

# Aplicação dos Bioensaios com Células Ba/F<sub>3</sub>-LLP e Nb2 na Determinação da Potência Biológica da Prolactina Humana

Fernanda dos Santos Arthuso e Dr. Carlos Roberto Jorge Soares  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

## INTRODUÇÃO

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio proteico primariamente secretado pela glândula hipofisária anterior. Consiste de uma cadeia única com uma massa molecular de 23 kDa e com três pontes dissulfeto intramoleculares.

É mais conhecida por estimular a lactação, crescimento e desenvolvimento da glândula mamária, mas está também relacionada com mais de trezentas funções diferentes. Possui importante uso diagnóstico, porém suas possíveis aplicações clínicas ainda estão em fase de estudo. Apresenta duas isoformas principais a Prolactina Não Glicosilada (NG-hPRL) e a Prolactina Glicosilada (G-hPRL) [1].

## OBJETIVO

Padronização e comparação dos bioensaios *in vitro* com células Ba/F<sub>3</sub>-LLP e Nb2 na avaliação da potência biológica de diferentes preparações de prolactina ou de suas isoformas.

## METODOLOGIA

As atividades das diferentes isoformas de hPRL foram avaliadas por dois bioensaios, o primeiro utilizando as células Ba/F<sub>3</sub>-LLP, desenvolvido no laboratório, e o segundo com células Nb2. As células Ba/F<sub>3</sub>-LLP além de prolactino - dependentes apresentam receptores humano para a prolactina, apresentando a vantagem, no nosso caso, de ser um ensaio espécie-específico.

Já o bioensaio clássico Nb2 [2], estas células são derivadas de um linfoma de

rato da linhagem *Noble*, também são prolactina dependentes e apresentam como desvantagem o fato de terem receptores para prolactina de rato, gerando no nosso caso um ensaio não espécie-específico. Estas células foram mantidas em suspensão em frasco para cultura de células de 75 cm<sup>2</sup>, no meio RPMI-1640, com suplementos.

Para os bioensaios foi utilizado como padrão de referência a hPRL 97/714 da Organização Mundial da Saúde (WHO). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (20 a 50k células/poço). Após incubação de 72h, a 37 °C e com 5% CO<sub>2</sub>, o número de células viáveis foi avaliado por teste colorimétrico utilizando a solução MTS-PMS (Cell Titer 96 Aqueous Kit, Promega Corp., Madison, WI), com leitura no comprimento de onda de 490nm [1].

## RESULTADOS

As células Ba/F<sub>3</sub>-LLP e Nb2 foram utilizadas para determinar a potência biológica de amostra contendo hPRL e suas isoformas.

Um exemplo de curva é apresentado na Figura 1. Esse ensaio apresenta uma sensibilidade de resposta na ordem de 50 picogramas de hPRL/mL e a leitura após 2 horas de incubação com MTS-PMS foi a que apresentou melhor resposta.

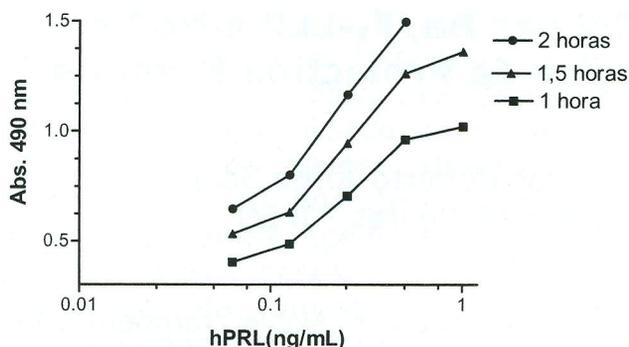


Figura 1: Exemplo de ensaio proliferativo com células Ba/F<sub>3</sub>-LLP utilizando o padrão de hPRL recombinante WHO-CRS (padrão de referência da Organização Mundial da Saúde). São comparadas curvas dose-resposta obtidas com diferentes tempos de incubação após adição da solução MTS-PMS.

Os resultados principais dos ensaios desenvolvidos nesse projeto estão sintetizados na Tabela I.

Nos casos das amostras de hPRL produzidas por células CHO cultivadas em suspensão e por bactéria *E. coli*, que são compostas principalmente pela isoforma NG-hPRL, o ensaio com células Ba/F<sub>3</sub>-LLP determinou uma potência aproximadamente duas vezes superior ao ensaio com células Nb2. Esse fato precisa ser melhor investigado, para isso é necessário um maior número de ensaios que proporcionaria uma avaliação estatística mais precisa e confiável.

Tabela I: Potência Biológica determinada nos dois bioensaios para as diferentes preparações de hPRL e de suas isoformas analisada nesse estudo. Foi utilizada como referência a hPRL recombinante da WHO - 97/714.

Preparações	Potência Biológica UI/mg ± CV(%)	
	Células Nb2	Células Ba/F <sub>3</sub> -LLP
G-hPRL WHO	19,3 ± 16,8 (n=2)	24,6 ± 21,0 (n=2)
G-hPRL IPEN	14,7 ± 38,6 (n=3)	11,2 ± 13,9 (n=2)
hPRL - CHO susp. IPEN	29,3 ± 31,0 (n=2)	50,9 ± 41,0 (n=2)
hPRL - <i>E. coli</i> - IPEN	51,5 ± 24,0 (n=3)	102,3 ± 6,3 (n=2)

## CONCLUSÕES

O bioensaio de proliferação com células Ba/F<sub>3</sub>-LLP apresenta alta sensibilidade, aproximadamente 50 pg hPRL/mL, similar à sensibilidade do ensaio clássico com células Nb2, de aproximadamente 20 pg hPRL/mL.

Confirmamos que o perfil mais adequado da curva dose-resposta nos dois bioensaios de proliferação ocorre após duas horas de incubação com o reagente MTS-PMS.

Não foi observado diferenças significativas nas respostas dos ensaios de proliferação com células Ba/F<sub>3</sub>-LLP e Nb2 na análise das amostras de G-hPRL.

A G-hPRL produzida no IPEN também apresentou uma atividade biológica aproximadamente 60% menor que a isoforma da prolactina glicosilada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[6]SOARES, C. R., A. Glezer, K. Okazaki, E. K. Ueda, S. R. Heller, A. M. Walker, V. Goffin, and P. Bartolini. 2006. Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Protein Expr Purif* 48:182-94.

[7]TANAKA, T, Shiu, R.P.C., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L., Friesen, H.G. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab.*, 1980; 51(5): 1058-63.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

FAPESP e CNPq