

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROLACTINA HUMANA EM CÉLULAS CHO TRATADAS COM BUTIRATO DE SÓDIO

Marcos Vinicius Nucci Capone e Carlos Roberto Jorge Soares
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio protéico primariamente secretado pela glândula hipofisária anterior. Desde que níveis anormais de hPRL foram relacionados a inúmeras desordens na função hipofisária e de reprodução, a hPRL é um dos hormônios mais frequentemente determinados na rotina de ensaios clínicos.

A hPRL é conhecida por estimular a lactação, crescimento e desenvolvimento da glândula mamária, mas está também relacionada com mais de trezentas funções. Apresenta duas isoformas principais a prolactina não glicosilada (NG-hPRL) e a prolactina glicosilada (G-hPRL) [1].

OBJETIVO

Analisar o nível de expressão de prolactina secretada por células CHO, testando fatores que segundo a literatura aumentam a síntese de proteínas recombinantes, como o butirato de sódio (NaBu).

METODOLOGIA

A hPRL foi obtida a partir de células CHO transfectadas com o vetor pEDdc – hPRL [1]. As células CHO foram cultivadas em placas de cultura de 10 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio de cultura α -MEM (Minimum Essential Medium - Alfa), soro bovino fetal dialisado 10% e 100 nM de metotrexato. A seguir foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ até as células atingirem confluência, sendo então ressuspensas utilizando uma solução de tripsina 0,05% (p/v) em PBS, e redistribuídas em placas de 24 cavidades. Em seguida, a cultura foi submetida a diferentes concentrações de NaBu para avaliar seus efeitos sobre o nível de

expressão de hPRL e sobre o crescimento e viabilidade celular. Diferentes técnicas físico-químicas e imunológicas foram utilizadas para avaliar a expressão de hPRL.

RESULTADOS

Para avaliar o efeito do NaBu sobre a biossíntese de hPRL, foram coletadas amostras do meio condicionado de células CHO para a realização da RP-HPLC e *Western blot* (figuras 2 e 3). Após a purificação da hPRL do meio condicionado, as amostras tratadas ou não com NaBu foram submetidas a análises por HPSEC (figura 4). As diferentes metodologias empregadas como, *Western blot* quanto RP-HPLC e/ou HPSEC indicam que 1 mM NaBu foi a concentração ideal de tratamento, provendo o maior nível de expressão de hPRL, mantendo ainda uma boa viabilidade celular e um pequeno decréscimo do crescimento celular (figura 1).

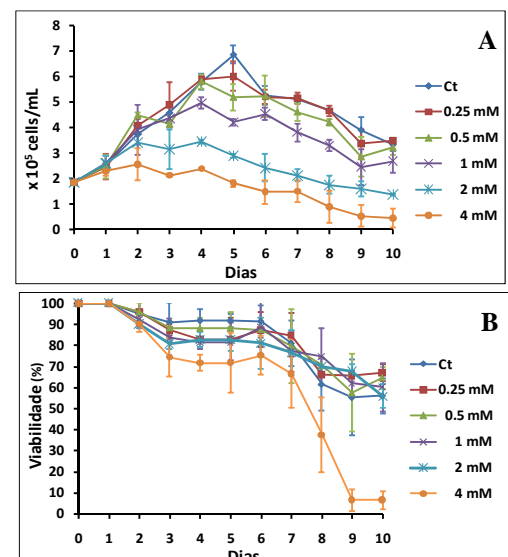


Figura 1 - Influência do NaBu sobre o (A) crescimento e (B) viabilidade de células CHO pEDdc-hPRL.

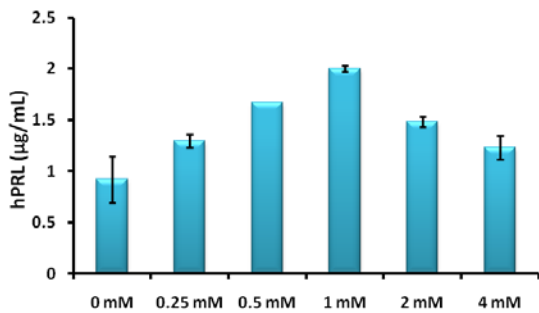


Figura 2 - Quantificação da produção de hPRL por RP-HPLC a partir do meio de cultivo de culturas de células CHO pEDdc-hPRL, tratadas ou não tratadas com diferentes concentrações de NaBu.

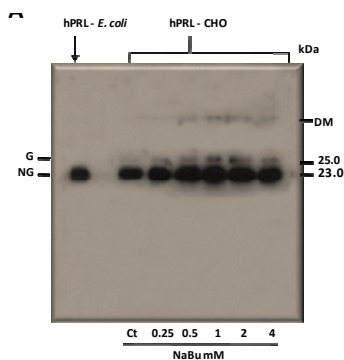


Figura 3 - Western blot dos pools resultantes das coletas diárias do meio de cultivo durante os 10 dias de tratamento com diferentes concentrações NaBu. DM: dímero de hPRL.

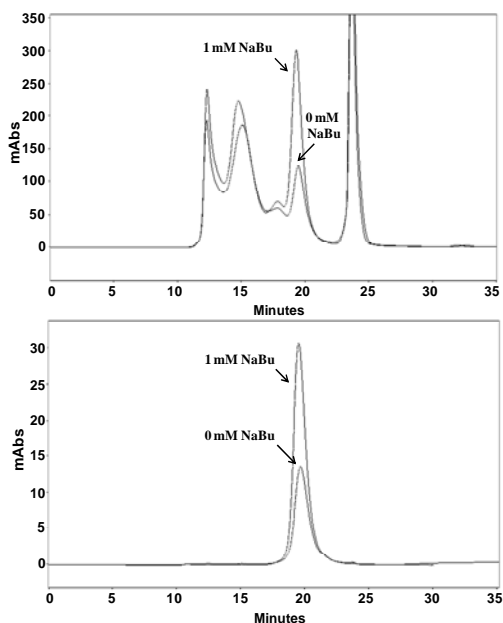


Figura 4- (A) Quantificação da produção de hPRL por HPSEC de células CHO pEDdc-hPRL,

tratadas ou não tratadas com diferentes concentrações de NaBu. (B) Segundo passo de purificação de hPRL com ~ 97% de pureza.

CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de NaBu sobre a síntese de hPRL em culturas células CHO modificadas geneticamente. O tratamento com 1 mM de NaBu demonstrou um aumento de ~2 vezes sobre a síntese de hPRL. A adição do NaBu, provavelmente não afetou a estrutura protéica da hPRL, pois o tempo de retenção avaliado por RP-HPLC ou HPSEC não foi alterado, quando comparado ao controle não tratado e ao padrão de referência de hPRL-lpen.

No entanto, com apenas 1 mM de NaBu obtivemos um aumento da síntese de hPRL, com um menor declínio do crescimento celular, mantendo a viabilidade celular similar ao controle não tratado.

Análises por *Western blot* também confirmaram que a adição de NaBu à culturas de células CHO induziram uma maior síntese de hPRL. No entanto, somente a concentração de 1 mM de NaBu demonstrou um aumento da expressão de hPRL, confirmando as análises por RP-HPLC e HPSEC [2].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Soares, C.R.J., Morganti, L., Miloux, B., Lupker, J.H., Ferrara, P., and Bartolini, P. 2000. High level synthesis of human prolactin in Chinese Hamster Ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32:127-135.
- [2] Rodrigues Goulart, H., F. S. Arthuso, M. V. N. Capone, T. L. Oliveira, P. Bartolini, and C. R. J. Soares. 2010. Enhancement of Human Prolactin Synthesis by Sodium Butyrate Addition to Serum-Free CHO Cell Culture. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:1-11.

APOIO FINANCEIRO

CNPq e FAPESP