

Purificação e caracterização da tireotrofina humana (hTSH) expressa em células de rim de embrião humano (Expi293F™) em suspensão

Renan Passos Freire e Carlos Roberto Jorge Soares
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

A tireotrofina, ou hormônio estimulador da tireóide (TSH) é um hormônio pituitário heterodimérico que possui duas subunidades unidas não covalentemente (α e β), produzida e secretada pelos tireotrófos, regulando funções da glândula Tireoide na secreção dos hormônios tireoidianos, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). Esse mecanismo de regulação, conhecido como eixo-hipotálamo-hipófise-tireóide, faz parte de uma retroalimentação negativa, onde o hormônio liberador da tireotrofina (TRH) regula a secreção do TSH e dos hormônios T3 e T4; à medida que a concentração de T3, T4 sobem, a concentração de TSH e TRH abaixam. Caso a concentração de T3, T4 declinem, as concentrações de TRH e TSH sobem [1]. Diversos estudos demonstram a atividade fisiológica dos hormônios tireoidianos, como na maturação de funções sexuais, captação de iodo, desenvolvimento cerebral em neonatos, entre outros [2]. A partir da expressão do hTSH em células de rim de embrião humano (HEK293F), foi dada continuidade aos processos de purificação e caracterização da tireotrofina humana recombinante. Foram feitas purificações em sistemas de cromatografias de fase reversa (RP-HPLC) e de exclusão molecular (HPSEC) e por trocas catiônicas e de exclusão molecular, usando o sistema AKTA.

OBJETIVOS

Purificar e caracterizar a tireotrofina humana (hTSH) expressas em células Expi293F™ cultivadas em suspensão.

METODOLOGIA

O r-hTSH secretado no meio condicionado foi purificado utilizando técnicas cromatográficas com duas resinas em diferentes etapas: a primeira, com a resina de troca catiônica SP-Sepharose Fast Flow, e a segunda etapa, uma resina de gel filtração Sephacryl S100 empacotadas em colunas de vidro O meio condicionado, antes de entrar na coluna, foi dialisado pelo sistema de filtração tangencial TFF (*Tangencial Flow Filtration*, Merck, Tullagreen, CO, Irlanda), utilizando o tampão acetato de sódio 20 mM pH 8,0 ajustado para 5,0. Para purificação foi utilizado o equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare, LC, Inglaterra). Para purificação por troca catiônica, os frascos contendo o hTSH (#45-67) foram coletados e concentrados de 154 mL para 19 mL utilizando o sistema de filtração tangencial TFF, sendo armazenado a -80 °C. Alíquota de 500 μ L a partir do *pool* dessa purificação foi reservada para análises em HPSEC e RP-HPLC. Após concentrar o produto purificado para 19 mL utilizando o sistema TFF, a proteína foi submetida à etapa de purificação por gel filtração. As frações contendo o hTSH (#3-23) foram coletadas e concentradas de 40 mL para 2 mL no sistema Amicon® Ultra – 15 *Centrifugal Filters Ultracel® 10K* (Merck, Tullagreen, CO, Irlanda), por rotação em centrífuga a 4 °C e 1500 g por 20 minutos. As análises foram feitas e quantificadas em RP-HPLC e HPSEC.

RESULTADOS

A purificação por troca catiônica usando a resina SP-Sepharose FF foi realizada partindo de 120 mL de meio condicionado dialisado (Figura 1). As frações coletadas e

armazenadas foram reservadas para análises em RP-HPLC e HPSEC. A partir da primeira etapa de purificação, podemos observar mediante os cromatogramas (Figura 1) que um perfil de glicosilação do r-hTSH desapareceu, quando submetido a RP-HPLC. Duas isoformas principais se mantem no tempo de retenção próximo ao do padrão obtido em CHO. Com a análise em HPSEC, podemos afirmar que o produto analisado é o r-hTSH, pois o tempo de retenção entre o padrão e o r-hTSH obtido em HEK293 são similares.

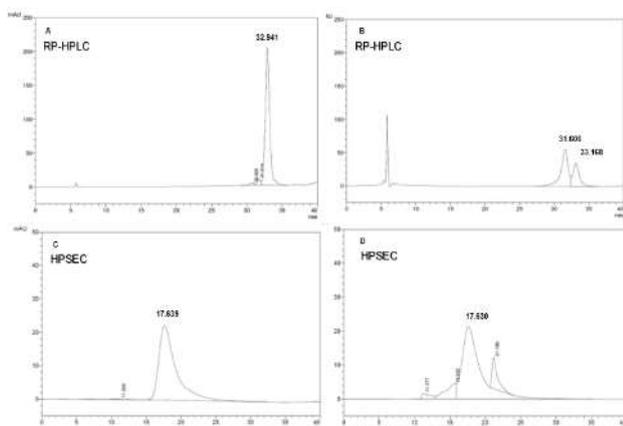


Figura 1 - Cromatogramas analíticos da purificação por troca catiônica. (A): RP-HPLC Thyrogen® 5 µg/5µL; (B): RP-HPLC r-hTSH HEK293F após SP-Sepharose concentrado para 19 mL (30 µL). (C): HPSEC Thyrogen® 5 µg/5µL; (D): HPSEC r-hTSH HEK293F após SP-Sepharose concentrado para 19 mL (30 µL).

O resultado obtido após a primeira etapa de purificação demonstrou que ainda havia impurezas na solução contendo o TSH. Por isso, foi introduzida uma outra etapa de purificação mediante uma resina de gel filtração. As frações coletadas correspondentes ao TSH apresentaram alto nível de pureza, quando analisada em RP-HPLC e HPSEC, superior a 95%. Contudo, as duas formas glicosiladas do TSH ainda são encontradas (Figura 2)

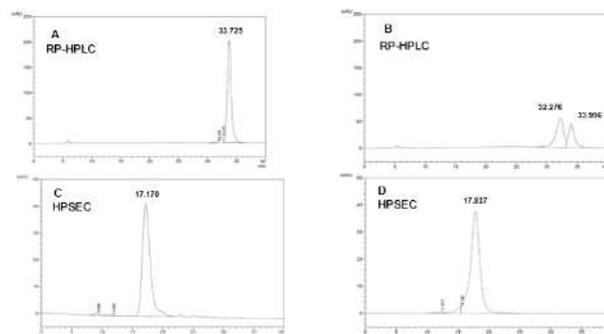


Figura 2: Cromatogramas referente a purificação do r-hTSH por exclusão molecular após a etapa de purificação por troca catiônica. (A): RP-HPLC Thyrogen 5 µg/5µL; (B): RP-HPLC r-hTSH HEK293F após Sephacryl (5 µL); (C): HPSEC Thyrogen 5 µg/5µL; (D): HPSEC r-hTSH HEK293F após Sephacryl (5 µL).

CONCLUSÕES

Foi possível determinar a efetividade do sistema de cultura em suspensão de células HEK293F assim como sua purificação em apenas duas etapas. A ordem de expressão de 50 µg/mL possibilitou que, com apenas quatro produções, fossem alcançadas em torno de 5 mg de proteína em 120 mL de meio condicionado. Dado o baixo volume de meio condicionado, as etapas de purificação do produto foram reduzidas, diminuindo custo, tempo e risco de degradação proteica. A partir dos dados obtidos, análises de N-glicosilação estão sendo realizadas para comparação entre as formas pituitária e comercial Thyrogen® (Genzyme, MA, EUA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SZKUDLINSKI, M.W. et al. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 473- 502, 2002.
- [2] DE MOURA, E. G.; MOURA, C. C. Regulation of thyrotropin synthesis and secretion. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 40-52, 2004.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/PIBIC