

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS CHO CULTIVADAS NA PRESENÇA DE
CICLOHEXIMIDA PARA OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROLACTINA
HUMANA GLICOSILADA (G-hPRL) RECOMBINANTE**

SUSANA DA ROCHA HELLER

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

Orientador:
Dr. CARLOS ROBERTO JORGE SOARES

São Paulo

2008

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Jonathan Heller** e **Nanci da Rocha Heller** por todo apoio, carinho, amor, compreensão e conselhos em toda a minha caminhada até aqui.

À Minha irmã e melhor amiga **Michelle**, por tudo que passamos juntas em toda a nossa vida.

Ao meu noivo **Leonardo**, pois a partir daqui começamos nossa caminhada.

*“Agrada-te do Senhor,
e ele satisfará os desejos do teu coração.*

*Entrega o teu caminho ao Senhor,
confia nele, e o mais ele fará.”*

Salmos 37:4-5

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois foi ele quem me abençoou, abriu todas as portas e me trouxe até aqui.

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, pela orientação, ensino, paciência, apoio, amizade e oportunidade.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

Aos amigos José Maria, João Ezequiel, Fernanda, Taís e Herbert, Junqueira, Dra. Maria Teresa, e Dra. Cibele por toda a ajuda na realização deste trabalho, colaboração, e apoio.

Aos amigos Renata, Eliza, Cristiane, Beatriz, Claudia, Flavia, Miriam, Nélio, Danielle, Geyza, Rosa, Marcos A. Júnior, Jean, Camila, Edna e Néia, pela amizade e bons momentos que passamos juntos.

Aos amigos Fernanda e Herbert pela ajuda na revisão deste trabalho.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela Oportunidade de desenvolver este trabalho

À FAPESP, pela concessão de recursos financeiros.

Lista de Abreviaturas

CHO – células de ovário de hamster chinês

CRS – Chemical Reference Standard

Da – Dalton

E.coli - *Escherichia coli*

G-hPRL – prolactina humana glicosilada

hPRL – prolactina humana

HPSEC – cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular

kDa – kilo Dalton

MALDI-TOF – matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight

MTX – Metotrexato

NG-hPRL - Prolactina humana não-glicosilada

PBS – tampão fosfato salina

RP-HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

SFBd – soro fetal bovino dialisado

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

WB – western blotting

WHO – Organização Mundial de Saúde

UV – ultravioleta

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS CHO CULTIVADAS NA PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA PARA
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROLACTINA HUMANA GLICOSILADA (G-hPRL)
RECOMBINANTE**

Susana da Rocha Heller

RESUMO

A Prolactina humana hPRL é um hormônio protéico com 199 aminoácidos (MM ~ 23.000 Da) com um amplo espectro de atividades biológicas, sendo mais conhecido por estimular a lactação e regular o crescimento e diferenciação da glândula mamária. Além de quebra proteolítica, a maioria dos variantes de prolactina podem ser resultantes de outros processos pós-traducionais como polimerização, fosforilação, desamidação, sulfatação e glicosilação. Essa proteína contém apenas um sítio potencial de glicosilação por ligação à asparagina, localizada no aminoácido 31, que é parcialmente ocupado (10%) quando a proteína é sintetizada em células eucariotas. Apesar da atividade biológica *in vitro* da prolactina glicosilada (G-hPRL) ser muito menor (~4 vezes) quando comparada à não glicosilada, sua função fisiológica ainda não é bem definida e a porção de carboidrato parece ter um importante papel na biossíntese, secreção, atividade biológica, e clearance plasmático do hormônio. Com o objetivo de melhor caracterizar e estudar esta variante hormonal, foi realizada sua purificação em escala laboratorial a partir de células de ovário de hamster chinês (CHO) modificadas geneticamente, utilizando meio de cultura suplementado com cicloheximida, aumentando ~4 vezes sua concentração absoluta e ~10 vezes a razão entre a isoforma glicosilada e a não-glicosilada. A purificação da G-hPRL seguiu um processo simples e efetivo de duas etapas principais baseado em uma coluna de troca catiônica e uma coluna preparativa de exclusão molecular acoplada a um sistema de cromatografia líquida de exclusão molecular de alta eficiência (HPSEC). A caracterização foi feita por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) e exclusão molecular, SDS-PAGE, Western Blotting, espectrometria de massa (MALDI-TOF) e um bioensaio *in vitro* utilizando células Nb2 e Ba/F3-LLP. Nossos resultados demonstram que a cicloheximida pode ser uma importante ferramenta para aumentar a produção de prolactina glicosilada, facilitando a purificação e caracterização dessa isoforma.

**UTILIZATION OF CHO CELLS CULTIVATED IN PRESENCE OF CYCLOHEXIMIDE FOR
OBTAINMENT AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN GLYCOSYLATED
PROLACTIN (G-hPRL)**

Susana da Rocha Heller

ABSTRACT

Human prolactin hPRL is a 199 aminoacid protein hormone (MM ~23.000 Da) with a wide spectrum of biological activities being, however, best known for its stimulation of lactation and development of mammary gland. Besides proteolytic cleavage, the majority of prolactin variants can be the result of other posttranslational processing of the mature molecule in the anterior pituitary gland or the plasma. These include polymerization, phosphorylation, deamidation, sulfation, and glycosylation. This protein contains only one potential asparagine-linked glycosylation site which is partially (~10%) occupied when the protein is synthesized in eukaryotic cells. Although the biological activity of glycosylated hPRL (G-hPRL) has been found ~ 4-fold lower compared to that of hPRL, its physiological function is not well defined yet, and the carbohydrate moiety seems to play an important role in the biosynthesis, secretion, biological activity, and plasma clearance of the hormone. In order to better characterize and study this hormone variant, we carried out its laboratory scale synthesis and purification from genetically modified CHO cells medium that had been supplemented with cycloheximide, increasing thus ~4-fold its absolute concentration and ~10-fold the glycosylated versus non-glycosylated hPRL concentration ratio. G-hPRL purification was carried via a simple and effective two-step process based on a cationic exchanger and a preparative size-exclusion HPLC column (HPSEC). Characterization was carried out by reversed-phase and size-exclusion HPLC, SDS-PAGE, western blotting, MALDI-TOF MS and *in vitro* bioassay utilizing Nb2 and Ba/F3-LLP cells. Ours results show that cycloheximide can be an important tool to increase the production of glycosylated proteins hPRL facilitating the purification and characterization of these isoforms.

SUMÁRIO

	Página
1 Introdução _____	1
1.1 Aspectos Gerais _____	1
1.2 Objetivos do Trabalho _____	9
2 Material e Métodos _____	10
2.1 Material _____	10
2.1.1 Material utilizado no cultivo celular _____	10
2.1.1.1 Meios de cultura _____	10
2.1.1.2 Linhagens Celulares _____	10
2.1.1.3 Material Plástico _____	11
2.1.1.4 Reagentes utilizados na cultura celular _____	11
2.1.2 Material utilizado no processo de purificação e análise da G-hPRL _____	12
2.1.2.1 Colunas Cromatográficas _____	12
2.1.2.2 Resinas Cromatográficas _____	12
2.1.2.3 Padrões, antissoros e outros reagentes para WB _____	13
2.1.3 Material Radioativo _____	13
2.1.4 Reagentes para marcação de Proteína A para Western Blotting _____	13
2.1.5 Outros Reagentes _____	13
2.1.6 Equipamentos e acessórios Principais _____	15
2.1.7 Diversos _____	17
2.2 Métodos _____	18
2.2.1 Cultura de células _____	18
2.2.2 Influência da concentração de cicloheximida na produção de hPRL por células CHO em diferentes meios de cultura _____	18
2.2.3 Influência de fatores externos (temperatura e concentração de CO ₂) _____	19
2.2.4 Produção de G-hPRL _____	19
2.2.5 Concentração do meio e purificação da G-hPRL _____	20

2.2.6	Caracterização Físico-química	21
2.2.6.1	Análise por SDS-PAGE	21
2.2.6.2	Análise por Western Blotting	23
2.2.6.3	Análise por espectrometria de massa (MALDI - TOF)	24
2.2.6.4	Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC	24
2.2.7	Ensaio Biológicos	25
2.2.7.1	Bioensaio com células Ba/F3-LLP	25
2.2.7.2	Bioensaio com células Nb2	26
3	Resultados	27
3.1	Influência da cicloheximida no cultivo.	27
3.2	Influência da concentração de cicloheximida na produção de G-hPRL em outros meios e condições de cultura.	29
3.3	Ação da cicloheximida sobre a viabilidade celular e produção de prolactina	32
3.4	Análise comparativa mediante HPSEC de produções com e sem a utilização de cicloheximida	34
3.5	Concentração e Purificação	36
3.5.1	Coluna de troca catiônica	37
3.5.1.1	Análise do eluato de SP-Sepharose Fast Flow por RP-HPLC	39
3.5.1.2	Análise do eluato de SP-Sepharose Fast Flow por HPSEC	42
3.5.2	Utilização da HPSEC como coluna preparativa	43
3.5.3	Introdução de uma etapa intermediária de concentração	44
3.6	Caracterização da G-hPRL	46
3.6.1	Análise por HPLC	46
3.6.2	Análise por SDS-PAGE e Western Blotting	47
3.6.3	Ensaio Biológicos com células Ba/F3-LLP e Nb2	48
3.6.4	Determinação da massa molecular relativa por espectrometria de massa (MALDI - TOF)	49
4	Discussão	51
5	Conclusão	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 Introdução

1.1 Aspectos Gerais

A Prolactina humana hPRL é um hormônio protéico com uma cadeia única de 199 aminoácidos (MM ~ 23.000 Da) e três pontes dissulfeto. Foi descoberta há mais de 70 anos como um fator pituitário que estimula o desenvolvimento da glândula mamária e a lactação em coelhos (24). O gene que codifica para a prolactina é único sendo encontrado em todos os vertebrados e em humanos está localizado no cromossomo 6 (32). É um hormônio primariamente secretado pela glândula hipofisária anterior e afeta os processos fisiológicos mais do que todos os outros hormônios pituitários combinados. Possui um amplo espectro de atividades biológicas. As mais conhecidas são a estimulação da lactação e o crescimento e diferenciação da glândula mamária e sua ação na reprodução (44). Mais de 300 funções biológicas diferentes foram atribuídas à PRL e estas podem ser subdivididas nas seguintes categorias: Funções ligadas à reprodução; Endocrinologia e Metabolismo; Controle e balanço de água e eletrólitos; crescimento e desenvolvimento; inteligência e comportamento; imunorregulação e proteção (4). Em nível celular, a prolactina exerce atividades mitogênicas, morfogênicas e secretoras (1).

Desde que níveis anormais de hPRL foram relacionados a inúmeras desordens na função hipofisária e de reprodução (hiperprolactinemia, galactorréia,

infertilidade, etc), é um dos hormônios mais freqüentemente determinado na rotina de ensaios clínicos (45; 15; 46). Dados da literatura indicam o potencial uso clínico da hPRL após transplante de medula óssea, por estimular a hematopoiese e a recuperação imune, ou na reversão da mielossupressão induzida por azidotimidina (AZT) ou por terapias mielo-ablativas (55). Estudos indicam também sua potencial aplicação como agente imunoterápico nos casos de infecção por HIV (39). Estudos em ratos mostram que o nível de hPRL aumenta em resposta ao estresse, sugerindo sua ação protetora contra o estresse agudo induzido por hipocalcemia e erosões gástricas (12) e que a hPRL também melhora a resposta antitumoral dos linfócitos “natural killer” (58). A hPRL apresenta ainda outras aplicações clínicas em fase de estudo. Podemos citar como exemplos aquelas relativas à artrite reumatóide, à fibrose cística e ao câncer de colo retal, entre outras (1). Evidências como a secreção e ação local da hPRL (efeito autócrino/parácrino) relacionam este hormônio com o desenvolvimento de câncer de mama e de próstata (14; 38; 26). Como é produzida em muitos tecidos e age de várias maneiras, a PRL é um dos muitos agentes mitogênicos endógenos (19), mas há evidências que a PRL possui atributos protetores, podendo ser usada para o tratamento e prevenção do câncer de mama (17).

Inicialmente considerou-se que esta proteína apresentava apenas a forma não glicosilada, com peso molecular de 23 kDa, mas em 1984, em estudos sobre a glândula hipofisária ovina, estabeleceu-se que a prolactina também pode ocorrer sob a forma glicosilada, com 25 kDa (24), representando 15% da prolactina na hipófise anterior (25) e 30% da prolactina das células decíduais (57).

Este polipeptídeo está sujeito a várias modificações pós-traducionais, tais como quebra proteolítica, polimerização, fosforilação, desamidação, sulfatação e glicosilação, aumentando desta forma o seu espectro de ação (34).

A Figura 1 mostra algumas destas modificações em formato esquemático.

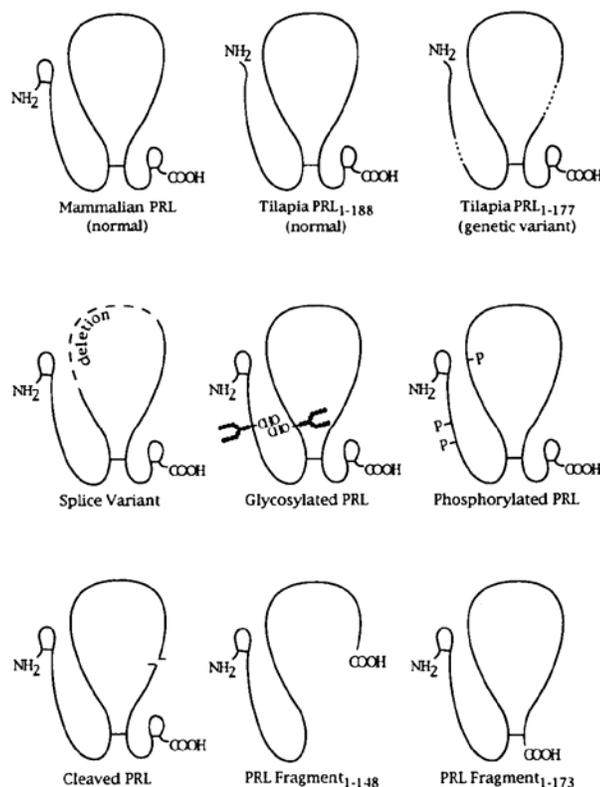


Figura 1. Diagrama esquemático da molécula de PRL e algumas das suas variantes estruturais (44).

Glicosilação é uma modificação pós-traducional que ocorre na maioria das proteínas secretadas por células de mamíferos. Pode acontecer ou no retículo endoplasmático, onde uma cadeia oligossacarídica é transferida para a proteína e se liga covalentemente a uma asparagina (Asn) localizada na seqüência do tripeptídeo Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina (Pro). Recebe então o nome de “glicosilação *N-linked*” (Figura 2), como no caso da prolactina humana (Asn 31), ovina, bovina e outras (44), ou no Complexo de Golgi, em que a cadeia oligossacarídica se liga à serina (Ser) ou treonina (Thr), denominada “glicosilação *O-linked*”, como nos casos da prolactina de rato e peru (44). Podem ainda ocorrer os dois tipos de glicosilação na mesma glicoproteína. As bactérias e alguns sistemas eucariontes, como as leveduras, não são capazes de realizar modificações pós-traducionais complexas como a glicosilação.

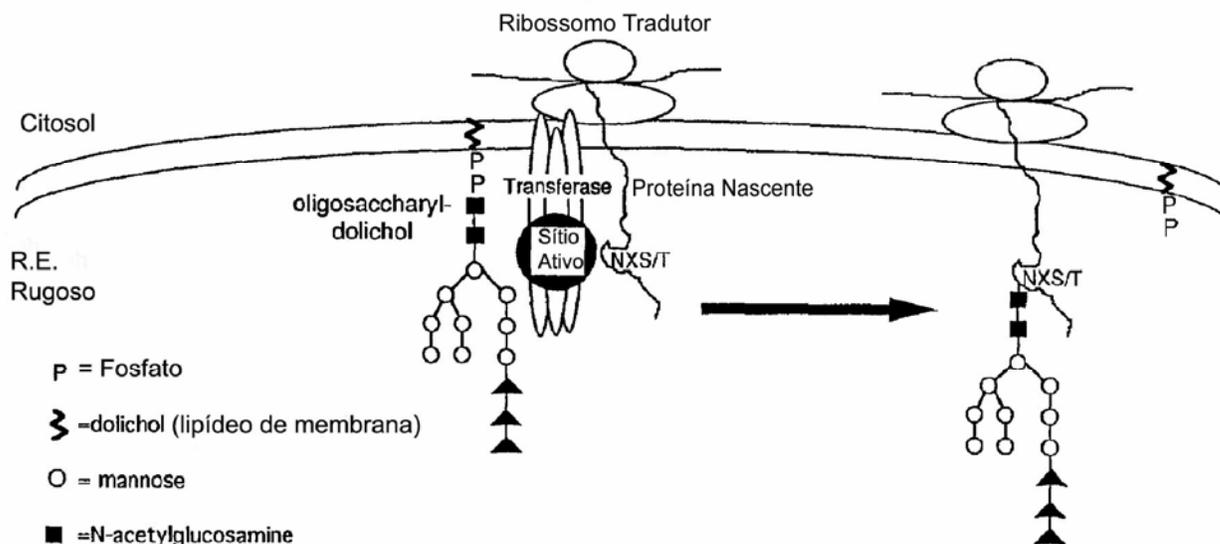


Figura 2. Transferência de oligossacarídeos Asparagina "N-linked" (42).

A relação entre a glicosilação e a tradução protéica foi sugerida por Lau (23), que notou que o sítio potencial de glicosilação de um peptídeo nascente permanece por um curto período de tempo próximo à região em que reside o sítio efetivo da peptidil transferase.

A cicloheximida é um inibidor da síntese protéica em organismos eucariotos, produzido pela bactéria *Streptomyces griseus*. Atua interferindo na atividade da peptidil transferase do ribossomo 60S. Provavelmente, a cicloheximida aumenta a ocupação do sítio de glicosilação por agir na etapa de alongação durante a tradução. Esta droga reduz a taxa de alongação (em códons/segundo) do ribossomo através do mRNA, aumentando o tempo de exposição do sítio de glicosilação (2; 42). A Figura 3 esquematiza o modo de ação de alguns inibidores (químicos e antibióticos) sobre a síntese protéica, entre os quais a cicloheximida.

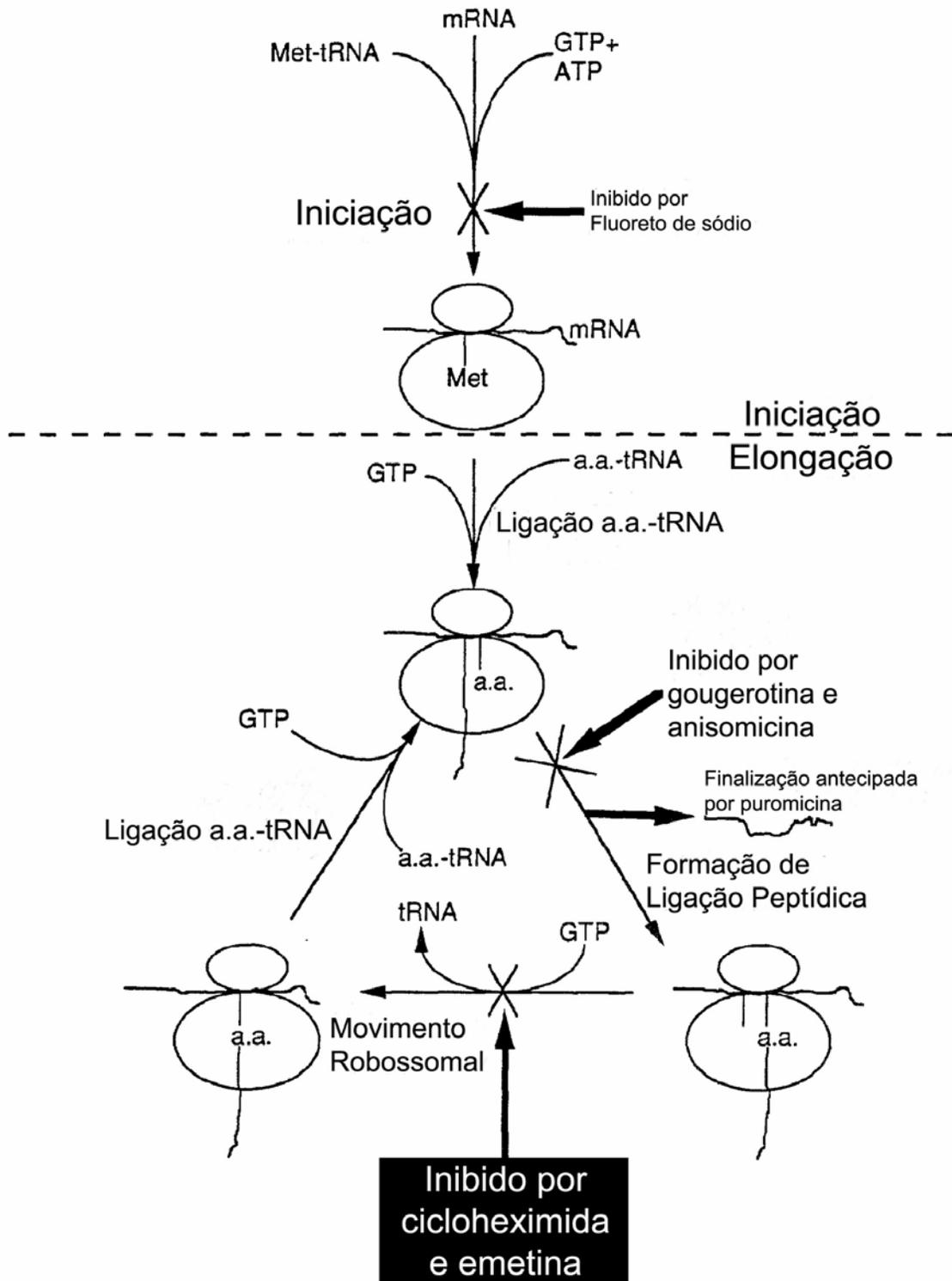


Figura 3. Modo de ação de inibidores da síntese protéica (51).

A cadeia oligossacarídica possui um papel importante na biossíntese, secreção, atividade biológica e depuração (“clearance”) plasmática das glicoproteínas (44). A “glicosilação *N-linked*” é promotora da solubilidade, inibe a agregação protéica e promove proteção contra ataque de enzimas proteolíticas no meio extracelular, enquanto que tanto a “glicosilação *N-linked*” quanto a “glicosilação *O-linked*” facilitam o processo de dobramento (“refolding”), junção das subunidades e secreção de algumas glicoproteínas. Em alguns casos a remoção parcial ou completa dos oligossacarídeos aumenta a suscetibilidade à desnaturação térmica (16) e pequenas mudanças na glicosilação, como por exemplo a presença de um açúcar com carga negativa, podem acarretar em mudanças na sua bioatividade (21). Existem três determinantes do tipo de glicosilação: o tipo de proteína, o fenótipo celular e o ambiente em que a célula se encontra (53). De acordo com a literatura, mudanças no ambiente celular, como temperatura e concentração de CO₂, podem afetar o padrão de N-glicosilação (13). Em estudo recente realizado em nosso laboratório foi observado um aumento de 60% na produção de hTSH recombinante produzido por células de ovário de hamster chinês (CHO) ao se modificar as condições de cultivo de 5% para 0,03% de CO₂ (31). O efeito da temperatura na fisiologia, crescimento e expressão gênica em células de mamíferos ainda não foi muito bem estabelecida. Segundo diferentes autores, temperaturas entre 37°C e 30-33°C prolongam o tempo de cultivo celular (37; 54), pois em baixas temperaturas normalmente o crescimento celular é suprimido, mas o efeito na produtividade celular é variável em diferentes linhagens celulares e sistemas de expressão.

A prolactina humana é um excelente modelo para estudos de glicosilação, pois exibe o mais simples tipo de macroheterogeneidade de glicosilação: uma população proteica é produzida com e outra sem o único oligossacarídeo “*N-linked*” (42).

As isoformas glicosilada (G-hPRL) e não glicosilada (NG-hPRL) da prolactina possuem diferentes propriedades imunológicas, biológicas e de ligação ao receptor e estão presentes normalmente na circulação, mas em diferentes

proporções. A determinação da proporção entre as duas isoformas na circulação é geradora de grandes controvérsias. Enquanto que para alguns autores a NG-hPRL é a forma predominante, variando de 76-84% em mulheres normais, e de 70-90% em mulheres grávidas ou em período de amamentação (10; 44), para outros a forma glicosilada (G-hPRL) é a predominante (27; 28; 20), podendo atingir mais de 70% da hPRL circulante conforme descrito por Price *et. al.* Segundo esse mesmo autor a G-hPRL é produzida e liberada continuamente, enquanto que a NG-hPRL é liberada somente sob condições de estímulo apropriadas (34).

A produção de hPRL e seus análogos por tecnologia do DNA recombinante é uma importante ferramenta para a melhor compreensão da ação desse hormônio. Altos níveis de hPRL recombinante já foram obtidos no citoplasma (33), em células de inseto (8), no espaço periplásmico de bactérias (48) e em células de mamíferos (34; 47). Price *et. al.* (34) descreve a produção de hPRL em sistema de expressão utilizando células de origem murina: C127. Nesse trabalho é relatado a purificação e caracterização das isoformas G-hPRL e NG-hPRL. Soares *et. al.* (47) descrevem altas expressões de hPRL em CHO ($\cong 30 \mu\text{g}$ de hPRL/ 10^6 células/dia utilizando o vetor pEDdc), onde a G-hPRL representa 10% da prolactina total secretada, e também relatam a identificação de uma outra isoforma, a hPRL₁₁₋₁₉₉, assim definida por não apresentar os 10 primeiros aminoácidos da porção N-terminal, pouco relatada na literatura.

Foi observado em bioensaios utilizando células Nb2, que a G-PRL é ~4 vezes menos ativa que a NG-PRL, demonstrando a importância da glicosilação na bioatividade deste hormônio (29; 47; 36). Este ensaio é o mais utilizado na determinação da atividade biológica da prolactina e possui sensibilidade que excede à do RIE (radioimunoensaio) (18; 49; 15). As células utilizadas neste ensaio foram derivadas de linfoma transplantável (designado "Nb 2 Node") de rato da linhagem Noble (Nb) (30) e respondem especificamente a hormônios lactogênicos.

Recentemente desenvolvemos um bioensaio para avaliar a potência biológica de hPRL e suas isoformas (15; 46). Esse bioensaio, baseado na proliferação de células Ba/F3-LLP estimulada pela presença da prolactina, além da

alta sensibilidade (50 pg hPRL/mL) apresenta a grande vantagem de ser espécie-específico, ao contrário do bioensaio clássico em Nb2. As células Ba/F3 (linfócitos pro-B murino) foram transfectadas com um plasmídeo que codifica o receptor longo de hPRL e as células transfectadas capazes de expressar esse receptor de uma forma estável foram selecionadas mediante geneticina. A substituição da interleucina-3, inicialmente necessária para a proliferação dessas células, por hPRL (1µg/mL) possibilitou a seleção de células prolactino-dependentes. Após poucas passagens nessas condições, a população estável foi dividida em 3 sub-populações, cultivadas rotineiramente em meio de cultura contendo 10, 100, ou 1000 ng de hPRL/mL. Essas sub-populações foram identificadas como LP (Low prolactin), MP (medium PRL), e HP (high PRL), respectivamente (3). A Ba/F3-LP, por sua vez, foi cultivada em meio contendo 1 ng/mL de hPRL, gerando o que denominamos Ba/F3-LLP (low low prolactin). Esta última etapa foi realizada em nosso laboratório em colaboração com a FMUSP, sob orientação do Dr. Vicent Goffin (INSERM, Paris-França). A diferença prática observada, comparando-se as células Ba/F3-LP e Ba/F3-LLP é que, no segundo caso, a proliferação máxima ocorre com cerca de 1 ng hPRL/mL enquanto no caso de Ba/F3-LP ocorre em 10 ng hPRL/mL. No presente trabalho avaliamos pela primeira vez a potência da G-hPRL mediante bioensaios com células Ba/F3-LLP, em comparação com o ensaio clássico com células Nb2.

1.2 Objetivos do Trabalho

Este projeto teve por meta principal potencializar a obtenção da G-hPRL purificada a partir de células de ovário de hamster chinês (CHO) modificadas geneticamente em nosso laboratório, avaliando principalmente a influência da cicloheximida, um inibidor de síntese proteica, já relatado na literatura como um composto que favorece o aumento da glicosilação. Foi possível assim caracterizar por métodos físico-químicos e biológicos a forma glicosilada purificada. Na caracterização da atividade biológica *in vitro* foram realizados novos estudos comparando o bioensaio clássico com células Nb2 com outro, recém desenvolvido em nosso laboratório que utiliza células Ba/F3-LLP, ambos baseados na proliferação celular estimulada pela presença de prolactina.

2 Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Material utilizado no cultivo celular

2.1.1.1 Meios de cultura

- “Minimum Essential Medium” (α -MEM), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)
- “Serum Free Medium” (CHO-S-SFM II) com nucleosídeos (hipoxantina e timidina), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)
- “Serum Free Medium” (CD-CHO AGT), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)

2.1.1.2 Linhagens Celulares

- Células de linfoma de rato Nb2, gentilmente doadas pelo Dr. P. Gout (British Columbia Câncer Agency, Vancouver, Canadá). A proliferação dessas células depende dos 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
- Células Ba/F3-LLP (linfócitos pro-B murino - low low prolactin) transfectadas com um plasmídeo que codifica o receptor longo de hPRL, prolactina dependentes

2.1.1.3 Material Plástico

- Garrafas de 75 cm², Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Pipetas de 2, 5, 10 e 25 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Placas de petri de 10 cm de diâmetro, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Sistema de Filtração de 500 mL, 0,22µm, Corning Costar Corp.(NY, EUA)
- Tubos criogênicos de 2 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Tubos para centrífuga de 15 e 50 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Tubos eppendorf (Hamburgo, Alemanha)

2.1.1.4 Reagentes utilizados na cultura celular

- Cicloheximida, Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- Anfotericina B, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)
- Bicarbonato de sódio p.a., Sinth (São Paulo, Brasil)
- Gentamicina, Shering-Plougt (Rio de Janeiro, Brasil)
- Metotrexato (MTX), Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- Penicilina – Streptomina, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)
- Soro fetal bovino dialisado, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)
- Soro fetal bovino, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)
- Tripsina, Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)
- Glicose p.a., Merk (São Paulo, Brasil)
- Pepstatina A, Sigma (St. Louis, MO, EUA)

2.1.2 Material utilizado no processo de purificação e análise da G-hPRL

2.1.2.1 Colunas Cromatográficas

A) Coluna de vidro utilizada em cromatografia clássica

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

B) Colunas de aço inoxidável utilizadas em Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)

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

2.1.2.2 Resinas Cromatográficas

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

2.1.2.3 Padrões, antissoros e outros reagentes para WB

- hPRL de referência produzida em *E.coli*
- Antissoro anti-prolactina humana produzido em coelho do NIDDK-NHI (bethesda, MD, USA)
- Proteína A, Pharmacia (Uppsala, Suécia)
- hPRL rec WHO – CRS
- G-hPRL WHO – 98/580

2.1.3 Material Radioativo

- Na¹²⁵I comercial, livre de carregador e oxidantes, fornecido pela Nordion Europe S.A. (Fleurus. Bélgica) em concentração de aproximadamente 11100-22200 MBq/mL (300-600 mCi/mL) utilizado para marcação de proteína A utilizada no Western Blotting

2.1.4 Reagentes para marcação de Proteína A para Western Blotting

- Cloramina T p.a., Merk (São Paulo, Brasil)
- Iodeto de Potássio p.a., Merk (São Paulo, Brasil)
- Metabissulfito de Sódio, Carlo Erba (São Paulo, Brasil)

2.1.5 Outros Reagentes

- Ácido acético glacial, Labsynth (São Paulo, Brasil)
- Ácido clorídrico, Merk (São Paulo, Brasil)
- Acrilamida, Merk (São Paulo, Brasil)

- Álcool metílico, Merk (São Paulo, Brasil)
- Bis-acrilamida, Merk (São Paulo, Brasil)
- Cloreto de sódio, Merk (São Paulo, Brasil)
- Coomassie Brilliant Blue G 250, GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Dodecil sulfato de sódio (SDS), GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Fosfato de sódio monobásico p.a., Merk (São Paulo, Brasil)
- Fosfato de sódio dibásico p.a., Merk (São Paulo, Brasil)
- Glicerol, Merk (São Paulo, Brasil)
- Glicina, Merk (São Paulo, Brasil)
- Padrões de massa molecular, GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Persulfato de amônio, Merk (São Paulo, Brasil)
- TEMED (N, N, N', N' tetrametilenodiamina), Sigma (St Louis, EUA)
- Tris, Sigma (St Louis, EUA)
- Leite desnatado em pó Mólico, Nestlé (São Paulo), composição declarada: gordura (1%), proteínas (36%), lactose (52%), sais minerais (8%), água (3%)

2.1.6 Equipamentos e acessórios Principais

- Agitador magnético modelo 258, Fanen (São Paulo, Brasil)
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil)
- Aparelho de Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-1GA, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD, EUA)
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil)
- Autoclave horizontal, modelo speedclave II 12L, Odontobrás (São Paulo, Brasil)
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich. Suíça)
- Balança analítica, modelo P1000N, Mettler (Zurich. Suíça)
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich. Suíça)
- Banho-maria, modelo 146, Fanen (São Paulo, Brasil)
- Câmara de Neubauer, Boeco (Hamburg, Alemanha)
- Centrífuga, modelo LS-3 plus, Celm (São Paulo, Brasil)
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super speed RC – 28, Sorvall (newtown, Connecticut, EUA).
- Centrífuga refrigerada automática, modelo: 5810R, Eppendorf, Alemanha.
- Coletor de frações, modelo Frac-200, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Contador gama tipo “poço”, com troca automática de amostra, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para ^{125}I de 80%, Packard Instrument Company (ilinois, EUA)
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil)
- Estufa de cultura Celular, modelo 3159, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA)
- Espectrofotômetro, modelo ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia)

- Fluxo laminar classe II A/B, modelo 1140. Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA)
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Freezer -20°C, modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil)
- Freezer -40°C, modelo AB240, Metalfrio (São Paulo, Brasil)
- Freezer -80°C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA)
- Leitor de placas de microtitulação modelo MR400 (Dynatech, Bethesda, EUA)
- Medidor digital de pH, modelo 420^a, Orion (Boston, MA, EUA)
- Membrana de filtração de 0,22µm, Millipore (Bedford, MA, EUA)
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha)
- Micro-centrífuga, modelo 5415P, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha)
- 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)
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA)
- Sistema de transferência Semi-seco Hoefer TE 70, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)

2.1.7 Diversos

- Cilindro de CO₂, tipo 2,8, White Martins (São Paulo, Brasil)
- Filmes de raios-X Kodac X-OMAT (Kodak, Sr Louis, MO, EUA) para radiografias do WB
- Membrana de nitrocelulose (Hybond-C), 0,45 Micron, Bio-Rad (Hercules, CA, EUA)
- Dispositivo de Ultrafiltração Amicon Ultra-4. Membrana de Celulose regenerada 3000 Daltons, 4mL. Millipore Corporation (Billerica, MA, EUA)

2.2 Métodos

2.2.1 Cultura de células

Células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com o vetor pEDdc-hPRL (Soares, 2000) foram cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ em placa de cultura de 10 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio de cultura α -MEM (Minimum Essential Medium – Alfa Medium- GIBCO), gentamicina 40 μ g/mL, soro fetal bovino dialisado 10%, glicose (4 g/L), 100 nM de metotrexato (MTX), cuja função principal é manter a pressão de seleção, estimulando dessa forma a produção de hPRL pelo mecanismo da amplificação gênica. As células, após atingirem confluência, foram ressuspensas utilizando uma solução de tripsina 0,2% e redistribuídas em placas de cultura. Após atingirem 80% de confluência, o meio de cultura foi substituído pelo de interesse contendo diferentes concentrações da droga cicloheximida.

2.2.2 Influência da concentração de cicloheximida na produção de hPRL por células CHO em diferentes meios de cultura

Com base no trabalho realizado por Shelikoff *et. al.* (42), avaliamos a influência da cicloheximida, um inibidor de síntese proteica, na expressão das isoformas glicosilada (G-hPRL) e não-glicosilada (NG-hPRL) de hPRL recombinante. Inicialmente foram realizados estudos sobre a influência da cicloheximida em três meios utilizados para cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO): α -MEM, CHO-S-SFM-II (Serum Free medium - GIBCO) e CD-CHO AGT (Serum Free Medium - GIBCO); e concentrações de cicloheximida no intervalo de 0 a 2 μ g/mL (0 μ g/mL; 0,02 μ g/mL ; 0,06 μ g/mL ; 0,2 μ g/mL ; 0,6 μ g/mL ; 2 μ g/mL).

2.2.3 Influência de fatores externos (temperatura e concentração de CO₂)

As células foram mantidas em estufas com diferentes condições de temperatura (32°C e 37°C) e concentração de CO₂ (0,03% e 5%), utilizando também diferentes concentrações de cicloheximida, como mencionado no tópico anterior.

2.2.4 Produção de G-hPRL

Com o objetivo de obter maiores quantidades de Prolactina Glicosilada para posterior purificação, foram realizadas produções em placas de 10 cm de diâmetro. Cerca de 1 milhão de células foram semeadas em cada placa em meio α -MEM até atingir 80% de confluência, quando se inicia a produção com o meio apropriado e sem soro fetal bovino dialisado (SFBd). As coletas diárias do meio condicionado, após centrifugação e adição de inibidor enzimático Pepstatina A (2 μ M) (34), foram armazenadas em frascos a -80°C. Quando as células começaram a se desprender, a produção foi interrompida. Alíquotas de 1 mL das coletas diárias foram separadas para análise por SDS-PAGE e Western Blotting.

2.2.5 Concentração do meio e purificação da G-hPRL

A G-hPRL presente no meio de cultura condicionado foi concentrada e purificada utilizando uma versão modificada do método descrito por Soares *et. al.* (47). O processo de purificação é composto basicamente por três etapas: Uma etapa de concentração e simultânea purificação utilizando uma resina para separação por troca catiônica, a SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, São Paulo, Brasil), uma segunda etapa intermediária de concentração em membrana Millipore Amicon Ultra-4 (celulose regenerada, 3000 Da) em centrífuga refrigerada por 30 minutos à 4000 rpm, seguido de cromatografia de exclusão Molecular empregando HPSEC como coluna preparativa. Na primeira etapa o pH do meio condicionado foi ajustado para 5,0 utilizando ácido acético glacial. O material foi então aplicado à coluna com resina SP-Sepharose Fast Flow equilibrada em acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). A absorvância em UV foi monitorada a 280 nm. Em seguida foi aplicado novamente o tampão de equilíbrio até a redução da absorvância aos valores iniciais.

Com o objetivo de eliminar impurezas foi aplicado o mesmo tampão, agora acrescido de NaCl (90 mM). A eluição de prolactina foi realizada em seguida utilizando o tampão HEPES 25 mM (pH 8,0).

Diferentes frações contendo a proteína foram analisadas por HPSEC e Western Blotting, e a fração principal, apresentando maior quantidade de G-hPRL foi concentrada em membrana Millipore Amicon Ultra-4 por centrifugação, e então purificadas na mesma coluna HPSEC, funcionando desta vez como uma coluna preparativa. O volume máximo aplicado foi de 500µL.

2.2.6 Caracterização Físico-química

As isoformas de prolactina (hPRL glicosilada e hPRL não glicosilada) foram caracterizados mediante técnicas físico-químicas como SDS-PAGE, Western Blotting, HPLC em fase reversa (RP-HPLC) e de exclusão molecular (HPSEC), e enviadas para o exterior para análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF).

2.2.6.1 Análise por SDS-PAGE

Foram realizadas análises do meio de cultura condicionado obtidos durante a produção em CHO e das frações resultantes das etapas de purificação da hPRL mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de Sódio (SDS-PAGE) (5; 41).

A eletroforese foi realizada utilizando-se gel de poliacrilamida 15% em condição não reduzida. O equipamento utilizado é um sistema de eletroforese vertical Hoefer mini VE (Amershan Biosciences, Uppsala, Suécia), aplicando-se uma corrente com intensidade de 35 mA. A duração aproximada da corrida é de 2 horas.

As amostras foram preparadas adicionando-se o tampão de amostra na proporção 1:4 sendo em seguida fervidas por aproximadamente 15 minutos.

A revelação foi realizada imergindo o gel em solução fixadora contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água, sob leve agitação durante 1 hora. Após a fixação, a revelação pode ser feita de duas formas:

2.2.6.1.1 Revelação com comassie Brilliant Blue G-250:

É realizada com o gel imerso em solução corante composta por 0,25% de azul de Coomassie (“Coomassie Brilliant Blue G-250”), 45% de metanol e 8% de ácido acético por aproximadamente 15 minutos e a seguir, descorado em solução de ácido acético 10% fazendo-se “lavagens” a cada 1 hora (3-4 vezes) e a conservação é feita em solução de ácido acético 1%.

2.2.6.1.2 Revelação com nitrato de prata:

A técnica utilizada foi baseada na descrita por Wray *et. al.* (56) Após a fixação, o gel é 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 é incubado por 15 minutos sob agitação na solução de nitrato de prata (nitrato de prata 0,8%, NaOH 0,2 N, NH₄OH 0,2 N) recém preparada. Ao final da incubação o gel é 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 conservando-a em solução com 40% metanol, 1% glicerol.

2.2.6.2 Análise por Western Blotting

Para serem analisadas por Western Blotting, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE e, em seguida, à uma transferência semi-seca para membrana de nitrocelulose (22 µm) realizada por eletroeluição e utilizando o antissoro anti-prolactina humana produzido em coelho do NIDDK-NIH (Bethesda, MD, USA).

Após a transferência a membrana foi tratada por 10 minutos com tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado e liofilizado (Nestlé, São Paulo, Brasil), sendo incubada por 18h a temperatura ambiente com 50 mL de antissoro diluído em PBS e 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 400.000 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 por pelo menos 6 vezes. Na seqüência, foi deixada na estufa à 37°C até secar, sendo posteriormente envolvida numa folha transparente de PVC, estando assim pronta para a auto-radiografia. A exposição auto-radiográfica, utilizando telas intensificadoras, foi realizada a -80°C. O tempo de exposição depende da intensidade da resposta desejada, da atividade específica da ^{125}I -Prot. A, da afinidade e título dos anticorpos e da quantidade do produto a ser analisado.

2.2.6.3 Análise por espectrometria de massa (MALDI - TOF)

Uma amostra purificada e concentrada em resina SP-Sepharose Fast Flow e HPSEC, contendo as isoformas glicosilada e não glicosilada da prolactina foi enviada para determinação da massa molecular por espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time-of-Flight mass spectrometry) no laboratório Commonwealth Biotechnologies, Inc. Richmond, VA, EUA). A espectrometria de massa foi realizada em espectrômetro de massa Voyager DE, operando de modo linear do íon positivo, utilizando o ácido sinapínico (AS) como matriz (solução saturada de AS em 5% de acetonitrila).

2.2.6.4 Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC

A avaliação qualitativa e quantitativa da G-hPRL foi realizada por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC) e em fase reversa (RP-HPLC) (40; 7; 45). Em ambas, a detecção foi feita mediante luz ultravioleta (UV), no comprimento de onda de 220 nm.

No caso da HPSEC, a técnica de eluição foi isocrática utilizando como fase móvel o tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 contendo cloreto de sódio 0,15 M, sendo o fluxo de trabalho de 1,0mL/min.

Na RP-HPLC a coluna foi mantida a 42°C e foram usados na fase móvel 71,3% de Tris 0,05 M, pH 7,0 e 28,7% de N-propanol. Sendo o fluxo de trabalho de 0,5 mL/min.

Tanto em HPSEC quanto em RP-HPLC a determinação do tempo de retenção e a quantificação se fez comparativamente à preparação recombinante IPEN de prolactina obtida em *E. coli*. e/ou do padrão internacional de prolactina recombinante da Organização Mundial de Saúde (WHO), o CRS (Chemical Reference Standard).

2.2.7 Ensaios Biológicos

Foram realizados estudos avaliando a ação da prolactina glicosilada em ensaios de proliferação celular com células Nb2 e Ba/F3-LLP, linhagens prolactino-dependentes, com receptores de prolactina murino e humanos, respectivamente. Foram utilizados como referência o padrão de hPRL-recombinante da WHO 97/714 e o padrão de prolactina glicosilada também do WHO 98/580.

2.2.7.1 Bioensaio com células Ba/F3-LLP

As células Ba/F3-LLP são mantidas rotineiramente em suspensão em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado por aquecimento (20 minutos a 45°C), 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 700 µg/mL de geneticina (G418) e 1 ng/mL de hPRL recombinante (rhPRL). Antes de começar o ensaio de proliferação, as células são mantidas em meio sem prolactina e com 1% de SFB inativado por 4 a 6 horas, depois distribuídas em placa de 96 poços (50 x 10⁴ células/poço) com um volume final, incluindo a amostra, de 200 µL por poço. Depois de 72 h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, o número de células viáveis é avaliado por coloração com MTS (6). Brevemente, 2 mg/mL de MTS [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolin (Promega Corp., Madison, WI, USA)] dissolvidos em tampão fosfato-salina (PBS) é misturado na proporção de 20:1 (vol/vol) com fenazina metosulfato (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.92 mg/mL em PBS. Vinte microlitros da mistura são então adicionados a cada poço e após 2h de incubação a 37°C a absorbância é lida no comprimento de onda de 490nm utilizando um leitor de microplacas (Dynatech, Model MR4000, Chantilly, VA, USA).

2.2.7.2 Bioensaio com células Nb2

As células Nb2 são mantidas rotineiramente em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 10% soro de cavalo castrado, Penicilina (50 U/ mL), e 2-ME (Betamercaptoetanol) 5 mM em tampão fosfato-salina. Antes de começar o ensaio de proliferação, as células são mantidas por 8 horas no meio de pré-ensaio, similar ao meio de crescimento, porém com redução do SFB de 10 para 1%, constituindo o pré-ensaio. Depois deste período, o meio é centrifugado e as células são ressuspensas no meio de ensaio, sem SFB e com adição de HEPES 0,015 M, sendo então distribuídas em placa de 96 poços (20×10^3 células/poço) com um volume final, incluindo a amostra, de 200 μ L por poço. Depois de 72 h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, o número de células viáveis é avaliado por coloração com MTS (6), da mesma forma descrita para as Células Ba/F3-LLP.

3 Resultados

3.1 Influência da cicloheximida no cultivo.

Os estudos iniciais sobre a influência da concentração de cicloheximida sobre a expressão da hPRL foram realizados com meio α -MEM, a 37°C, em incubadora com 5% de CO₂. A Figura 4 exemplifica uma análise por Western Blotting deste cultivo. Verifica-se que com o aumento da concentração de cicloheximida ocorreu a diminuição da quantidade da NG-hPRL e aumento da G-hPRL, aumentando a relação G-hPRL/NG-hPRL. A melhor condição observada para produção foi na concentração de 0,6 μ g/mL da droga, na qual a relação entre as duas isoformas parece ser de 50% (1:1) e a viabilidade celular se manteve estável.

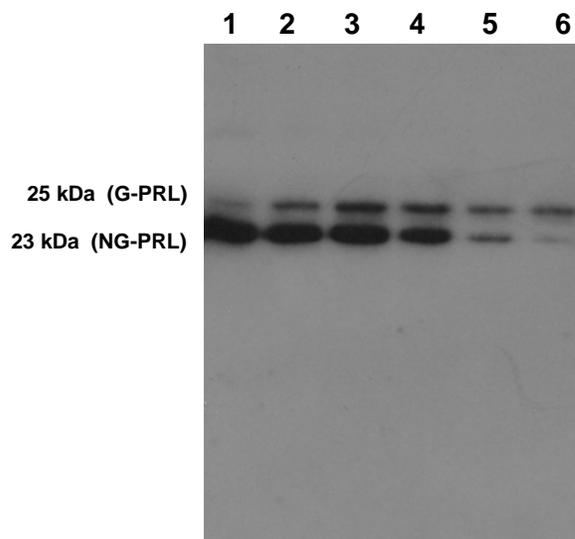


Figura 4. Análise em Western Blotting de 15 μ L dos meios de cultura coletados no quarto dia de produção em placas de seis poços; **1-6**, análise de meio de cultura com diferentes concentrações de cicloheximida: **1.** 0 μ g/mL; **2.** 0,02 μ g/mL; **3.** 0,06 μ g/mL; **4.** 0,2 μ g/mL; **5.** 0,6 μ g/mL; **6.** 2 μ g/mL.

A condição referência de produção de prolactina (Meio α -MEM, 10% de soro fetal bovino dialisado, metotrexato 100nM, 37°C, 5% CO₂) foi comparada com outras condições (+MTX, + SFBd) na presença ou não de 0,6 μ g/mL cicloheximida (Figura 5). Observamos que a utilização de soro fetal bovino dialisado (SFBd) aumenta a expressão de hPRL, porém dificulta sua posterior purificação. Observamos também que a utilização de metotrexato não parece ser um fator decisivo na produção, podendo não ser utilizado.

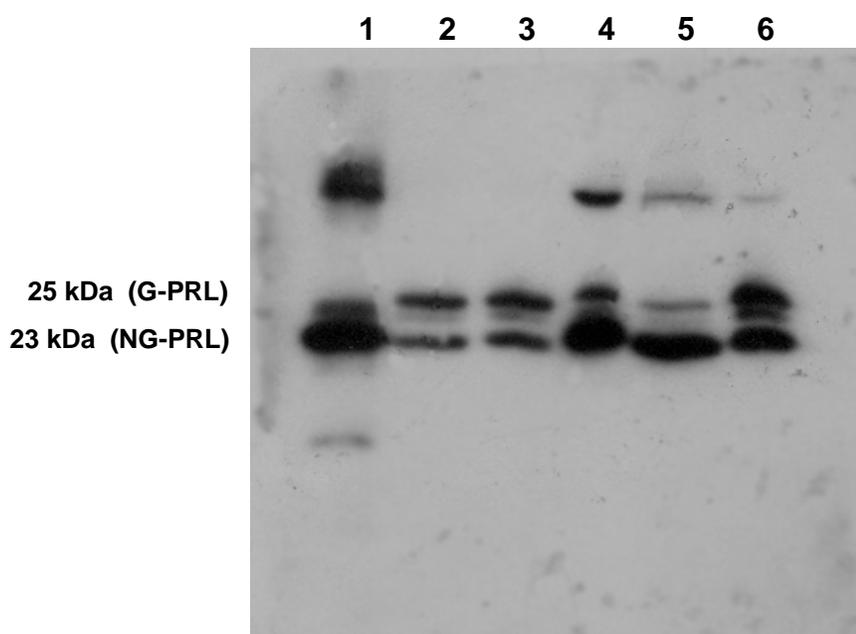


Figura 5. Análise em Western Blotting de 15 μ L dos meios de cultura coletados no quarto dia de produção. **1.** hPRL de referência produzida em *E.coli*; **2.** α -MEM + 0,6 μ g/mL cicloheximida; **3.** α -MEM + 0,6 μ g/mL cicloheximida + MTX; **4.** α -MEM + MTX + Soro Fetal Bovino dialisado; **5.** α -MEM + MTX; **6.** α -MEM + 0,6 μ g/mL cicloheximida + Soro Fetal Bovino + MTX.

3.2 Influência da concentração de cicloheximida na produção de G-hPRL em outros meios e condições de cultura.

Com base no resultado obtido com o meio α -MEM, experimentos similares foram realizados com outros dois meios de cultura: CD-CHO e CHO-S-SFM-II sem nucleosídeos, Figura 6 e 7, respectivamente.

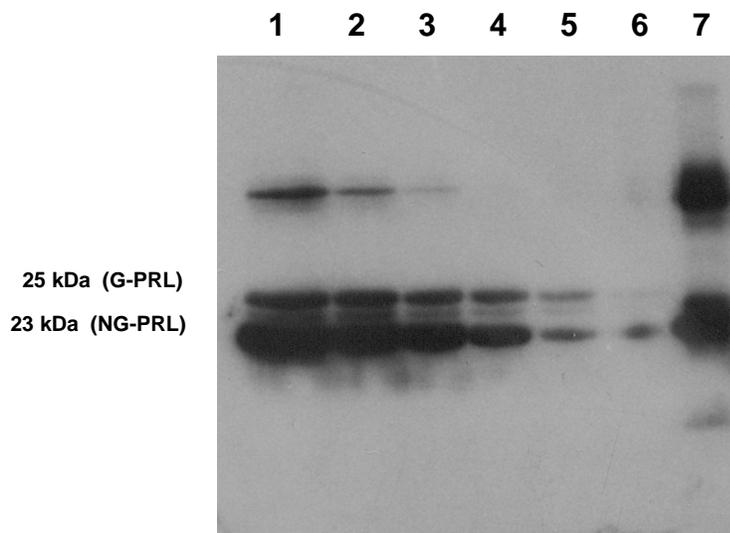


Figura 6. Análise por western blotting de hPRL presente no quarto dia de coleta utilizando o meio de cultura CD-CHO a 37°C com 5% CO₂; 1 a 6, análise do meio de cultura com diferentes concentrações de cicloheximida: 1. 0 µg/mL; 2. 0,02 µg/mL; 3. 0,06 µg/mL; 4. 0,2 µg/mL; 5. 0,6 µg/mL; 6. 2 µg/mL; 7. Prolactina humana de referência produzida em *E.coli*.

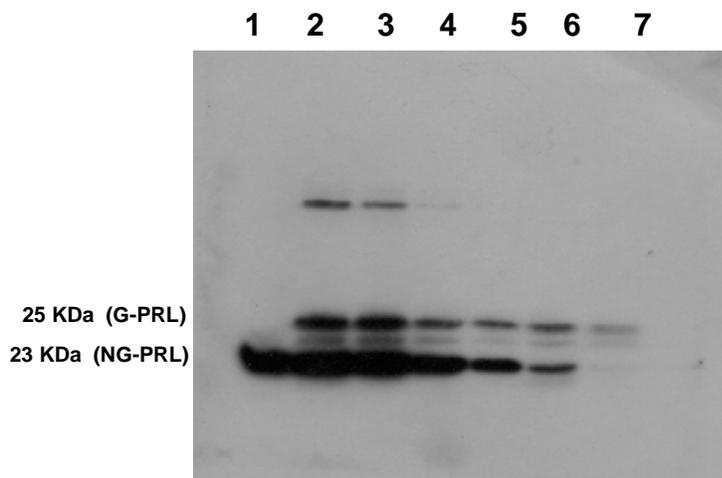


Figura 7. Análise por western blotting de hPRL presente no quarto dia de coleta utilizando o meio de cultura CHO-S-SFM-II a 37°C com 5%CO₂. 1. Prolactina humana de referência produzida em *E.coli*; 2-7; análise do meio de cultura com diferentes concentrações de cicloheximida: 2. 0 µg/mL ; 3. 0,02 µg/mL ; 4. 0,06 µg/mL ; 5. 0,2 µg/mL ; 6. 0,6 µg/mL ; 7. 2 µg/mL.

Observamos que na utilização desses meios também ocorre uma redução significativa da expressão de NG-hPRL, e que diferentemente do observado com o meio α -MEM, a G-hPRL também apresentou uma queda na expressão.

Em experimentos paralelos avaliamos a influência da temperatura e presença de CO₂. Optamos por iniciar esses estudos com o meio CHO-S-SFMII, por ser um meio comercial amplamente usado no cultivo de células CHO e que não necessita da adição de soro, cujos resultados estão apresentados na Figura 8.

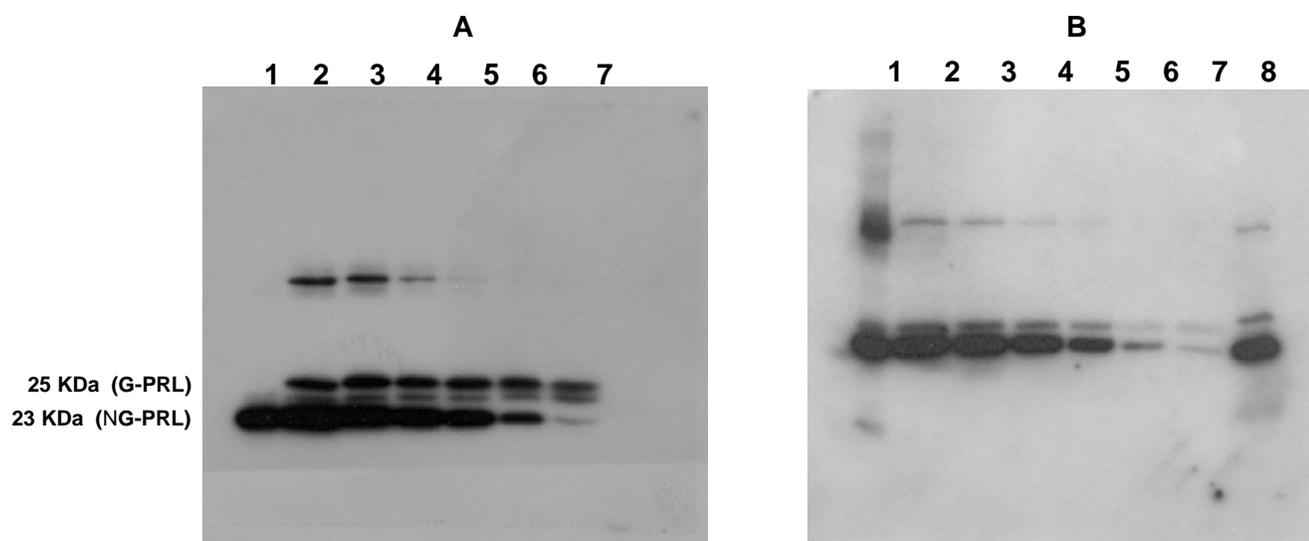


Figura 8. Análise por western blotting de hPRL presente no quarto dia de coleta na presença de diferentes concentrações de cicloheximida. **A.** Meio CHO-S-SFM-II a 32°C/5% CO₂; **B.** Meio CHO-S-SFM a 32°C/0% CO₂. 1. Prolactina de referência produzida em *E.coli*; 2. 0 µg/mL ; 3. 0,02 µg/mL ; 4. 0,06 µg/mL ; 5. 0,2 µg/mL ; 6. 0,6 µg/mL ; 7. 2 µg/mL; 8. α -MEM 37°C/5% CO₂ e 0 µg/mL.

Observamos que na temperatura de 32°C com 5% CO₂ (Figura 8A) a banda correspondente à G-hPRL, diferentemente do observado à 37°C (Figura 7), tende a manter sua intensidade com o aumento da concentração de cicloheximida, apresentando uma significativa redução da NG-hPRL na presença de 2 µg/mL dessa droga. Nessa condição percebemos também, com maior evidência, a presença de uma banda intermediária entre a NG-hPRL e G-hPRL, já observada antes (Figura 7), o que não foi observado na Figura 8B (32°C sem CO₂).

Os resultados obtidos comparando diferentes meios e condições de cultivo foram interessantes, entretanto não levaram a grandes melhoras em comparação com os dados da Figura 4. Com o objetivo principal de obter e caracterizar a G-hPRL, optamos por seguir nosso trabalho utilizando meio α -MEM, de menor custo, nas condições padrões de cultivo: 37°C e 5%CO₂. Um estudo mais profundo sobre a influência do meio e condições de cultivo na expressão de prolactina e suas isoformas poderá ser realizado em projetos futuros.

3.3 Ação da cicloheximida sobre a viabilidade celular e produção de prolactina

Analizamos a produção diária com concentrações de 0,6 µg/mL, 2 µg/mL e 0 µg/mL de cicloheximida comparando produção de prolactina e viabilidade celular. Na Figura 9 são apresentadas fotografias da cultura celular e Western Blotting das respectivas coletas diárias.

Podemos observar que na presença de 0,6 µg/mL de cicloheximida as células permanecem confluentes e viáveis até pelo menos o décimo dia de coleta podendo chegar a 20 dias, sem alterações morfológicas, similarmente ao observado na cultura sem a utilização da droga. Porém, quando utilizamos a concentração de 2 µg/mL, após o oitavo dia, a maioria das células já não está mais aderida à placa, indicativo de que ocorreu morte celular. A análise por western blotting da prolactina produzida nessa condição (2 µg/mL) mostra uma queda na produção de prolactina durante as coletas, reflexo direto da diminuição de células viáveis durante o cultivo (Figuras 9C.1 e 9C.2).

Com relação à produção de G-hPRL, sem a utilização da droga há uma estabilidade na produção tanto da isoforma não-glicosilada quanto da isoforma glicosilada, com predomínio da isoforma não-glicosilada em todos os dias de coleta, correspondendo a ~90% da prolactina total produzida (Figura 9 A.2). No cultivo com 0,6µg/mL há um aumento da produção da isoforma glicosilada, como já relatado anteriormente, enquanto ocorre um decréscimo da isoforma não glicosilada. Pode-se observar que há uma porcentagem de G-hPRL superior a 50% após o 4° dia de produção, diferentemente do que acontece na produção com 2µg/mL, onde há predominância inicial da isoforma glicosilada da prolactina, correspondendo à ~80% da prolactina total produzida, porém durante um período mais limitado de cultivo.

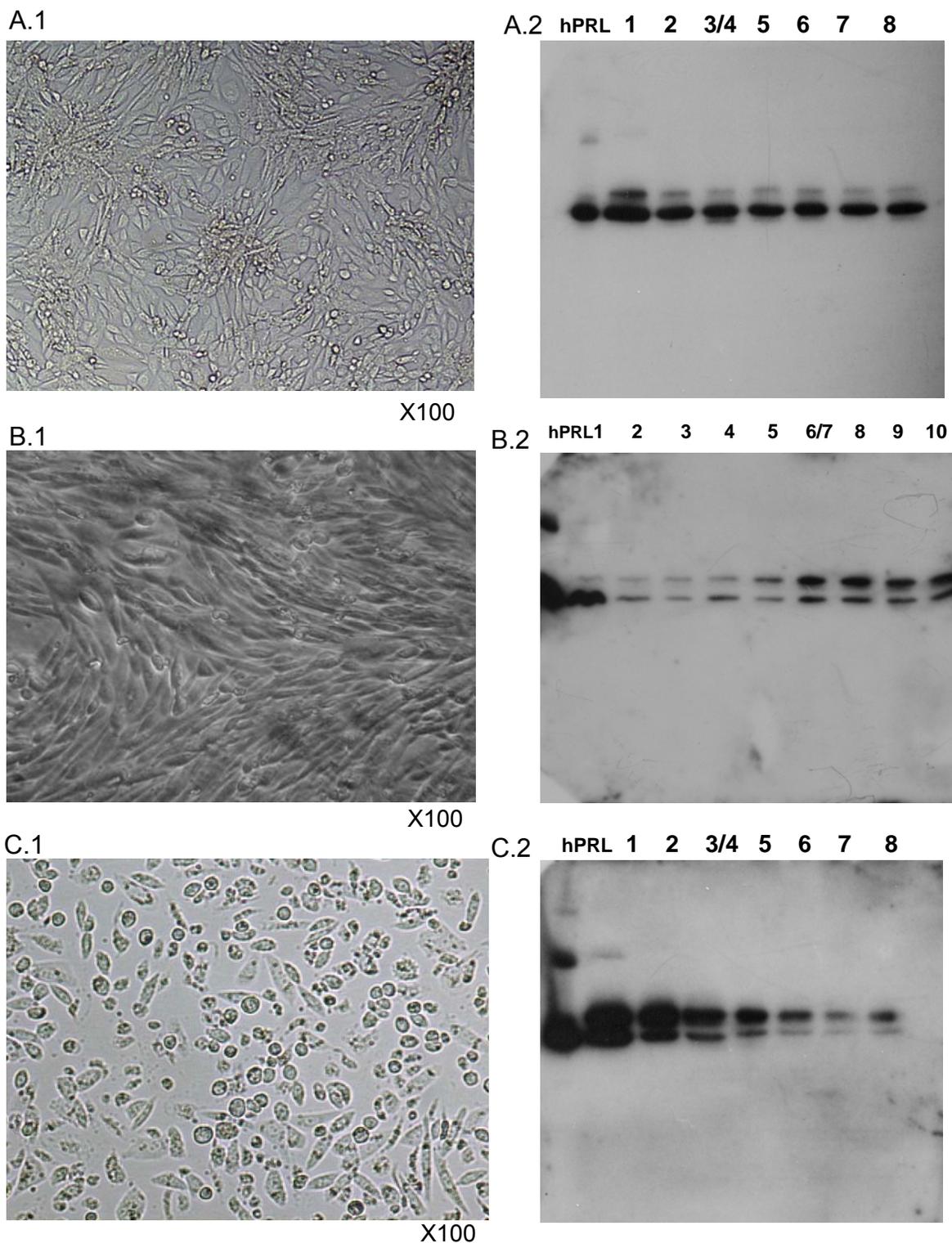


Figura 9. **A1, B1 e C1**, foto das células, em microscópio invertido (aumento de 100x), aderidas na placa, cultivadas em α -MEM, a 37°C e com 5% de CO₂, no décimo dia de coleta, com 0µg/mL, 0,6µg/mL e 2µg/mL de cicloheximida, respectivamente. **A2, B2 e C2**, western blotting correspondente as análises diárias da prolactina produzida, sendo hPRL, a prolactina de referência produzida em *E. coli* e 1 a 10 as coletas do 1° ao 10° dia, respectivamente.

3.4 Análise comparativa mediante HPSEC de produções com e sem a utilização de cicloheximida

Foi realizado um estudo mediante HPSEC com o objetivo de analisar os perfis cromatográficos e a relação entre as isoformas glicosilada e não-glicosilada presentes em produções com a utilização de 0,6 µg/mL e 0 µg/mL de cicloheximida.

Na Figura 10, o tempo de retenção das isoformas presentes no padrão CRS da WHO (Figura 10 C) confirmam a presença da G-hPRL e NG-hPRL nas produções com e sem cicloheximida. A análise comparativa entre os cromatogramas A e B permite determinar a relação entre as áreas das duas isoformas com e sem tratamento com cicloheximida, servindo para avaliar a relação quantitativa entre essas isoformas:

Fig. 10 A com cicloheximida: $G\text{-hPRL}/NG\text{-hPRL} = 5,455$

Fig. 10 B sem cicloheximida: $G\text{-hPRL}/NG\text{-hPRL} = 0,605$

Por esses dados podemos medir um incremento de aproximadamente 10 vezes na relação G-hPRL/NG-hPRL decorrente do tratamento com cicloheximida, além de confirmar a identidade da isoforma glicosilada de hPRL.

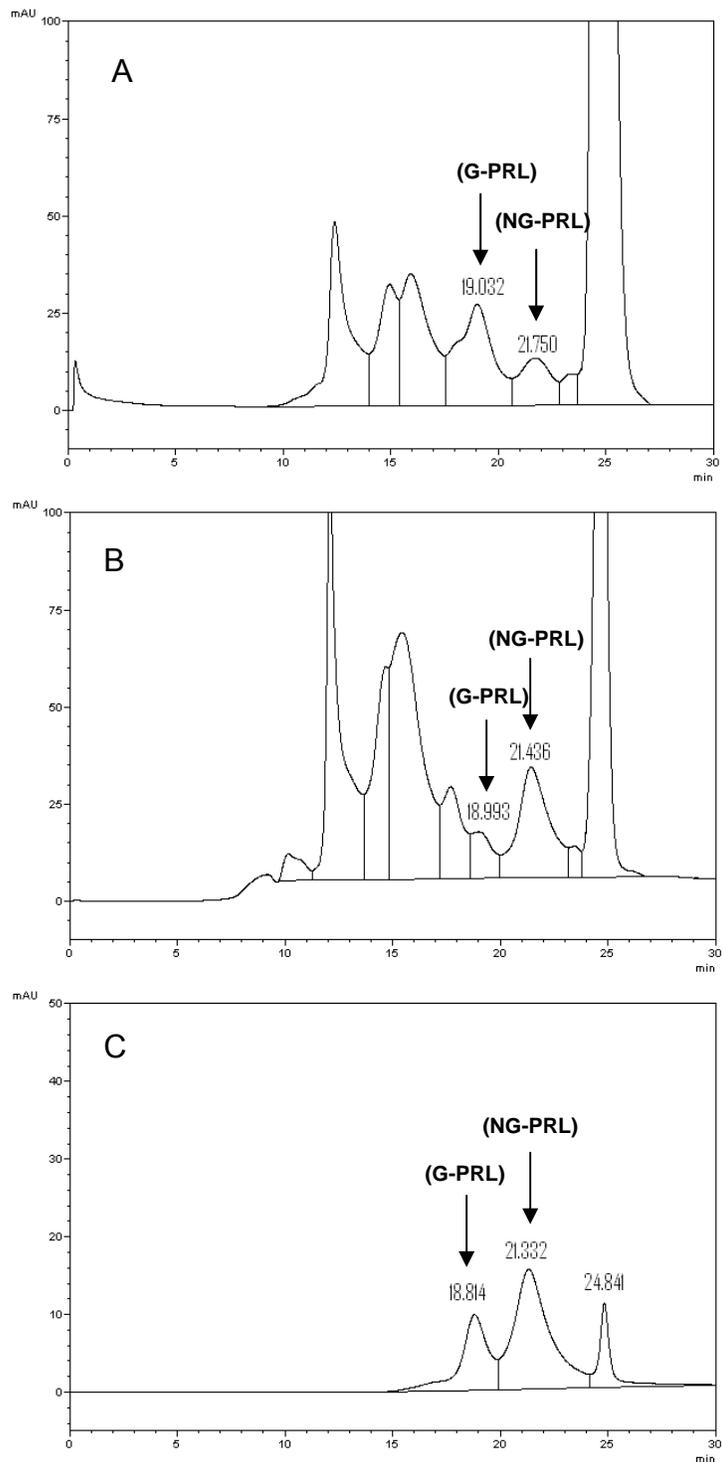


Figura 10. Análise por HPSEC de frações coletadas após concentração e purificação mediante cromatografia com SP-Sepharose Fast Flow. **A.** Perfil cromatográfico derivado de produção utilizando 0,6 µg/mL de cicloheximida; **B.** Perfil cromatográfico derivado de produção sem utilização de cicloheximida; **C.** Padrão de hPRL recombinante da WHO, Chemical Reference Standard (CRS).

3.5 Concentração e Purificação

A prolactina produzida em placas de 10 cm de diâmetro com meio α -MEM, sem SFBd, com 0,6 μ g/mL de cicloheximida, incubada a 37°C com 5% CO₂, foi coletada diariamente por 10 a 20 dias, sendo utilizadas de 10 a 15 placas para cada produção. Um exemplo de análise por RP-HPLC da hPRL produzida no meio de cultura é apresentado na Figura 11. Como a hPRL se apresenta diluída no meio de cultura, 10 mL do meio inicial foram concentrados até 0,6 mL (16,7 vezes) em filtro Amicon Ultra (MILLIPORE) para análise e quantificação mediante HPLC de fase reversa (RP-HPLC). Para cada 1 mL de meio foi calculado 0,09 μ g (~52,3% da PRL total) da isoforma não glicosilada e 0,082 μ g (~47,7% da PRL total) da isoforma glicosilada.

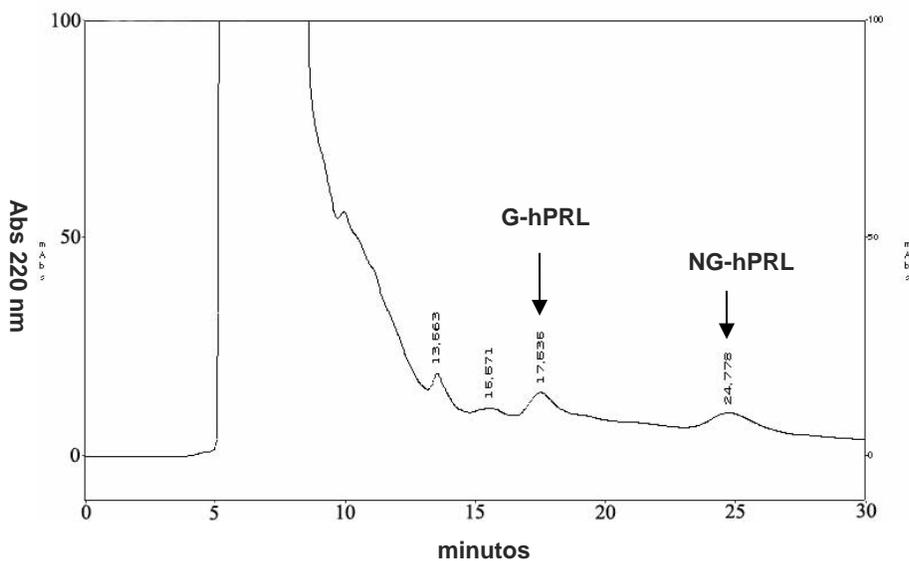


Figura 11. Análise por HPLC de Fase Reversa do meio de cultura obtido durante processo de produção de hPRL na presença de 0,6 μ g/mL de cicloheximida.

3.5.1 Coluna de troca catiônica

Com base nos trabalhos de Price *et. al.* (34) e Soares *et. al.* (47), resolvemos utilizar a cromatografia de troca catiônica SP-Sepharose Fast Flow como primeira etapa de purificação, pois além de uma purificação parcial, essa resina concentra a hPRL presente no meio de cultura. Um exemplo de análise por Western Blotting das amostras coletadas durante uma produção, assim como o perfil cromatográfico dessa primeira etapa de purificação e análises das frações principais que compõem o pico de eluição de hPRL são apresentados na Figura 12. A tabela 1 apresenta exemplos de dados quantitativos relativos à prolactina obtida durante essa primeira etapa de purificação.

Tabela 1. Quantificação por HPSEC da fração principal de prolactina eluída da cromatografia com a resina SP-Sepharose Fast-Flow.

Purificação	Vi do meio (mL)	Prolactina presente na fração principal (5mL)			
		PRL Total (µg)	NG-hPRL	G-hPRL	% G-hPRL
A	1771,3	100,0	38,5	61,5	61,5
B	420,0	66,5	19,0	47,5	71,4
C	605,0	114,0	41,0	73,0	64,0

Vi – Volume inicial

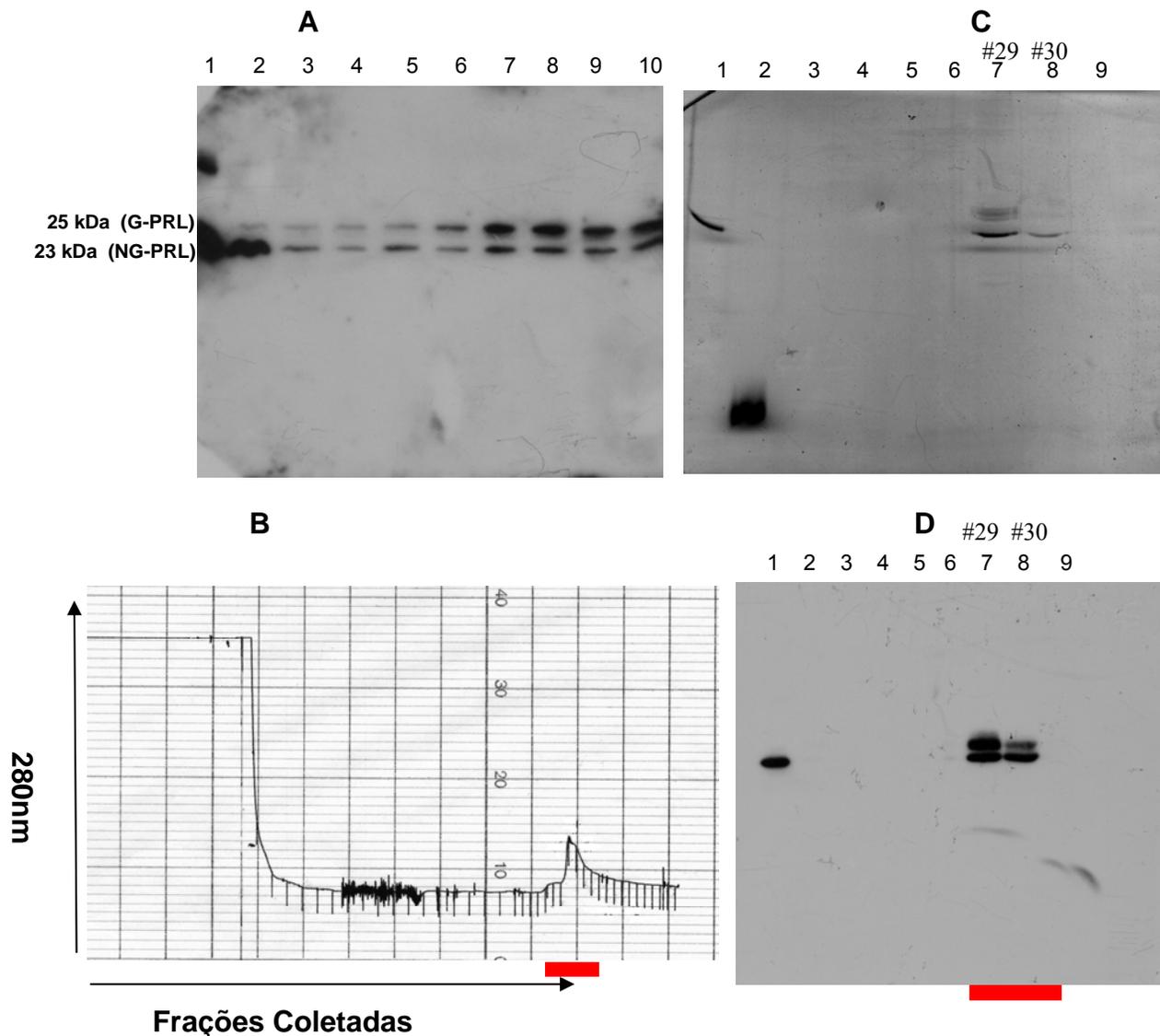


Figura 12. A- Western Blotting analisando amostras tratadas com 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida coletadas durante a produção em meio α -MEM 37°C/ 5% CO_2 . 1. Prolactina de referência produzida em *E.coli*; 2 a 10. Coletas do dia 1 ao dia 9; B- Perfil cromatográfico obtido na purificação da hPRL presente no meio de cultura de CHO mediante cromatografia com resina SP-Sepharose Fast Flow; C- SDS-PAGE analisando diferentes frações do pico de eluição; 1. Prolactina de referência produzida em *E.coli*; 2. Amostra inicial; 3. #25; 4. #26; 5. #27; 6. #28; 7. #29; 8. #30; 9. Material não absorvido pela coluna; D- Western Blotting analisando diferentes frações do pico de eluição; 1. Padrão; 2. Amostra inicial; 3. #25; 4. #26; 5. #27; 6. #28; 7. #29; 8. #30; 9. Material não retido na coluna.

3.5.1.1 Análise do eluato de SP-Sepharose Fast Flow por RP-HPLC

Um exemplo de análise por RP-HPLC das frações obtidas da purificação na cromatografia de troca catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow é apresentado na Figura 13. Podemos observar que a fração #27 contém ~17,2% de NG-PRL e ~82,8% de G-PRL, a fração #28, ~55,2% de NG-PRL e ~44,8% de G-PRL, e a fração #29 ~83,3% de NG-PRL e ~16,7% de G-PRL, mostrando a tendência da isoforma glicosilada eluir antes da não glicosilada nessa etapa de purificação por troca catiônica, tendência confirmada pela análise por SDS-PAGE destas mesmas frações (Figura 14).

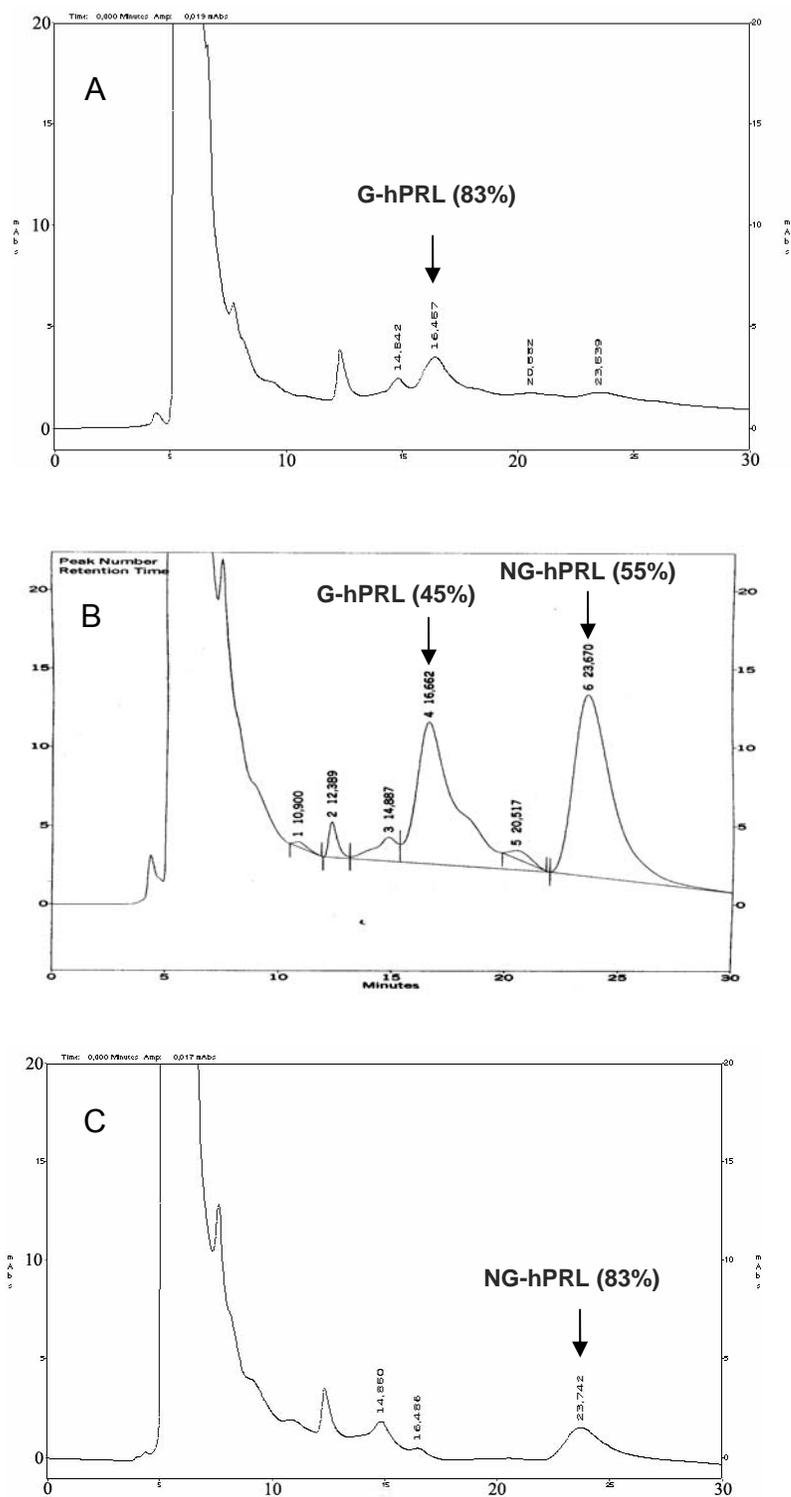


Figura 13. Análise por HPLC de Fase Reversa das diferentes frações do pico principal obtidas da purificação do meio condicionado em cromatografia por troca catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow. **A-** Fração #27; **B-** Fração #28; **C-** Fração #29 (ver Figura 14).

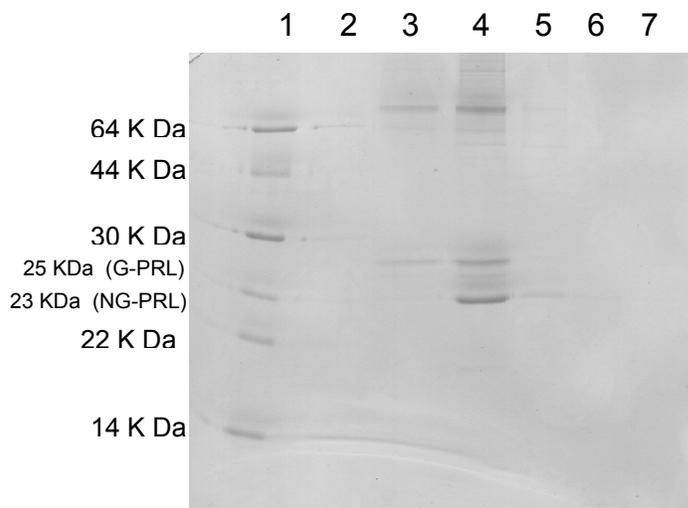


Figura 14. Análise por SDS-PAGE de diferentes frações do pico principal obtidas da purificação do meio condicionado em cromatografia por troca catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow; 1. Marcador de peso molecular + Prolactina de referência produzida em *E.coli*; 2. #26; 3. #27; 4. #28; 5. #29; 6. #30; 7. #31.

3.5.1.2 Análise do eluato de SP-Sepharose Fast Flow por HPSEC

Um exemplo de análise por HPSEC das principais frações obtidas da purificação em cromatografia por troca catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow é apresentado na Figura 15. Observamos que a maior parte da prolactina glicosilada foi eluída na fração 27 (#27), Figura 15B.

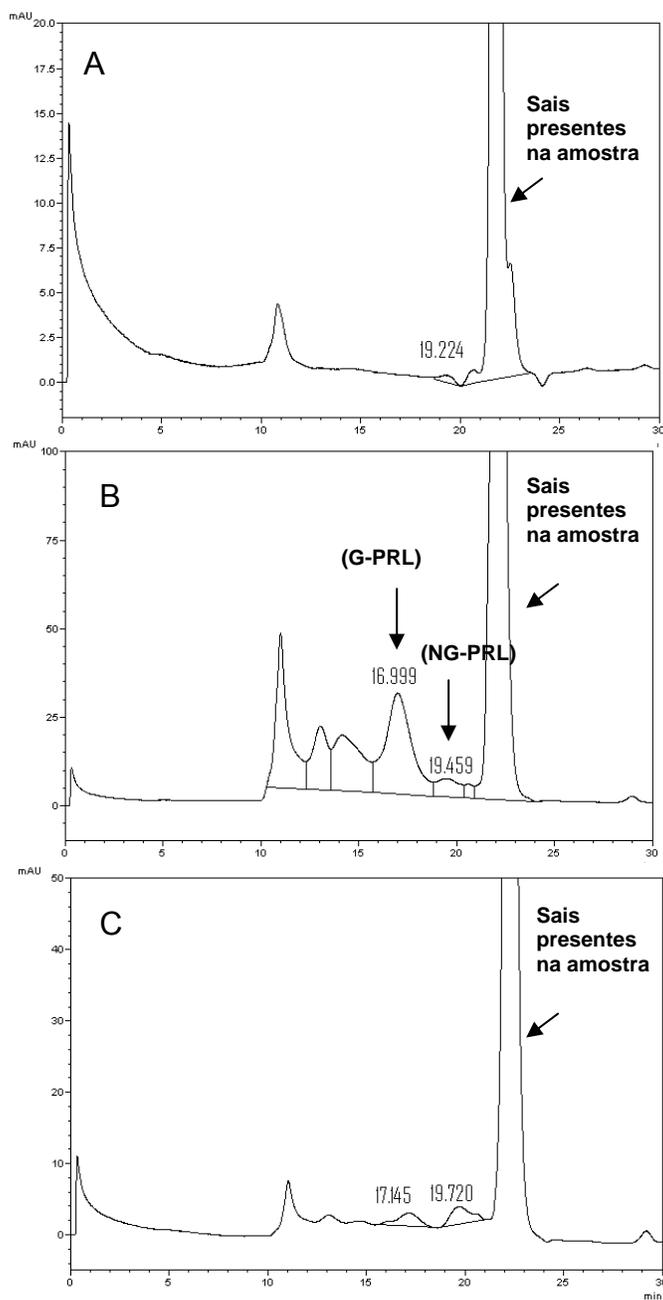


Figura 15. Análise por HPSEC de frações obtidas da purificação em cromatografia por troca catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow. A. #26; B. #27; C. #28.

3.5.2 Utilização da HPSEC como coluna preparativa

Os resultados das análises por RP-HPLC e HPSEC das frações obtidas da cromatografia por troca catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow mostraram que as duas técnicas foram eficientes na separação das frações de hPRL glicosilada e não glicosilada. Considerando que na separação por RP-HPLC, a amostra é eluída com tampão contendo 71,3% de Tris 0,05 M, pH 7,0 e 28,7% de N-propanol, que pode interferir na estabilidade da G-hPRL, assim como nas análises físico-químicas e biológicas, optamos por utilizar a HPSEC como segunda etapa de purificação da G-hPRL.

Um exemplo da utilização da HPSEC na separação da G-hPRL é apresentado na Figura 16. A análise por Western Blotting das frações coletadas confirma a identidade das isoformas glicosilada e não glicosilada de hPRL, a boa resolução obtida e que as frações 3 e 4 (Figura 16 C) são praticamente constituídas por G-hPRL pura.

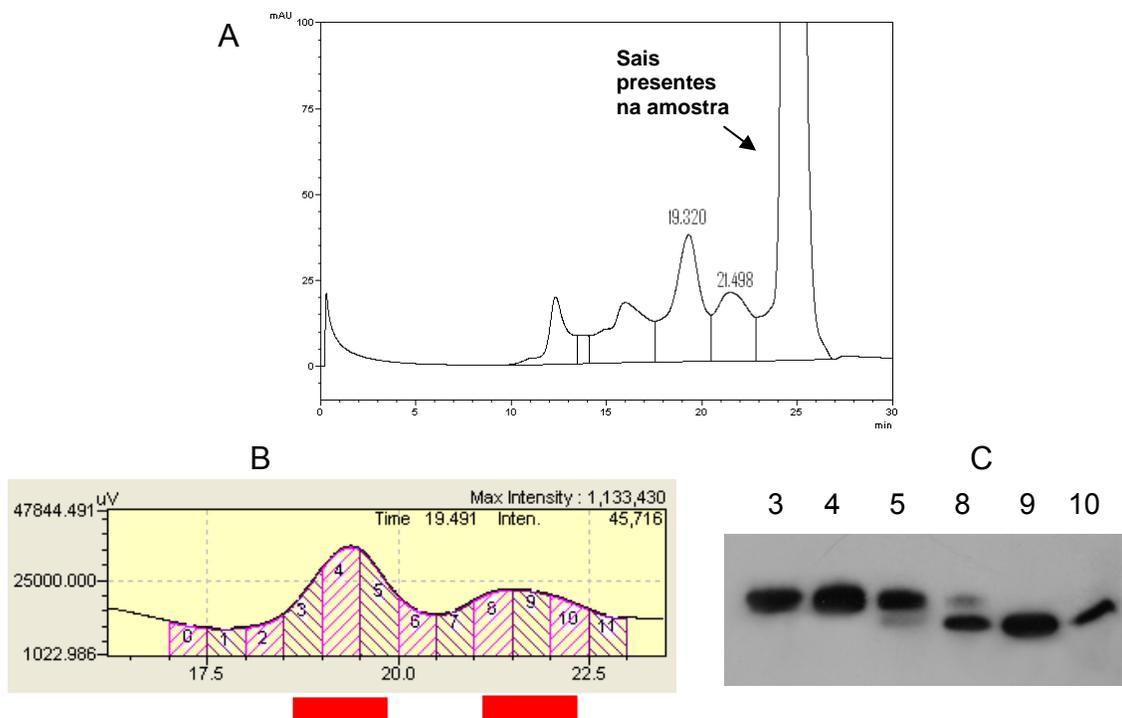


Figura 16. A. Perfil cromatográfico da fração 29 aplicada em HPSEC (500uL); B. Perfil cromatográfico esquemático identificando as frações coletadas da HPSEC; C. Frações coletadas em B analisadas por western blotting.

3.5.3 Introdução de uma etapa intermediária de concentração

As duas etapas de purificação, troca catiônica e HPSEC, possibilitaram o isolamento da G-hPRL (Figura 16), porém em concentrações relativamente baixas (1 a 2µg de G-hPRL/mL). Como o volume máximo de amostra aplicado na HPSEC nas nossas condições está limitado a 500 µL, e como a fração principal contendo G-hPRL obtida da SP-Sepharose Fast Flow é de 5000 µL, resolvemos introduzir uma etapa intermediária de concentração por centrifugação utilizando o sistema de concentração Millipore Amicon Ultra-4, que se mostrou eficiente, permitindo, de forma fácil e rápida, obter concentrações de 10 vezes ou mais, com perdas relativamente baixas de G-hPRL, da ordem de 10% (Figura 17).

Com a introdução dessa etapa de concentração, foi possível isolar frações de G-hPRL da ordem de 10 µg/mL, utilizadas nos estudos de caracterização.

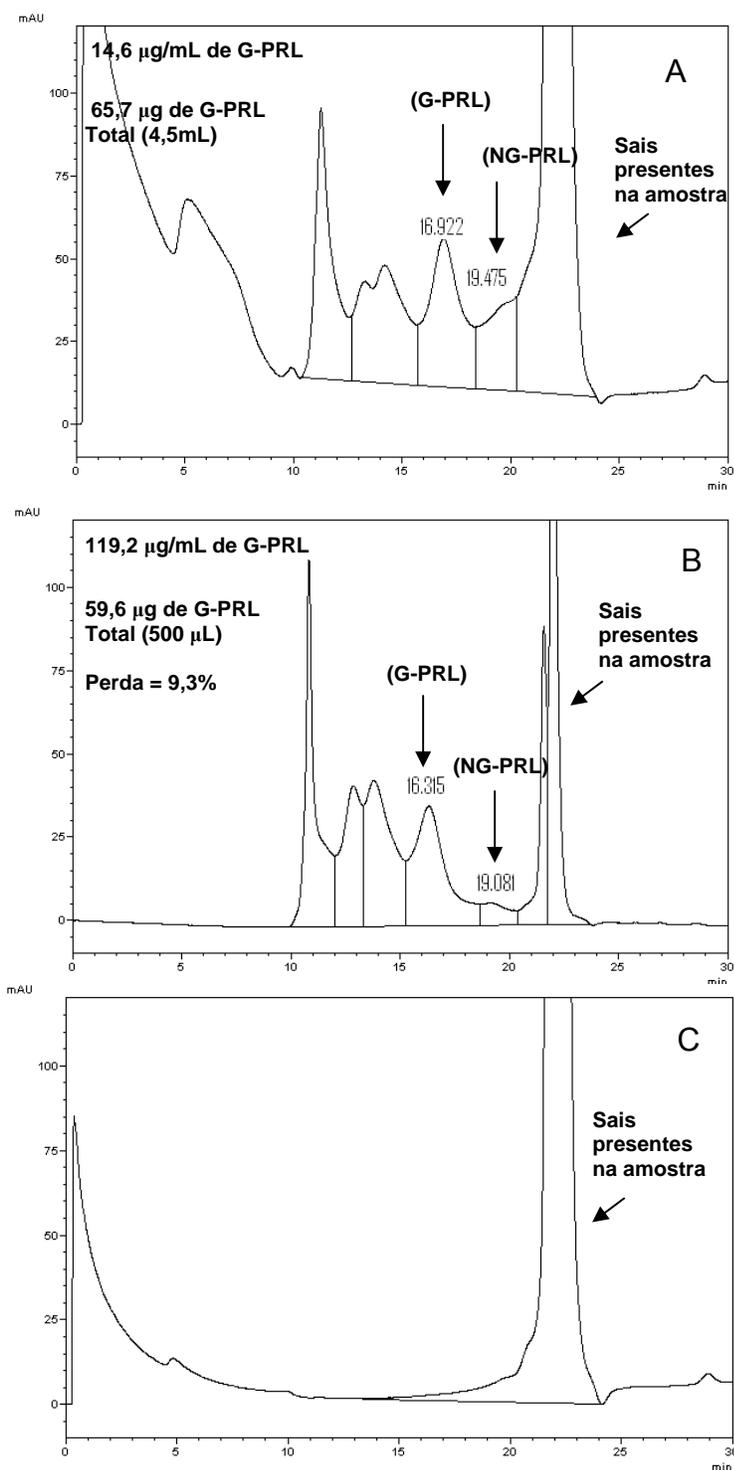


Figura 17. Análise por HPSEC da etapa de concentração utilizando sistema Millipore Amicon ultra-4. **A.** 500 µL da fração principal resultante da 1ª etapa de purificação utilizando a resina de troca catiônica (SP Sepharose Fast Flow); **B.** 50 µL da fração total de 500 µL, concentrada 9 vezes; **C.** Análise de 500 µL fração não retida pela membrana de celulose contendo moléculas menores que 3000 Da, no volume final de 4000 µL.

3.6 Caracterização da G-hPRL

3.6.1 Análise por HPLC

Exemplo de caracterização físico-química da G-hPRL purificada é apresentado na Figura 18. A concentração de G-hPRL foi estimada considerando o valor médio mensurado por HPSEC (9,2 $\mu\text{g/mL}$) e RP-HPLC (7,2 $\mu\text{g/mL}$), ou seja: 8,2 $\mu\text{g/mL}$ +/- 17,2%.

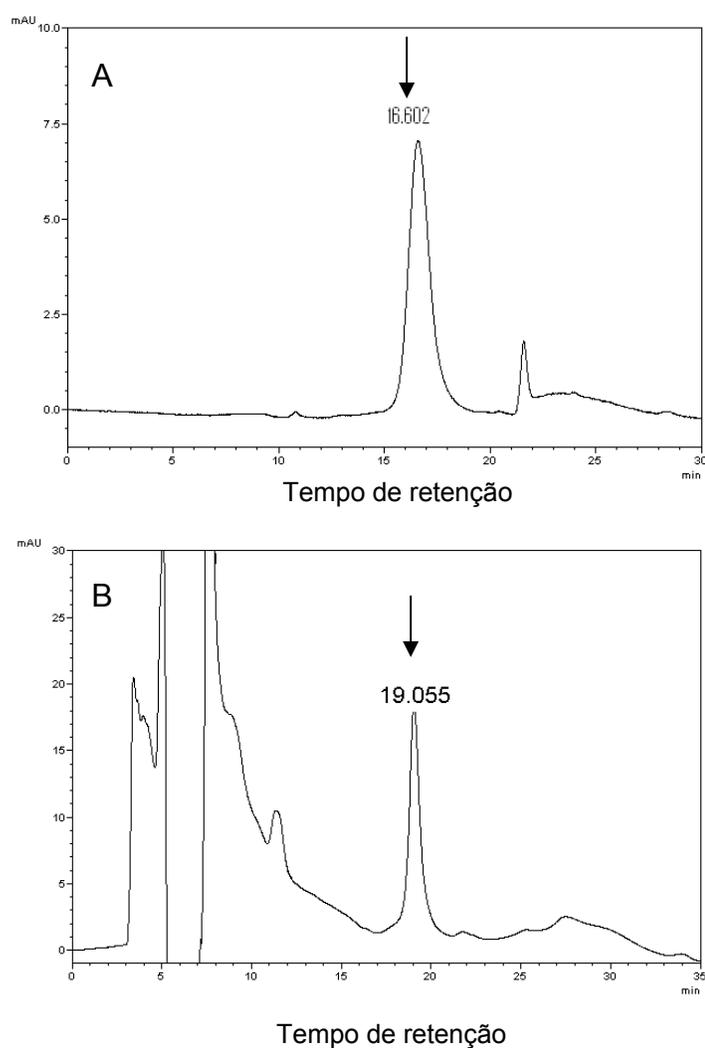


Figura 18. Análise por HPSEC (A) e RP-HPLC (B) da G-hPRL purificada. As setas indicam a posição da G-hPRL utilizada como referência em corridas paralelas.

3.6.2 Análise por SDS-PAGE e Western Blotting

Amostras derivadas das etapas de purificação foram analisadas por SDS-PAGE e Western Blotting (Figura 19) e comparadas aos padrões de hPRL recombinante da Organização Mundial de Saúde (WHO) obtido a partir de células C127: Chemical Reference Standard (CRS), que contém as duas isoformas; a G-hPRL da WHO; e a prolactina de referência IPEN, produzida em *E.coli*. Observamos no SDS-PAGE que a G-hPRL IPEN apresenta uma banda principal praticamente na mesma posição da G-hPRL WHO, e por apresentar uma quantidade maior de material, possibilita também a visualização de outras bandas próximas.

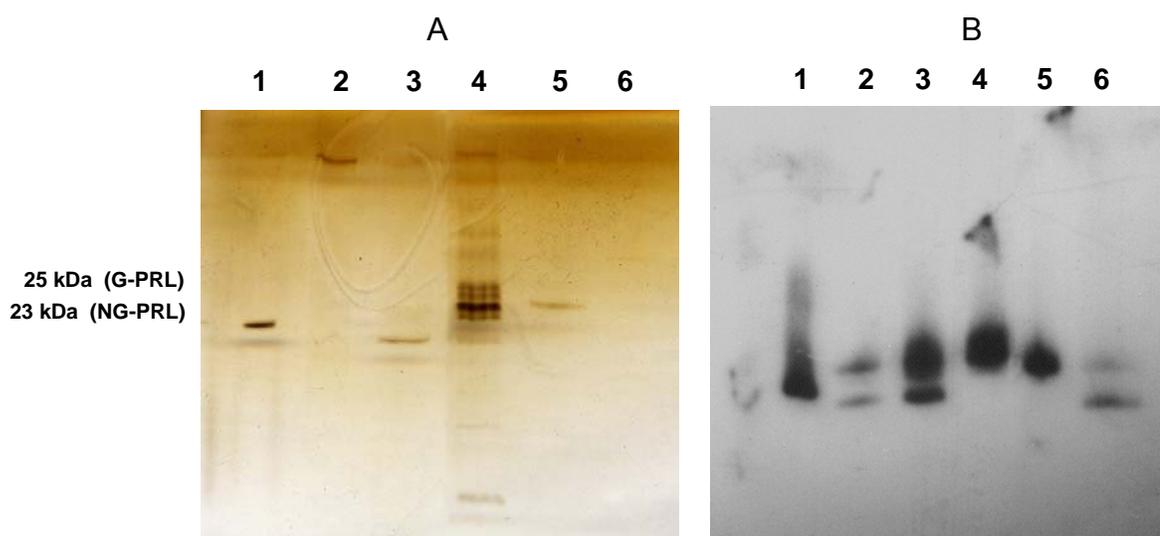


Figura 19. **A.** SDS-PAGE revelado por prata; **B.** Análise por Western Blotting; **1.** Prolactina de referência produzida em *E.coli*; **2.** Meio de cultura condicionado; **3.** Fração obtida da 1^o etapa de purificação e concentração (SP-Sepharose Fast Flow); **4.** Fração obtida da etapa de purificação por HPSEC; **5.** G-hPRL WHO; **6.** hPRL-WHO (CRS).

3.6.3 Ensaios Biológicos com células Ba/F3-LLP e Nb2

Foram realizados estudos avaliando a ação das isoformas da hPRL (G-PRL e NG-PRL) em ensaios de proliferação celular em células Nb2 e Ba/F3-LLP, células prolactino-dependentes, com receptores de prolactina murino e humano, respectivamente.

A Figura 20 apresenta exemplos de curvas de proliferação celular obtidas utilizando como amostras a hPRL recombinante WHO (Padrão 97/714) com atividade específica estimada em 57,2 UI/mg, G-hPRL recombinante da WHO (Padrão 98/580) com atividade específica estimada em 16 UI/mg e a prolactina glicosilada purificada IPEN (G-hPRL-IPEN). As potências da G-hPRL produzida no IPEN e da G-hPRL da WHO estimadas nos dois ensaios biológicos com base no padrão 97/714 são apresentadas na Tabela 2.

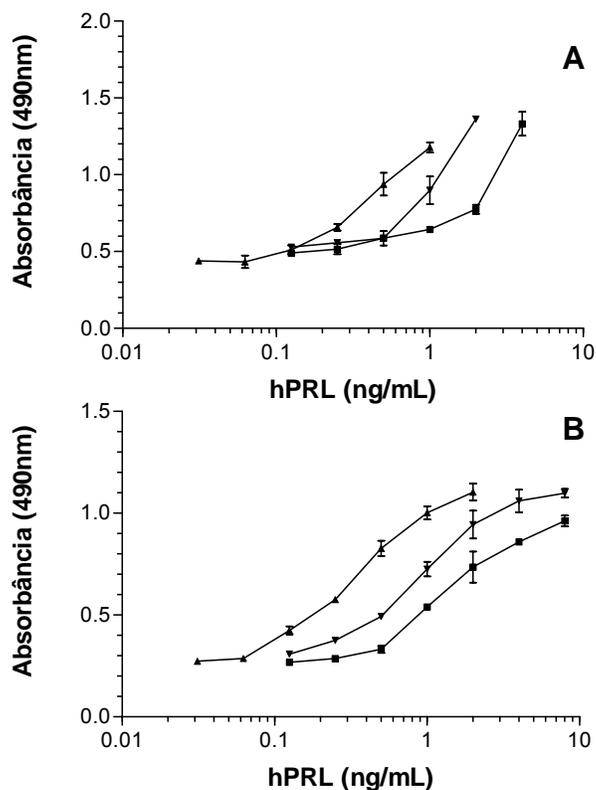


Figura 20. Exemplo de ensaio *in vitro* baseado em células Ba/F3-LLP (A) e Nb2 (B). São comparadas as curvas do padrão de hPRL recombinante da WHO 97/714 (▲), G-hPRL-IPEN (■) e padrão de G-hPRL recombinante da WHO 98/580 (▼).

Tabela 2. Potências da G-hPRL produzida no IPEN e da G-hPRL da WHO estimadas nos dois bioensaios (Ba/F3-LLP e Nb2). Cada valor é resultante da média de dois ensaios biológicos (n=2).

	Nb2		Ba/F3-LLP	
	UI/mg	CV%	UI/mg	CV%
G-hPRL-IPEN	11,12	+/- 4,1%	11,19	+/- 13,8%
G-hPRL-WHO	19,3	+/- 16,8%	24,54	+/- 21,0%

3.6.4 Determinação da massa molecular relativa por espectrometria de massa (MALDI - TOF)

As massas moleculares relativas (M_r) das isoformas glicosilada e não-glicosilada de prolactina foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF (Figura 21). Foi analisada uma amostra parcialmente purificada contendo as duas isoformas de hPRL (G-hPRL e NG-hPRL) obtidas após purificação por SP-Sepharose Fast Flow e HPSEC. Para a prolactina não-glicosilada (NG-hPRL), obtivemos uma massa molecular de 22888,85 Da, e para a glicosilada (G-hPRL), foram encontradas massas moleculares relativas entre 24640,46 e 25891,01 Da.

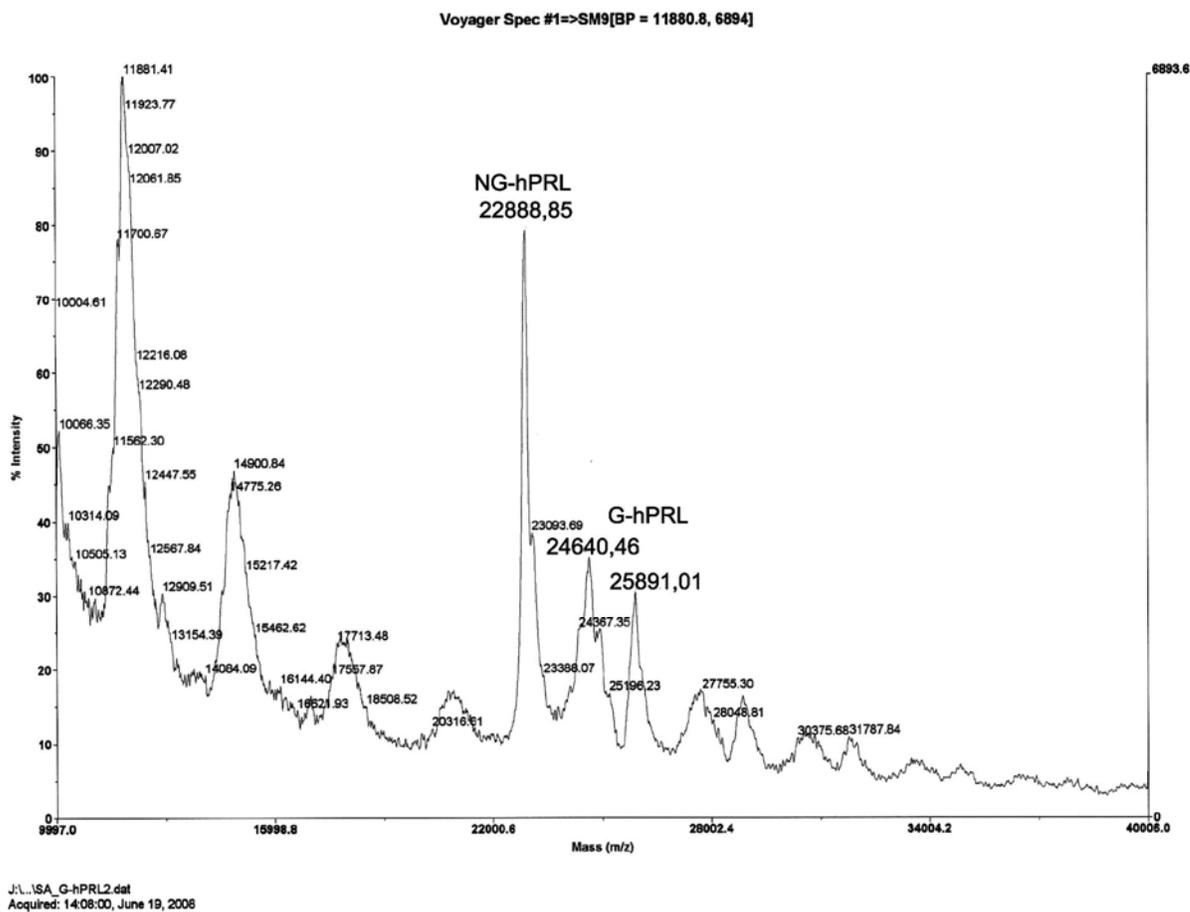


Figura 21. Análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF) da preparação parcialmente purificada contendo as isoformas G-hPRL e NG-hPRL.

4 Discussão

A G-hPRL é uma das isoformas mais comuns de hPRL e relativamente pouco estudada, entre os poucos trabalhos científicos que focalizam a síntese e a caracterização da G-hPRL recombinante podemos destacar o trabalho de Shelikoff *et. al.* (42) que analisou a influência de diferentes inibidores de síntese proteica sobre a síntese da G-hPRL recombinante produzida por células C127 e o trabalho de Price *et. al.* (34) utilizando as mesmas células C127 descreve a obtenção, purificação e a caracterização da G-hPRL.

Com base nos resultados obtidos por Shelikoff *et. al.* (42), a cicloheximida, um inibidor da síntese proteica, foi a droga que apresentou maior efeito sobre o aumento da síntese de G-hPRL. Então, resolvemos verificar se esses dados seriam reproduzidos em nosso clone. O resultado desses primeiros experimentos está exemplificado na Figura 4. Neste experimento, utilizando o mesmo meio de cultura descrito em Soares *et al.* (47), foi confirmado o efeito da cicloheximida no aumento da síntese da G-hPRL, ao mesmo tempo que ocorreu um decréscimo significativo na síntese da NG-hPRL. Confirmamos também que a mesma concentração de 0,6 $\mu\text{g/mL}$, como reportado por Shelikoff, foi a que obtivemos melhores resultados no nosso estudo. Outro resultado apresentado na Figura 5, também utilizando 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida, desta vez porém comparando com a presença de metotrexato (MTX) e soro fetal bovino dialisado (SFBd), confirmou claramente o aumento da G-hPRL em relação à produção sem cicloheximida. A proporção entre

G-hPRL e NG-hPRL parece se manter independente da presença do SFBd e do MTX. A presença do SFBd, embora aumente a síntese da hPRL, não foi utilizado durante a produção, pois sua presença aumenta a síntese de proteínas totais, o que dificulta a purificação da hPRL. O MTX não foi necessário durante a produção já que sua presença no meio de cultivo não refletiu no aumento significativo na síntese de hPRL, confirmando que o clone após o processo de seleção e amplificação gênica se mostrou estável. Esses primeiros resultados foram importantes para viabilizar esse projeto, porém, estudos complementares foram necessários para confirmar e quantificar melhor esses dados. Lembramos que as amostras analisadas se referem à coleta no quarto dia de produção e que o western blotting é limitado como técnica quantitativa, considerando ainda que não sabemos se o anticorpo utilizado reconhece com a mesma eficiência a G-hPRL e a NG-hPRL.

Podemos observar na Figura 4, que a relação G-hPRL/NG-hPRL também foi alta na presença de 2 $\mu\text{g/mL}$, porém, nessa condição a duração do cultivo ficou muito limitada, pois essa concentração foi tóxica para as células, conforme podemos observar na Figura 9C1 e C2. A Figura 9 também mostra a análise da produção de hPRL durante coletas diárias nas concentrações de 0; 0,6 e 2 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida. Observamos que após o quarto dia ocorreu aumento na síntese da hPRL, como se fosse necessário um tempo de adaptação da célula à presença da droga. No entanto, a produção de G-hPRL, referente à coleta do primeiro dia (Figura 9 B2), é menor quando comparada à NG-hPRL. De acordo com Shelikoff *et al.* (1994) a cicloheximida provavelmente aumenta a ocupação do sítio de glicosilação da prolactina por indução seletiva de proteínas que alteram o processo de glicosilação. Esta droga reduz a taxa de alongação do ribossomo, em códons por segundo, através do mRNA, consequentemente reduzindo a taxa, em aminoácidos por segundo, em que um polipeptídeo individual de prolactina é translocado através da membrana do retículo endoplasmático, aumentando o tempo de exposição do sítio de glicosilação à oligosacariltransferase, que se localiza no lúmen do retículo. É de se esperar então que a população de moléculas de prolactina secretadas por uma única célula tenha uma maior fração de proteína glicosilada (42).

Para quantificar o incremento sobre a síntese da G-hPRL em relação à isoforma NG-hPRL, após tratamento das células com cicloheximida foi analisado por HPLC de exclusão molecular (HPSEC) a prolactina produzida nas duas condições de cultivo: a) 0,6 $\mu\text{g/mL}$ e b) 0 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida. Como essa técnica não tem sensibilidade suficiente para detectar diretamente a prolactina presente no meio de cultura, analisamos amostras obtidas ao longo de dez dias de produção e que foram concentradas após a primeira etapa de purificação em cromatografia de troca catiônica (SP-Sepharose Fast Flow). A Figura 10 resume essa análise. Utilizamos como referência o padrão de hPRL recombinante CRS da WHO (Figura 10C), essa preparação contém as duas isoformas G-hPRL e NG-hPRL purificadas a partir do meio condicionado das células C127. Com base no tempo de retenção de cada isoforma, já previamente identificadas (36), identificamos em nossas amostras os picos correspondentes à G-hPRL e NG-hPRL. A comparação entre as áreas desses picos permitiu determinar um incremento de aproximadamente 10 vezes na relação G-hPRL/NG-hPRL, assim como um incremento em valor absoluto de 12,5 a 47,5 μg de G-hPRL (~4 vezes). Claramente essa avaliação tem limitações, como por exemplo, erros de medida que podem decorrer da influência de outros picos de proteínas presentes na amostra ou perdas de hPRL durante a etapa de concentração/purificação e/ou estocagem mas, certamente, é um método quantitativo mais exato quando comparado às análises por Western Blotting e/ou SDS-PAGE, as quais foram utilizadas como metodologia por Shelikoff *et. al.* (1994).

Também foi utilizada HPLC de fase reversa (RP-HPLC) para determinar a quantidade de G-hPRL no meio de cultura. Essa técnica tem a vantagem de separar melhor as isoformas G-hPRL e NG-hPRL (45) dos contaminantes presentes no meio, porém, a sensibilidade dessa técnica ainda é um obstáculo para avaliar a quantidade de G-hPRL diretamente no meio de cultura. Para contornar esse problema concentramos o meio de cultura, o que permitiu determinar a quantidade de G-hPRL presente durante a produção, conforme apresentada na Figura 11.

Realizamos alguns experimentos para avaliar o efeito da cicloheximida em diferentes meios de cultura (Figuras 6 e 7). Com o meio CD-CHO observamos uma

diminuição bem acentuada na síntese da hPRL total em resposta ao aumento da concentração de cicloheximida e a relação G-hPRL/NG-hPRL parece não ter sido alterada de forma significativa (Figura 6). Com o meio CHO-SFM II observamos um aumento na relação G-hPRL/NG-hPRL, mas a prolactina glicosilada aparentemente sofreu uma redução em valor absoluto com o aumento da concentração de cicloheximida.

Considerando alguns dados da literatura, os quais relatam que a redução da temperatura tem um efeito benéfico sobre a produção de proteínas heterólogas em células (22; 9; 11; 43), e sabendo que a prolactina é bastante sensível à temperatura (48), realizamos alguns experimentos avaliando o efeito da diminuição da temperatura de cultivo sobre a síntese de hPRL nas células CHO (Figura 8A). Observamos nesta condição (32°C/5% CO₂) que a banda correspondente à G-hPRL, diferentemente do observado à 37°C (Figura 7), tende a manter sua intensidade com o aumento da concentração de cicloheximida. Nesta condição percebemos também, com maior evidência, a presença de uma banda intermediária entre a G-hPRL e NG-hPRL.

A influência da porcentagem de CO₂ durante o cultivo parece ser outro fator que influencia a produtividade. Yoon *et. al.* (57) e Oliveira *et. al.* (31) relatam o aumento da produtividade de eritropoietina e da tireotrofina recombinante humana (hTSH), respectivamente, com a retirada do CO₂ durante a produção, ambos utilizaram células CHO. Realizamos também alguns estudos avaliando a ação do CO₂ (Figura 8B), e verificamos que a utilização do meio SFM-II, a 32°C e sem a adição de CO₂ ocasionou a eliminação da banda intermediária observada na Figura 8A e não percebemos um aumento significativo na relação G-hPRL/NG-hPRL.

Os resultados obtidos comparando os diferentes meios de cultura, temperatura e concentração de CO₂ apresentaram dados interessantes os quais merecem ser investigados posteriormente. Para dar continuidade ao nosso trabalho, optamos pela utilização do meio α -MEM suplementado com glicose, pelo fato de ser um meio já utilizado em nossos trabalhos (47) e apresenta um menor custo. A

temperatura de 37°C e 5% CO₂ foi mantida por não apresentar isoformas intermediárias de G-hPRL e por serem condições utilizadas de rotina no laboratório.

Como mencionado anteriormente, na primeira etapa de purificação optamos por utilizar uma cromatografia de troca catiônica (SP-Sepharose Fast Flow), como descrito por Price *et al.*,(34) e Soares *et al.* (47; 46). Essa resina além de purificar parcialmente, também apresenta a vantagem de concentrar a prolactina presente no meio de cultura. Outra alternativa seria utilizar uma cromatografia por afinidade a metais imobilizados (IMAC) (50; 48), utilizada na purificação de hPRL presente no espaço periplásmico de bactérias, Ueda *et. al.* (50). Neste trabalho foi comparado as duas metodologias, onde a IMAC apresentou uma recuperação maior, 76 a 86% contra 45 a 67% obtidos com a troca catiônica (SP-Sepharose Fast Flow). Essa metodologia (IMAC) foi testada por nós (dados não apresentados), porém, além da prolactina eluir em volumes maiores, apresentando portanto, uma menor concentração, apresentou uma maior presença de contaminantes quando analisada por SDS-PAGE. Também apresentou a desvantagem de não ser eficiente na purificação de análogos de hPRL, como por exemplo o análogo S179D-hPRL, que não se liga a essa resina (52). Um exemplo de purificação utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow é apresentado na Figura 12. Na análise das frações eluídas (Figuras 13 e 14). Observamos que a G-hPRL apresenta uma tendência em eluir antes da NG-hPRL. Outro aspecto prático que percebemos nessa etapa de purificação é a presença de volumes superiores a 600 mL, sendo a recuperação da PRL proporcionalmente menor (Tabela 1). Talvez isto se deva à demora na eluição da amostra, que durante esse tempo permanece em pH 5.0, facilitando a degradação da PRL.

A técnica de RP-HPLC apresentou uma eficiente separação das isoformas (Figura 13), mas o fato da eluição ocorrer em tampão contendo 71,3% de Tris 0,05M, pH 7,0 e 28,7% de N-propanol, diferente do utilizado em ensaios biológicos e análises físico-químicas, implica na adição de uma etapa de diálise, o que pode introduzir grandes perdas. Considerando isso, optamos por utilizar a HPSEC

preparativa como segunda etapa de purificação, em modo isocrático, utilizando como fase móvel o tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 contendo cloreto de sódio 0,15 M, o qual pode estar presente nos ensaios biológicos e nas análises físico-químicas, com exceção do MALDI-TOF, eliminando a etapa de diálise (Figura 16).

O processo de purificação utilizando duas etapas: troca catiônica e HPSEC demonstrou ser prático e rápido, mas apresentou limitações com relação à concentração final de G-hPRL. O rendimento também foi comprometido em troca de uma separação mais eficiente, pois em cada etapa se faz necessária a escolha de frações onde há mínima interferência da isoforma não-glicosilada da prolactina.

Então foi introduzida uma etapa intermediária de concentração em sistema Amicon Ultra-4 da Millipore, de celulose regenerada e porosidade de 3000 Da. Este sistema demonstrou ser de grande eficiência, chegando a concentrar 10x a amostra, com perdas relativamente baixas, como mostra a Figura 17.

A caracterização e pureza da G-hPRL obtida pôde ser confirmada através das técnicas HPSEC, RP-HPLC, SDS-PAGE e Western Blotting, sempre em comparação ao padrão da Organização Mundial de Saúde (Figuras 18 e 19).

As massas moleculares relativas das isoformas glicosilada e não-glicosilada de prolactina foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF (Figura 21). Para a prolactina não-glicosilada (NG-hPRL), obtivemos uma massa molecular de 22888,85 Da, sendo a teórica de 22898 Da (46). Esse valor, com uma diferença de 0,04% com relação ao teórico, confirma os dados de espectrometria de massa já obtidas em nosso laboratório para essa isoforma de 22888 Da (hPRL obtida em *E. coli*) (46), de 22927 Da (hPRL obtida em CHO) (46) e de 22,905.8 Da (hPRL obtida em *E. coli*, determinada por eletro spray) (48). Para a G-hPRL, foram encontradas massas moleculares entre 24640,46 e 25891,01 Da. Uma variação análoga da massa molecular da G-hPRL também foi relatada por Price *et. al.* (34). Nesse trabalho a G-hPRL recombinante obtida de células C127 foi analisada por espectrometria de massa eletro spray, apresentando valores de massa entre 24864 e 25588 Da. Essas diferenças de massa talvez possam ser

resultantes de diferentes padrões de glicosilação devidos talvez ao processo de cultivo e/ou a diferentes linhagens celulares.

A Figura 20 exemplifica as curvas obtidas nos ensaios biológicos de proliferação celular utilizando células Nb2 e Ba/F3-LLP. É importante ressaltar que pela primeira vez o ensaio com células Ba/F3-LLP foi utilizado na análise da bioatividade da G-hPRL e que os resultados obtidos com essas células que contém receptores humanos para PRL foram similares aos obtidos com as células Nb2, os quais contém receptores murino para PRL.

Embora as amostras de G-hPRL-IPEN e G-hPRL-WHO apresentem paralelismo de resposta nas curvas obtidas nos dois tipos de ensaios biológicos, a G-hPRL-IPEN apresentou aproximadamente 60% da bioatividade da G-hPRL-WHO. Essa atividade é inferior àquela relatada por Soares *et. al.* (47), onde se declara que a atividade biológica da G-hPRL é de 16,5 UI/mg +/- 32,5%. Essa diferença de atividade pode ser devida a vários fatores, como mudança do padrão de glicosilação causada em função da linhagem celular, pelo tratamento com cicloheximida ou pelo processo de cultivo, perdas da atividade durante o processo de purificação ou estocagem, diferentes metodologias utilizadas na avaliação da amostra e variação estatística.

O presente trabalho também cria novas ferramentas e abre caminho para estudos futuros avaliando outros fatores que possam influenciar a expressão de hPRL glicosilada e/ou não-glicosilada, como por exemplo condições de cultivo, utilização de células adaptadas para crescer em suspensão, ou ação de outras drogas, como butirato de sódio, que estimulam a expressão de proteínas recombinantes. Além disso, esse método pode ser aplicado para purificação das formas glicosiladas de antagonistas de prolactina, também produzidas em nosso laboratório (46) e com potencial ação anti-tumoral. A obtenção de G-hPRL pura também possibilita os estudos *in vivo* relacionados com biodistribuição e “clearance”, assim como estudos sobre a composição e estruturas de carboidratos desta molécula.

5 Conclusão

- Os resultados obtidos confirmam dados da literatura, e mostram a forte influência da cicloheximida sobre a expressão das isoformas de hPRL: com 0,6 μ g/mL a produção da G-hPRL aumenta enquanto a NG-hPRL é reduzida drasticamente.
- A utilização de 2,0 μ g/mL de cicloheximida, apesar de aumentar a relação G-hPRL/NG-hPRL e inicialmente ser mais eficiente que a concentração de 0,6 μ g/mL, demonstrou ser tóxica às células, diminuindo a sobrevivência celular e, conseqüentemente o tempo de cultivo.
- Parte dos problemas relacionados aos rendimentos do processo de purificação foram minimizados adicionando uma etapa de concentração intermediária.
- A estratégia de purificação original desenvolvida nesse trabalho, utilizada possibilitou a obtenção de G-hPRL com alta pureza, em concentração da ordem de 10 μ g G-hPRL/mL, permitindo sua caracterização físico-química e biológica conforme proposto para o presente trabalho.
- Os ensaios biológicos utilizando células Ba/F3-LLP e Nb2 confirmaram menor potência biológica da prolactina glicosilada em relação à não

glicosilada, já discutida na literatura (35), e que a preparação glicosilada IPEN apresentou aproximadamente 60% da bioatividade da preparação WHO.

- O presente trabalho cria novas ferramentas para estudos futuros avaliando outros fatores que possam influenciar a expressão de hPRL glicosilada e/ou não-glicosilada, como condições de cultivo utilizando células adaptadas para crescer em suspensão, ou a ação de outras drogas, como butirato de sódio, que estimulam a expressão de proteínas recombinantes.
- Esse método pode ser aplicado para purificação das formas glicosiladas de antagonistas de prolactina também produzidas em nosso laboratório e com potencial ação anti-tumoral.
- A obtenção de G-hPRL pura possibilita também estudos *in vivo* relacionados com biodistribuição, “clearance”, etc.; assim como estudos mais profundos sobre glicosilação, avaliando a composição e estruturas de carboidratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Ben-Jonathan, N., J. L. Mershon, D. L. Allen e R. W. Steinmetz. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. **Endocr Rev**, v.17, n.6, Dec, p.639-69. 1996.
- 2 - Bergman, L. W., E. Harris e W. M. Kuehl. Glycosylation causes an apparent block in translation of immunoglobulin heavy chain. **J Biol Chem**, v.256, n.2, Jan 25, p.701-6. 1981.
- 3 - Bernichtein, S., S. Jeay, R. Vaudry, P. A. Kelly e V. Goffin. New homologous bioassays for human lactogens show that agonism or antagonism of various analogs is a function of assay sensitivity. **Endocrine**, v.20, n.1-2, Feb-Mar, p.177-90. 2003.
- 4 - Bole-Feysot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binart e P. A. Kelly. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocr Rev**, v.19, n.3, Jun, p.225-68. 1998.
- 5 - Bowen, B., J. Steinberg, U. K. Laemmli e H. Weintraub. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. **Nucleic Acids Res**, v.8, n.1, Jan 11, p.1-20. 1980.
- 6 - Chen, T. J., C. B. Kuo, K. F. Tsai, J. W. Liu, D. Y. Chen e A. M. Walker. Development of recombinant human prolactin receptor antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. **Endocrinology**, v.139, n.2, Feb, p.609-16. 1998.
- 7 - Dalmora, S., J. E. Oliveira, R. Affonso, E. Gimbo, M. T. Ribela e P. Bartolini. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **J Chromatogr A**, v.782, n.2, Oct 10, p.199-210. 1997.

- 8 - Das, T., P. W. Johns, V. Goffin, P. Kelly, B. Kelder, J. Kopchick, K. Buxton e P. Mukerji. High-level expression of biologically active human prolactin from recombinant baculovirus in insect cells. **Protein Expr Purif**, v.20, n.2, Nov, p.265-73. 2000.
- 9 - Fogolin, M. B., R. Wagner, M. Etcheverrigaray e R. Kratje. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. **J Biotechnol**, v.109, n.1-2, Apr 8, p.179-91. 2004.
- 10 - Fonseca, M. E., R. Ochoa, C. Moran e A. Zarate. Variations in the molecular forms of prolactin during the menstrual cycle, pregnancy and lactation. **J Endocrinol Invest**, v.14, n.11, Dec, p.907-12. 1991.
- 11 - Fox, S. R., U. A. Patel, M. G. Yap e D. I. Wang. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. **Biotechnol Bioeng**, v.85, n.2, Jan 20, p.177-84. 2004.
- 12 - Fujikawa, T., H. Soya, K. L. Tamashiro, R. R. Sakai, B. S. Mcewen, N. Nakai, M. Ogata, I. Suzuki e K. Nakashima. Prolactin prevents acute stress-induced hypocalcemia and ulcerogenesis by acting in the brain of rat. **Endocrinology**, v.145, n.4, Apr, p.2006-13. 2004.
- 13 - Gawlitzek, M., U. Valley, M. Nimtz, R. Wagner e H. S. Conradt. Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions. **J Biotechnol**, v.42, n.2, Sep 29, p.117-31. 1995.
- 14 - Ginsburg, E. e B. K. Vonderhaar. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. **Cancer Res**, v.55, n.12, Jun 15, p.2591-5. 1995.
- 15 - Glezer, A., C. R. Soares, J. G. Vieira, D. Giannella-Neto, M. T. Ribela, V. Goffin e M. D. Bronstein. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, n.3, Mar, p.1048-55. 2006.
- 16 - Goochee, C. F. Bioprocess factors affecting glycoprotein oligosaccharide structure. **Dev Biol Stand**, v.76, p.95-104. 1992.
- 17 - Goodman, G. e D. Bercovich. Prolactin does not cause breast cancer and may prevent it or be therapeutic in some conditions. **Med Hypotheses**, v.70, n.2, p.244-51. 2008.
- 18 - Gout, P. W., C. T. Beer e R. L. Noble. Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas. **Cancer Res**, v.40, n.7, Jul, p.2433-6. 1980.

- 19 - Hankinson, S. E., W. C. Willett, G. A. Colditz, D. J. Hunter, D. S. Michaud, B. Deroo, B. Rosner, F. E. Speizer e M. Pollak. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. **Lancet**, v.351, n.9113, May 9, p.1393-6. 1998.
- 20 - Hashim, I. A., R. Aston, J. Butler, A. M. McGregor, C. R. Smith e M. Norman. The proportion of glycosylated prolactin in serum is decreased in hyperprolactinemic states. **J Clin Endocrinol Metab**, v.71, n.1, Jul, p.111-5. 1990.
- 21 - Hoffmann, T., C. Penel e C. Ronin. Glycosylation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance. **J Endocrinol Invest**, v.16, n.10, Nov, p.807-16. 1993.
- 22 - Kaufmann, H., X. Mazur, M. Fussenegger e J. E. Bailey. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. **Biotechnol Bioeng**, v.63, n.5, Jun 5, p.573-82. 1999.
- 23 - Lau, J. T., J. K. Welply, P. Shenbagamurthi, F. Naider e W. J. Lennarz. Substrate recognition by oligosaccharyl transferase. Inhibition of co-translational glycosylation by acceptor peptides. **J Biol Chem**, v.258, n.24, Dec 25, p.15255-60. 1983.
- 24 - Lewis, U. J., R. N. Singh, L. J. Lewis, B. K. Seavey e Y. N. Sinha. Glycosylated ovine prolactin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.81, n.2, Jan, p.385-9. 1984.
- 25 - Lewis, U. J., R. N. Singh, Y. N. Sinha e W. P. Vanderlaan. Glycosylated human prolactin. **Endocrinology**, v.116, n.1, Jan, p.359-63. 1985.
- 26 - Llovera, M., C. Pichard, S. Bernichtein, S. Jeay, P. Touraine, P. A. Kelly e V. Goffin. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. **Oncogene**, v.19, n.41, Sep 28, p.4695-705. 2000.
- 27 - Markoff, E. e D. W. Lee. Glycosylated prolactin is a major circulating variant in human serum. **J Clin Endocrinol Metab**, v.65, n.6, Dec, p.1102-6. 1987.
- 28 - Markoff, E., D. W. Lee e D. R. Hollingsworth. Glycosylated and nonglycosylated prolactin in serum during pregnancy. **J Clin Endocrinol Metab**, v.67, n.3, Sep, p.519-23. 1988.
- 29 - Markoff, E., M. B. Sigel, N. Lacour, B. K. Seavey, H. G. Friesen e U. J. Lewis. Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. **Endocrinology**, v.123, n.3, Sep, p.1303-6. 1988.

- 30 - Noble, R. L., B. C. Hochachka e D. King. Spontaneous and estrogen-produced tumors in Nb rats and their behavior after transplantation. **Cancer Res**, v.35, n.3, Mar, p.766-80. 1975.
- 31 - Oliveira, J. E., R. Damiani, K. Vorauer-Uhl, P. Bartolini e M. T. Ribela. Influence of a reduced CO₂ environment on the secretion yield, potency and N-glycan structures of recombinant thyrotropin from CHO cells. **Mol Biotechnol**, v.39, n.2, Jun, p.159-66. 2008.
- 32 - Ormandy, C. J., A. Camus, J. Barra, D. Damotte, B. Lucas, H. Buteau, M. Edery, N. Brousse, C. Babinet, N. Binart e P. A. Kelly. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. **Genes Dev**, v.11, n.2, Jan 15, p.167-78. 1997.
- 33 - Paris, N., F. Rentier-Delrue, A. Defontaine, V. Goffin, J. J. Lebrun, L. Mercier e J. A. Martial. Bacterial production and purification of recombinant human prolactin. **Biotechnol Appl Biochem**, v.12, n.4, Aug, p.436-49. 1990.
- 34 - Price, A. E., K. B. Logvinenko, E. A. Higgins, E. S. Cole e S. M. Richards. Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. **Endocrinology**, v.136, n.11, Nov, p.4827-33. 1995.
- 35 - Rafferty, B., P. Rigsby e R. E. Gaines-Das. Draft Report of an International Collaborative Study of the proposed WHO Reference Reagents for rDNAderived Prolactin and its Glycosylated and Non-glycosylated Components. **WHO TRS (Technical Report Series)** v.52, N° 924 Geneva. 2001.
- 36 - Rafferty, B., P. Rigsby e R. E. Gaines-Das. Multicentre collaborative study to calibrate IGF-II by bioassay and immunoassay: establishment of the First WHO Reference Reagent. **Growth Horm IGF Res**, v.11, n.1, Feb, p.18-23. 2001.
- 37 - Rao, P. N. e J. Engelberg. Hela Cells: Effects of Temperature on the Life Cycle. **Science**, v.148, May 21, p.1092-4. 1965.
- 38 - Reynolds, C., K. T. Montone, C. M. Powell, J. E. Tomaszewski e C. V. Clevenger. Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. **Endocrinology**, v.138, n.12, Dec, p.5555-60. 1997.
- 39 - Richards, S. M., R. D. Garman, L. Keyes, B. Kavanagh e J. M. Mcpherson. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. **Cell Immunol**, v.184, n.2, Mar 15, p.85-91. 1998.
- 40 - Riggan, R. M., C. J. Shaar, G. K. Dorulla, D. S. Lefeber e D. J. Miner. High-performance size-exclusion chromatographic determination of the potency of

biosynthetic human growth hormone products. **J Chromatogr**, v.435, n.2, Jan 8, p.307-18. 1988.

41 - Sambrook, J., E. F. Fritsch e T. Maniatis. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v.1, 2 ed, p.6.36-6.44. 1989.

42 - Shelikoff, M., A. J. Sinskey e G. Stephanopoulos. The effect of protein synthesis inhibitors on the glycosylation site occupancy of recombinant human prolactin. **Cytotechnology**, v.15, n.1-3, p.195-208. 1994.

43 - Shi, M., Z. Xie, M. Yu, B. Shen e N. Guo. Controlled growth of Chinese hamster ovary cells and high expression of antibody-IL-2 fusion proteins by temperature manipulation. **Biotechnol Lett**, v.27, n.23-24, Dec, p.1879-84. 2005.

44 - Sinha, Y. N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. **Endocr Rev**, v.16, n.3, Jun, p.354-69. 1995.

45 - Soares, C. R., I. M. Camargo, L. Morganti, E. Gimbo, J. Ezequiel De Oliveira, R. Legoux, P. Ferrara e P. Bartolini. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. **J Chromatogr A**, v.955, n.2, May 10, p.229-36. 2002.

46 - Soares, C. R., A. Glezer, K. Okazaki, E. K. Ueda, S. R. Heller, A. M. Walker, V. Goffin e P. Bartolini. Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Protein Expr Purif**, v.48, n.2, Aug, p.182-94. 2006.

47 - Soares, C. R., L. Morganti, B. Miloux, J. H. Lupker, P. Ferrara e P. Bartolini. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells. **Biotechnol Appl Biochem**, v.32 (Pt 2), Oct, p.127-35. 2000.

48 - Soares, C. R., E. K. Ueda, T. L. Oliveira, F. I. Gomide, S. R. Heller e P. Bartolini. Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: temperature plays a major role in protein yields. **J Biotechnol**, v.133, n.1, Jan 1, p.27-35. 2008.

49 - Tanaka, T., R. P. Shiu, P. W. Gout, C. T. Beer, R. L. Noble e H. G. Friesen. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. **J Clin Endocrinol Metab**, v.51, n.5, Nov, p.1058-63. 1980.

50 - Ueda, E. K., P. W. Gout e L. Morganti. Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic Escherichia coli extracts. **J Chromatogr A**, v.922, n.1-2, Jul 13, p.165-75. 2001.

- 51 - Vazquez, D. Inhibitors of protein biosynthesis. **Mol Biol Biochem Biophys**, v.30, p.i-x, 1-312. 1979.
- 52 - Walker, A. M. S179D prolactin: antagonistic agony! **Mol Cell Endocrinol**, v.276, n.1-2, Sep 30, p.1-9. 2007.
- 53 - Warren, C. E. Glycosylation. **Curr Opin Biotechnol**, v.4, n.5, Oct, p.596-602. 1993.
- 54 - Watanabe, I. e S. Okada. Stationary phase of cultured mammalian cells (L5178Y). **J Cell Biol**, v.35, n.2, Nov, p.285-94. 1967.
- 55 - Woody, M. A., L. A. Welniak, R. Sun, Z. G. Tian, M. Henry, S. Richards, A. Raziuddin, D. L. Longo e W. J. Murphy. Prolactin exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. **Exp Hematol**, v.27, n.5, May, p.811-6. 1999.
- 56 - Wray, W., T. Boulikas, V. P. Wray e R. Hancock. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Anal Biochem**, v.118, n.1, Nov 15, p.197-203. 1981.
- 57 - Yoon, S. K., J. Y. Song e G. M. Lee. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. **Biotechnol Bioeng**, v.82, n.3, May 5, p.289-98. 2003.
- 58 - Zhang, W. C., R. Sun, J. Zhang e Z. Tian. Recombinant human prolactin protects against irradiation-induced myelosuppression. **Cell Mol Immunol**, v.2, n.5, Oct, p.379-85. 2005.