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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM
BIORREATOR PARA PRODUÇÃO DE PROLACTINA HUMANA
SECRETADA NO ESPAÇO PERIPLÁSMICO DE *Escherichia coli***

TAÍS LIMA DE OLIVEIRA

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, **Amauri Vaz de Oliveira** e **Regina Maria Lima de Oliveira** por todo apoio, carinho, amor, compreensão e conselhos em toda a minha caminhada até aqui.

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

"O exercício do silêncio é tão importante quanto a prática da palavra"

Willian James

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, Herbert, Dra. Maria Teresa e Dra. Cibele por toda a ajuda na realização deste trabalho, colaboração, e apoio.

Aos amigos Renata, Eliza, Cristiane, Beatriz, Susana, Claudia, Flavia, Renata Martinussi, Miriam, Nélío, Karina, Geyza, Marcos A. Júnior, Jean, Edna e Néia, pela amizade e bons momentos que passamos juntos.

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 e a CAPES, pela concessão de recursos financeiros.

Lista de Abreviaturas

CHO – células de ovário de hamster chinês

CRS – Chemical Reference Standard

CS-FF-Ni²⁺ - "Chelating Sepharose Fast Flow - níquel"

Da – Dalton

DsbA – peptídeo sinal

E.coli - *Escherichia coli*

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ESI-MS – espectrometria de massa utilizando ionização por eletrospray

G-hPRL – prolactina humana glicosilada

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

hGH – hormônio de crescimento humano

hPRL – prolactina humana

HPSEC – cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular

IMAC – cromatografia por afinidade por metais imobilizados

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB – lúria bertani

λ **P_L** – promotor originário do bacteriófago Lambda

Mr – massa relativa

MTX – Metotrexato

NG-hPRL - prolactina humana não-glicosilada

PCR – reação de polimerase em cadeia

PBS – tampão fosfato salina

PRL – prolactina

PVC – policloreto de vinila

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

SD – shine dalgarno

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

SFB – soro fetal bovino

WB – western blotting

WHO – Organização Mundial de Saúde

UV – ultravioleta

**Desenvolvimento do processo de fermentação em biorreator para
produção de prolactina humana secretada no espaço periplásmico de
*Escherichia coli***

Taís Lima de Oliveira

RESUMO

A Prolactina (PRL) é um dos hormônios mais versáteis em termos de ação biológica. Sua ação mais conhecida está relacionada com o estímulo da lactação e regulação do crescimento e da diferenciação da glândula mamária; também apresenta importante aplicação diagnóstica. Somando os crescentes estudos sobre suas possíveis aplicações terapêuticas, fica cada vez mais notória a necessidade da obtenção desse hormônio puro, biologicamente ativo e na sua forma autêntica. O objetivo fundamental desse projeto foi a produção de hPRL em escala laboratorial a partir de bactérias (*E.coli*) modificadas geneticamente, utilizando um sistema de expressão baseado no promotor Lambda (λ) P_L , o mesmo utilizado com sucesso em nosso laboratório na expressão do hGH. Descrevemos nesse trabalho um processo de cultivo em biorreator, onde não foi utilizado o repressor *clts*, uma proteína termo-sensível que usualmente é utilizada para inibir o funcionamento do promotor λP_L durante crescimento a 30°C. O processo de cultivo apresenta basicamente três etapas: na primeira etapa o crescimento é realizado sem adição contínua de nutrientes (cultivo em “batch”), na segunda etapa ocorre adição contínua de nutrientes e carboidrato (cultivo em “fed-batch”) e na última etapa é realizada a ativação, caracterizada pelo aumento da temperatura mantendo-se a adição de nutrientes e carboidrato. Esse processo de fermentação rápido e flexível, com duração média de 20 horas, permitiu obter uma biomassa final correspondente à densidade óptica de aproximadamente 30 A_{600nm} (unidades ópticas de absorbância em 600nm) e com uma expressão da ordem de 1 μg de hPRL mL^{-1} A_{600}^{-1} , as mais altas já relatadas para secreção de prolactina no espaço periplásmico. A hPRL monomérica foi purificada e caracterizada por métodos físico-químicos e biológicos, os quais confirmaram a sua atividade biológica e imunológica, o seu correto processamento e uma massa molecular relativa (Mr) de 22.906.

Development of the fermentation process in bioreactor for the production of human prolactin secreted in the periplasmic space of *Escherichia coli*

Taís Lima de Oliveira

ABSTRACT

Prolactin (PRL) is one of the most versatile hormones in terms of biological action. His best known action is related to the stimulation of lactation and regulation of growth and differentiation of the mammary gland; it also has wide important diagnostic applications. Considering all the increasing studies on its potential therapeutic applications, the need for obtaining this hormone in its pure, biologically active and authentic form becomes clearer and clearer. The fundamental objective of this project was the production of hPRL on the laboratory scale, from genetically modified bacteria (*E.coli*), using an expression system based on Lambda (λ) P_L promoter, the same successfully used in our laboratory for the expression of hGH. We set up a cultivation process in bioreactor, where the repressor (cIts), a thermo-sensitive protein that is usually used to inhibit the P_L promoter during the growth phase (30°C). The cultivation process presents basically three stages: the first step in was not used the growth is carried out without the continuous addition of nutrients ("batch" cultivation), the second step in which a continuous addition of nutrients and carbohydrate occurs ("fed-batch" cultivation) and a final step when activation is carried out. The latter is characterized by an increased temperature, still maintaining the addition of nutrients and carbohydrate. This fast and flexible process of fermentation, with the average duration of 20 hours, led to a final biomass of approximately 30 A_{600nm} (units of optical absorbance at 600nm), with the expression of about 1 μg of hPRL $mL^{-1}A_{600}^{-1}$, the highest ever reported for the secretion of prolactin in the periplasmic space. Monomeric hPRL was purified and characterized by physical-chemical methods and biological assays, which confirmed its biological and immunological activity, correct processing and a relative molecular mass (Mr) of 22,906.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Materiais	9
3.1.1 Equipamentos e acessórios	9
3.1.2 Reagentes e soluções	10
3.1.3 Sistemas e reagentes específicos	12
3.1.4 Material radioativo	12
3.2 Métodos	13
3.2.1 Construção do plasmídeo	13
3.2.2 Cepas bacterianas e cultivo em frascos	14
3.2.3 Cultivo em batch e fed batch das cepas de <i>E.coli</i> W3110 transformadas	14
3.2.4 Choque osmótico	16
3.2.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e exclusão molecular (HPSEC)	18
3.2.5.1 Cromatografia por RP-HPLC	18
3.2.5.2 Cromatografia por HPSEC	18
3.2.6 HPSEC-radioimunoensaio (RIA)	19
3.2.7 Análise por SDS-PAGE e Western Blot	19
3.2.7.1 SDS-PAGE	19
3.2.7.2 Western Blot (WB)	20
3.2.8 Estudo da estabilidade do plasmídeo	20
3.2.9 Purificação de Prolactina	21
3.2.9.1 Cromatografia de quelação utilizando Sepharose Fast Flow com Ni ²⁺ como agente ligante (CS-FF- Ni ²⁺) – Cromatografia de Afinidade por Metais Imobilizados (IMAC)	21
3.2.9.2 Cromatografia de Exclusão Molecular Sephacryl S-100	22
3.2.10 Bioensaio <i>in vitro</i>	22
3.2.10.1 Bioensaio com células Ba/F3-LLP	22
3.2.10.2 Bioensaio com células Nb2	23
3.2.11 Espectrometria de massa por electrospray (ESI-MS)	23

4 RESULTADOS	25
4.1. Construção dos vetores de expressão	25
4.2 Análise do sistema de expressão λP_L x repressor clts	27
4.3 Padronização em frascos de cultura das condições de crescimento e de expressão da cepa produtora de hPRL	30
4.4 Estudo da estabilidade do plasmídeo	32
4.5 A influência da temperatura na degradação da hPRL no citoplasma	33
4.6 Cultivo em biorreator da cepa W3110 produtora de hPRL	34
4.7 Análise da hPRL recombinante sintetizada no biorreator	37
4.7.1 Duração do período de cultivo a 37°C	37
4.7.2 Análise do extrato periplásmico mediante HPSEC	38
4.8 Purificação da hPRL presente no extrato periplásmico	40
4.8.1 Cromatografia de quelação utilizando Sepharose Fast Flow com Ni^{2+} como agente ligante (CS-FF- Ni^{2+})	40
4.8.2 Cromatografia de Exclusão Molecular Sephacryl S-100	41
4.9 Caracterização físico-química e biológica da hPRL recombinante purificada	42
4.9.1 Análise por SDS-PAGE	42
4.9.2 Análise por HPLC	42
4.9.2.1 Análise por HPSEC	42
4.9.2.2 Análise por RP-HPLC	43
4.9.3 Determinação da atividade biológica	45
4.9.4 Determinação da massa molecular relativa de hPRL por espectrometria de massa por electrospray (ESI-MS)	47
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico conhecido por estimular a lactação e por exercer ação regulatória no crescimento e na diferenciação da glândula mamária (Clarke *et al.*, 1980; Sinha, 1995). Mais de 300 atividades biológicas foram atribuídas à PRL que 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 (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Goffin *et al.*, 2002).

O gene da prolactina, junto com o do hormônio de crescimento (GH) e o gene do lactogênio parecem ser originários de um gene ancestral único, o que leva a PRL a apresentar uma alta similaridade estrutural e funcional com esses hormônios polipeptídicos (Miller & Ederherdt, 1983; Goffin *et al.*, 2005).

A prolactina humana (hPRL) tem massa molecular relativa (Mr) de 22898 (Soares *et al.*, 2006), contendo 199 aminoácidos e 3 pontes dissulfeto intramoleculares. O gene da hPRL, com 10 Kb, está localizado no cromossomo 6, contém 5 éxons e 4 íntrons. O hormônio maduro é derivado de uma molécula precursora por clivagem proteolítica do seu peptídeo sinal de 28 aminoácidos localizado na sua porção N- terminal, e cuja transcrição é regulada por duas regiões promotoras independentes, sendo o promotor proximal responsável pela transcrição do mRNA da PRL hipofisária e o promotor distal responsável pelo mRNA da PRL extra-hipofisária. (Sinha, 1995; Goffin *et al.*, 2002) (FIG. 1). Sua estrutura tridimensional é composta por 4 α -hélices, organizadas em feixes antiparalelos (Sinha, 1995) (FIG. 2).

FIGURA 1. Representação gráfica do gene da PRL humana e dos seus dois promotores distintos.

FIGURA 2. Esquema da estrutura tridimensional da hPRL (Keeler *et al.*, 2003).

Em geral têm-se atribuído à hPRL duas funções principais: a de hormônio circulante e a de citocina. Tal diversidade pode ser atribuída a três componentes principais:

a) Polimorfismo estrutural, que pode ter relação com o seu processo pós-traducional, originando distintas isoformas como: formas clivadas, glicosilada, fosforilada, desamidada, sulfatada, polimérica e associada à outras proteínas.

b) Local de processamento e produção (hipofisária ou extra-hipofisária)

c) Vias de sinalização intracelular divergentes.

Desde que níveis elevados de hPRL foram relacionados a inúmeras desordens como consequência de prolactinomas (hiperprolactinemia, galactorréia, infertilidade, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, esclerose múltipla, etc) é um dos hormônios mais freqüentemente determinados na rotina de ensaios clínicos (Soares *et al.*, 2002; Glezer *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2006). 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 (Woody *et al.*, 1999). Estudos indicam também sua potencial aplicação como agente imunoterápico nos casos de infecção por HIV (Richards *et al.*, 1998). 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 (Fujikawa *et al.*, 2004) e que a hPRL também melhora a resposta antitumoral dos linfócitos “natural killer” (Zhang *et al.*, 2005). 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 (Ben-Jonathan, 1996).

Evidências como a secreção e ação local da hPRL (efeito autócrino/parácrino) relacionam esta proteína com o desenvolvimento de câncer de mama e de próstata (Ginsburg & Vonderhaar, 1995; Reynolds *et al.*, 1997; Llovera *et al.*, 2000). Como é produzida em muitos tecidos e age de várias maneiras, a PRL é um dos muitos agentes mitogênicos endógenos

(Hankinson *et al.*, 1998), existe também um trabalho recente que menciona o seu possível uso no tratamento e prevenção do câncer de mama (Goodman & Bercovich, 2008).

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 (Price *et al.*, 1995). A FIGURA 3 mostra algumas destas modificações em formato esquemático.

FIGURA 3. Diagrama esquemático da molécula de PRL e de algumas das suas variantes estruturais. (A) Variantes citadas por Sinha (1995). (B) Diagrama esquemático da variante hPRL₁₁₋₁₉₉ (Shelikoff *et al.*, 1994; Soares *et al.*, 2000).

No passado, a hPRL era extraída de hipófises humanas, através de procedimentos laboratoriais muito complexos e pouco eficientes. Eram obtidas aproximadamente 0,1 mg apenas deste hormônio por hipófise (Lewis *et al.*, 1971; Hwang *et al.*, 1975; Roos *et al.*, 1979; Hodgkinson & Lowry, 1981;

Melmed & Kleinberg, 2003). Como alternativa para a produção da hPRL e outros hormônios pituitários surgiu a tecnologia de DNA recombinante (Ribela *et al.*, 2003). A hPRL recombinante foi obtida inicialmente com uma metionina situada no N-terminal e localizada em corpos de inclusão no citoplasma de bactérias (Cunningham *et al.*, 1990; Paris *et al.*, 1990). Duas proteínas de fusão contendo hPRL foram sintetizadas sempre como corpos de inclusão em *E. coli* e obtidas parcialmente purificadas (Gilbert *et al.*, 1991; Hiraoka *et al.*, 1991). A forma autêntica de hPRL foi obtida em células de mamíferos (Price *et al.*, 1995; Hiraoka *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 2000) e em células de inseto (Das *et al.*, 2000).

Uma estratégia alternativa para obter hPRL autêntica em células procarióticas é a expressão periplásmica bacteriana, desenvolvida e descrita pela nossa equipe de pesquisa (Morganti *et al.*, 1998). A secreção de proteínas recombinantes no periplasma apresenta grandes vantagens quando comparada a outros sistemas da expressão em *E. coli* e em células de mamíferos. Pode-se mencionar: menor custo, menos contaminantes, baixa atividade proteolítica, e baixos níveis ou mesmo ausência de isoformas indesejáveis, como glicosiladas, fosforiladas, formas de alto peso molecular ou formas clivadas.

O desenvolvimento em nosso laboratório de uma tecnologia para obtenção da hPRL autêntica recombinante secretada no periplasma de *E. coli* tem sido um processo gradativo. Inicialmente uma variante da hPRL, biologicamente ativa, a tag-hPRL [Ala-Ser-(His)₆-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL] foi obtida pela primeira vez com sucesso no periplasma de *E. coli*, usando um vetor contendo o promotor tac, ativado por IPTG e a seqüência do peptídeo sinal obtida do gene "cex" da *Cellulomonas fimi*, com expressão de 0,7 µg mL⁻¹ A₆₀₀⁻¹ (Morganti *et al.*, 1996).

O mesmo sistema de expressão, após retirada da seqüência tag (Ala-Ser-(His)₆), realizada com o objetivo de obter a hPRL autêntica, resultou em uma expressão periplásmica diminuída (0,08 µg mL⁻¹ A₆₀₀⁻¹). A expressão oito vezes superior, no caso da tag-hPRL, sugere que a seqüência tag pode exercer um efeito estabilizador nos níveis de transcrição, tradução ou pós-tradução, como relatado por Morganti *et al.* (1998). Posteriormente, em trabalho de colaboração com a empresa Sanofi (Toulouse, França), foi

realizada a comparação entre diferentes peptídeos sinalizadores o que possibilitou a obtenção de níveis significativos de expressão de hPRL periplásmica com vetores que também utilizam o promotor tac e, portanto, com indução pela adição de IPTG. Com base nesses resultados concluímos que grande parte das dificuldades iniciais na obtenção de altos níveis de hPRL estava relacionada à natureza do peptídeo sinalizador que por ser pouco eficiente não possibilitou uma secreção periplásmica significativa da hPRL em *E. coli*.

Por outro lado, níveis elevados da expressão do hormônio de crescimento humano (hGH) foram obtidos em nosso laboratório usando um sistema baseado no promotor λP_L controlado pelo repressor termo-sensível clts, inicialmente com a utilização de uma sequência sinalizadora, derivada do gene natural do hGH (Oliveira *et al.*, 1999) e depois do gene DsbA, natural de bactérias (Soares *et al.*, 2003). Conhecidamente, o λP_L é um dos promotores mais usados para a produção industrial de proteínas em *E. coli*. A indução térmica, característica desse promotor, apresenta uma grande vantagem sobre os indutores químicos como IPTG ou o ácido nalidíxico, que são caros e perigosos para os manipuladores e o meio ambiente. O promotor λP_L é induzido quando a temperatura de cultivo aumenta de 30 para 42°C. Nessas condições o repressor, uma proteína termosensível, é inativada liberando a ação do promotor que inicia o processo de transcrição/tradução da proteína de interesse. O ponto crítico dessa metodologia baseada na mudança de temperatura são os problemas comumente associados com a expressão de proteínas em temperaturas relativamente altas como por exemplo proteólise e agregação, que podem influenciar negativamente a produção de proteínas particularmente lábeis.

Considerando as limitações do uso do IPTG, como toxicidade e elevado custo, a secreção periplásmica bem sucedida obtida com um vetor de expressão do hGH baseado no promotor λP_L (Ribela *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 1999) e a melhora na expressão apresentada pelo mesmo sistema utilizando o peptídeo sinalizador DsbA e a cepa de *E. coli* W3110 (Soares *et al.*, 2003), decidimos usar este sistema para a secreção e produção da hPRL, inicialmente padronizando cultivo em frascos e, depois em nosso biorreator piloto, tendo por

base estudos de fermentação já realizados por nosso grupo para o hGH (Dalmora *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1999).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste projeto foi a produção em escala laboratorial de hPRL, utilizando o sistema de expressão baseado no promotor λP_L sem a utilização do repressor. Para isso foi desenvolvido um processo rápido e flexível de fermentação em biorreator, tendo por meta valores finais de biomassa da ordem de 30 - 40 A_{600nm} e uma expressão específica que viabilize uma produção industrial ($1\mu g\ mL^{-1}A_{600}^{-1}$).

Outra meta desse projeto foi realizar a purificação da hPRL em escala laboratorial a partir das bactérias provenientes do processo de fermentação, obtendo hPRL monomérica com pureza superior a 95%. O produto final, após caracterização físico-química e biológica poderá ser utilizado como padrão de referência em estudos futuros, incluindo possíveis aplicações terapêuticas desse hormônio e relativos estudos em modelos animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético, modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Agitador rotatório tipo Vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil);
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10A, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD,EUA);
- Aparelho Milli-Q-plus, purificador de água, Millipore, Bedford, (MA,EUA);
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil);
- Autoclave horizontal, modelo speedclave II 12L, Odontobrás (São Paulo, Brasil);
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich, Suíça);
- Balança analítica, modelo P1000N, Mettler (Zurich, Suíça);
- Banho-maria, modelo 146, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Biorreator de 20 L (MBR, Zurich, Switzerland);
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, Sorvall, Newtown, (Connecticut, EUA);
- Coluna para HPLC de fase reversa C₄, 214 TP54 (25 cm x 4,6 mm D.I.), diâmetro dos poros 300 Å e tamanho das partículas de 5 µm e pré-coluna 214 GD 54 (5 µm; 1,0 cm x 4,6 mm D.I.), Vydac (Hesperia, EUA);
- Contador gama tipo “poço”, com troca automática, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para I¹²⁵ de 80%, Packard Instrument Compary (Illinois, EUA);
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil);
- Espectrofotômetro, modelo ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia);
- Estufa de esterilização e secagem, modelo 315 SE, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Estufa de cultura, modelo 002-CB, Fanem (São Paulo, Brasil);
- 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);
- Fluxo Laminar, Veco (São Paulo, Brasil);
- Incubadora refrigerada com agitação, marca Tecnal, TE-421(São Paulo, Brasil);
- Máquina de produzir gelo picado, modelo EGE 150, Everest (Rio de Janeiro, Brasil);
- Membrana de nitrocelulose (22µm), Hynbond – C modelo RPN 303C, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia);
- Micro-centrífuga, modelo 5415 C, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha);
- Padrões de massa molecular, GE Healthcare (São Paulo, Brasil);
- Refrigerador para cromatografia com duas portas de vidro, modelo 2201 combicoldrac II, LKB (Bromma, Suécia);
- Sistema de eletroforese vertical Horfer Mini VE, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia);
- Sistema de transferência semi-seco Hoefer TE 70, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).

3.1.2 Reagentes e soluções

- Acrilamida, Merck (São Paulo, Brasil);
- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Ácido Acético, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Ácido Clorídrico, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Ácido Etilenodiaminotetracético (sal dissódico) (EDTA), Synth (São Paulo, Brasil);
- Ácido Fosfórico, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Agar Purificado para bacteriologia, Merck (São Paulo);
- Agar (Bacto Agar), BD (São Paulo, Brasil);
- Álcool Isopropílico, P.A., Synth (São Paulo, Brasil);

- Ampicilina, Bayer (São Paulo, Brasil);
- Azul de Bromofenol, Sigma (St. Louis, EUA);
- Bicarbonato de Amônio, P.A., Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha);
- Casaminoácidos, Difco (São Paulo, Brasil);
- Cloreto de Cálcio Anidro, J.T. Baker Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Cloreto de Sódio, P.A., QM (São Paulo, Brasil);
- Dodecilsulfato de sódio, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia)
- Etanol, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Extrato de Levedura para Microbiologia, Difco (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de Sódio Bibásico, P.A., Synth (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de Sódio Monobásico, P.A., Synth (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de Potássio Monobásico, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Formaldeído, P.A., Synth (São Paulo, Brasil);
- Glicerol, P.A., Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Glicina, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Glicose, P.A., Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Hidróxido de Sódio, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Iodeto de Potássio, P.A., Carlo Erba (São Paulo, Brasil);
- Leite desnatado em pó Molico, composição declarada: gordura (1%), proteínas (36%), lactose (52%), sais minerais (8%), água (3%);
- Metanol, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Metilenobisacrilamida, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia);
- Molibdato de Sódio, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- n-propanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Persulfato de Amônio, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia);
- Proteína-A, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia);
- Sacarose para uso em meios de cultura bacteriológicos, Difco (São Paulo, Brasil);
- Sílica Si 60, 7,9-12,4 μm , Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Soluções tampões para calibração de pHmetro, pH 4,0 e 7,0 Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Amônio, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);

- Sulfato de Cobalto II (Heptahidratado), P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Ferro II (Heptahidratado), P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Magnésio Anidro, P.A., J.T. Baker Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Sulfato de Manganês (Monohidratado), P.A., Synth (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Potássio, P.A., QM (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Zinco (Heptahidratado), P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Triptona, Difco (São Paulo, Brasil);
- Tris Base (Trizma Base), P.A., Sigma (St. Louis, EUA).

3.1.3 Sistemas e reagentes específicos

- Marcador de massa molecular para SDS-PAGE da GE Healthcare Bio-Sciences, código 17-0446-01 (Uppsala, Suécia);
- Padrão Internacional de hGH recombinante (WHO 98/574), com atividade específica de 3,0 UI mg⁻¹. Cada ampola contém 2 mg de somatropina, 2 mg de glicina, 2 mg de manitol, 2 mg de lactose e 2,5 mg de bicarbonato de sódio. Cedido pelo National Institute for Biological Standards and Control (Londres, Inglaterra);
- Soro de coelho anti-hPRL: NIDDK-anti hPRL-3, AFP-C11580, fornecido pelo Dr. A.F. Parlow do National Hormone and Pituitary Program (Torrance, CA, USA).

3.1.4 Material Radioativo

- Na ¹²⁵I comercial, livre de carregadores e oxidantes com atividade específica de 11100-22200 MBq mL⁻¹ (300-600 mCi/mL), fornecido pela Nordion Europe S.A. (Fleurus, Bélgica).

3.2 Métodos

3.2.1 Construção do Plasmídeo

O vetor utilizado foi obtido a partir de um cassete de expressão, desenvolvido em nosso laboratório, que apresenta como características principais o controle da expressão por meio do promotor λP_L , uma seqüência espaçadora (spacer) entre o sítio de ligação ao ribossomo (SD) e o códon iniciador (ATG), de 10 nucleotídeos (GGAATTCCAT), rica em AT (Dalbøge *et al.*, 1989), o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina e sítios de restrição específicos para a introdução do gene de interesse.

A seqüência de DNA que inclui o sítio de ligação da endonuclease Nde I, o “start” códon, o peptídeo sinalizador DsbA, o cDNA de hPRL codificando uma seqüência do hormônio, o “stop” códon e o sítio Bam HI foram obtidos por reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando o plasmídeo p3SN8hPRL3 (Morganti *et al.*, 1998) como molde. Os oligonucleotídeos sintéticos usados para este PCR foram: o “forward”, incluindo o sítio Nde I, o peptídeo sinalizador DsbA e 20 NT (nucleotídeos) da seqüência do cDNA de hPRL (5'-GAT-CGA-TCG-ATC-CAT-ATG-AAA-AAG-ATT-TGG-CTG-GCT-CTG-GCT-GGT-TTA-GTT-TTA-GCG-TTT-AGC-GCA-TCG-GCG-TTG-CCC-ATC-TGT-CCC-GGC-GG-3'); o oligonucleotídeo reverso (“reverse primer”), incluindo a seqüência C-terminal do gene da hPRL e o sítio Bam HI e o “stop” códon (5'- GAT-CGA-TCG-GAT-CCT-TAT-CAG-CAG-TTG-TTG-TTG-TTG-AT-3'). Após a digestão dos fragmentos de DNA obtidos por PCR com as endonucleases Nde I e Bam HI, os fragmentos foram subclonados nos sítios Nde I-Bam HI no cassete do vetor de expressão, o mesmo utilizado para obter o vetor do hGH (λP_L -DsbA-hGH) que contém o promotor λP_L e o gene de resistência a ampicilina (Soares *et al.*, 2003). O vetor de hPRL resultante foi denominado λP_L -DsbA-hPRL.

3.2.2 Cepas bacterianas e Cultivo em frascos

A cepa RRI de *E. coli*, contendo o plasmídeo pRK248clts (Bernard & Helinski, 1989) com baixo número de cópias (“copy number”) que codifica o gene do repressor termo-sensível (clts), foi usado para a propagação e extração do pRK248clts. Para a expressão de hPRL ou de hGH, foi usada a cepa hospedeira de *E. coli* W3110, obtida da American Type Culture Collection (ATCC). Foram usadas quatro cepas transformadas de *E. coli* W3110: duas contendo somente o vetor de expressão (λ P_L-DsbA-hPRL ou λ P_L-DsbA-hGH), selecionadas nas placas de LB/ágar (Luria-Bertani) suplementadas com 100 μ g de amp mL⁻¹, e as outras duas contendo o vetor de expressão mais o plasmídeo pRK248clts com o gene do repressor, selecionadas nas placas de LB suplementadas com 100 μ g de amp mL⁻¹ e 50 μ g de tetraciclina mL⁻¹. O cultivo foi realizado em frascos de 500 mL contendo 100 mL do meio LB. Cada frasco foi inoculado com uma única colônia de *E. coli* selecionada das placas de LB/ágar e incubado em um agitador rotacional a 30°C (120 rpm). Após o crescimento até aproximadamente 1,5 A₆₀₀, a cultura foi mantida a 30°C ou foi induzida a expressão por aumento da temperatura de cultivo.

3.2.3 Cultivo em batch e fed batch das cepas de *E.coli* W3110

transformadas

Todos os cultivos em “*batch*” ou “*fed batch*” foram realizados em um biorreator com capacidade nominal de 20 L (New MBR, Zurique, Suíça) com adição de 100 μ g mL⁻¹ de ampicilina. O biorreator foi operado com pH fixado em 7,2, ajustado por adição de HCl 2N ou NaOH 5M. Para evitar a limitação de oxigênio, utilizou-se oxigênio dissolvido com saturação acima de 20%, mantida por adição de ar e controlando a velocidade de agitação entre 200 a 900 rpm. Utilizou-se um meio de cultura complexo, o meio HKSII descrito por Jensen & Carlsen (1990) concentrado duas ou quatro vezes (TAB. 1). A formação de espuma foi controlada por adição de Antifoam A (Sigma-Aldrich Fine Chemicals).

O processo de cultivo desenvolvido em biorreator apresenta basicamente três etapas:

Etapa 1: é caracterizada pelo crescimento sem adição contínua de nutrientes (*batch*). Essa etapa é iniciada pela adição de 500 mL do inóculo, equivalente a 10% do volume total do cultivo. O inóculo consiste da cepa de interesse cultivada em meio LB a 30°C até atingir uma biomassa entre 0,4 e 1,0 unidades de densidade óptica (A_{600}). Em seguida o pH do meio é ajustado para 7,2 por adição de NaOH 5M. A agitação (rpm) e o ar aplicados são ajustados manualmente para que o oxigênio dissolvido no meio não seja inferior a 20% de saturação. O cultivo é mantido a 30°C. Após ser atingida uma biomassa correspondente a 5 A_{600nm} inicia-se a próxima etapa, denominada *fed-batch*.

Etapa 2: é caracterizada pela adição contínua de nutrientes (*fed batch*), as condições foram similares ao cultivo em *batch*. O meio de adição contínua consiste de uma fonte de carbono (glicose ou glicerol) dissolvido no meio complexo de cultivo (TAB. 1). A taxa de alimentação de glicose no caso da produção de hGH foi de 3,6 g L⁻¹h⁻¹ durante o *fed batch* e 5,4 g L⁻¹h⁻¹ durante a etapa da ativação e, no caso da produção de hPRL, foi de 1,1 g L⁻¹h⁻¹, e mantida constante até o final do processo. O aumento de biomassa foi acompanhado durante todo o processo, e quando o crescimento se estabilizou (curva em “plateau”) iniciou-se a terceira etapa: a ativação.

Etapa 3: é caracterizada pelo aumento da temperatura que induz à síntese da proteína recombinante nas bactérias. A ativação tanto a 37°C ou a 42°C, é iniciada quando a A_{600} atinge um valor máximo constante. As demais condições da etapa anterior são mantidas. Geralmente após 6 horas de ativação ou indução, o cultivo é interrompido e o meio de cultura é coletado para a extração da hGH ou hPRL presentes no espaço periplásmico, mediante choque osmótico (Koshland & Botstein, 1980).

Foi desenvolvido também, somente para a cepa produtora de hPRL, um outro processo alternativo de fermentação. Esse processo, com duração de aproximadamente 10 horas, é caracterizado por duas etapas ou fases de crescimento: etapa inicial de crescimento em biorreator utilizando o mesmo meio de cultivo e condições de fermentação do processo batch, porém sem a presença ou adição de carboidrato. Quando a biomassa atinge $\sim 3 A_{600}$ inicia-se a etapa final de crescimento e ativação, durante a qual a temperatura sofre um incremento de 30 para 37°C, sendo mantida nessa condição por seis horas, quando termina o processo.

TABELA 1. Descrição do meio de cultura Jensen 2HKSII e meio Fed-Batch.

Componentes	Jensen (g/4,5L)	Fed Batch (g/L)
Extrato de Levedura	56,25	10
Tryptona	112,5	20
Casaminoácidos	22,5	4
K ₂ SO ₄ .7 H ₂ O	17,4	3,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,5	0,8
CaCl ₂ .H ₂ O	0,45	0,08
Trace Metals	1,8mL	0,32mL
Glicose	-	54

3.2.4 Choque Osmótico

O produto da fermentação foi submetido ao choque osmótico, (incubação em meio hipertônico seguido de incubação em meio hipotônico), utilizado para extrair proteínas periplásmicas a partir da suspensão bacteriana da fermentação, sem que ocorra ruptura da célula, como pode ser observado na FIGURA 1 (koshland & Botstein, 1980).

FIGURA 1. Esquema de choque osmótico realizado para extração das proteínas periplásmicas. (A) meio hipertônico. (B) meio hipotônico.

As bactérias foram sedimentadas por centrifugação (4000g – 5 minutos a 4°C). O precipitado resultante, após ressuspensão em solução de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 contendo sacarose 20 % e solução de EDTA 0,5 M pH 8,0, foi mantido em repouso, em banho de gelo, durante 10 minutos. Nova centrifugação foi realizada, nas mesmas condições anteriores, sendo descartado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em solução de Tris-HCl 1mM pH 7,0 e mantido em banho de gelo por 10 minutos. Nova centrifugação é realizada, nas mesmas condições anteriores, durante 15 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, contendo as proteínas periplásmicas, foi mantido a 4°C ou estocado a -80°C. Os volumes das soluções de sacarose e Tris-HCl são calculados pela fórmula “a” e os volumes de EDTA pela fórmula “b” respectivamente.

3.2.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase

Reversa (RP-HPLC) e Exclusão Molecular (HPSEC)

As avaliações qualitativa e quantitativa da hPRL foram realizadas por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e por exclusão molecular (HP-SEC). Foi utilizado o HPLC da marca Shimadzu (Shimadzu, MD, USA), modelo SCL-10 AV HPLC acoplado a um detector de UV SPD-10 AV no comprimento de onda de 220 nm, empregando o software Class VP, também da Shimadzu.

3.2.5.1 Cromatografia por RP-HPLC

A coluna utilizada foi a Vydac C₄ 214TP54 (25 cm x 4,6 mm ID, diâmetro dos poros de 300 Å e diâmetro de partícula de 5 µm) e uma pré-coluna (Vydac 214FSK54) colocada entre o injetor de amostra e a coluna principal. Além disso, foi instalada entre a bomba e o injetor, uma coluna de sílica empacotada com LiChrosorb Si-60 com partículas de 7,9 a 12,4 µm (Merck, Darmstadt, Germany). A fase móvel consistiu num tampão de Tris-HCl 71% (50mM, pH 7,5) e n-propanol 29%, como o descrito por Dalmora *et al.* (1997). O fluxo foi de 0,5 mL min⁻¹, com leitura do detector no comprimento de onda de 220nm, a coluna foi mantida a 45°C e o volume da amostra entre 25-200 µL (Soares *et al.*, 2002; 2003). A quantidade da forma não alterada de hPRL foi calculada utilizando o programa de computador Class-VP, fornecido pela Shimadzu.

Esta técnica foi utilizada principalmente para a determinação da expressão específica a partir do extrato periplásmico e acompanhamento das etapas de purificação e análise do produto final.

3.2.5.2 Cromatografia por HPSEC

A coluna utilizada foi a G2000SW (60 cm x 7,5 mm I.D., com poros de diâmetro de 125 Å e diâmetro de partícula de 10 µm) com uma pré-coluna TSK SW de 7,5 cmX7,5 mm I.D.. As colunas foram fornecidas pela TosoHaas (Montgomeryville, PA, USA). A fase móvel usada foi constituída de bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,0 ajustado com ácido fosfórico 2%, com um fluxo de

1,0 mL min⁻¹ e com leitura em comprimento de onda em 220nm, como descrito em Dalmora *et al.* (1997).

3.2.6 HPSEC-radioimunoensaio (RIA)

Para a determinação da porcentagem da forma monomérica de hPRL presente no fluido periplásmico, as amostras de choque osmótico foram analisadas por HPSEC e as frações coletadas foram determinadas por RIA-hPRL como descrito previamente (Morganti *et al.*, 1996).

3.2.7 Análise por SDS-PAGE e Western Blot

O SDS-PAGE, baseado em gel de poliacrilamida a 15%, foi realizado sob condição não-redutora e a análise por *Western blot* (WB) feita como descrita em Soares *et al.*, 2006. O anti-soro anti-hPRL (coelho), NIDDK-anti-hPRL-3 (AFP-C11580), foi fornecido pelo Dr. A.F. Parlow do *National Hormone and Pituitary Program* (Torrance, CA, USA).

3.2.7.1 SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 15%, na presença de 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), sob condições não redutoras. Durante a corrida eletroforética, a intensidade da corrente foi de 35 mA. As proteínas presentes no gel foram fixadas mergulhando o gel em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial, por 30 minutos.

A coloração foi efetuada imergindo o gel fixado em uma solução com 0,25% de “Coomassie Brilliant Blue G250”, 45% de metanol e 8% de ácido acético e mantendo-o sob agitação por aproximadamente 1 hora. A seguir o gel foi descorado em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial, sendo realizadas trocas sucessivas, até ser obtida a transparência desejada. O gel foi conservado em uma solução de 1% de glicerol em água.

3.2.7.2 Western Blot (WB)

As amostras para análise no WB foram submetidas a uma SDS-PAGE seguida por transferência semi-seca para uma membrana de nitrocelulose (0,22µm). A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do seguinte modo: colocou-se uma camada de aproximadamente 3 mm de espessura de papel filtro pré-umedecido em tampão de transferência (glicina 0,3%, Tris-Base 0,6%, SDS 0,04%, metanol 20%) e em seguida, do pólo positivo para o pólo negativo, colocou-se a membrana de nitrocelulose, o gel e mais uma camada de papel de filtro pré-umedecida. A corrente foi fixada de acordo com a área do gel, sendo calculada da seguinte forma: corrente aplicada (mA) = área (cm²) x 0,85. A transferência foi realizada em 1 hora.

Após a transferência, a membrana foi tratada por dez minutos com tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de leite desnatado liofilizado e incubada por dezoito horas a temperatura ambiente com 50 mL de anticorpo diluído (1:100) em PBS contendo 5% de leite desnatado. Após a incubação com o anticorpo foram realizadas cinco 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 desnatado contendo 200.000 cpm/mL de proteína A marcada com ¹²⁵I. Ao final dessa incubação, a membrana foi lavada com PBS 5% de leite por 5 vezes, seguida de 3 lavagens com PBS. Na seqüência, a membrana foi seca a temperatura ambiente e envolvida por membrana transparente de PVC, estando assim pronta para a autorradiografia. A exposição autorradiográfica, utilizando telas intensificadoras, foi realizada a -80°C, por um período de tempo dependente da intensidade de resposta desejada, que por sua vez depende da atividade específica da proteína A marcada com ¹²⁵I, da afinidade, do título do anticorpo e da riqueza do produto a ser analisado.

3.2.8 Estudo da estabilidade do plasmídeo

Para confirmar a estabilidade dos vetores, a cepa W3110 contendo somente o plasmídeo λP_L-DsbA-hPRL foi cultivada no meio LB (com e sem ampicilina) no mínimo por 50 gerações, mantendo-a sempre na fase de crescimento (log) e a 30°C. A expressão de hPRL e sua resistência ao

antibiótico foram comparadas a uma cultura análoga crescida por somente 10 gerações.

3.2.9 Purificação de Prolactina

O processo de purificação foi realizado basicamente em duas etapas: uma etapa de concentração e purificação utilizando uma resina de afinidade por metais imobilizados (IMAC) e outra utilizando cromatografia por exclusão molecular, como descrito por Ueda *et al.* (2001), com algumas modificações descritas abaixo.

3.2.9.1 Cromatografia de quelação utilizando Sepharose Fast Flow com Ni^{2+} como agente ligante (CS-FF- Ni^{2+}) – Cromatografia de Afinidade por Metais Imobilizados (IMAC)

Antes da aplicação do choque osmótico na coluna CS-FF (Chelating Sepharose Fast Flow, GE Healthcare Bio-Sciences, código: 17-0575-01, Uppsala, Suécia), este foi dialisado contra um tampão bicarbonato de amônio 50 mM (pH 7,9), para se retirar possíveis traços de EDTA utilizado no choque osmótico. Após a diálise, foi adicionado NaCl até uma concentração de 0,8M.

A amostra foi então aplicada em uma coluna (XK 16/40 25 cm x 16 mm I.D., Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) empacotada com resina CS-FF previamente carregada com Ni^{2+} (CS-FF- Ni^{2+}) seguindo recomendações do fabricante, equilibrada com tampão de corrida fosfato 50 mM (pH 7,2); 0,8 M NaCl (Pharmacia Biotec, Uppsala, Suécia). O efluente foi monitorado a 280 nm e o fluxo mantido em 100mL/h. Após a aplicação do choque osmótico dialisado a coluna foi lavada com uma solução de tampão de corrida (TC) até a densidade óptica chegar à linha de base. Com o objetivo de minimizar perdas a lavagem intermediária original com 30 mM imidazol foi eliminada no nosso processo. A hPRL foi eluída com 60 mM imidazol em TC. Contaminantes com forte afinidade pela coluna de CS-FF- Ni^{2+} foram então eluídos com imidazol 100 mM em TC. A purificação foi monitorada por SDS-PAGE, RP-HPLC e HPSEC.

3.2.9.2 Cromatografia de Exclusão Molecular Sephacryl S-100

O material proveniente da cromatografia por IMAC contendo hPRL foi aplicado em uma coluna de 300 mL (XK26/70-57 cm x 26 mm I.D., Pharmacia Biotech) de resina de exclusão molecular Sephacryl S-100 HR (Pharmacia Biotech) pré-equilibrada com bicarbonato de amônio 0,050 M pH 7,9 com um fluxo de 60 mL/h a 4°C. O volume máximo de amostra aplicado foi de 15 mL (5% do volume total da coluna). O pool contendo a hPRL teve sua pureza testada por SDS-PAGE e WB, e sua identidade confirmada por HPSEC.

3.2.10 Bioensaio *in vitro*

A bioatividade de hPRL purificada foi determinada usando dois ensaios de proliferação: o ensaio clássico utilizando células Nb2 e um outro desenvolvido recentemente em nosso laboratório com células Ba/F3-LLP, ambas linhagens prolactino-dependentes (Glezer *et al.*, 2006). A diferença básica entre elas é que as células Ba/F3-LLP foram transfectadas com um plasmídeo que codifica o receptor longo de hPRL, enquanto as células Nb2 apresentam receptores de PRL de origem murina.

Foi utilizado como padrão de referência de PRL recombinante o *Chemical Reference Standard* (CRS) e o primeiro reagente de referência para PRL, humano, recombinante, liofilizado, 97/714 com uma atividade específica de $57,2 \pm 11,4$ IU mg^{-1} , ambos da WHO (Organização Mundial de Saúde) (Rafferty *et al.*, 2001).

3.2.10.1 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^{-1} de penicilina, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina, 700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de geneticina (G418) e 1 ng mL^{-1} 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 10^3 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 CO_2 , o número de células

viáveis é avaliado por coloração com MTS (Chen, 98). Brevemente, 2 mg mL⁻¹ de MTS [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolin (Promega Corp., Madison, WI, USA)] em solução fosfato-salina (PBS) são misturados na proporção de 20:1 (vol/vol) com fenazina metassulfato (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,92 mg mL⁻¹ 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).

3.2.10.2 Bioensaio com células Nb2

As células Nb2 são mantidas rotineiramente em meio de crescimento: RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 10% de soro de cavalo castrado, penicilina e estreptomicina (50 U mL⁻¹) e betamercaptoetanol (0,1 mM). Antes de começar o ensaio de proliferação, as células são mantidas por cerca de 8 horas no meio de pré-ensaio, similar ao meio de crescimento, porém com redução do SFB de 10 para 1%. Depois deste período o meio é centrifugado e as células são ressuspensas no meio de ensaio: RPMI-1640 suplementado com 10% de soro de cavalo castrado, penicilina e estreptomicina (50 U mL⁻¹), betamercaptoetanol (0,1 mM) e HEPES 0,015M, sendo então distribuídas em placa de 96 poços (20 x 10³ células/poço) com um volume final, incluindo a amostra, de 200µL 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 (Chen *et al.*, 1998), da mesma forma que as Células Ba/F3-LLP.

3.2.11 Espetrometria de massa por electrospray (ESI-MS)

A amostra (1 µg de proteína) previamente liofilizada foi dissolvida em 5µL de ácido fórmico 0,1% e aplicada mediante injetor automático de um sistema de HPLC-ESI-MS (Fisher Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), sob um constante fluxo de 1mL min⁻¹. O gradiente cromatográfico foi realizado em uma coluna de RP-HPLC Bischoff NPS C18 (4,6mm×14 mm). A fase móvel “A” foi ácido fórmico 0,1% e a fase móvel “B” foi uma mistura de

acetonitrila:água:ácido fórmico (900:100:0,1). Foi utilizado um gradiente linear de 0-100% de “B” por 6 minutos. O sistema de controle e os dados do processo foram fornecidos pelo programa Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Essa análise foi realizada no Instituto Butantan.

4 RESULTADOS

4.1. Construção dos vetores de expressão

O plasmídeo λ P_L-DsbA-hPRL, foi obtido substituindo o gene do hGH presente no plasmídeo λ P_L-DsbA-hGH (Soares *et al.*, 2003) pelo cDNA da hPRL obtido por PCR. O esquema de construção e os mapas desses plasmídeos, incluindo também o pRK248 clts, responsável pela síntese do repressor, estão apresentados na FIGURA 1.

FIGURA 1. A e B, mapas dos plasmídeos λ P_L-DsbA-hGH e pRK248 clts, respectivamente . C, esquema de construção do plasmídeo λ P_L-DsbA-hPRL.

4.2 Análise do sistema de expressão λP_L x repressor clts

Utilizamos como referência em nossos estudos um sistema de expressão para o hormônio de Crescimento humano (hGH), já desenvolvido em nosso laboratório (Soares *et al.*, 2003). Este sistema utiliza a cepa W3110 de *Escherichia coli* transformada com os plasmídeos λP_L -DsbA-hGH e pRK248 clts. Esse último plasmídeo (pRK248 clts) é responsável pela síntese do repressor do promotor λP_L , uma proteína termo-lábil que é inativada em temperaturas superiores a 42°C. Esse sistema clássico de expressão confirmou um perfeito funcionamento, em nosso laboratório, no caso do hGH.

Resultados comprovando o funcionamento dessa construção para o hGH estão na FIGURA 2, onde são apresentados cromatogramas de HPLC por fase reversa, isocrática (RP-HPLC) referentes ao nível de expressão de hGH presente no extrato periplásmico após ativação em diferentes temperaturas. Observamos que em temperaturas iguais ou abaixo de 37 °C a expressão de hGH é mínima, enquanto a 42°C obtemos 1,8 $\mu\text{g hGH mL}^{-1}\text{A}_{600}^{-1}$. Uma síntese desses resultados estão apresentados na TABELA 1.

O mesmo sistema incluindo o vetor do repressor (pRK248clts) e em idênticas condições de cultivo em frascos, utilizando uma temperatura de ativação de 42°C, foi utilizado para a expressão da hPRL, porém a quantidade de prolactina humana produzida foi muito baixa, da ordem de 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}\text{A}_{600}^{-1}$, como é observado na FIGURA 3.

FIGURA. 2. Análise da expressão periplásmica de hGH por RP-HPLC isocrática após ativação por diferentes temperaturas, foi utilizada a cepa de *E. coli* W3110 produtora de hGH e transformada com o gene pRK248clts codificador do repressor. As setas indicam o tempo de retenção (t_R) do hGH de referência.

TABELA 1. Nível de secreção periplásmica após ativação por diferentes temperaturas (t_A) utilizando a cepa W3110 secretora de hGH com e sem o gene do repressor (clts).

t_A (°C)	λP_L -DsbA-hGH (+ clts) ($\mu\text{g mL}^{-1} A_{600}^{-1} \pm \text{S.D.}$)	λP_L -DsbA-hGH (- clts) ($\mu\text{g mL}^{-1} A_{600}^{-1} \pm \text{S.D.}$)
30	0,01	$1,0 \pm 0,14$ ($n=2$)
35	0,02	—
37	0,06	—
42	$1,31 \pm 0.38$ ($n=4$)	$1,61 \pm 0,11$ ($n=3$)

FIGURA. 3. Análise da expressão periplásmica de hPRL por RP-HPLC isocrática após a ativação a 42°C, utilizando a cepa de *E. coli* W3110 produtora de hPRL e transformada com o plasmídeo pRK248clts, que contem o gene codificador do repressor. A seta indica o t_R da hPRL de referência.

4.3 Padronização, em frascos de cultura, das condições de crescimento e de expressão da cepa produtora de hPRL

Considerando os valores obtidos para a expressão da hPRL, a instabilidade desse hormônio frente às altas temperaturas e o eficiente funcionamento do repressor clts em temperaturas de até 37°C, foi estudada a possibilidade de não usar o plasmídeo pRK248clts, responsável pela síntese do repressor. Assim, sem a presença do repressor, o promotor λP_L funcionaria como um promotor constitutivo. Na FIGURA 4 podemos comparar o DNA plasmidial extraído das duas cepas, confirmando a presença ou ausência do plasmídeo pRK248clts. É interessante observar também nessa figura a diferença do número de cópias ("copy number") entre os dois plasmídeos, que pode ser avaliada pela quantidade de DNA presente em cada banda. O pRK248clts de fato confirmou apresentar um baixo "copy number" (FIG. 4, coluna 3).

FIGURA. 4. Análise por eletroforese em gel de agarose (1%) de amostras de DNA digerido com a enzima EcoR1, com revelação mediante brometo de etídeo. 1, 500ng do marcador de tamanho molecular (λP_L digerido por Eco R1 e Hind III, onde pb significa par de bases); 2, pRK248clts (~10,1 Kpb, ~50 ng); 3, DNA extraído da cepa de *E. coli* W3110 transformada com os plasmídeos λP_L -DsbA-hPRL (~800 ng) e pRK248clts (~20 ng); 4, DNA extraído da cepa de *E. coli* W3110 transformada somente com o plasmídeo λP_L -DsbA-hPRL (~400 ng).

Diferente do observado no caso do hGH cultivado a 42°C, onde a presença do repressor não influenciou de forma significativa na expressão, estudos com a cepa secretora de hPRL sem o repressor mostraram um sensível aumento na expressão de prolactina. A expressão máxima obtida com indução a 37°C foi aproximadamente 30 vezes superior à obtida na presença do repressor, 0,92 contra 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}\text{A}_{600}^{-1}$, respectivamente, conforme pode ser observado nas FIGURA 5 e 6 e TABELA 2.

FIGURA 5. Nível de expressão da hPRL, determinada por RP-HPLC, no extrato periplásmico obtido sob diferentes temperaturas de ativação, utilizando a cepa de *E. coli* W3110, transformada ou não com pRK248clts (—♦— sem clts; —●— com clts).

TABELA 2. Secreção periplásmica de hPRL em *E. coli* W3110, após ativação em diferentes temperaturas, utilizando a cepa contendo (+clts) ou não contendo (-clts) o gene do repressor.

t_A (°C)	λP_L -DsbA-hPRL (+ clts) ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{A}_{600}^{-1} \pm \text{S.D.}$)	λP_L -DsbA-hPRL (- clts) ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{A}_{600}^{-1} \pm \text{S.D.}$)	Estatística ^a
30	0,001 ($n = 1$)	0,14 $\pm$ 0,02 ($n = 6$)	—
35	—	0,73 $\pm$ 0,07 ($n = 5$)	$P < 0,001$
37	0,03 ($n = 1$)	0,92 $\pm$ 0,10 ($n = 6$)	$P < 0,01$
39	—	0,60 $\pm$ 0,12 ($n = 8$)	$P < 0,001$
42	0,02 ($n = 1$)	0,19 $\pm$ 0,05 ($n = 4$)	$P < 0,001$

^a Teste t de Student comparando cada valor obtido com λP_L -DsbA-hPRL (- clts) com a temperatura de ativação anterior.

FIGURA 6. Análise por RP-HPLC isocrática de extratos periplásmicos de hPRL, após ativação em diferentes temperaturas. Foi utilizada a cepa de *E. coli* W3110 produtora de hPRL transformada ou não com o plasmídeo pRK248clts. As setas indicam o t_R da amostra de referência de hPRL.

4.4 Estudo da estabilidade do plasmídeo

A literatura menciona que a ausência do repressor pode facilitar a instabilidade ou perda do plasmídeo, comprometendo significativamente a expressão (Caulcott & Rhodes, 1986; Crowl, 1986). Portanto, foi necessário confirmar que no nosso sistema esse fenômeno não ocorre. Para isso realizamos um estudo de expressão de hPRL periplásmica comparando o cultivo após diferentes gerações de *E. coli*. O estudo foi realizado em frascos de cultura contendo meio LB com e sem ampicilina e cultivados a 30°C. Os valores de expressão específica obtidos foram de $0,64 \pm 0,06$ e $0,78 \pm 0,03$ µg hPRL

$\text{mL}^{-1}\text{A}_{600}^{-1}$, correspondentes a 10 e 50 gerações, respectivamente (TAB. 3). Em adição, a presença ou ausência do antibiótico não influenciaram os rendimentos específicos de expressão. Portanto, a ausência do repressor, neste caso específico, não contribuiu para a perda ou instabilidade do plasmídeo na cepa de *E. coli* em exame.

TABELA 3. Expressão de hPRL avaliada por RP-HPLC após cultivo por diferentes gerações na presença ou não de ampicilina.

Nº de gerações	$\mu\text{g hPRL mL}^{-1}\text{A}_{600}^{-1}$		Valor médio
	com Ampicilina	sem Ampicilina	$(\mu\text{g mL}^{-1}\text{A}_{600}^{-1} \pm \text{S.D.})$
10	0,60	0,68	$0,64 \pm 0,06$
50	0,80	0,76	$0,78 \pm 0,03$

4.5 A influência da temperatura na degradação da hPRL no citoplasma

Para estudar a labilidade da PRL em função da temperatura de cultivo, foram realizadas análises por WB de amostras de lisado bacteriano total e de extrato periplásmico obtidos a partir da ativação com diferentes temperaturas: 37 ou 42°C. Os resultados dessas análises estão exemplificados na FIG. 7. Observamos claramente que a banda correspondente à hPRL monomérica é muito mais intensa a 37°C e, que no lisado, há um aumento considerável dos produtos da degradação, principalmente na temperatura de 42°C. Em contraste, a prolactina purificada se manteve estável após incubação por 10 h a 37°C ou a 42°C, quando comparada com uma amostra mantida em -20°C.

FIGURA 7. Análise por WB de hPRL purificada derivada de *E.coli*, lisado bacteriano total e extratos periplásmicos.

(A) 40 ng de hPRL purificada, estocada a -20°C (1) incubada por 10h a 37°C (2) ou a 42°C (3).

(B) Amostras derivadas de massa bacteriana correspondente a $1,5 A_{600}$. 1 e 2 correspondem a lisados de *E. coli* ativados a 37°C e a 42°C , respectivamente. 3 e 4, amostras de extrato periplásmico obtidas após ativação a 37°C e a 42°C (4). hPRL purificada, estocada a -20°C (5).

4.6 Cultivo em biorreator da cepa W3110 produtora de hPRL

O processo de fermentação padronizado utilizando o nosso biorreator piloto (20L) (ver material e métodos) dura em média 20 horas, resultando em uma biomassa final correspondente à densidade óptica de $\sim 35 A_{600\text{nm}}$ e com uma expressão específica da ordem de $1\mu\text{g}$ de hPRL $\text{mL}^{-1} A_{600}^{-1}$, portanto com rendimentos em hPRL da ordem de 35 mg L^{-1} de meio de cultura. Exemplos de curva de crescimento e de produção de hPRL estão apresentados na FIGURA 8.

FIGURA 8. Exemplo de curva de crescimento de cultivo otimizado no biorreator piloto e níveis de secreção de hPRL durante o tempo de indução a 37°C. Curva de crescimento em *E.coli* (■); nível de expressão de hPRL (◆).

Outro processo alternativo de fermentação, com duração de aproximadamente 10 horas foi também utilizado. Nesse caso foram obtidos rendimentos da ordem de 10 mg de hPRL L⁻¹ de meio de cultura, com densidade óptica final de ~18 A₆₀₀.

A TABELA 4 compara resultados obtidos com a hPRL produzida em cepa de *E. coli* W3110 em biorreator numa escala piloto com aqueles obtidos em frascos e também com aqueles relativos ao cultivo otimizado em biorreator (*fed batch*), utilizando cepas análogas produtoras de hGH. O glicerol foi também utilizado como a fonte de carbono em vez da glicose, como sugerido por diferentes autores (Jensen & Carlsen, 1990; Tabandeh *et al.*, 2004), fornecendo um bom rendimento da biomassa, mas com expressão mínima de hPRL. Nas fermentações da cepa produtora de hPRL a biomassa obtida foi inferior à da cepa secretora de hGH. Contudo, a ativação a 37°C com baixa adição de glicose durante o *fed batch*, 1,1g L⁻¹h⁻¹ no lugar de 3,6 g L⁻¹h⁻¹, possibilitou manter um bom nível de expressão específica (da ordem de 1µg mL⁻¹A₆₀₀⁻¹), uma biomassa aceitável (A₆₀₀ = 35,3) e um rendimento produtivo útil (~35µg mL⁻¹).

Igualmente notável é a demonstração de que o cultivo simples em batch condicionado a 37°C, sem a adição da glicose (Exp. 5 – TAB. 4), poderia fornecer um rendimento de aproximadamente 10 mg hPRL L⁻¹ em um processo mais simples e que exige somente 10 h de cultivo. No experimento n° 7 foi confirmado que, mesmo no biorreator, um aumento de t_A de 37°C para 42°C, a paridade de todas as outras condições, resultou em uma baixa expressão de hPRL como ocorreu nos cultivos em frascos.

TABELA 4. Rendimentos de hPRL produzida pela cepa de *E. coli* W3110 determinados por RP-HPLC. Foram comparadas diferentes condições: em biorreator piloto; cultivo regular em frascos e fermentação otimizada de uma cepa análoga, porém produtora de hGH.

Exp. N°	Processo	Expressão Específica ($\mu\text{g mL}^{-1} A_{600\text{nm}}^{-1}$)	D.O. (A_{600})	Rendimento Hormonal (mg L^{-1})	Tempo de processo (h)
1	Cepa produtora de hGH (+clts), fed batch (4xHKSII), com glicose, t_A 42°C	1,5	63,2	94,8	20
2	Cepa produtora de hPRL (-clts), cultivo em frascos (meio LB), t_A 37°C	0,93	3,0	2,8	16
3	Cepa produtora de hPRL (-clts), nas mesmas condições do exp. 1, t_A 37°C	0,17	42,4	7,2	20
4	Mesmas condições do exp. 3, usando glicerol no lugar da glicose (2xHKSII)	0,07	53,4	3,7	23
5	Cepa produtora de hPRL (-clts), batch (2xHKSII), sem adição de glicose, t_A 37°C	0,58	18,3	10,6	10
6	Cepa produtora de hPRL (-clts), fed batch (2xHKSII), com baixa adição de glicose*, t_A 37°C	1,0	35,3	35,3	21
7	Mesmas condições do exp. 6, t_A 42°C	0,23	32,1	7,4	18

*1,1 g de glicose L⁻¹h⁻¹ durante fed batch e ativação

4.7 Análise da hPRL recombinante sintetizada no Biorreator

Esse capítulo apresenta estudos realizados com extratos periplásmicos bacteriano obtidos ao longo do processo de fermentação no biorreator e que serviram para otimizar o processo e também para avaliar a qualidade da hPRL recombinante antes da purificação.

4.7.1 Duração do período de cultivo a 37°C

Estudamos o aumento do nível de expressão de hPRL durante a ativação, quando a temperatura de cultivo no biorreator aumenta de 30°C para 37°C. Nessa etapa, que também pode ser chamada de etapa de produção ou indução, acompanhamos o aumento da síntese de hPRL ao longo do tempo e o valor máximo foi obtido após 5 ou 6 horas de indução. As FIGURAS 9 e 10 exemplificam os resultados obtidos.

FIGURA 9. Análise por RP-HPLC do extrato periplásmico após diferentes horas (0, 3, 5 e 6h) de ativação e respectivos níveis de expressão. A seta indica o tempo de retenção (t_R) da preparação de referência de hPRL analisada em paralelo.

FIGURA 10. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de Sódio (SDS-PAGE) corado com “Coomassie Brilliant Blue G-250” (A), e WB correspondente (B), de amostras de extrato periplásmico obtidas durante a etapa de indução ou ativação no biorreator, quando a temperatura de cultivo aumenta de 30 para 37 °C. T1 corresponde a amostra coletada após uma hora de ativação, T2 após duas horas e assim sucessivamente até T6. M e P representam marcadores de massa molecular e o padrão de prolactina usada como referência, respectivamente.

4.7.2 Análise do Extrato periplásmico mediante HPSEC

A FIGURA 11-A apresenta um cromatograma resultante da análise do extrato periplásmico por HPLC de exclusão molecular (HPSEC). Durante a eluição foram coletadas várias frações para posterior análise por WB e radioimunoensaio específico. A seta indica o pico correspondente à atividade imunológica de hPRL. O t_R do pico de hPRL resultou praticamente idêntico aquele da preparação monomérica de referência.

A FIGURA 11-B exemplifica a análise por WB de diferentes frações coletadas durante a cromatografia do extrato periplásmico (HPSEC). Esse resultado demonstra que a prolactina presente no espaço periplásmico se encontra principalmente na forma monomérica (frações 54 a 60).

A **B**

FIGURA 11. A, análise por HPSEC referente ao extrato periplásmico após cultivo no biorreator. As frações coletadas durante a eluição foram analisadas por radioimunoensaio e WB. A seta indica o pico correspondente à atividade imunológica de hPRL, coincidente com o t_R da hPRL. B, análise por WB das frações coletadas. As frações 54 a 60 correspondem à eluição da hPRL monomérica.

4.8 Purificação da hPRL presente no extrato periplásmico

A hPRL recombinante resultante do cultivo da cepa de *E. coli* em biorreator foi purificada em escala laboratorial, a partir do extrato periplásmico. A purificação foi realizada em duas etapas, conforme descrito por Ueda *et al.* (2001). Etapa 1: Cromatografia de Afinidade por Metais Imobilizados (IMAC); Etapa 2: Cromatografia de Exclusão Molecular em Sephacryl S-100.

4.8.1 Cromatografia de Quelação utilizando Sepharose Fast Flow com Ni^{2+} como agente ligante (CS-FF- Ni^{2+})

A FIGURA 12 apresenta um cromatograma típico da purificação por Cromatografia de Afinidade por Metais Imobilizados (IMAC) utilizada no presente estudo. Introduzimos uma alteração no protocolo original (Ueda *et al.*, 2001) que consistiu em eliminar a etapa intermediária de lavagem com imidazol 30 mM, com o objetivo de minimizar perdas.

FIGURA 12. Exemplo de perfil cromatográfico obtido na primeira etapa de purificação mediante Cromatografia de Afinidade por Metais Imobilizados (IMAC).

4.8.2 Cromatografia de Exclusão Molecular Sephacryl S-100

Uma cromatografia por exclusão molecular utilizando a resina Sephacryl HR S-100 foi realizada como segunda etapa de purificação da hPRL. Considerando a capacidade de concentração da hPRL obtida na primeira etapa (CS-FF- Ni^{2+}) não foi necessário tratamento para concentrar a amostra. O perfil cromatográfico dessa segunda etapa é apresentado na FIGURA 13. As frações correspondentes a hPRL foram coletadas para estudos de pureza e caracterização físico-química e biológica.

FIGURA 13. Exemplo de perfil cromatográfico obtido na segunda etapa de purificação mediante exclusão molecular. A seta indica a posição da hPRL confirmada após análise por HPSEC.

4.9 Caracterização Físico-química e biológica da hPRL recombinante purificada

A hPRL purificada foi analisada e caracterizada por diferentes técnicas físico-químicas e biológicas já desenvolvidas em nosso laboratório, os resultados principais serão apresentados a seguir.

4.9.1 Análise por SDS-PAGE

A FIGURA 14 apresenta análise por SDS-PAGE da amostra de hPRL frente a outra preparação. Os resultados evidenciaram a pureza do nosso produto que apresentou massa molecular dentro do esperado.

FIGURA 14. Análise por SDS-PAGE 15% em condições não redutoras revelando com “Coomassie Brilliant Blue G-250”. 1, marcadores de massa molecular; 2, padrão de prolactina recombinante WHO-CRS (0,6 µg); 3, hPRL recombinante produzida no IPEN, secretada por *E. coli* (0,6 µg).

4.9.2 Análise por HPLC

4.9.2.1 Análise por HPSEC

A FIGURA 15 apresenta a análise por HPSEC da Prolactina recombinante purificada (B) em comparação com o padrão de PRL-CRS (A) fornecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO). Observamos que a hPRL recombinante se apresenta pura e com praticamente o mesmo tempo retenção (t_R) da hPRL monomérica padrão.

FIGURA 15. Análise comparative por HPSEC entre 11 μ g de hPRL-CRS (WHO) (A) e 2,5 μ g de hPRL periplásmica purificada obtida no presente estudo (B). O padrão de referência da WHO também apresenta um pico correspondente à isoforma glicosilada de prolactina (G-hPRL) com um $t_R = 17,81$ min. Essa isoforma, como esperado, não está presente na hPRL periplásmica.

4.9.2.2 Análise por RP-HPLC

A FIGURA 16 apresenta a análise por RP-HPLC da Prolactina recombinante purificada (B) em comparação com o padrão de PRL-CRS (A) fornecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO). Observamos que a hPRL recombinante IPEN apresenta praticamente o mesmo tempo de retenção (t_R) da hPRL monomérica presente no padrão, que apresenta outros picos que devem corresponder a isoformas glicosiladas, desamidadas ou oxidadas.

FIGURA 16. Análise comparativa por RP-HPLC entre 11 μ g de hPRL-CRS (WHO) (A) e hPRL periplásmica purificada obtida no presente estudo (B). O padrão de referência WHO apresenta um pico principal correspondente a hPRL monomérica não glicosilada com um t_R = 22,59 min.

4.9.3 Determinação da atividade biológica

A atividade ou potência biológica da hPRL purificada foi determinada por dois diferentes bioensaios: o bioensaio clássico utilizando células Nb2 e um outro desenvolvido recentemente em nosso laboratório utilizando células Ba/F3-LLP. Foi utilizado como padrão de referência o Padrão Internacional de Prolactina Humana WHO 97/714, com atividade específica de 57,2 UI/mg.

A FIGURA 17 apresenta a comparação entre as duas curvas de proliferação, (amostra versus padrão) para cada um dos bioensaios. No bioensaio Nb2, a potência biológica calculada para a hPRL recombinante produzida no IPEN em comparação ao padrão WHO foi de $51,5 \pm 24$ UI/mg, enquanto no bioensaio Ba/F₃-LLP foi de $102,3 \pm 6,2$ UI/mg. Essa diferença, pode ser em parte devida à variação na resposta dos receptores murino ou humano presentes nas células Nb2 e Ba/F3-LLP, respectivamente.

Figura 17. Curva dose-resposta com células Ba/F₃-LLP (A) e com células Nb2 (B). São analisadas duas amostras: hPRL periplásmica purificada produzida no IPEN (*) e o 1º padrão de hPRL recombinante da WHO 97/714 (57,2 IU/mg) (■). Cada curva com células Ba/F₃-LLP é resultado da média de 2 experimentos e cada curva com células Nb2 é resultado da média de 3 experimentos.

4.9.4 Determinação da massa molecular relativa de hPRL por espectrometria de massa por electrospray (ESI-MS)

A PRL purificada analisada por espectrometria de massa (ESI-MS) apresentou uma Massa relativa (M_r) de 22905,8 contra uma M_r de 22908,6 obtida com o padrão de hPRL-CRS da Organização mundial de Saúde (OMS). Ambos os valores apresentam uma diferença inferior a 0,05% quando comparados com a massa molecular calculada teoricamente ($M_r = 22897,75$), confirmando o correto processamento do peptídeo sinalizador durante o transporte da proteína do citoplasma para o periplasma bacteriano. A FIGURA 18 apresenta os espectrogramas resultantes da análise por ESI-MS, onde A corresponde ao padrão (hPRL-CRS) e B à prolactina purificada produzida em *E. coli* em nosso laboratório.

FIGURA 18. Análise por ESI-MS, onde A corresponde ao padrão (hPRL-CRS) e B à prolactina purificada produzida em *E. coli* em nosso laboratório.

5. DISCUSSÃO

Um nível de secreção periplásmica relativamente útil (aproximadamente $1 \mu\text{g mL}^{-1} \text{A}_{600}^{-1}$), o mais elevado já relatado para a hPRL periplásmica, foi obtido por expressão constitutiva baseada na não repressão do promotor λP_L , em cultivo a 37°C . O nível de expressão é aproximadamente 12 vezes superior ao obtido em trabalho anterior em que foi usado um promotor tac IPTG-ativado (Morganti *et al.*, 1998). Este rendimento específico de secreção é, entretanto, ainda significativamente menor ($p < 0,001$) daquele observado quando o gene do hGH é introduzido no mesmo vetor de expressão no lugar do gene da hPRL.

Demonstramos que a secreção periplásmica da hPRL, sob o controle do promotor constitutivo do λP_L , tem uma eficiência máxima a 37°C (FIG. 5 e 6), diminuindo em temperaturas maiores. Esta drástica diminuição da secreção acima de 37°C provavelmente é resultante da labilidade térmica da hPRL e/ou do aumento da atividade das proteases presentes no espaço periplásmico (Caulcott & Rhodes, 1986). Como descrito por Lowman & Bina (1990) os níveis da proteína heteróloga acumulada podem ser o resultado do equilíbrio entre a taxa de síntese protéica e a taxa de degradação. Para a hPRL tal equilíbrio poderia ser particularmente a favor da taxa de síntese, a 37°C . De fato, um aumento na degradação devido à atividade proteolítica acima de uma temperatura de ativação de 40°C foi relatado para a cistatina C humana (Dalbøge *et al.*, 1989) e mesmo para o hGH (Tabandeh *et al.*, 2004), uma molécula que é considerada mais estável que a hPRL. Com base nos resultados mostrados na FIGURA 7, podemos concluir que a hPRL é altamente degradada no citoplasma, a 42°C , uma degradação que já ocorre limitadamente a 37°C . Isto parece ser devido a uma maior atividade de proteases presentes no citoplasma, uma vez que a hPRL purificada se mostrou estável nestas temperaturas (FIG. 7A).

De acordo com o presente estudo, a proteína repressora, clts, parece funcionar adequadamente até 37°C , ainda exercendo alguma influência negativa na expressão mesmo a 42°C . Isto pode ser visto tanto no exemplo do hGH como no caso da expressão de hPRL comparando-se os rendimentos específicos da expressão nesta temperatura com ou sem a presença de clts.

Podemos ainda especular que a maior expressão a 42°C nos sistemas que não utilizam a proteína repressora poderia ser devido a alguma proteção à degradação oferecida pelo ambiente do espaço periplásmico (Mackides, 1996) em relação a proteína sintetizada previamente durante o cultivo a 30°C (FIG. 6). Isto parece ser confirmado pelo fato de que não há nenhuma evidência de produtos degradados no fluído periplásmico (FIG. 7B).

A ausência de repressão, como ocorre com o uso de uma cepa sem o plasmídeo que codifica o repressor, aparentemente não levou à perda do plasmídeo como sugerido por diferentes autores (Bernard & Helinski, 1979; Crowl, 1986; Caulcott & Rhodes, 1986; Makrides, 1996) já que não ocorreu nenhuma diminuição significativa no rendimento específico da expressão mesmo depois de 40 gerações. Devemos enfatizar que este experimento foi realizado em frascos sob agitação, com meio LB, sem nenhuma adição da glicose (TAB. 3).

Os experimentos realizados em biorreator de escala piloto mostraram que o uso do λP_L como um promotor constitutivo, sob um estrito controle da temperatura (37°C) e com adição limitada da glicose (1,1 g L⁻¹h⁻¹) podem fornecer bons níveis de expressão específica e rendimentos úteis de hPRL. A adição de fonte de carbono em quantidades mais elevadas, a fim de obter uma maior biomassa sempre levou a uma expressão muito baixa de hPRL.

Os dados apresentados confirmaram a identidade, a conformação (folding) apropriada e a bioatividade da hPRL obtida utilizando o nosso protocolo de cultivo e purificação.

As análises do extrato periplásmico e da preparação purificada por HPSEC, realizadas em uma coluna cromatográfica longa que permite a detecção de pequenas alterações estruturais da molécula da proteína (Barth *et al.*, 1998; Mendonça *et al.*, 2005; Ribela *et al.*, 2006), junto com radioimunoensaio e WB confirmaram a presença da forma monomérica corretamente processada, cujo comportamento cromatográfico foi praticamente idêntico àquele correspondente à prolactina não glicosilada do Padrão Internacional de hPRL da Organização Mundial de Saúde (hPRL-CRS) (FIG. 11 e 15). A análise por RP-HPLC confirmou que a maior parte da hPRL purificada

apresentou tempo de retenção correspondente ao t_R da prolactina não glicosilada presente no Padrão CRS.

A hPRL purificada apresentou atividade biológica nos dois bioensaios testados. No ensaio de proliferação com células Nb2, utilizado como bioensaio de referência para proteínas lactogênicas por pelo menos 25 anos (Gout *et al.* 1980; Tanaka *et al.*, 1980), foi avaliada uma atividade mitogênica de $51,5 \pm 24$ UI mg^{-1} , $n = 3$ ensaios, que não é significativamente diferente ($P > 0,05$) daquela do Padrão de Referência da WHO 97/714 ($57,2 \pm 11,4$ UI mg^{-1} , $n = 5$ ensaios, (FIG. 17B). Por outro lado, no bioensaio homólogo utilizando as células Ba/F3-LLP a atividade obtida foi de $102,3 \pm 6,3$ UI mg^{-1} , $n = 2$ ensaios. Considerando que o ensaio com células Ba/F3-LLP é relativamente novo (Glezer *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2006) e as grandes diferenças entre as duas linhagens celulares, como por exemplo tipo de receptor e o número de receptor por célula, menos de 300 no caso da Ba/F3 (Bernichtein *et al.*, 2003) e de cerca de 12.000 para as células Nb2 (Goffin *et al.*, 1998), um estudo mais sistemático comparando as duas metodologias seria interessante, que porém foge do escopo desse projeto. O único trabalho comparando Nb2 e Ba/F3-LLP é o de Glezer *et al.* (2006) que relata não ter observado diferenças estatísticas significantes ao comparar a inclinação de curvas analisando amostras de hPRL monomérica obtidas de pacientes. Um ensaio menos sensível, utilizando células BaF3-LP, foi descrito por Bernichtein *et al.* (2003), porém focalizaram a aplicação desse ensaio na inibição da resposta da hPRL em relação a diferentes antagonistas de hPRL.

As análises por espectrometria de massa via ESI-MS (FIG. 18) demonstraram que a massa relativa da hPRL purificada ($M_r = 22905,8$) foi similar à da hPRL da WHO utilizada como padrão ($M_r = 22906,5$). Além disso, uma preparação análoga de *E.coli* derivada de hPRL relatada em trabalho anterior, apresentou massa relativa praticamente idêntica, M_r de 22888 (Soares *et al.*, 2006).

É difícil antecipar agora uma demanda futura para a hPRL, especialmente para aplicações terapêuticas. Porém ressaltamos o alto valor agregado de PRL humana comercializada no mercado internacional, podendo chegar até oito mil dólares o miligrama de acordo com a BioVision (Califórnia, EUA) e Genway (San Diego, EUA). A nossa hPRL apresenta um importante

diferencial com relação à prolactina atualmente comercializada: é idêntica à prolactina natural, enquanto que, a prolactina comercializada, por ser obtida de corpos de inclusão, apresenta um amino ácido a mais (metionina) localizado na porção N-terminal.

Considerando rendimentos de $\sim 30 \text{ mg L}^{-1}$ do hormônio autêntico (FIG. 8 e TAB. 4), a purificação com recuperação de $\sim 40\%$ e a utilização de um biorreator de 150 litros (o mesmo que nós usamos para produções industriais relativamente pequenas de hGH) seria possível obter $\sim 1,5 \text{ g}$ de hormônio purificado por processo de fermentação. Assim, juntamente com um tempo de fermentação relativamente curto ($\sim 20 \text{ h}$), uma produção anual competitiva superior a 200 g de hPRL purificada pode ser possível mesmo nesta escala, industrialmente limitada.

A nossa preparação já tem sido usada de rotina em nosso laboratório como padrão de referência secundário de hPRL, tanto em estudos com HPLC como em análises por SDS-PAGE e WB. Já foi também marcada com iodo radioativo (^{125}I) servindo portanto como reagente para radioimunoensaios (dados não apresentados). Além disso, claramente estão abertas oportunidades de novos estudos *in vitro* e *in vivo* focalizando aspectos fisiológicos e metabólicos da ação desse hormônio. Com relação aos aspectos biotecnológicos, o processo padronizado ainda pode ser aperfeiçoado e também aplicado na produção de outras proteínas heterólogas. A influência da concentração de glicose e da temperatura deverá ser mais estudada, utilizando cepas que sintetizam outras proteínas como antagonistas de PRL, PRL de camundongo, ou outras citocinas como por exemplo interferon ou interleucinas.

Em conclusão, os resultados apresentados demonstram claramente a praticidade de utilizar *E. coli* em vez dos sistemas de expressão em células de mamíferos ou de inseto (Price *et al.*, 1995; Hirooka *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2001) para uma produção eficiente e econômica de hPRL autêntica, não glicosilada e altamente homogênea.

6. CONCLUSÕES

- Foi obtido um nível de secreção de aproximadamente $1 \mu\text{g mL}^{-1}\text{A}_{600}^{-1}$, o mais elevado já relatado para a hPRL periplásmica.
- Demonstramos que a secreção periplásmica da hPRL, sob o controle do promotor constitutivo λP_L , tem uma eficiência máxima a 37°C .
- A hPRL é altamente degradada no citoplasma, a 42°C , uma degradação que, limitadamente, já ocorre a 37°C .
- A ausência de repressão, como ocorre com o uso de uma cepa sem o gene do repressor, aparentemente não levou à perda do plasmídeo.
- Os experimentos realizados em biorreator piloto mostraram que o uso do λPL como um promotor constitutivo, sob um estrito controle da temperatura (37°C) e a adição limitada da glicose ($1,1 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) podem fornecer bons níveis de expressão específica e rendimentos úteis de hPRL.
- Os dados apresentados confirmaram a identidade, a conformação (folding) apropriada e a bioatividade da hPRL, obtida utilizando o nosso protocolo de cultivo e purificação.
- Os resultados apresentados demonstram claramente a praticidade de utilizar *E. coli* em vez dos sistemas de expressão em mamíferos ou de inseto para uma produção eficiente e econômica de hPRL autêntica e altamente homogênea que pode alcançar níveis industrialmente úteis mesmo com um fermentador de apenas 150L.

7. REFERÊNCIAS

- Barth, H.G., Boyes, B.E., Jackson, C., 1998. Size exclusion chromatography and related separation techniques. *Anal. Chem.* 70, 251R–278R.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L., Steinmetz, B.W., 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr. Rev.*, 17, 639 – 69M.
- Bernard, H., Helinski, D.R., 1979. Use of the λ phage promoter P_L to promote gene expression in hybrid plasmid cloning vehicles. *Methods Enzymol.* 68, 482–492.
- BioVision Incorporated (Mountain View, CA, EUA).
Disponível em:
<http://www.biovision.com/Merchant2/merchant.mvc>.
Acesso em 25 nov. 2008
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19, 225-268.
- Caulcott, C.A., Rhodes, M., 1986. Temperature-induced synthesis of recombinant proteins. *Trends Biotechnol.* 4, 142–146.
- Chen, T.J.; Kuo, B.C.; Tsai, K.F.; Liu, J.W.; Chen, D.Y.; Walker, A.M. , 1998. Development of Recombinant Human Prolactin Receptor Antagonists by Molecular Mimicry of the Phosphorylated Hormone. *Endocrinol.* 139 (2): 609-616.
- Clarke, W.L., Bern, H.A., 1980. Comparative endocrinology of prolactin. *Horm. Prot. and Peptides.* 8, 105-197.

Crowl, R., 1986. Expression of human interferon genes in *E. coli* with the lambda P_L promoter. *Methods Enzymol.* 119, 376–383.

Cunningham, B.C., Bass, S., Fuh, G., Wells, J.A., 1990. Zinc mediation of the binding of human growth hormone to the prolactin receptor. *Science*, 250, 1709 – 1712.

Dalböge, H., Jensen, E.B., Töttrup, H., Grubb, Abrahamson, M., Olafsson, I., Carlsen, S., 1989. High-level expression of active cystatin C in *Escherichia coli*. *Gene* 79, 325–332.

Dalmora, S., Oliveira, J.E., Affonso, R., Gimbo, E., Ribela, M.T.C.P., Bartolini, P., 1997. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. *J. Chromatogr. A* 782, 199–210.

Das, T., Johns, P.W., Goffin, V., Kelly, P., Kelder, B., Kopchick, J., Buxton, K., Mukerji, P., 2000. High-level expression of biological active human prolactin from recombinant baculovirus in insect cells. *Protein Expr. Purif.* 14, 23–30.

Genway (San Diego, EUA)

Disponível em:

http://www.genwaybio.com/advanced_search_result.php?so=c&igg=on&igy=on&rprotein=on&peptide=on&secondary_elisa=on&keywords=prolactin&x=36&y=2

Acesso em 25 nov.2008.

Ginsburg, E. e Vonderhaar, B. K., 1995. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 55(12), 2591 – 2595.

Glezer, A., Soares, C.R.J., Vieira, J.G., Giannella-neto, D., Ribela, M.T.C.P., Goffin, V., Bronstein, M.D., 2006. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1048 – 1055.

Goffin, V., Bernichtein, S., Touraine, P., Kelly, P.A., 2005. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr. Rev.* 26, 400 – 422.

Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P., 2002. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 47–67.

Goodman, G., Bercovich, D., 2008. Prolactin does not cause breast cancer and may prevent it or be therapeutic in some conditions. *Med. Hypot.* 70 (2), 244 – 251.

Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R. L., 1980. Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas. *Cancer Res.* 40 (7), 2433 – 2436.

Hankinson, S. E., Willett, W. C., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Michaud, D. S., Deroo, B., Rosner, B., Speizer, F. E. e Pollak, M., 1998. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet*, 351(9113), 1393 – 1396.

Hirooka, T., Suganuma, N., Furhashi, M., Kitagawa, T., Ando, H., Kikkawa, F., Tomoda, Y., Seo, H., 1996. Synthesis and release of glycosylated prolactin in transfected cells with human prolactin complementary deoxyribonucleic acid. *Endocr. J.* 43, 423–428.

Hodgkinson, S.C., & Lowry, P.J., 1981. Hydrophobic-interaction cromatography and anion-exchange chromatography in the presence of acetonitrile. *Biochem J.*, 199, 619 – 627.

Hwang, P., Guyda, H., Friensen, H., 1975. Purification of human prolactin. *Methods Enzymol.*, 37, 389 – 402.

Jensen, E.B., Carlsen, S., 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol. Bioeng.* 36, 1–11.

Keeler, C., Dannies, P.S., Hodsdon, M.E., 2003. The Tertiary Structure and Backbone Dynamics of Human Prolactin. *J. Mol. Biol.*, 8 (5), 1105 – 1121.

Koshland, D., Botstein, D., 1980. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell* 20, 749–760.

Lewis, U.J. Singh, R.P.N. Seavey, B.K, 1971. Human Prolactin: isolation and some properties. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44, 1169-1176.

Llovera, M., Pichard, C., Bernichtein, S., Jeay, S., Touraine, P., Kelly, P. A. e Goffin, V. 2000. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncog.*, 19 (41), 4695 – 4705.

Lowman, H.B., Bina, M., 1990. Temperature-mediated regulation and downstream inducible selection for controlling gene expression from the bacteriophage λ P_L promoter. *Gene* 96, 133–136.

Makrides, S.C., 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512–538.

Melmed, S., Kleinberg, D., 2003. Anterior Pituitary. Saunders – Elsevier, Philadelphia, PA. In: Larsen, P.R., Kroneberg, H.M., Melmed, S., Polansky, K.S. (Eds.) *Williams Textbook of Endocrinology*, 177-279.

Mendonca, F., Oliveira, J.E., Bartolini, P., Ribela, M.T.C.P., 2005. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotrophin and its

immunological, biological, physico-chemical and mass spectral characterization. J. Chromatogr. A 1062, 103–112.

Miller, W.L., Eberhardt, N.L., 1983. Structure and evolution of the growth-hormone gene family. Endocr. Rev. 4, 97 – 130.

Morganti, L., Huyer, M., Gout, P.W., Bartolini, P., 1996. Production and characterization of biologically active Ala–Ser–(His)–Ile–Glu–Gly–Arg-human prolactin (tag-hPRL) secreted in the periplasmic space of *Escherichia coli*. Biotechnol. Appl. Biochem. 23, 67–75.

Morganti, L., Soares, C.R.J., Affonso, R., Gout, P.W., Bartolini, P., 1998. Synthesis and characterization of recombinant authentic prolactin secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*. Biotechnol. Appl. Biochem. 27, 63–70.

Oliveira, J.E., Soares, C.R.J., Peroni, C.N., Gimbo, E., Camargo, I.M.C., Morganti, L., Bellini, M.H., Affonso, R., Arkaten, R.R., Bartolini, P., Ribela, M.T.C.P., 1999. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in *Escherichia coli* periplasmic space. J. of Chromatogr. A, 852, 2, 441-450.

Paris, R.H., Rentier-Delrue, F., Defontaine, A., Goffin, V., Lebrun, J.J., Mercier, L., Martial, J.A., 1990. Bacterial production and purification of recombinant human prolactin. Biotechnol Appl Biochem., 12, 436 – 449.

Pereira, C.A., Pouliquen, Y., Rodas, V., Massotte, D., Mortensen, C., Sogayar, M.C., M´enissier-de Murcia, J., 2001. Optimized insect cell culture for the production of recombinat heterologous proteins and baculovirus particles. Biotechniques 31, 1262–1268.

Price, A.E., Logvinenko, K.B., Higgins, E.A., Cole, E.S., Richards, S.M., 1995. Studies on the microheterogeneity and *in vitro* activity of glycosylated

and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. *Endocrinology* 136, 4827–4833.

Rafferty, B. Rigsby, P., Gaines-Das, R.E. (2001) Draft Report of an International Collaborative Study of the proposed WHO Reference Reagents for rDNA-derived Prolactin and its Glycosylated and Non-glycosylated Components. WHO TRS (Technical Report Series) 52, N° 924 Geneva.

Reynolds, C., Montone, K. T., Powell, C. M., Tomaszewski J. E. e Clevenger, C. V., 1997. Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. *Endocrinol.*, 138 (12), 5555 – 5560.

Richards, S. M., Garman, R. D., Keyes, L., Kavanagh, B. e Mcpherson, J. M., 1998. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunol*, 184 (2), 85 – 91.

Ribela, M.T.C.P., Gout, P.W., Bartolini, P., 2003. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. *J. Chromatogr. B* 790, 285–316.

Ribela, M.T.C.P., Gout, P.W., Oliveira, J.E., Bartolini, P., 2006. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. *Curr. Pharm. Anal.* 2, 103–126.

Roos, P., Nyberg, F., Wide, L., 1979. Isolation of human pituitary prolactin. *Biochim Biophys Acta.*, 588, 368 – 379.

Shelikoff, M., Sinskey, A.J., Stephanopoulos, G., 1994. The effect of protein synthesis inhibitors on the glycosylation site occupancy of recombinant human prolactin. *Cytotechnol.* 15(1-3), 195 – 208.

Sinha, N.Y., 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological

significance. *Endocr. Rev.* 16, 354–369.

Soares, C. R., Ueda, E. K., Oliveira, T. L., Gomide, F. I., Heller, S. R. e Bartolini, P. 2008. 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*, 133(1),27 – 35.

Soares, C.R.J., Glezer, A., Okazaki, K., Ueda, E.K.M., Heller, S.R., Walker, A.M., Goffin, V., Bartolini, P., 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, 182–194.

Soares, C.R.J., Gomide, F.I.C., Ueda, E.K.M., Bartolini, P., 2003. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the λP_L promoter: use of HPLC for product quantification. *Protein Eng.* 16, 1–8.

Soares, C.R.J., Camargo, I.M.C., Morganti, L., Gimbo, E., Oliveira, J.E., Legoux, R., Ferrara, P., Bartolini, P., 2002. Reversed-phase highperformance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. *J. Chromatogr. A* 955, 229–236.

Soares, C.R.J., Morganti, L., Miloux, B., Lupker, J.H., Ferrara, P., Bartolini, P., 2000. High level synthesis of human prolactin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32, 127–135.

Tabandeh, F., Shojaosadati, S.A., Zamorodipour, A., Khodabandeh, M., Savati, M.H., Yakhchali, B., 2004. Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 26, 245–250.

Tanaka, T., Shiu, R. P., Gout, P. W., Beer, C. T., Noble, R. L., Friesen, H. G., 1980. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51 (5), 1058 – 1063.

Ueda, E.K.M., Gout, P.W., Morganti, L., 2001. Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic *Escherichia coli* extracts. *J. Chromatogr. A* 922, 165–175.

Woody, M. A., Welniak, L. A., Sun, R., Tian, Z. G., Henry, Richards, M., S., Raziuddin, A., Longo, D. L. e Murphy, W. J., 1999. Prolactin exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. *Exp Hematol*, 27 (5), 811 – 816.

Zhang, W., Sun, R., Zhang, J., Zhang, J., Tian, Z., 2005. Recombinant human prolactin protects against irradiation-induced myelosuppression. *Cell. Mol. Immunol.* 2, 379 – 385.