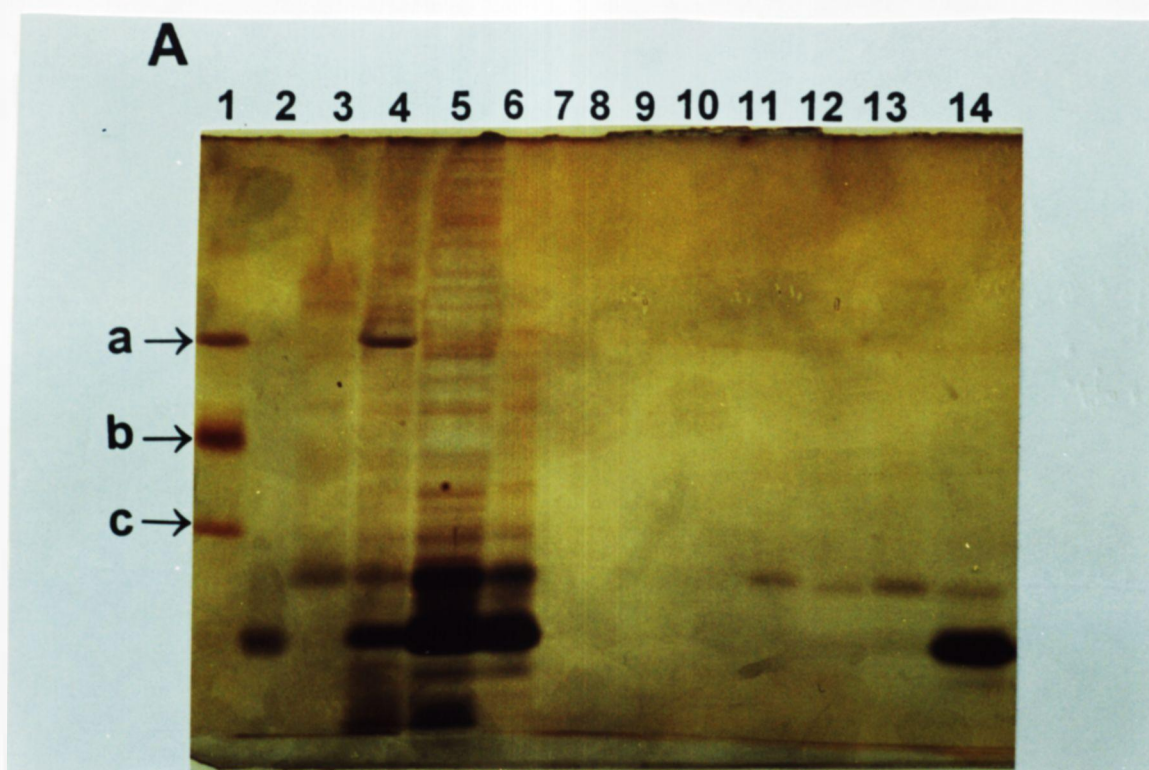


Fig. 17. SDS-PAGE, em condições não redutoras das frações obtidas durante o processo de purificação do material obtido em garrafas utilizando meio α -MEM. Linha 1, padrões de peso molecular: a, BSA (66kDa); b, ovalbumina (45 kDa); c, anidrase carbônica (30kDa). Linha 2, padrão de prolactina hipofisária do NIDDK (200ng). Linha 3, padrão interno de referência de G-hPRL. Linha 4, meio de cultura inicial. Linha 5, "pool" da SP-Sepharose Fast-Flow. Linha 6, "pool" da Sephacryl S-100. Linhas 7, 8, 9 e 10, frações 2, 7, 10, 13 eluidas da coluna SP-Sepharose High Performance (etapas de lavagem). Linhas 11, 12, e 13, frações de eluição da G-hPRL. Linha 14, fração de eluição da NG-hPRL.

3.11. Obtenção da tagPRL

O clone 1 do vetor p658-tagPRL foi o que apresentou a melhor expressão de tagPRL: 3,4 $\mu\text{g}/10^6$ células/dia. Por essa razão foi escolhido para produção em placas de cultura visando a purificação da tagPRL. A metodologia utilizada foi a mesma usada para purificação da tagPRL produzidas em bactérias (51). Apesar de serem realizadas várias tentativas a pureza obtida não foi satisfatória, quanto comparado com a purificação de material obtido de bactérias. Uma proteína com peso molecular próximo ao da albumina é o principal contaminante da tagPRL obtida em CHO, a presença dessa proteína não foi observada na tagPRL purificada proveniente de bactérias (Fig. 18 A).

Um WB das várias etapas de purificação da tagPRL, produzida em CHO também é mostrado (Fig. 18 B).

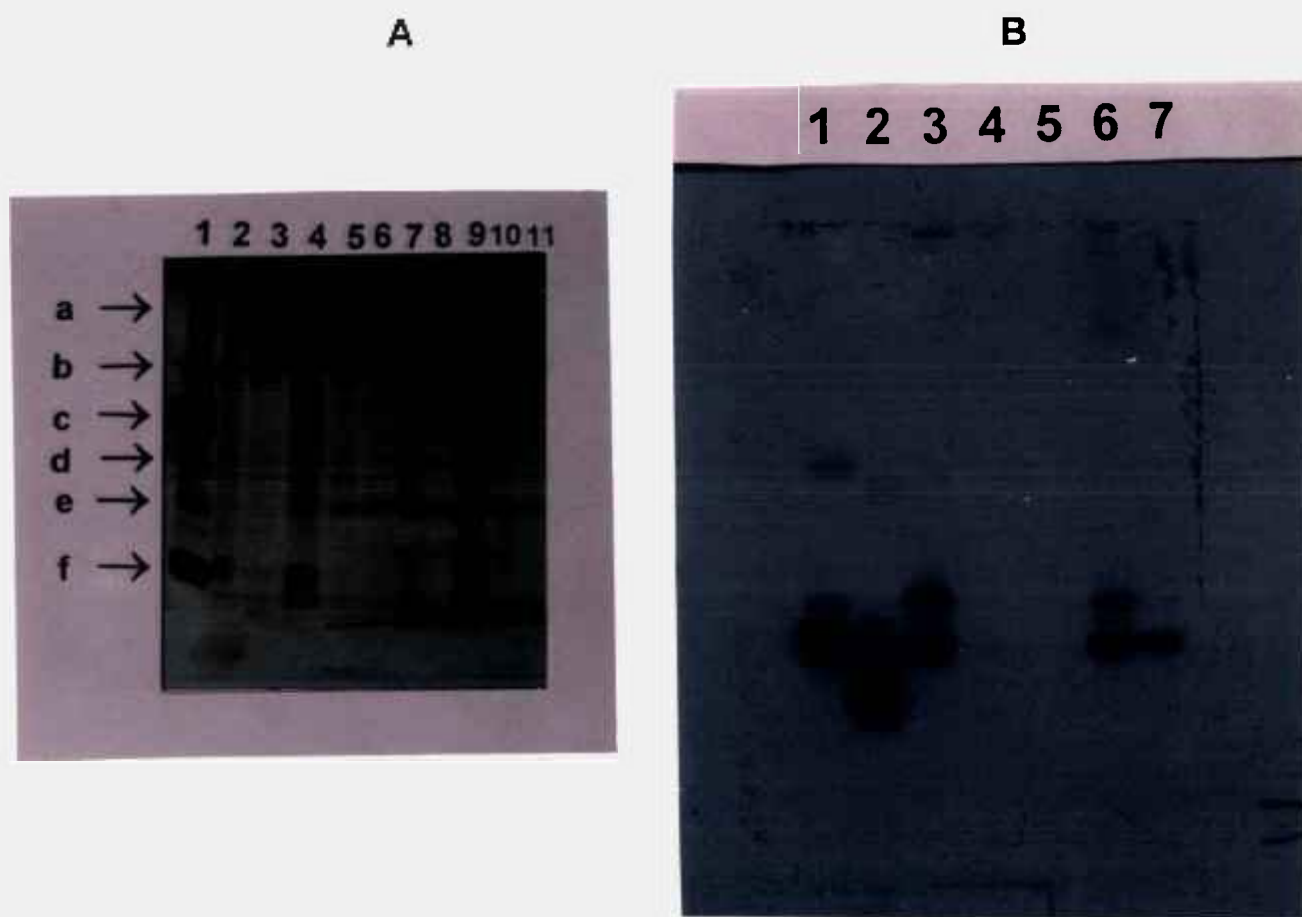


Fig. 18.

A - SDS-PAGE, em condições não redutoras das frações obtidas durante o processo de purificação da tagPRL produzida em CHO (linhas 2 a 6) e em *E. coli* (linhas 7 a 11). Linha 1, padrões de peso molecular; a, fosforilase b (94 KDa); b, BSA (66 KDa); c, ovalbumina (45 KDa); d, anidrase carbônica (30 KDa); e, tagPRL (25 KDa); f, mioglobina (17 KDa). Linha 2 e 7, meio de cultura inicial. Linha 3 e 8, sobrenadante do meio de cultura após incubação com a resina Ni-NTA-agarose. Linhas 4 e 9, solução de lavagem. Linhas 5 e 10, tagPRL eluída com imidazol 100 mM. Linhas 6 e 11, tagPRL eluída com 200 mM de imidazol.

B - WB das frações obtidas durante o processo de purificação da tagPRL produzida em CHO. Linha 1, tag-PRL obtida em bactérias. Linha 2, hPRL hipofisária (100 ng). Linha 3, meio de cultura inicial de CHO. Linha 4, sobrenadante do meio de cultura após incubação com a resina Ni-NTA-agarose. Linha 5, solução de lavagem. Linha 6, tagPRL eluída com imidazol 100 mM. Linha 7, tagPRL eluída com 200 mM de imidazol.

3.12. Caracterização físico-química da prolactina obtida

3.12.1. Análise por HPLC em fase reversa (RP-HPLC)

Uma metodologia que permita uma análise qualitativa e quantitativa de hPRL inclusive em extratos crus está em fase final de padronização em nosso laboratório. A técnica se baseia naquela descrita por Riggin (72) e Dalmora (15) para análise de hGH em HPLC em fase reversa (RP-HPLC). Tanto a PRL como o hGH são proteínas com características similares de alta hidrofobicidade, o que explica o fato de serem retidas com maior afinidade em colunas de separação por fase reversa, facilitando sua resolução da maioria das proteínas contaminantes derivadas da célula hospedeira.

3.12.1.1. Comparação dos tempos de retenção de diferentes prolactinas

A Tabela X compara os tempos de retenção (t_R) dos picos principais de diferentes prolactinas analisadas por HPLC em fase reversa (RP-HPLC). As várias determinações foram realizadas no mesmo dia sendo comparadas com padrões internacionais de hormônio de crescimento humano (hGH) hipofisário e recombinante. Observamos que as amostras de hGH apresentam maior hidrofobicidade e que a NG-hPRL produzida em CHO apresenta t_R similar às outras formas de prolactina humana não glicosilada, com exceção do padrão de PRL-NIDDK que apresenta um t_R menor. Observamos também que as formas glicosiladas são 1,2 a 1,5 vezes menos hidrofóbicas que a correspondente forma não glicosilada. Alguns dos cromatogramas podem ser observados na Fig. 19.

TABELA X – Tempos de retenção (t_R) de diferentes prolactinas analisadas por RP-HPLC e tempos de retenção relativos (t_{RR}) determinados contra o padrão internacional de rec-hGH.

	rec-hGH (WHO)	pit-hPRL (WHO)	pit-hPRL (NIDDK)	pit-hPRL (R)	rec-hPRL (E.coli)	pit-hPRL (N)	rec-hPRL (CHO)	rec-G-hPRL (CHO)	OPRL (Sigma)	G-oPRL (NIDDK)	pPRL (R)	G-pPRL (R)
T_R (min)	32,2	32,3	27,6	30,2	30,7	31,0	30,0	19,9	24,0	19,5	28,1	18,3
T_{RR}	-	1,00	0,85	0,94	0,95	0,96	0,93	0,62	0,74	0,60	0,87	0,57

Abreviações: rec-hGH, hormônio de crescimento humano recombinante; pit-hGH, hormônio de crescimento humano de origem hipofisária; pit-hPRL, prolactina humana hipofisária; rec-hPRL, prolactina humana recombinante; rec-G-hPRL, prolactina humana recombinante glicosilada; oPRL, prolactina ovina; G-oPRL, prolactina ovina glicosilada; pPRL, prolactina porcina; G-pPRL, prolactina porcina glicosilada; WHO, "World Health Organization"; NIDDK, "National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases"; N, produzida na Noruega; R, produzida na Rússia.

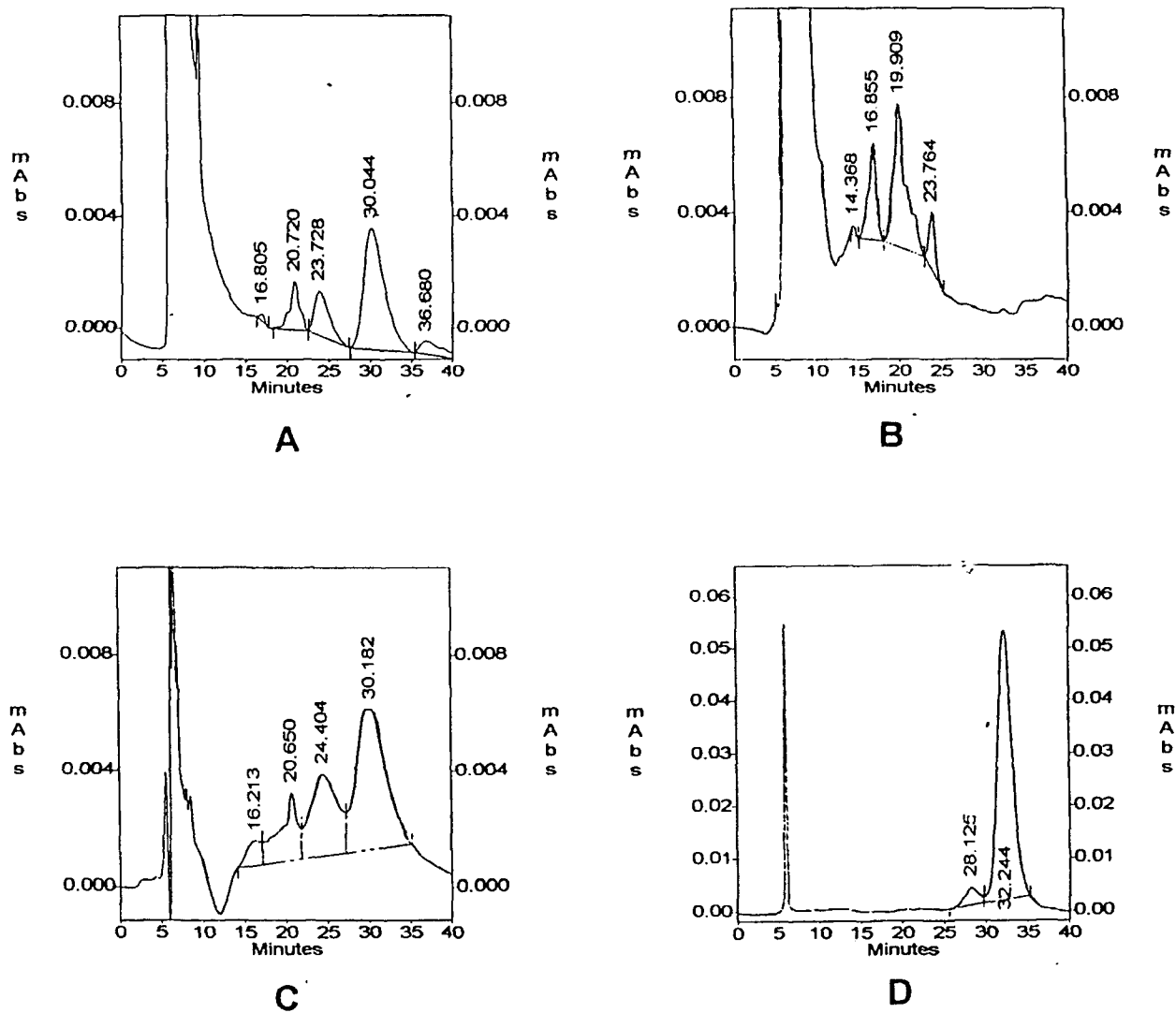


Fig.19. Perfis cromatográficos de diferentes amostras de prolactina humana analisadas por RP-HPLC, em comparação com o padrão de rec-hGH.

- A. NG-hPRL produzida em células CHO.
- B. G-hPRL produzida em células CHO.
- C. hPRL hipofisária, (R).
- D. hGH recombinante

3.12.1.2. Análise em RP-HPLC de diferentes formas de rec-hPRL obtidas em células CHO

Uma amostra de prolactina derivada de CHO, após concentração na coluna de SP-Sepharose Fast-Flow foi analisada por HPLC em fase reversa. Frações correspondentes aos picos obtidos foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE, revelando com nitrato de prata (Fig. 20). O pico principal resultou ser a forma NG-hPRL, confirmada por SDS-PAGE e também pelo t_R , do padrão. Os outros picos menores e com menor t_R correspondem provavelmente a variantes de glicosilação, sendo que formas desamidadas ou sulfoxidadas, que são resolvidas pela RP-HPLC, não o seriam na SDS-PAGE. No mesmo cromatograma indicamos o t_R teórico da preparação controle de referência de G-hPRL, que resultou coincidente com o t_R de P2.

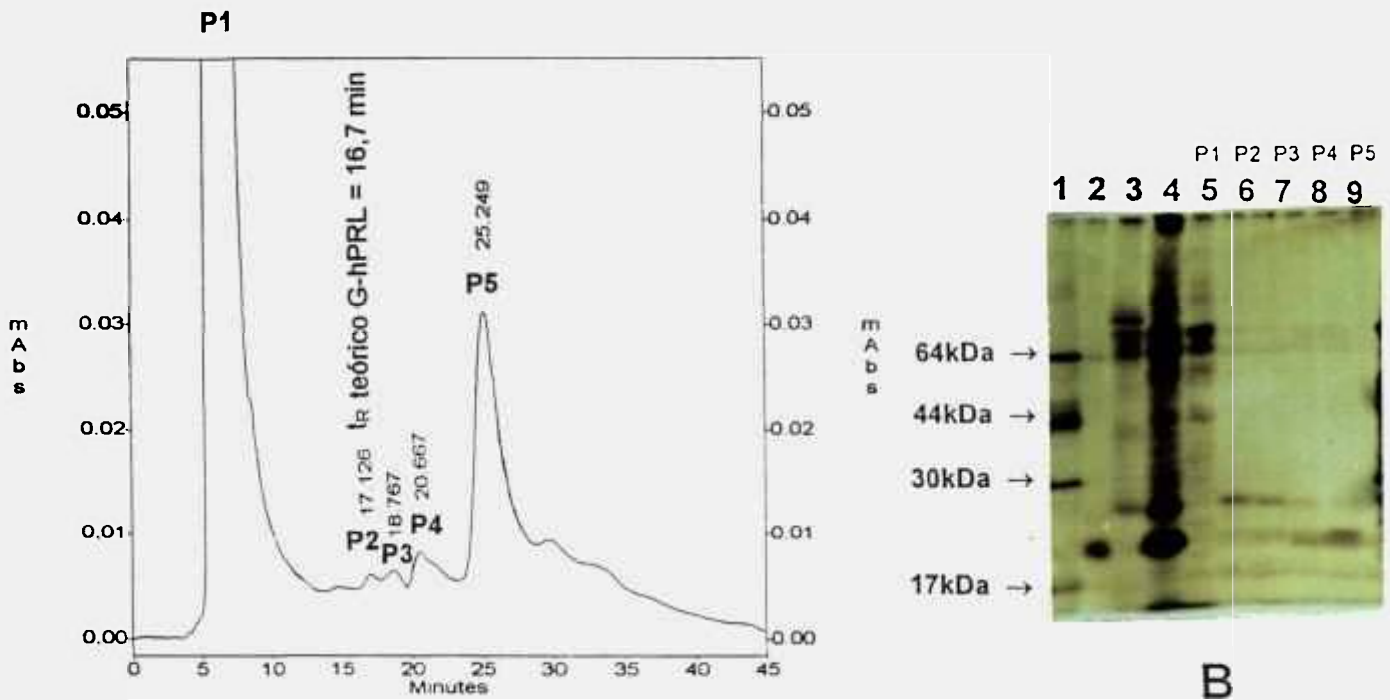


Fig. 20.

A. Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC de hPRL sintetizada em células CHO. Foram aplicados 200 μ L do "pool" obtido da coluna SP-Sepharose Fast-Flow. O pico principal (P5) apresentou t_r similar ao do padrão de NG-hPRL (24,6 minutos).

B. SDS-PAGE em condições não redutoras revelada com nitrato de prata. Linha 1, padrões de peso molecular; linha 2, padrão de Pit-hPRL do NIDDK (200 ng); linha 3, padrão interno de referência da G-hPRL; linha 4, hPRL produzida em CHO, concentrada em SP-Sepharose Fast-Flow; linhas 5, 6, 7, 8 e 9 correspondem aos picos P1, P2, P3, P4 e P5 da Fig. 20A.

3.12.2. Análise por HPLC de exclusão molecular (HPSEC)

A análise por exclusão molecular de uma amostra purificada de NG-hPRL secretada por células CHO transfectadas é mostrada na Fig. 21A. O pico principal com t_R de 15,87 minutos é um pouco maior que aquele observado para o hGH-rec ($t_R = 14,9$ minutos). Embora a maior parte da área observada represente a forma monomérica da hPRL, podemos observar um pico com t_R de 11,75 minutos (posição inespecífica dos agregados) correspondente a 13,7 % da área total. Essa possível forma agregada de PRL pode ser resultado do congelamento e das condições de armazenamento da amostra.

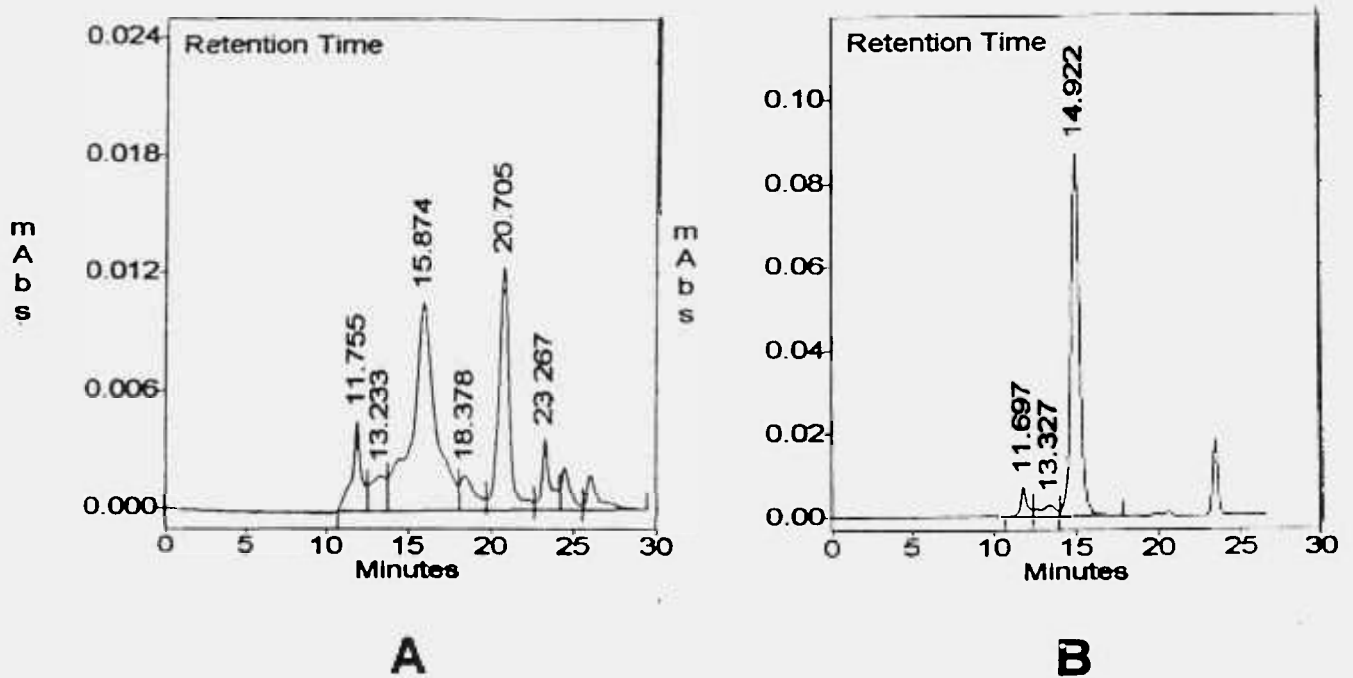


Fig. 21. Perfil cromatográfico de amostras analisadas por HPSEC.

A - NG-hPRL

B - hGH-rec.

3.13. Determinação da atividade biológica “in vitro” de G-hPRL, NG-hPRL e tagPRL

A avaliação da atividade biológica da G-hPRL e da NG-hPRL foi realizada mediante o bioensaio “in vitro” que utiliza células de linfoma de rato, Nb2. Foi utilizado o padrão internacional de Pit-hPRL (WHO 84/500) com atividade específica declarada de 21,2 UI/mg. Com base na quantificação realizada por RIE, a atividade da NG-hPRL resultou ser de $34,7 \pm 8,4$ UI/mg ($n = 3$ ensaios independentes) enquanto que a G-hPRL apresentou aproximadamente 47 % desta atividade (Tabela XI). Um exemplo de curvas obtidas em um ensaio típico é mostrado na Fig. 22. Amostras não purificadas de rec-hPRL (NG-hPRL + G-hPRL) e rec-tagPRL, obtidas diretamente do meio de cultura, também foram analisadas e apresentaram 29,1 e 40,3 UI/mg respectivamente.

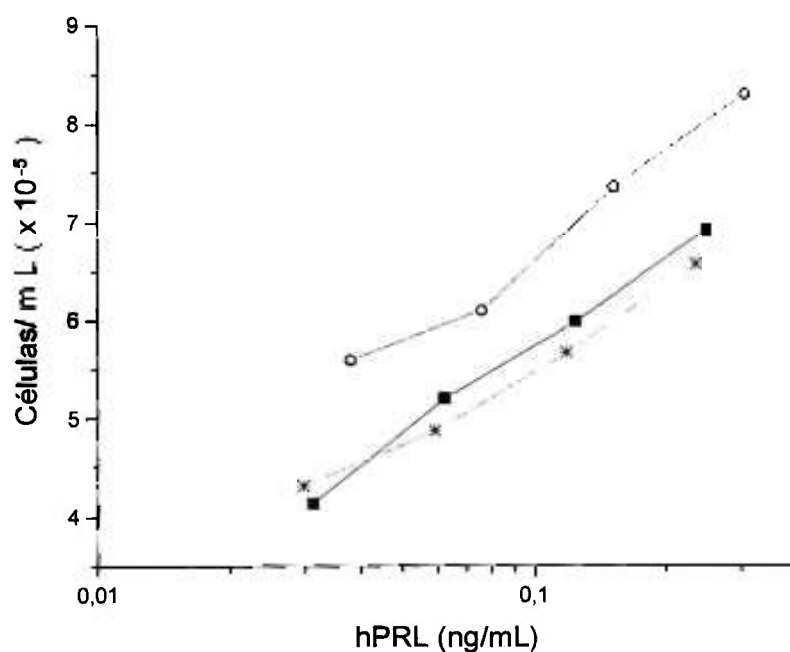


Fig. 22. Exemplo de um ensaio “in vitro” baseado em células Nb2. São comparadas as curvas da NG-hPRL (○), G-hPRL (*) e do padrão internacional de pit-hPRL (WHO 84/500) (◆).

TABELA XI - Determinação da atividade biológica realizada mediante o bioensaio "in vitro" com células de linfoma de rato, Nb2. Foi utilizado o padrão internacional de Pit-hPRL (WHO 84/500) quantificando a prolactina presente por RIE.

amostra analisada	1 ^o ensaio	2 ^o ensaio	3 ^o ensaio	valor médio (UI/mg ± CV)
	UI/mg			
NG-hPRL(purificada)	44,0	32,5	27,7	34,7 ± 24,1 %
G-hPRL (purificada)	18,4	20,7	10,5	16,6 ± 32,4 %
tagPRL (meio de cultura)	48,2	32,2	-	40,3 ± 28,1 %
hPRL (meio de cultura)	32,9	25,3	-	29,1 ± 18,4 %

4. DISCUSSÃO

Altos níveis de expressão de hPRL recombinante foram obtidos pela primeira vez em células CHO, utilizando dois vetores com diferentes mecanismos de seleção e que apresentam como característica comum a utilização do gene da enzima dhfr como marcador de seleção. Foram desenvolvidos três sistemas de expressão, um baseado no vetor pEDdc (pEDdc-hPRL), que secreta hPRL e outros dois baseados no vetor p658, que secretam hPRL (p658-hPRL) e tagPRL (p658-tagPRL).

A principal característica do vetor p658 é permitir um rápido isolamento de linhagens celulares altamente produtivas sem a necessidade de amplificação com MTX, possibilitando economia de tempo e redução de gastos com material e mão de obra. Por outro lado, a alta produtividade do pEDdc, um vetor de expressão dicistrônico que também possibilita altos níveis de expressão, depende do sucesso de uma amplificação gênica que é freqüentemente demorada e trabalhosa. O desempenho dos vetores foi confirmado experimentalmente e a secreção de hPRL pelos clones mais produtivos de cada construção foi a mais alta já reportada na literatura para essa proteína em células de mamífero, comprovando a viabilidade da utilização desses clones num processo de produção.

O primeiro estudo realizado consistiu em transfecção transiente, um ensaio recomendado para avaliação inicial da expressão, devido à sua rapidez, reprodutividade e eficiência. Os resultados confirmaram a síntese de prolactina imunologicamente ativa nos três casos e permitiram também a primeira comparação entre as construções. Os vetores p658-hPRL e p658-tagPRL apresentaram porém, expressões muito superiores ao pEDdc-hPRL, da ordem de 70 e 25 vezes respectivamente. A transfecção permanente também confirmou, já na etapa de seleção, o grande potencial de expressão do vetor p658 sem a necessidade da amplificação gênica.

O vetor pEDdc-hPRL, por outro lado, mostrou um aumento significativo na secreção de hPRL durante as sucessivas etapas de amplificação com MTX, sendo

obtidos níveis de secreção 40-50 vezes superiores aos valores iniciais, enquanto o vetor p658-hPRL praticamente não respondeu à amplificação. A etapa de amplificação com MTX 200 nM não apresentou em geral aumento significativo na produção de hPRL. Esse resultado, somado ao fato da célula se desenvolver melhor com concentração menor de MTX, influenciou na escolha da concentração de 100 nM de MTX como sendo a mais adequada para prosseguir o trabalho. O clone escolhido para os primeiros estudos em biorreator e para determinação da porcentagem da forma glicosilada foi o número 18 derivado do vetor pEDdc-hPRL obtido na presença de MTX 100 nM, um dos clones mais produtivos e melhor adaptado ao crescimento neste meio.

De acordo com a literatura somente três trabalhos estão direcionados à produção de PRL em células de mamífero, dois relativos à PRL humana (30, 67) e um às prolactinas de macaco e babuíno (13). Os dois primeiros não forneceram nenhum dado relacionado com os níveis de expressão ou de secreção; o terceiro reportou uma expressão de PRL de símio (sPRL) obtida em células murinas da linhagem C127 e medida por RIE, da ordem de 1-2 $\mu\text{g/mL/dia}$. Ressaltando que o melhor parâmetro para comparar os níveis de expressão de diferentes linhagens celulares é, ao nosso ver, a produtividade celular e não a concentração da proteína de interesse. As informações fornecidas por Cole e cols. sugerem que a expressão de sPRL é claramente inferior àquela relativa à PRL humana obtida com o presente sistema de células CHO.

A transfecção de células CHO com vetores de expressão para hPRL, além da obtenção de um alto nível de secreção da proteína de interesse, apresenta uma série de outras vantagens como a ausência de outros hormônios hipofisários que, contaminando o produto purificado, podem reagir de forma inespecífica com anticorpos anti-PRL e com receptores. Outra vantagem é a sua secreção na forma autêntica e diretamente no meio de cultura, o que simplifica o processo de extração e purificação e a preservação de todos os mecanismos pós-traducionais (ex.: glicosilação), o que não ocorre nos sistemas de expressão em procariotos. No caso

de CHO é amplamente aceito que essas células sintetizam glicoproteínas cuja estrutura de carboidrato é bastante similar àquela do hormônio humano nativo (101). Lembramos a esse respeito que a prolactina é um modelo de proteína ideal para ser usado neste tipo de estudo porque exhibe o tipo mais simples de heterogeneidade de glicosilação possível: uma população de moléculas N-glicosiladas em um único sítio (Asp³¹-Leu-Ser-Ser) e outra população de moléculas não glicosiladas (77). De fato, a principal modificação pós-traducional da hPRL é a glicosilação e esta afeta profundamente a atividade do hormônio. A porção de carboidrato da G-PRL parece exercer uma importante ação na biossíntese, secreção, atividade biológica, e na depuração plasmática ("clearance") do hormônio (79).

Nas condições de cultura aqui apresentadas, a porcentagem de G-hPRL secretada pelas células CHO foi estimada com uma boa aproximação. Todas as determinações foram realizadas por densitometria em SDS-PAGE e a visualização das bandas foi possível graças à alta sensibilidade da revelação por nitrato de prata (94), um método que evita o tão bem conhecido "bias" introduzido por metodologias baseadas na diferente imunoreatividade da NG-hPRL e G-hPRL (ex.: WB ou imunensaio). Além disso, foram evitadas perdas seletivas de uma das duas isoformas de PRL que podem ocorrer durante o processo de purificação, pois a análise foi realizada diretamente no meio de cultura após um número mínimo de operações. A porcentagem da G-hPRL recombinante secretada pela nossa linhagem de células CHO transformadas (10,3%) é incluída no amplo intervalo descrito para G-hPRL de origem hipofisária (31, 67, 65, 78), sendo um pouco menor que aquelas determinadas para a linhagem de célula murina C127, 13% (77) e 14% (67). Já Hirooka e cols. obtiveram um valor significativamente superior: 17-18% de G-hPRL secretada por uma linhagem análoga de células CHO (30).

A padronização da referida técnica de determinação de G-hPRL possibilita também a avaliação de possíveis flutuações na porcentagem desta forma em função da presença de diferentes nutrientes no meio de cultura ou até mesmo de diferentes condições de biorreação, sendo portanto importante ferramenta para futuros estudos da secreção de hPRL e suas isoformas.

Embora a G-hPRL possua a mesma seqüência de aminoácidos da NG-hPRL, ela mostra menor atividade imunológica, de ligação ao receptor e biológica, com relação à forma NG-hPRL (27, 47, 65, 79). Esta diminuição de atividade pode ser resultado da interferência provocada pela sua porção de carboidrato ligada à Asp³¹ na ligação do hormônio aos anticorpos e aos receptores envolvidos (10). Em nossos estudos a bioatividade da G-hPRL purificada, com base no ensaio mitogênico "in vitro" com células Nb2 foi de 47,5% relativamente à NG-hPRL. Isto confirma dados da literatura para hPRL hipofisária (31, 65), mas é maior que o valor determinado por Price e cols. para G-hPRL secretada em células C127. Deve ser lembrado, entretanto, que a maioria desses dados de bioatividade, incluindo os nossos, são baseados na imunoreatividade da G-hPRL e NG-hPRL, um tipo de quantificação que apresenta grande "bias" e necessita ser reavaliada (47).

A padronização de um método de HPLC em fase reversa (RP-HPLC) foi realizada para comparar os tempos de retenção (t_R) de amostras de PRL de diferentes origens. Observamos a esse respeito que a NG-hPRL produzida em CHO apresenta t_R similar às outras formas de prolactina humana não glicosilada, naturais ou recombinantes, incluída a hPRL de origem bacteriana, com exceção do padrão de hPRL-NIDDK que apresentou um t_R menor. Essa técnica também pode ser útil na análise qualitativa da forma glicosilada, conforme foi mostrado na Fig. 20, onde a RP-HPLC mostra além do pico principal correspondente à forma NG-hPRL, outros picos menores e com menor t_R , provavelmente derivados da G-hPRL. Os diferentes t_R podem ser justificados pela existência de variantes da forma glicosilada. Essas variantes poderiam representar diferentes tipos de glicosilação, ou formas desamidadas (e/ou sulfóxidos) de uma mesma forma glicosilada. Essa última possibilidade parece ser menos provável, já que alterações equivalentes e na mesma proporção não são observadas para NG-hPRL, que está presente em proporção bem maior (Fig. 20).

A existência de formas heterogêneas de G-hPRL tem sido relatada por vários autores. Duas formas de G-hPRL extraídas de hipófises e separadas por cromatografia por afinidade utilizando Concanavalina A (Con A), foram relatadas por

Lewis (47): os 2 tipos de G-hPRL mostraram ter diferentes atividades no bioensaio de papo de pombo. De forma similar, duas isoformas de G-hPRL, diferindo na afinidade de ligação à Con A, apresentaram atividades distintas em ensaio de ligação ao receptor (27). Também tem sido mostrado que duas isoformas de G-hPRL isoladas de prolactinoma e separadas por cromatografia por Con A promoveram diferentes atividades de crescimento no bioensaio Nb2 (31). Price e cols. (67) detectaram pelo menos quatro sub-populações de G-hPRL recombinante produzida em células C127.

Resultados preliminares em biorreatores do tipo “hollow fiber” foram obtidos utilizando fundamentalmente o meio α -MEM. Durante os primeiros dias o meio extracapilar, que tem contato direto com as células, foi suplementado com 10% de SFBd, para um crescimento mais eficiente.

Foram necessários cerca de 12 dias para os valores máximos de crescimento e produção serem atingidos, porém a existência de espaços vazios no cartucho sugeriu que esse meio, embora suficiente para a produção da proteína recombinante, não é o ideal. Durante a produção o suplemento de SFBd é retirado para facilitar a posterior purificação. Observou-se que com o passar dos dias a produção de prolactina diminuía: esse problema foi minimizado alternando-se um período de no máximo cinco dias sem SFBd e dois dias com SFBd (Fig. 4). Nessas condições foi atingida uma produção média de 2 mg hPRL por dia, com concentrações da ordem de 200 a 300 μ g de hPRL/mL, ou seja 30 vezes maiores, quando comparadas com placas de cultura que utilizam o mesmo meio.

A análise por SDS-PAGE sem redução de amostras derivadas do biorreator mostrou uma banda intensa logo abaixo da NG-hPRL. Essa banda imunoativa, com aproximadamente o mesmo peso molecular do hGH (22 kDa) cuja presença foi detectada somente após o 3^o dia de funcionamento do biorreator, foi inicialmente denominada forma 22K de hPRL. Essa proteína apresenta características físico-químicas muito semelhantes às da prolactina íntegra, fato comprovado pela sua presença mesmo após várias etapas de purificação, o que torna muito difícil a sua

separação. Uma variante análoga correspondente à forma glicosilada também foi observada.

Após purificação e seqüenciamento N-terminal dos 6 primeiros aminoácidos identificou-se uma prolactina clivada com 10 aminoácidos a menos, portanto sem a alça correspondente à ponte dissulfeto N-terminal, passando a ser denominada de hPRL₁₁₋₁₉₉. Curiosamente, esta alça compreende uma região altamente conservada que está presente na maioria das prolactinas, com exceção daquelas encontradas em alguns peixes. Uma forma similar à hPRL₁₁₋₁₉₉, sem alça N-terminal foi descrita pela primeira vez por Cole e cols. (13) na produção de PRL de macaco e babuíno em biorreator, utilizando células C127. Uma hipótese sobre a influência dessa alça foi levantada por Rhee (68). Esse autor examinou a atividade biológica e imunológica de quatro mutantes de hPRL. Um deles, o mutante des(3-11)-PRL, o qual teve a alça removida, apresentou propriedades imunológicas e biológicas reduzidas de 10 e 8 vezes respectivamente, sugerindo que essa região foi conservada por ser necessária para a atividade biológica. Por analogia com o hGH o autor sugere que essa alça pode fazer parte do sítio 2 de ligação ao receptor da PRL. Em contraposição, esse mesmo autor menciona estudos envolvendo prolactina ovina, bovina ou de rato onde a influência dessa região sobre a atividade biológica resultou ser menos significativa e cita trabalhos onde alterações em um único aminoácido em outras regiões pode reduzir a atividade biológica em até 100 vezes.

Em outro estudo, Morin e cols. (57) analisaram os efeitos de uma mutação (C4S) em prolactina de rato. A perda da ponte dissulfeto N-terminal resultou em um incremento de 50% na taxa de secreção de rPRL em células transformadas de uma linhagem hipofisária de rato, sugerindo uma ação da mesma alça N-terminal no trânsito intracelular e na estocagem do hormônio. Estas simples informações derivadas da literatura já sugerem que esta forma pode ser interessante para futuros estudos e aplicações.

O meio CHO-S-SFM II, mais apropriado para biorreatores (25, 26, 76, 95), foi utilizado na tentativa de impedir a formação da hPRL₁₁₋₁₉₉. Os resultados desse estudo mostraram que esta forma alterada continuou sendo produzida mesmo nesse

novo meio e, como foi observado com o meio α -MEM, a hPRL₁₁₋₁₉₉ começou a surgir após o 3^o dia de funcionamento do biorreator.

Além de Cole e cols. também Shelikoff e cols. (77) observaram o aparecimento dessa forma durante o processo de purificação de PRL, relatando que esta foi detectada após incubação do sobrenadante sem células por 5 dias. Nesse caso a cultura de células C127 tinha sido realizada em placas. Em nossos estudos a forma clivada foi observada somente no meio de cultura de biorreatores, não tendo evidências de sua produção em placas. A razão da presença dessa isoforma somente em biorreator ainda não foi esclarecida. Pode ser devida provavelmente a alguma degradação enzimática potencializada pelas condições do biorreator que favorecem a obtenção de altas concentrações de células (e provavelmente de enzimas) e de substrato (hPRL). Observou-se que logo após a troca do meio intracápsular a porcentagem da hPRL₁₁₋₁₉₉ tende a ser menor. Isso sugere que talvez uma troca mais freqüente desse meio possa eliminar ou atenuar significativamente a produção dessa isoforma. Mudanças nas condições experimentais para melhorar a produção e pureza da rec-hPRL gerada no biorreator estão atualmente sendo investigadas.

Shelikoff e cols. também demonstraram que a presença de PMSF (um inibidor enzimático) em condições ácidas inibe a formação da forma clivada, sugerindo que a clivagem é realizada por uma protease (classe "serina") extracelular que utiliza como possível substrato o sítio Arg-10/Cys-11, como mostrado por Cole e cols. (13, 77). No entanto, a possibilidade da utilização de algum inibidor enzimático ou de diferentes condições de pH para inibir essa clivagem exige estudos que avaliem sua influência no crescimento celular e/ou na secreção da proteína recombinante de interesse.

É interessante observar que essa forma clivada foi obtida em diferentes células de mamífero (C127 e CHO) e em PRL de diferentes espécies (sPRL e hPRL), no entanto não temos conhecimento da sua descrição em amostras produzidas em *E. coli*.

Considerando que várias atividades atribuídas à prolactina são resultado da ação isolada ou combinada de suas diferentes isoformas, a hPRL₁₁₋₁₉₉, embora apareça como um subproduto indesejável na produção da rec-hPRL, pode ter um

interesse próprio. No entanto ainda não temos informação de nenhuma ação fisiológica relevante que tenha sido atribuída a essa forma.

Como opção ao biorreator foi realizada a produção de prolactina em placas, que embora seja menos prática, apresenta como vantagem a ausência da isoforma hPRL₁₁₋₁₉₉. No entanto, devido à baixa concentração em prolactina, um grande volume de material é necessário para iniciar a purificação, resultando em um processo mais difícil e trabalhoso.

Foram desenvolvidas basicamente duas metodologias de purificação, uma para as amostras obtidas em biorreator e outra para as amostras coletadas a partir de placas. A diferença básica entre elas é uma etapa adicional inicial no caso do material derivado de placas, que consiste em uma coluna de troca catiônica cuja função principal é concentrar o material.

A última etapa da purificação demonstrou ser eficiente na separação das formas NG-hPRL e G-hPRL, uma tarefa complexa devido à semelhança entre essas duas moléculas. O uso de etileno glicol e n-butanol nos tampões de purificação foi fundamental na dissociação dessas proteínas, resultando em G-hPRL e NG-hPRL com mais de 95% de pureza, o que permitiu a caracterização dessas duas formas.

A recuperação em hPRL total foi altamente satisfatória com rendimentos da ordem de 80,0%. No entanto, após a separação das duas isoformas verificamos que a recuperação foi muito baixa, com a forma glicosilada apresentando uma recuperação ainda menor com relação a NG-hPRL. A diferença acentuada nos rendimentos de G-hPRL e NG-hPRL, pode ser devida à pequena quantidade inicial da G-hPRL (ca. 10 vezes menos), o que dificulta sua recuperação durante o processo de purificação. Outra causa seria a eliminação proposital das frações contaminadas com a isoforma NG-hPRL, o que proporciona de fato as maiores perdas. Outra possibilidade é que a glicosilação deixe a proteína mais vulnerável a ação de proteases, contribuindo assim para a sua maior instabilidade (79).

A pureza da rec-hPRL (NG-hPRL e G-hPRL) avaliada por SDS-PAGE mostrou-se satisfatória. O mesmo não podemos dizer com relação à tagPRL. Esse resultado sugere que a metodologia para a purificação desta última forma precisa ser

aperfeiçoada. De fato, proteínas que contém seqüência de histidina não são comuns em bactérias, mas são abundantes em células de mamífero. Como consequência, para produtos derivados de células eucarióticas pode ser necessário intensificar o rigor das lavagens durante a separação por cromatografia de afinidade que utiliza o níquel como quelante. Isto pode ser feito por diminuição gradual do pH do tampão de lavagem, ou por um lento aumento da concentração de imidazol. O pH ou a concentração de imidazol tolerada antes de iniciar a eluição varia levemente para cada proteína e devem ser determinados empiricamente (33).

Com base nos resultados obtidos podemos afirmar que a síntese e purificação da rec-hPRL e de suas isoformas a partir de células CHO transformadas possibilita sua utilização como um reagente insubstituível em várias pesquisas sobre a relação estrutura-função, a interação com o receptor, e as várias ações fisiológicas deste hormônio. Lembramos também sua ampla utilização em campo diagnóstico "in vitro" que não pode depender do produto hipofisário e, como amplamente mencionado na "Introdução", sua potencial aplicação em várias áreas terapêuticas atualmente em fase de estudo e experimentação.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram a eficiência de expressão das três construções realizadas que secretaram hPRL e tagPRL biologicamente ativas. Pela primeira vez é descrita a expressão e purificação deste hormônio a partir das células CHO.

Dos clones obtidos, os que apresentaram maiores níveis de expressão de hPRL foram aqueles derivados do vetor pEDdc-hPRL, após amplificação com MTX. Os valores de secreção encontrados foram os mais altos já relatados para prolactina humana em células de mamíferos. É importante salientar que os clones obtidos com o vetor p658-hPRL, apesar de apresentarem menores rendimentos, possuem a vantagem da obtenção de bons níveis de expressão em um tempo relativamente curto, visto que não é necessário a amplificação, poupando trabalho e gasto de material.

A purificação de rec-hPRL (G-hPRL+NG-hPRL) apresentou resultados satisfatórios e altos rendimentos. Foram obtidas as formas G-PRL e NG-PRL, altamente purificadas, mesmo sendo os rendimentos, destas duas isoformas, relativamente baixos.

Foi padronizada a produção de prolactina humana em biorreator. A experiência adquirida na utilização desse equipamento com certeza será útil na expressão dessa e de outras glicoproteínas recombinantes a serem produzidas no laboratório. O biorreator tipo "hollow fiber" comprovou ser eficiente e prático para obtenção de quantidades relativamente altas de hPRL, mesmo considerando a utilização do meio α -MEM. A produção de prolactina utilizando o meio ideal para biorreator (CHO-S-SFM II) não apresentou melhoras significativas e a forma hPRL₁₁₋₁₉₉ também continuou sendo produzida. Parece claro que a produção em biorreator

facilita a formação dessa forma clivada de prolactina. Estudos estão sendo realizados para eliminar esta forma, quando indesejada, talvez utilizando inibidores enzimáticos. A análise de coletas consecutivas obtidas do biorreator mostrou que essa forma tende a diminuir quando a coleta é realizada logo após a troca do meio intracapilar, sendo essa uma informação importante para um posterior estudo sobre sua eliminação total ou parcial. Uma alternativa menos prática, mas temporariamente útil, é o cultivo em garrafas ou placas, onde não se observou a formação da hPRL₁₁₋₁₉₉.

Os primeiros estudos realizados por RP-HPLC demonstraram que essa técnica pode ser muito útil na identificação de diferentes formas glicosiladas, sem mencionar a possibilidade de realizar uma análise qualitativa e quantitativa da hPRL nas diferentes fases do processo de purificação, incluindo o meio inicial, ainda altamente heterogêneo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AMORESANO A.; SICILIANO, R.; ORRÙ, S.; NAPOLEONI, R.; ALTAROCCA, V.; DE LUCA, E.; SIRNA, A.; PUCCI, P. Structural characterization of human recombinant glyco hormones follitropin, lutropin and choriogonadotropin expressed in Chinese hamster ovary cells. **Eur. J. Biochem.**, v.242, p. 608-618, 1996.
2. BARTOLINI, P.; DIAS, L.M.F.; MURATA, Y. Produção do hormônio de crescimento humano por técnicas de DNA-recombinante. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 45, p. 241-243, 1990.
3. BELLINI, M.H.; MATHOR, M.B.; DE LUCA, M.; CANCEDDA, R.; BARTOLINI, P. Ultrasensitive in vivo bioassay detects bioactive human growth hormone in transduced primary human keratinocytes. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 21, p. 1-6, 1998.
4. BEM-JONATHAN, N.; MERSHON, J.L.; ALLEN, D.L.; STEINMETZ, R.W. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. **Endocr. Rev.**, v.17, p. 639-669, 1996.
5. BENJAMIN, L.; Genes IV. New York, N.Y.: Oxford University Press, p. 975-978, 1997.
6. BLACKWELL, R.E. Diagnosis and management of prolactinomas. **Fertil. Steril.**, v. 43, p.5-16, 1985.
7. BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERY, M.; BINART, N.; KELLY, P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocr. Rev.**, v.19, p. 225-268, 1998.
8. BOLLENGIER, F; MAHLER, A.; MATTON, A.; VANHAELST, L. Molecular heterogeneity and glycosylation modulation of rat pituitary prolactin isoforms synthesized and secreted in vitro in postnatal ontogeny, gestation, lactation and weaning. **J. Neuroendocrinol.**, v. 8, p. 721-730, 1996.
9. BURNETTE, W.N. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, v. 112, p. 195-203, 1981.

* De acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT), Referências bibliográficas: NBR-6023, Rio de Janeiro, 1989.

10. BUTNEV, V.Y.; GOTSCHALL, R.R.; BAKER, V.L.; MOORE, W.T.; GOUT, P.W.; BOUSFIELD, G.R. Glycosylated equine prolactin and its carbohydrate moiety. **J. Prot. Chem.**, v.15, p. 413-426, 1996.
11. CLAPP, C.; MARTIAL, J.A.; GUZMAN, R.C.; RENTIER-DELRUE, F.; WEINER, R.I. The 16-Kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. **Endocrinology**, v. 133, p. 1292-1299, 1993.
12. CLARKE, W.C.; BERN, H.A. Comparative endocrinology of prolactin. In: Li CH (ed) **Hormonal Proteins and Peptides**, Academic Press, New York, v. 8, p.105-197, 1980.
13. COLE, E.S.; NICHOLS, E.H.; LAUZIERE, K.; EDMUNDS, T.; MCPHERSON, J.M. Characterization of the microheterogeneity of recombinant primate prolactin: implications for posttranslational modifications of the hormone in vivo. **Endocrinology**, v. 129, p. 2639-2646, 1991.
14. COOKE, N.E. Prolactin: normal synthesis, regulation and actions. In: De Groot LJ (ed) **Endocrinology**, Sanders, Philadelphia, p. 384-407, 1989.
15. DALMORA, S.; OLIVEIRA, J.E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **J. Chromatogr.**, v. 782, p. 199-210, 1997.
16. D'ANGELO, G.; MARTINI, J.F.; LIRI, T.; FANTL, W.J.; MARTIAL, J.; WEINER, R.I. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of ras in capillary endothelial cells. **Mol. Endocrinol**, v. 13, p. 692-704, 1999.
17. D'ANGELO, G.; STRUMAN, I.; MARTIAL, J.; WEINER, R.I. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 6374-6378, 1995.
18. FOUSSER, L.A.; SWANBERG, S.L.; LIN, B.Y.; BENEDICT, M.; KELLCHER, K.; CUMMING, D.A.; RIEDEL, G.E. High level expression of a chimeric anti-ganglioside GD-2 antibody: genomic kappa sequences improve expression in COS and CHO cells. **Bio/Technology**, v. 10, p. 1121-1127, 1992.
19. FRIEDMAN, J.S.; COFER, C.L.; ANDERSON, C.L.; KUSHNER, J.A.; GRAY, P.P.; CHAPMAN, G.E.; STUART, M.C.; LAZARUS, L.; SHINE, J.; KUSHNER, P.J. High expression in mammalian cells without amplification. **Bio/Technology**, v. 7, p. 359-362, 1989.

20. GERSHONI, J.M.; PALADE, E.P. Protein blotting: principles and applications. **Anal. Biochem.**, v. 131, p. 1-15, 1983.
21. GILBERT, M.S.; LOWRY, P.J.; CASTRO, M.G.; WOODS, R.J.; SAVVA, D. Expression and partial purification of human prolactin in *Escherichia coli*. **Int. J. Biochem.**, v. 23, p. 107-114, 1991.
22. GOFFIN, V; TOURAINÉ, P.; PICHARD, C.; BERNICHTÉIN, S.; KELLY, P.A. Should prolactin be reconsidered as a therapeutic target in human breast cancer? **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 151, p. 79-87, 1999.
23. GOOCHEE, C.F.; GRAMER, M.J.; ANDERSEN, D.C.; BOHR, J.B. The oligosaccharides of glycoproteins: factors affecting their synthesis and their influence on glycoprotein properties. In: TODD, P.; SIKDAR, S.K.; BIER, M. (eds) **Frontiers in Bioprocessing II**. American Chemical Society, Washington DC, p.199-240, 1992.
24. GRAHAM, F.L.; VAN DER, E.B. A.J. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. **Virology**, v. 54, p. 536-539, 1973.
25. GU, X.; HARMON, B.J.; WANG, D.I.C. Site- and branch-specific sialylation of recombinant human interferon- γ in chinese hamster ovary cell culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 55, p. 390-398, 1997.
26. GU, X.; XIE, L.; HARMON, B.J.; WANG, D.I.C. Influence of primatone RL supplementation on sialylation of recombinant human interferon- γ produced by Chinese hamster ovary cell using serum-free media. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 56, p. 353-360, 1997.
27. HARO, L.S.; LEE, D.W.; SINGH, R.N.P.; BEE, G.; MARKOFF, E.; LEWIS, U.J. Glycosylated human prolactin: alterations in glycosylation pattern modify affinity for lactogen receptor and values in prolactin radioimmunoassay. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 71, p. 379-383, 1990.
28. HENSLEY, P.; MC DEVITT, P.J.; BROOKS, I.; TRILL, J.J.; FEILD, J.A.; MC NULTY, D.E.; CONNOR, J.R.; GRISWOLD, D.E.; KUMAR, N.V.; KOPPLE, K.D.; CARR, S.A.; DALTON, B.J.; JOHANSON, K. The soluble form of E-selectin is na asymmetric monomer. **J. Biol. Chem.**, v. 39, p. 23949-23958, 1994.
29. HIRAOKA, Y.; NOMATA, Y.; MATSUO, K.; TSUBATA, N.; TANABE, K.; FUKUSAWA, T. Efficient production of biologically active human prolactin in *Escherichia coli*. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 81, p. 47-154, 1991.
30. HIROOKA, T.; SUGANUMA, N.; FURUHASHI, M.; KITAGAWA, T.; ANDO, H.; KIKKAWA, F.; TOMODA, Y.; SEO, H. Synthesis and release of glycosylated prolactin in transfected cells with human prolactin complementary deoxyribonucleic acid. **Endocr. J.**, v. 43, p. 423-428, 1996.

31. HOFFMANN, T.; PENEL, C.; RONIN, C. Glycosylation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 16, p. 807-816, 1993.
32. ISRAEL, D.I.; KAUFMAN, R.J. Highly inducible expression from vectors containing multiple GRE's in CHO cells overexpressing the glucorticoid receptor. **Nucl. Acid. Res.**, v. 17, p. 4589-4604, 1989.
33. JANKNECHT, R.; DEMARTYNOFF, G.; LOU, J.; HIPSKIND, R.A.; NORDHEIM, A.; STUNNENBERG, H.G. Rapid and efficient tagged purification of native histidine-protein expressed by recombinant vaccinia virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p. 8972-8976, 1991.
34. JINNO, M.; KATSUMATA, Y.; HOSHIAI, T.; NAKAMURA, Y.; MATSUMOTO, K.; YOSHIMURA, Y. A therapeutic role of prolactin supplementation in ovarian stimulation for in vitro fertilization: the bromocriptine rebound method. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, p. 3603-3611, 1997.
35. KAETZEL, D.M.; NILSON, J.H. Methotrexate-induced amplification of the bovine lutropin genes in Chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 6344-6351, 1988.
36. KAUFMAN, R.J. Amplification and expression of transfected genes in mammalian cells In:KELLEMS, R.E. (Ed) **Gene Amplification in Mammalian Cells**. New York: Marcel Dekker, p.315-343, 1992.
37. KAUFMAN, R.J.; DAVIES, M.V.; WASLEY, L.C.; MICHNICK, D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. **Nucl. Acids. Res.**, v. 19, p. 4485-4490, 1991.
38. KAUFMAN, R.J. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. **Meth. Enzymol.**, v. 185, p. 537-569, 1990
39. KAUFMAN, R.J. Strategies for obtaining high level expression in mammalian cells. **Technique-a journal of methods in cell and molecular biology**, v. 2, p. 221-236, 1990.
40. KIM, S.J.; KIM, N.S.; RYU, C.J.; HONG, H.J.; LEE, G.M. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 58, p. 73-84, 1997.
41. KNAZEK, R.A.; KOHLER, P.O.; GULLINS, P.M. Hormone production by cells grown in on artificial capillaries. **Exptl. Cell Res.**, v. 84, p. 251-254, 1974

42. KNAZEK, R.A.; WU, Y.W.; AEBERSOLD, P.M.; ROSENBERG, A.S. Culture of human tumor infiltrating lymphocytes in hollow fiber bioreactors. **J. Immunol. Meth.** V. 127, p. 29-37, 1990.
43. KNIGHT, P. Hollow fiber bioreactors for mammalian cell culture. **Bio/Technology**, v. 7, p. 459-461, 1989.
44. KÖNIG, R.; ASHWELL, G.; HANOVER, J.A. Overexpression and biosynthesis of CD4 in chinese hamster ovary cells: coamplification using the multiple drug resistance gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 9188-9192, 1989.
45. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
46. LAURIÈRE, M. A semidry electroblotting sistem efficiently transfers both high- and low- molecular weight proteins separated by SDS-PAGE. **Anal. Biochem.**, v. 212, p. 206-211, 1993.
47. LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; LEWIS, L.J. Two forms of glycosylated human prolactin have different pigeon crop sac-stimulating activities. **Endocrinology**, v. 124, p. 1558-1563, 1989.
48. LIN, J.H.; WANG, M.; ANDREWS, W.H.; WYDRO, R.; MORSE, J. Expression efficiency of the human thrombomodulin-encoding gene in various vector and host systems. **Gene**, v. 147, p. 287-292, 1994.
49. MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK. **J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Col Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989.
50. MELI, R.; RASO, G.M.; BENTIVOGLIO, C.; NUZZO, I.; GALDIERO, M.; DI CARLO, R. Recombinant human prolactin induces protection against *Salmonella typhimurium* infection in the mouse: role of nitric oxide. **Immunopharmacology**, v. 34, p. 1-7, 1996.
51. MILOUX, B.; LUPKER, J.H. Rapid isolation of highly productive recombinant Chinese hamster ovary cell lines. **Gene**, v. 149, p. 341-344, 1994.
52. MINTY, A.; CHALON, P.; GUILLEMOT, J.C.; KAGHAD, M.; LIAUZUN, P.; MAGAZIN, M.; MILOUX, B.; MINTY, C.; RAMOND, P.; VITA, N.; LUPKER, J.; SHIRE, D.; FERRARA, P.; CAPUT, D. Molecular cloning of the MCP-3 Chemokine gene and regulation of its expression. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 4, p. 99-110, 1993.
53. MOLTICH, M. Pregnancy and the hyperprolactinaemic woman. **N. Engl. J. Med.**, v. 312, p. 1364-1369, 1978.

54. MONACO, L.; TAGLIABUE, R.; GIOVANAZZI, S.; BRAGONZI, A.; SORIA, M.R. Expression of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in CHO dhfr⁻ cells: new insights into the in vitro amplification expression system. **Gene**, v. 45, p.150-180, 1996.
55. MORGANTI, L.; HUYER, M.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Production and characterization of biologically active Ala-Ser-(His)₆-Ile-Glu-Gly-Arg-human prolactin (tag-hPRL) secreted in the periplasmic space of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, p. 23, v. 67-75, 1996.
56. MORGANTI, L.; SOARES, C.R.J.; AFFONSO, R.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Synthesis and characterization of recombinant, authentic human prolactin secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 27, p. 63-70, 1998.
57. MORIN, A.; PICART, R.; TIXIER-VIDAL, A. Effects of the N-terminal cysteine mutation on prolactin expression and secretion in transfected cells. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 117, p. 59-73, 1996.
58. MORY, Y.; BEN-BARAK, J.; SEGEN, D.; COHEN, B.; NOVICK, D.; FISCHER, D.G.; RUBINSTEIN, M.; KARGMAN, S.; ZILBERSTEIN, A.; VIGNERON, M.; REVEL, M. Efficient constitutive production of human IFN- γ in chinese hamster ovary cells. **DNA**, v. 5, p. 181-193, 1986.
59. NICKEL, C. Endocrine dysfunction in impotence. **J. Urol.**, v. 132, p.40-46, 1984.
60. OGATA, M.; WAKITA, K.; KIMURAK, K.; MARUMOTO, Y.; OH-I-K.; SHIMIZU, S. High-level expression of recombinant human soluble thrombomodulin in serum-free medium by CHO-K1 cells. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 520-525, 1993.
61. OLIVEIRA, J.E.; SOARES, C.R.J.; PERONI, C.N.; GIMBO, E.; CAMARGO, I.M.C.; MORGANTI, L.; BELLINI, M.H.; AFFONSO, R.; ARKATEN, R.R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in *Escherichia coli* periplasmic space. **J. Chromatogr. A**, v. 852, p. 441-450, 1999.
62. PAREKH, R.B.; RAYMOND, A.; DWEK, R.A.; RUDD, P.M.; THOMAS, J.R.; RADEMARKER, T.W.; WARREN, T.; WUN, T.C.; HEBERT, B.; REITZ, B.; PALMIER, M.; RAMABHADRAN, T.; TIEMIER, D.C. N-glycosylation and in vivo enzymatic activity of human recombinant tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells and a murine cell line. **Biochemistry**, v. 28, p. 7670-7679, 1989.

63. PATEL, H.; BRAMALL, J.; WATERS, H.; DE BEER, M.C.; WOO, P.
Expression of recombinant human serum amyloid A in mammalian cells and demonstration of the region necessary for high-density lipoprotein binding and amyloid fibril formation by site-directed mutagenesis. **Biochem. J.**, v. 318, p. 1041-1049, 1996.
64. PARIS, N.; RENTIER-DELRUE, F.; DEFONTAINE, A.; GOFFIN, V.; LEBRUN, J.J.; MERCIER, L.; MARTIAL, J.A. Bacterial production and purification of recombinant human prolactin. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 12, p. 436-449, 1990.
65. PELLEGRINI, I.; GUNZ, G.; RONIN, C.; FENOUILLET, E.; PEYRAT, J.P.; DELORI, P.; JAQUET, P. Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells: immunological, receptor binding and biological properties of the glycosylated and nonglycosylated forms. **Endocrinology**, v. 122, p. 2667-2674, 1988.
66. POPKEN-HARRIS, P.; MCGROGAN, M.; LOEGERING, D.A.; CHECKEL, J.L.; KUBO, H.; THOMAS, L.L.; MOY, J.N.; SOTTRUP-JENSEN, L.; SNABLE, J.L.; KIKUCHI, M.T.; GLEICH, G.J. Expression, purification and characterization of the recombinant proform of eosinophil granule major basic protein. **J. Immunol.**, v. 155, p. 1472-1480, 1995.
67. PRICE, A.E.; LOGVINENKO, K.B.; HIGGINS, E.A.; COLE, E.S.; RICHARDS, S.M. Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. **Endocrinology**, v. 136, p. 4827-4833, 1995.
68. RHEE, H.K.; SUN, Z.; KIM, S.S.; GOFFIN, V.; MARTIAL, J.A.; DANNIES, P.S. Biological activity and immunological reactivity of human prolactin mutants. **Endocrinology**, v. 136, p. 4990-4995, 1995.
69. RIBELA, M.T.C.P.; MURATA, Y.; MORGANTI, L.; TONIOLO, D.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. **J. Immunol. Methods**, v. 150, p. 260-274, 1993.
70. RICHARDS, S.M.; GARMAN, R.D.; KEYES, L.; KAVANAGH, B.; MCPHERSON, J.M. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. **Cell Immunol.**, v. 184, p. 85-91, 1998.

71. RIGGIN, R.M.; DORULLA, G.K.; MINER, D.J. A reversed-phase high performance liquid chromatographic method for characterization of biosynthetic human growth hormone. **Anal. Biochem.**, v. p. 199-209, 1987.
72. RIGGIN, R. M.; SHAAR, C.J.; DORULLA, G.K.; LEFEBER, D.S.; MINER, D.J. High-performance size-exclusion chromatographic determination of the potency of biosynthetic human growth hormone products. **J. Chromatogr.**, v. 435, p. 307-318, 1988.
73. ROOS, P.; NYBERG, F.; WIDE, L. Isolation of human pituitary prolactin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 588, p. 368-379, 1979.
74. SCHIMKE, R.T. Gene amplification in cultured animal cells. **Cell**, v. 37, p. 705-71, 1984.
75. SCHIMKE, R.T. Gene amplification in cultured cells. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 5989-5992, 1988.
76. SCHUTT, C.; FURLL, B.; STÉLTER, F.; JACK, R.S.; WITT, S. CHO transfectants produce large amounts of recombinant protein in suspension culture. **J. Immunol. Methods**, v. 204, p. 99-102, 1997.
77. SHELIKOFF, M.; SINSKEY, A.J.; STEPHANOPOULOS, G. The effect of protein synthesis inhibitors on the glycosylation site occupancy of recombinant human prolactin. **Cytotechnology**, v. 15, p. 195-208, 1994.
78. SINHA, Y.N. Prolactin variants. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 3, p. 100-106, 1992.
79. SINHA, Y.N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. **Endocr. Rev.**, v. 16, p. 354-369, 1995.
80. SOMPAYRAC, L.M.; DANNA, K.L. Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 7575-7578, 1981.
81. TAKEUCHI, M.; TAKASAKI, S.; MIYAZAKI, KATO, T.; HOSHI, S.; KOCHIBE, N.; KOBATA, A. Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 3657-3663, 1988.
82. TANAKA, T.; SHIN, R.P.C.; GOUT, P.W.; BEER, C.T.; NOBLE, R.L.; FRIESEN, H.G. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human sera. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 51, p. 1058-1063, 1980.

83. TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
84. UFEARO, C.S.; ORISAKWE, O.E. Restoration of normal sperm characteristics in hypoprolactinemic infertile men treated with metoclopramide and exogenous human prolactin. **Clin. Pharmacol. Therap.**, v. 58, p. 354-359, 1995.
85. URLAUB, G.; CHASIN, L.A. Isolation of Chinese hamster ovary cells mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 4216-4220, 1980.
86. USHIDA, Y.; NATSUKA, S.; SHIMOKAWA, Y.; TAKATSU, Z.; SHIMAMURA, S.; HASE, S. Structures of the sugar chains of recombinant macrophage colony-stimulating factor produced in Chinese hamster ovary cells. **J. Biochem.**, v. 122, p.148-156, 1997.
87. VONDERHAAR, B.K. Prolactin: The forgotten hormone of human breast cancer. **Pharmacol. Ther.**, v. 79, p.169-178, 1998.
88. WEIGENT, D.A. Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. **Pharmacol. Ther.**, v. 69, p. 237-257, 1996.
89. WILLIS, C.F.; LIVINGSTONE, V. Infant insufficient milk syndrome associated with maternal postpartum hemorrhage. **J. Hum. Lact.**, v. 11, p. 123-126, 1995.
90. WOOD, C.R.; DORNER, A.J.; MORRIS, G.E.; ALDERMAN, E.M.; WILSON, D.; O'HARA, R.M.; KAUFMAN, R.J. High level synthesis of immunoglobulins in chinese hamster ovary cells. **J. Immunol.**, v. 145. p. 3011-3016, 1990.
91. WOOD, C.R.; MORRIS, G.E.; ALDERMAN, E.M.; FOUSSER, 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**, v. 88, p. 8006-8010, 1991.
92. WOODY, M.A.; WELNIAK, L.A.; RICHARDS, S.; TAUB, D. D.; TIAN, Z.G.; SUN, R.; HENRY, M.; LONGO, D.L.; MURPHY, W.J. Use of neuroendocrine hormones to promote reconstitution after bone marrow transplantation. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, p. 69-80, 1999.
93. WOODY, M.A.; WELNIAK, L.A.; SUN, R.; TIAN, Z.G.; HENRY, M.; RICHARDS, S.; RAZIUDDIN, A.; LONGO, D.L.; MURPHY, W.J. Prolactin exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. **Exp. Hematol.**, v. 27, p. 811-816, 1999.

94. WRAY, W.; BOULIKAS, T.; WRAY, V.P.; HANCOCK, R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 118, p. 197-203, 1981.
95. YOON, S.K.; AHN, Y.; KWON, I.; HAN, K.; SONG, J.Y. Influence of reducing agents on the secretion rate of recombinant erythropoietin from CHO cells. **Biotechnol. Letters**, v. 20, p. 101-104, 1998.
96. YONEDA, N.; IRAHARA, M.; SAITO, S.; UEMURA, H.; AONO, T. Usefulness of recombinant human prolactin for treatment of poor puerperal lactation in a rat model. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 133, p. 613-617, 1995.
97. YOUNG, W.M.; DEAN, R.C. Optimization of mammalian-cell bioreactors. **Bio/Technology**, v. 5, p. 835-837, 1987.
98. YU-LEE, L.Y. Molecular actions of Prolactin in the immune system. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 215, p. 35-52, 1997.
99. ZELLWEGER, R.; WICHMAN, M.W.; AYALA, A.; DE MASO, C.M.; CHAUDRY, I.H. Prolactin: a novel and safe immunomodulating hormone for the treatment of immunodepression following severe hemorrhage. **J. Surg. Res.**, v. 63, p.53-58, 1996.
100. ZENG, S.; DINTER, A.; EISENKRÄTZER, D.; BISELLI, M.; WANDREY, C.; BERGER, E.G. Pilot scale expression and purification of soluble protein A tagged beta 1,6N-acetylglucosaminyltransferase in CHO cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 237, p. 653-658, 1997.
101. ZHANG, X.; LOK, S.H.L.; KAN, O.L. Stable expression of human α -2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1425, p. 441-452, 1998.