INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

ADAPTAÇÃO DE CÉLULAS CHO SECRETORAS DE PROLACTINA HUMANA E SEUS ANTAGONISTAS PARA O CRESCIMENTO EM SUSPENSÃO

FERNANDA DOS SANTOS ARTHUSO

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

2011

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Leda Gonçalves dos Santos Arthuso** e **Rubens Arthuso** por todo amor, compreensão e conselhos em toda a minha caminhada até aqui.

Ao meu irmão **Rafael** por toda alegria e amor incondicional.

Ao **Leandro**, por todo amor, ajuda e compreensão.

“Nada de grande se faz sem paixão.”
Friedrich Hegel

“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

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

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

A toda minha família pela compreensão, carinho, ajuda e apoio nos momentos em que mais precisei.

À Elen, minha melhor amiga, melhor companheira, a irmã que eu não tive para brincar de boneca, por ser meu exemplo, por me mostrar o mundo da pesquisa.

Ao Kauê, pelo belo desenho do *spinner*, meu sincero obrigada.

À Família Perez por acreditar em mim.

À Susana, quem me ensinou os primeiros passos.

À Diane, quem muito me ensinou e ajudou quando mais precisei.

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

Aos amigos Beatriz, Geyza, Miriam, Renata, Eliza, Claudia, Nélío, Marcos, Herbert, 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 CAPES, pela concessão de recursos financeiros.

ADAPTAÇÃO DE CÉLULAS SECRETORAS DE PROLACTINA HUMANA E SEUS ANTAGONISTAS PARA O CRESCIMENTO EM SUSPENSÃO

Fernanda dos Santos Arthuso

Resumo

O Grupo de Hormônios do Centro de Biotecnologia do IPEN desenvolveu várias linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO) modificadas geneticamente e comprovadamente eficientes na expressão de proteínas heterólogas, dentre elas a prolactina humana (hPRL) e os análogos antagonistas de prolactina (S179D-hPRL e G129R-hPRL). No entanto, todas as linhagens para expressão são cultivadas em monocamadas e dependentes da presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo para um crescimento eficiente. As células em suspensão apresentam um grande interesse industrial-farmacêutico, tanto pela facilidade de cultivo e ampliação de escala, como pela produtividade volumétrica. Desenvolvemos um protocolo para adaptação de células CHO para o crescimento em suspensão e também processos de produção em frascos *spinners*. Nesse trabalho foi realizada a adaptação das linhagens produtoras de hPRL; S179D-hPRL e G129R-hPRL para o crescimento em suspensão e em meio livre de SFB. Realizamos também a produção em escala laboratorial com as três linhagens adaptadas, assim como a correspondente purificação e caracterização de quatro proteínas heterólogas, incluindo a prolactina humana glicosilada (G-hPRL).

ADAPTATION OF CHO CELLS SECRETING HUMAN PROLACTIN AND THEIR ANTAGONISTS TO GROWTH IN SUSPENSION

Fernanda dos Santos Arthuso

Abstract

The Hormone Group of the Biotechnology Center of IPEN has developed different cells lines of genetically modified chinese hamster ovary cells (CHO) for the expression of heterologus protein like human prolactin (hPRL) and its analogs/antagonists (S179D-hPRL and G129R-hPRL). All cell lines for expression are however cultured in monolayer culture dish and depend on fetal bovine serum (FBS) in the medium for an efficient growth. Cells in suspension show a great industrial-pharmaceutical interest, especially for the cultivation facility and scale enlargement as well as for volumetric productivity. We developed a protocol for adapting CHO cells to suspension growth, in spinner flasks. The adaption of our cell lines producing hPRL; S179D-hPRL and G129R-hPRL to suspension growth and in serum-free medium was obtained. We also carried out laboratory scale production with the three suspension-adapted culture line cells and the corresponding purification and characterization of four heterologous proteins, including glycosylated human prolactin (G-hPRL).

Lista de Abreviaturas

CHO – células de ovário de hamster chinês

CRS – Chemical Reference Standard

Da – Dalton

E.coli - *Escherichia coli*

G-hPRL – prolactina humana glicosilada

hPRL – prolactina humana

HPSEC – cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular

kDa – kilodalton

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

MTX – Metotrexato

NG-hPRL – prolactina humana não glicosilada

P35 – Preparação interna de hPRL recombinante purificada produzida no espaço periplásmico bacteriano.

PBS – tampão fosfato salina

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

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

SFBd – soro fetal bovino dialisado

UV – luz ultravioleta

WB – western blotting

WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Material	9
3.1.1 Material utilizado no cultivo celular	9
3.1.1.1 Meios de cultura.....	9
3.1.1.2 Linhagens celulares	9
3.1.1.3 Material plástico	10
3.1.1.4 Reagentes utilizados na cultura celular	10
3.1.2 Material utilizado no processo de purificação e análise da prolactina e seus antagonistas	10
3.1.2.1 Colunas cromatográficas	10
3.1.2.2 Resinas cromatográficas.....	11
3.1.2.3 Padrões, antissoros e outros reagentes para WB.....	11
3.1.3 Material radioativo.....	11
3.1.4 Reagentes para marcação de Proteína A para Western Blotting.....	11
3.1.5 Outros reagentes	12
3.1.6 Equipamentos e acessórios principais	12
3.1.7 Materiais diversos	14
3.2 Métodos	14
3.2.1 Cultura de células	14
3.2.2 Adaptação para o crescimento em suspensão	15
3.2.3 Produção laboratorial	17
3.2.3.1 Produção de hPRL.....	17
3.2.3.2 Produção dos antagonistas.....	17
3.2.4 Purificação	18
3.2.4.1 Purificação da hPRL	18
3.2.4.2 Purificação dos antagonistas	18
3.2.5 Caracterização físico-química da prolactina e seus antagonistas.....	19
3.2.5.1 Análise por SDS-PAGE.....	19
3.2.5.1.1 Revelação com <i>Coomassie Brilliant Blue</i> G-250.....	19

3.2.5.2	Análise por Western Blotting.....	20
3.2.5.3	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC.....	20
3.2.6	Ensaio biológicos	21
3.2.6.1	Bioensaio com células Ba/F3-LLP	21
3.2.6.2	Bioensaio com células Nb2.....	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Adaptação para o crescimento em suspensão	23
4.2	Produção laboratorial	24
4.2.1	Produção laboratorial da hPRL	24
4.2.2	Produção laboratorial dos antagonistas G129R-hPRL e S179D-hPRL	28
4.3	Crescimento em <i>spinner</i> com altas densidades celulares	29
4.4	Comparação entre diferentes meios de cultivo	31
4.4.1	Purificação da prolactina.....	37
4.4.1.1	Purificação da prolactina produzida com meio de cultivo Select CHO..	42
4.4.2	Purificação dos antagonistas	45
4.4.2.1	Purificação dos antagonistas S179D-hPRL e G129R-hPRL.....	45
4.5	Bioensaio	50
4.5.1	Bioensaio com a hPRL.....	50
4.5.2	Bioensaio com os antagonistas	51
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Células de mamíferos cultivadas em laboratório possuem exigências diferentes daquelas encontradas quando integradas a um organismo vivo. Estas exigências, fundamentais para a sobrevivência celular, também diferem de célula para célula, conforme a espécie animal que a originou, os tecidos de origem ou o grau de adaptação destas células ao crescimento em cultura. Basicamente há dois métodos para o cultivo destas células: o que utiliza células que necessitam de um suporte para crescimento, e o que utiliza células não aderentes, que crescem em suspensão.

Células dependentes de ancoragem são aquelas que precisam de um suporte para que ocorra o crescimento, isto é, para crescerem necessitam de uma superfície adequada para se aderir. A adesão das células é mediada por receptores de membrana específicos para moléculas na matriz extracelular. A adesão é precedida pela secreção dessa matriz de proteínas e glicanos extracelulares específicos por parte das células. A necessidade básica de um suporte para ancoragem orienta todas as escolhas de processos produtivos. O aumento da escala de produção está diretamente ligado à ampliação da área de cultivo celular e deve levar em consideração a relação entre a área disponível para cultivo e o volume do biorreator.

Os primeiros cultivos industriais de células foram realizados em garrafas *roller*, em seguida utilizaram-se microcarregadores. O cultivo de células em garrafas *roller* é o mais tradicional para células em monocamada, podendo ser facilmente usado para cultivos em larga escala, simplesmente aumentando-se a quantidade de garrafas. A principal característica deste sistema é a excessiva manipulação exigindo grande esforço de mão de obra e aumentando o risco de contaminação.

Objetivando o estabelecimento de culturas com altas densidades celulares em um único recipiente, Weiss e Schleider (1968) desenvolveram um sistema formado por uma pilha de placas de vidro sobrepostas, imersas no meio de

cultura. Este procedimento permite aumentar a área disponível para crescimento e ao mesmo tempo utilizar um volume de meio de cultura relativamente pequeno.

Em 1972, House e col. desenvolveram um sistema, no qual, células BHK (*Baby Hamster Kidney*) e de embrião de camundongo cresceram aderidas a um filme plástico de poliéster transparente, disposto em espiral dentro de um frasco de cultura. Este procedimento aumentou em dez vezes a superfície disponível para a cultura, em relação ao sistema tradicional, que utilizava garrafas *roller*, reduzindo na mesma proporção o espaço ocupado e rendendo oito vezes mais células.

Um grande passo para o cultivo de células em alta densidade e em grande escala, foi obtido por Van Wezel em 1982. Ele desenvolveu um sistema para células suporte-dependentes, no qual as células crescem aderidas a microesferas ou microcarregadores (MCs) que por sua vez se mantêm em suspensão mesmo com suave agitação, o que permite uma grande homogeneização do meio, com um controle ideal das condições fisiológicas da cultura, como pH, temperatura e oxigênio.

Embora estes microcarregadores se mostrassem adequados para uso em produção de antígenos virais sintetizados pelas células após infecção viral (Yokomizo *et al.*, 2004), seu uso tem sido mais intenso na síntese de produtos recombinantes como hormônios e outros fatores humanos de interesse farmacêutico. Há na literatura um trabalho que descreve sua utilização para produção da tireotrofina humana (hTSH) (Cole *et al.*, 1993) e outro relativo a um hormônio de estrutura análoga, o hormônio folículo estimulante humano (hFSH) (Loumaye *et al.*, 1998), enquanto não há nenhum trabalho relativo à prolactina e seus antagonistas.

As células CHO são os hospedeiros mais comumente utilizados para produção de biofármacos, especialmente para a obtenção de glicoproteínas (Ribela *et al.*, 2003; Schmidt, 2004), por exemplo, hPRL e hTSH, sendo que a glicosilação que elas proporcionam é relativamente similar àquela apresentada pelas células humanas. Essas células crescem normalmente aderidas em placas de cultura e/ou garrafas ou, quando utilizadas em biorreatores, aderidas a suportes como microcarregadores.

As principais vantagens da utilização de células CHO cultivadas em suspensão estão relacionadas ao fato de que essas células possuem a

propriedade de crescerem rapidamente em frascos *spinner* ou biorreatores, atingindo altas densidades celulares, o que é muito útil em processos que exigem a redução de custos e redução de manipulação. Podem ser mantidas em cultura por uma simples diluição ou aumento do volume da cultura e, por último, mas não menos importante, elas oferecem uma maior segurança biológica, pois apresentam menores riscos de contaminação devido a proteases, príons, vírus, etc., pelo fato de poderem ser cultivadas em meio livre de soro fetal bovino (SFB) (Link *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Le Floch *et al.*, 2006; Beyer *et al.*, 2009).

Podemos assim, concluir que as culturas em suspensão e sem soro, realizadas em biorreatores, são agora um processo padrão para a produção de proteínas recombinantes, pois para a maioria dos produtos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) a produção é realizada sob estas condições (Zanghi *et al.*, 2000).

A prolactina (PRL), hormônio protéico primariamente secretado pela glândula hipofisária anterior, é mais conhecida por estimular o desenvolvimento da glândula mamária e a lactação nos seres humanos (Riddle *et al.*, 1933), contudo, também apresenta uma variedade de ações, tais como crescimento celular, balanço hídrico e de eletrólitos e vários aspectos fisiológicos e comportamentais da reprodução (Freeman *et al.*, 2000; Goffin *et al.*, 2002; Goodman e Bercovich, 2008). De forma autócrina e parácrina exerce atividades mitogênicas, morfogênicas e secretoras (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). O gene que codifica a prolactina é único sendo encontrado em todos os vertebrados e nos humanos, está localizado no cromossomo 6 (Ormandy *et al.*, 1997). Possui também ação direta nos controles do ciclo e diferenciação celular e da apoptose (Walker, 2001; 2007). A hPRL madura consiste de uma simples cadeia protéica de 23 kDa, composta por 199 aminoácidos, incluídas 6 cisteínas responsáveis por três pontes dissulfeto intra-moleculares (4-11, 58-174, e 191-199) (Sinha, 1995).

Essa proteína, quando expressa em células de mamíferos como, por exemplo, células lactotróficas da hipófise ou até mesmo células CHO, apresenta um sítio de glicosilação único e parcialmente ocupado na Asn-31 com um alcance de ocupação de 10-30% de hPRL glicosilada (G-hPRL) em relação ao total de hPRL de qualquer origem, hipofisária ou recombinante (Price *et al.*, 1995; Heller *et al.*, 2010; Rodrigues Goulart *et al.*, 2010).

Estão surgindo dados da literatura indicando um potencial uso clínico da PRL, por exemplo, o após transplante de medula óssea, por estimular a hematopoiese e a recuperação imune, ou na reversão da mielossupressão induzida por azidotimidina ou por terapias mielo-ablativas (Woody *et al.*, 1999). Estudos em ratos mostram que o nível de PRL 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 PRL 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 *et al.*, 1996).

Estudos indicam também a potencial aplicação da hPRL como agente imunoterápico nos casos de infecção por HIV (Richards *et al.*, 1998) e outras possíveis aplicações clínicas ainda estão em fase de estudo (Soares *et al.*, 2000; 2002; 2006). Evidências como a secreção e ação local da hPRL (efeito autócrino / parócrino) relacionam esta proteína com o desenvolvimento de câncer de mama e de próstata (Ginsburg e Vonderhaar, 1995; Reynolds *et al.*, 1997; Llovera *et al.*, 2000).

Inicialmente considerou-se que esta proteína apresentava apenas a forma não glicosilada, com peso molecular de 23 kDa, mas em 1984, em estudos sobre a glândula hipofisária ovina, estabeleceu-se que a prolactina também pode ocorrer sob a forma glicosilada, com 25 kDa (Lewis *et al.*, 1984), representando 15% da prolactina na hipófise anterior (Lewis *et al.*, 1985) e 30% da prolactina das células decíduais (Yoon *et al.*, 2003).

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 1 mostra algumas destas modificações em formato esquemático.

Figura 1: Diagrama esquemático da molécula de PRL e algumas das suas variantes estruturais (Sinha, 1995).

A glicosilação é uma modificação pós-traducional que ocorre na maioria das proteínas secretadas por células de mamíferos. Pode acontecer ou no retículo endoplasmático, onde uma cadeia oligossacarídica é transferida para a proteína e se liga covalentemente a uma asparagina (Asn) localizada na sequência do tripeptídeo Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina (Pro). Recebe então o nome de “glicosilação *N-linked*” (Figura 2), como no caso da prolactina humana (Asn 31), ovina, bovina e outras (Sinha, 1995), ou no Complexo de Golgi, em que a cadeia oligossacarídica se liga à serina (Ser) ou treonina (Thr), denominada “glicosilação *O-linked*”, como nos casos da prolactina de rato e peru (Sinha, 1995). Podem ainda ocorrer os dois tipos de glicosilação na mesma glicoproteína. As bactérias e alguns sistemas eucariontes, como as leveduras, não são capazes de realizar modificações pós-traducionais complexas como a glicosilação.

Figura 2: Transferência de oligossacarídeos Asparagina "N-linked" (Shelikoff *et al.*, 1994).

Pesquisas tendo como base a relação da PRL no desenvolvimento do câncer de mama e de próstata estão voltadas para o desenvolvimento de antagonistas de PRL e sua potencial ação anti-cancerígena. Foram estudados, por dois grupos distintos, principalmente dois tipos de análogos-antagonistas. O primeiro é derivado dos conhecimentos relativos ao antagonista do hGH, onde a substituição do aminoácido Glicina (G) 120 por outro, de maior tamanho e com carga positiva, a Arginina (R), resulta em um impedimento estérico que não permite a ligação desse hormônio à segunda molécula do receptor (Fuh *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1995). A partir dessas considerações, sintetizou-se por analogia o antagonista G129R-hPRL (Goffin *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1999; Bernichtein *et al.*, 2003). Um segundo antagonista foi estudado e desenvolvido com base nos resultados relativos à isoforma de prolactina fosforilada, um antagonista natural presente numa proporção de 10-15% na hipófise humana (Walker, 1994). Este antagonista denominado S179D-hPRL prevê a substituição da Serina (S) 179, presente na quarta α -hélice da hPRL por Aspartato (D) (Chen *et al.*, 1998), sendo que o ácido aspártico aparentemente exerce o mesmo impedimento estérico apresentado pela Serina – fosforilada. Os dois análogos antagonistas de hPRL têm demonstrado efeitos anti-tumorais *in vitro* e *in vivo* (Chen *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2006; 2006b; Xu *et al.*, 2001) podendo, em futuro próximo, contribuir para o tratamento de câncer humano de próstata e mama.

Mesmo sendo a maioria das aplicações da hPRL ainda em fase de estudo, o seu uso *in vitro* em laboratório de diagnóstico clínico é considerável. Isto faz dela um hormônio relativamente procurado, cujo custo na forma altamente purificada, pode atingir o valor de US\$ 5.000/mg.

O presente trabalho se propõe, portanto facilitar e melhorar a produção industrial da hPRL (NG e G) e de seus antagonistas mediante adaptação à suspensão na ausência de soro, das linhagens de CHO produtoras destas proteínas.

O estudo destes protocolos facilitará também o cultivo em suspensão laboratorial e industrial, de outras proteínas de interesse industrial/farmacêutico.

2 OBJETIVOS

Adaptação das linhagens celulares CHO que expressam as proteínas heterólogas: prolactina humana (NG-hPRL e G-hPRL) e os análogos antagonistas de hPRL: S179D-hPRL e G129R-hPRL, para o crescimento em suspensão na ausência de soro. Essa adaptação inclui também a comprovação da qualidade das proteínas heterólogas produzidas. Para tanto será otimizada para cada linhagem uma produção em escala laboratorial tendo por meta a obtenção da proteína de interesse em quantidade e pureza que viabilizem a sua caracterização físico-química e biológica, possibilitando a comparação com padrões internacionais ou amostras de referência interna.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material utilizado no cultivo celular

3.1.1.1 Meios de cultura

- “Minimum Essential Medium” (α -MEM), Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)
- Meio sem soro, CHO-S-SFM II, com nucleosídeos (hipoxantina e timidina), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)
- Meio sem soro, BD Select™ CHO, Becton Dickinson and Company (Sparks, MD, EUA)

3.1.1.2 Linhagens celulares

- Células de linfoma de rato Nb2, gentilmente doadas pelo Dr. P. Gout (British Columbia Câncer Agency, Vancouver, Canadá). A proliferação dessas células depende dos hormônios lactogênicos, como a prolactina, que atuam como fator de crescimento. Sua resposta mitogênica na presença desses hormônios é mediada por receptores específicos de superfície, sendo utilizadas no bioensaio de prolactina
- Células Ba/F3-LLP (linfócitos pro-B murinos - *Low Low Prolactin*) transfectadas com um plasmídeo que codifica o receptor longo de hPRL, prolactina dependentes
- Células CHO DXB-11 mutantes, deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR⁻), transfectadas com o vetor pEDdc-hPRL
- Células CHO DXB-11 mutantes, deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR⁻), transfectadas com o vetor p658-S179D-hPRL
- Células CHO DXB-11 mutantes, deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR⁻), transfectadas com o vetor p658-G129R-hPRL

3.1.1.3 Material plástico

- Pipetas de 1, 2, 5, 10 e 25 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Placas de petri de 10 cm de diâmetro, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Sistema de Filtração de 500 mL, 0,22µm, Corning Costar Corp.(NY, EUA)
- Tubos criogênicos de 2 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Tubos para centrífuga de 15 e 50 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Tubos eppendorf de 0,5 e 1,5 mL (Hamburgo, Alemanha)

3.1.1.4 Reagentes utilizados na cultura celular

- Anfotericina B, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)
- Bicarbonato de sódio P.A., Synth (São Paulo, Brasil)
- Gentamicina, Shering-Plougt (Rio de Janeiro, Brasil)
- Glicose P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Metotrexato (MTX), Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- Penicilina – Estreptomicina, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)
- Soro fetal bovino dialisado, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)
- Soro fetal bovino, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)
- Tripsina, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)

3.1.2 Material utilizado no processo de purificação e análise da prolactina e seus antagonistas

3.1.2.1 Colunas cromatográficas

A) Coluna de vidro utilizada em cromatografia clássica

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

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

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

3.1.2.2 Resinas cromatográficas

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

3.1.2.3 Padrões, antissoros e outros reagentes para WB

- hPRL utilizada como padrão de referência interno (P35), produzida em nosso laboratório a partir de bactérias *E.coli* modificadas geneticamente e calibrada contra o padrão internacional
- Antissoro anti-prolactina humana, produzido em coelho, do NIDDK-NHI (Bethesda, MD, USA)
- Proteína A, Pharmacia (Uppsala, Suécia)
- hPRL rec WHO – CRS (Chemical Reference Solution) – OMS (Londres, Inglaterra)

3.1.3 Material radioativo

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

3.1.4 Reagentes para marcação de Proteína A para Western Blotting

- Cloramina T P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Iodeto de Potássio P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Metabissulfito de Sódio, Carlo Erba (São Paulo, Brasil)

3.1.5 Outros reagentes

- Ácido acético glacial P.A., Labsynth (São Paulo, Brasil)
- Ácido clorídrico P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Acrilamida, Merck (São Paulo, Brasil)
- Álcool metílico, Merck (São Paulo, Brasil)
- Bis-acrilamida, Merck (São Paulo, Brasil)
- Cloreto de sódio, Merck (São Paulo, Brasil)
- Coomassie Brilliant Blue G 250, GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Fosfato de sódio monobásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Fosfato de sódio dibásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Glicerol, Merck (São Paulo, Brasil)
- Glicina, Merck (São Paulo, Brasil)
- Padrões de massa molecular, GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Persulfato de amônio, Merck (São Paulo, Brasil)
- TEMED (N, N, N', N' tetrametilenodiamina), Sigma (St Louis, EUA)
- Tris, Sigma (St Louis, EUA)
- Leite desnatado em pó Molico, Nestlé (São Paulo), composição declarada: gordura (1%), proteínas (36%), lactose (52%), sais minerais (8%), água (3%)

3.1.6 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético com 5 posições Bell-enniun®, Bellco (Vineland, NJ, EUA)
- Agitador magnético modelo 258, Fanen (São Paulo, Brasil)
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil)
- Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), modelo SCL-1GA, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD, EUA)
- Autoclave horizontal, modelo speedclave II 12L, Odontobrás (São Paulo, Brasil)
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil)
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich. Suíça)
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich. Suíça)

- Balança analítica, modelo P1000N, Mettler (Zurich. Suíça)
- Banho-maria, modelo 146, Fanen (São Paulo, Brasil)
- Câmara de Neubauer, Boeco (Hamburg, Alemanha)
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super speed RC – 28, Sorvall (Newtown, Connecticut, EUA).
- Centrífuga refrigerada automática, modelo: 5810R, Eppendorf, Alemanha.
- Centrífuga, modelo LS-3 plus, Celm (São Paulo, Brasil)
- Coletor de frações, modelo Frac-200, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Contador gama tipo “poço”, com troca automática de amostra, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para ^{125}I de 80%, Packard Instrument Company (Illinois, EUA)
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil)
- Espectrofotômetro, modelo ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia)
- Estufa de cultura celular, modelo 3159, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA)
- Fluxo laminar classe II A/B, modelo 1140. Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA)
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Frascos com volume nominal de 250 mL, Bellco (Vineland, NJ, EUA)
- Freezer -20°C, modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil)
- Freezer -40°C, modelo AB240, Metalfrio (São Paulo, Brasil)
- Freezer -80°C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA)
- Leitor de microplacas modelo Original Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, EUA)
- Medidor digital de pH, modelo 420^a, Orion (Boston, MA, EUA)
- Micro-centrífuga, modelo 5415P, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha)
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha)

- Refrigerador para cromatografia com duas portas de vidro, modelo 2201 combicoldrac II, LKB, Bromma, Suécia
- Sistema de eletroforese vertical modelo 220, Bio-Rad (Ca, EUA)
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Locator Jr., Thermolyne. (Dubuque, IA, EUA)
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA)
- Sistema de transferência Semi-seco Hoefer TE 70, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)

3.1.7 Materiais diversos

- Cilindro de CO₂, tipo 2,8, White Martins (São Paulo, Brasil)
- Filmes de raios-X Kodak X-OMAT (Kodak, Sr Louis, MO, EUA) para radiografias do WB
- Membrana de filtração de 0,22µm, Millipore (Bedford, MA, EUA)
- Membrana de nitrocelulose (Hybond-C), 0,45 Micron, Bio-Rad (Hercules, CA, EUA)
- Dispositivo de Ultrafiltração Amicon Ultra-4. Membrana de Celulose regenerada 3000 Daltons, 4mL. Millipore Corporation (Billerica, MA, EUA)

3.2 Métodos

3.2.1 Cultura de células

Foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com o vetor pEDdc-hPRL (Soares *et al.*, 2000) para a secreção da prolactina e transfectadas com o vetor p658-S179D-hPRL e p658-G129R-hPRL para a secreção dos análogos antagonistas de hPRL (Soares *et al.*, 2006). Foram cultivadas a 37°C, com 5% de CO₂, em placa de cultura de 10 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio de cultura α-MEM (Minimum Essential Medium – Alfa Medium- GIBCO), gentamicina 40 µg/mL, soro fetal bovino dialisado 10%, glicose (4 g/L), 100 nM de metotrexato (MTX), cuja função principal é manter a pressão de seleção, mantendo dessa forma a produção de hPRL obtida pelo mecanismo da amplificação gênica. As células, após atingirem confluência, foram ressuspensas utilizando uma solução de tripsina 0,2% e redistribuídas em placas de cultura, em concentrações de 10x10⁵ céls/mL.

3.2.2 Adaptação para o crescimento em suspensão

A adaptação ao crescimento em suspensão das linhagens CHO-hPRL; CHO-S179D-hPRL e CHO-G129R-hPRL seguiu protocolo desenvolvido nesse projeto, a partir de modificações do protocolo descrito por Sinacore *et al.* (2000) e pode ser dividido em 3 etapas:

- 1º) Adaptação para o crescimento sem soro em placas;
- 2º) Adaptação para o crescimento em suspensão em placas;
- 3º) Adaptação para o crescimento em altas densidades celulares em *spinner*.

Inicialmente, as células CHO cultivadas aderidas em placas foram adaptadas ao crescimento em meio sem soro substituindo-se gradualmente o meio original α -MEM com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) por CHO-S-SFM II (Gibco) como pode ser observado na Figura 3.

Após a adaptação ao crescimento em meio sem soro, as células foram adaptadas ao crescimento em suspensão estático em placas de cultura, através sucessivas diluições, por aproximadamente um mês.

No *spinner* utilizamos 50 mL de meio com aproximadamente 200.000 céls/mL e agitação com *impeller* de 50 a 60 RPM, em atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C. A concentração celular foi mantida entre 2×10^5 e 1×10^6 céls/mL e quando o tempo de duplicação celular ficou próximo às 24h, como observado no cultivo tradicional, a adaptação ao crescimento em suspensão foi considerada concluída.

FIGURA 3: Esquema de adaptação das células CHO para crescimento em suspensão. O processo de adaptação pode ser dividido em três fases:

- A)** Adaptação ao meio sem soro: Nessa etapa as células CHO dependentes de ancoragem e cultivadas em meio α-MEM suplementado com 10% de SFB foram gradualmente adaptadas ao crescimento em meio livre de soro (CHO-S-SFM II).
- B)** Adaptação para o crescimento em suspensão em placas: nesta etapa foram realizadas várias subculturas e diluições, durante aproximadamente um mês.
- C)** Adaptação para o crescimento em frascos *spinner* de 250 mL, atingindo alta densidade celular: Nessa fase foram feitas subculturas e diluições durante o cultivo em 50 mL de meio CHO-S-SFM II até o tempo de duplicação celular ocorrer em aproximadamente 24h. Depois de estabilizado o tempo de duplicação celular as células CHO adaptadas para o crescimento em suspensão foram submetidas a um aumento gradual na concentração celular atingindo até 4x10⁶ céls/mL.

3.2.3 Produção laboratorial

3.2.3.1 Produção de hPRL

Com o objetivo de obter maiores quantidades de hPRL para posterior purificação, caracterização físico-química e biológica, foram realizadas produções em *spinners* com volume nominal de trabalho de 250 mL. A produção foi iniciada quando a concentração celular chegou a aproximadamente 1×10^6 céls/mL.

Foram utilizados 2 processos de produção:

- Crescimento em *spinner* com capacidade nominal de 250 mL com troca diária de 100% do meio de cultivo, por 30 dias consecutivos. O número de células após cada coleta foi ajustado para 1×10^6 céls/mL de meio (volume de trabalho: 50 mL, incubação a 37 °C, 5% de CO₂ a 60 RPM);
- Crescimento em *spinner*, nas mesmas condições de cultivo antes mencionado, porém com a troca diária de 50% do meio de cultivo (incluindo as células) de um volume total de trabalho de 100 mL.

As coletas diárias do meio condicionado, após centrifugação, foram armazenadas em frascos a -80 °C. Alíquotas de 1 mL das coletas diárias foram separadas para análise por SDS-PAGE e Western Blotting e RP-HPLC.

3.2.3.2 Produção dos antagonistas

Com o objetivo de obter maiores quantidades de S179D-hPRL e G129R-hPRL, assim como de hPRL, para posterior purificação e caracterização físico-química, foram realizadas produções em frascos *spinners* com volume nominal de trabalho de 250 mL. A produção foi iniciada quando a concentração celular atingiu aproximadamente 1×10^6 céls/mL. Na maior parte dos experimentos foi utilizado o processo de produção de troca diária de 100% do meio de cultivo, geralmente de 50 mL.

3.2.4 Purificação

3.2.4.1 Purificação da hPRL

A hPRL presente no meio condicionado foi purificada utilizando o método descrito por Soares *et al.*, (2000). O processo é composto basicamente por duas etapas. A primeira etapa consiste na concentração e simultânea purificação utilizando uma resina para separação por troca iônica tipo catiônica, SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, São Paulo, Brasil). Nessa primeira etapa o pH do meio condicionado foi ajustado para 5,0 utilizando ácido acético glacial. O material foi então aplicado em uma coluna com a resina SP-Sepharose Fast Flow equilibrada com acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). A absorbância em UV foi monitorada a 280 nm. Em seguida foi aplicado novamente o tampão de equilíbrio até a redução da absorbância aos valores iniciais.

Com o objetivo de eliminar impurezas foi realizada uma lavagem com esse mesmo tampão acrescido de NaCl até uma concentração de 90 mM. A eluição da prolactina foi realizada com tampão HEPES 25 mM, pH 8,0. O fluxo utilizado foi de 200 mL/h e as frações coletadas foram de 5 mL.

Diferentes frações contendo a proteína foram analisadas por SDS-PAGE, e as com maior concentração de proteína de interesse foram selecionadas para a segunda etapa de purificação, caracterizada por uma coluna de exclusão molecular contendo resina Sephacryl S-100 High Resolution. O tampão utilizado foi bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 8,0.

A isoforma glicosilada necessitou de uma re-purificação. Utilizamos então uma coluna de Exclusão Molecular de Alta Eficiência (HPSEC) como coluna preparativa.

3.2.4.2 Purificação dos antagonistas

Cada antagonista contido no meio condicionado da produção foi purificado utilizando o método descrito por Soares *et al.*, (2006). O processo é composto basicamente por duas etapas, onde primeiro utilizamos a resina cromatográfica SP-Sepharose Fast Flow seguido por coluna de Exclusão Molecular de Alta Eficiência (HPSEC).

Para a primeira etapa de purificação utilizamos o mesmo protocolo descrito para a hPRL, utilizando uma resina para separação por troca iônica tipo catiônica, a SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, São Paulo, Brasil).

Diferentes frações contendo a proteína foram analisadas por SDS-PAGE, e as frações com maior concentração da proteína de interesse foram selecionadas para aplicação na segunda etapa de purificação, uma coluna de Exclusão Molecular de Alta Eficiência (HPSEC) utilizada como coluna preparativa.

3.2.5 Caracterização físico-química da prolactina e seus antagonistas

A prolactina e seus antagonistas foram caracterizados mediante técnicas físico-químicas convencionais como SDS-PAGE, Western Blotting, HPLC de fase reversa (RP-HPLC) e de exclusão molecular (HPSEC).

3.2.5.1 Análise por SDS-PAGE

As amostras do meio de cultura condicionado obtidas durante a produção com células CHO adaptadas para o crescimento em suspensão e das frações obtidas durante as etapas de purificação da hPRL foram analisadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Bowen *et al.*, 1980; Sambrook *et al.*, 1989).

A eletroforese foi realizada utilizando-se gel de poliacrilamida 15% em condição não redutora. O equipamento utilizado foi o sistema de eletroforese vertical Hoefer mini VE (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), aplicando-se uma corrente com intensidade de 35 mA. A duração aproximada da corrida foi de 1 hora.

As amostras foram preparadas adicionando-se o tampão de amostra (4x) e em seguida fervidas por aproximadamente 5 minutos.

A fixação foi realizada imergindo o gel em solução fixadora contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água, sob leve agitação durante 1 hora. Após a fixação, a revelação foi realizada com *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

3.2.5.1.1 Revelação com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

A revelação foi realizada com o gel imerso em solução corante composta por 0,25% de azul de *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue G-250*), 45% de metanol e 8% de ácido acético por aproximadamente 30 minutos, a seguir descorando em solução de ácido acético 10%, fazendo-se “lavagens” a cada 1

hora (3-4 vezes). Após a descoloração o gel foi conservado em solução de ácido acético 1%.

3.2.5.2 Análise por Western Blotting

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

Após a transferência, a membrana foi tratada por 10 minutos com tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado e liofilizado (Nestlé, São Paulo, Brasil), sendo incubada por 18h a temperatura ambiente com 50 mL de antissoro diluído em PBS e 5% de leite em pó. Após a incubação com o antissoro, foram realizadas 5 lavagens com PBS e 5% de leite. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com 50 mL de uma solução PBS e 5% de leite contendo 400.000 cpm/mL de proteína A (Pharmacia, Uppsala, Suécia) marcada com ^{125}I (^{125}I -Prot. A). Ao final dessa incubação, a membrana foi lavada com PBS por pelo menos 6 vezes. Na sequência, foi deixada na estufa à 37 °C até secar, sendo posteriormente envolvida em um filme plástico transparente de PVC, estando assim pronta para a auto-radiografia. A exposição auto-radiográfica, utilizando telas intensificadoras, foi realizada a -80 °C. O tempo de exposição depende da intensidade da resposta desejada, da atividade específica da ^{125}I -Prot. A, da afinidade e título dos anticorpos e da quantidade do produto a ser analisado.

3.2.5.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC

A avaliação qualitativa e quantitativa da prolactina e dos antagonistas foi realizada por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC) e em fase reversa (RP-HPLC) (Riggin *et al.*, 1988; Dalmora *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 2002). Em ambas, a detecção foi feita mediante luz ultravioleta (UV), no comprimento de onda de 220 nm.

No caso da HPSEC, a técnica de eluição foi isocrática utilizando como fase móvel o tampão bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,0 ajustado com ácido fosfórico 2%, sendo o fluxo de trabalho de 1,0 mL/min.

Na RP-HPLC a coluna foi mantida a 42 °C e foram usados na fase móvel 71% de Tris 0,05 M, pH 7,5 e 29% de N-propanol, sendo o fluxo de trabalho de 0,5 mL/min.

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

3.2.6 Ensaios biológicos

Foram realizados estudos para avaliar a potência da prolactina e dos antagonistas em ensaios de proliferação celular com células Nb2 e Ba/F3-LLP, linhagens prolactino-dependentes com receptores de prolactina murino e humanos, respectivamente (Tanaka *et al.*, 1980; Glezer *et al.*, 2006). Foi utilizado como referência o padrão de hPRL-recombinante da WHO 97/714.

3.2.6.1 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 50 °C), 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 700 µg/mL de geneticina (G418) e 1 ng/mL de hPRL recombinante (rhPRL). Antes de começar o ensaio de proliferação, as células são mantidas em meio sem prolactina e com 1% de SFB inativado por 4 a 6 horas, depois distribuídas em placa de 96 poços (50x10⁴ céls/poço) com um volume final, incluindo a amostra, de 200 µL por poço. Depois de 72h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, o número de células viáveis foi avaliado por coloração com MTS (Chen *et al.*, 1998). Brevemente, 2 mg/mL de MTS [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolin (Promega Corp., Madison, WI, USA)] dissolvidos em tampão fosfato-salina (PBS) foram misturados

na proporção de 20:1 (vol/vol) com fenazina metossulfato (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.92 mg/mL em PBS. Vinte microlitros da mistura foram então adicionados a cada poço e após 2h de incubação a 37 °C a absorbância foi lida no comprimento de onda de 490 nm utilizando um leitor de microplacas (Original Multiskan EX Thermo Electron Corporation, EUA).

3.2.6.2 Bioensaio com células Nb2

As células Nb2 foram mantidas rotineiramente em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de soro de cavalo castrado, penicilina (50 U/mL), e 2-ME (Betamercaptoetanol) 5 mM em tampão fosfato-salina. Antes de começar o ensaio de proliferação, as células foram mantidas por 8 horas no meio de pré-ensaio, similar ao meio de crescimento, porém com redução do SFB de 10 para 1%, constituindo o pré-ensaio. Depois deste período, o meio foi centrifugado e as células foram ressuspensas no meio de ensaio, sem SFB e com adição de HEPES 0,015 M, sendo então distribuídas em placa de 96 poços (20×10^3 células/poço) com um volume final, incluindo a amostra, de 200 µL por poço. Depois de 72h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, o número de células viáveis foi avaliado por coloração com MTS (Chen *et al.*, 1998), da mesma forma descrita para as células Ba/F3-LLP.

4 RESULTADOS

4.1 Adaptação para o crescimento em suspensão

As linhagens CHO-hPRL e CHO-G129R-hPRL, apresentaram uma adaptação rápida e relativamente fácil, foi seguida a metodologia desenvolvida nesse trabalho e apresentada de forma esquemática na Figura. 3 (pág. 16). Para essas linhagens, as três etapas de adaptação foram completadas em menos de dois meses (~45 dias). Durante a segunda etapa do cultivo ainda em placas foi observada a presença de aglomerados de células que poderiam dificultar a absorção de nutrientes e comprometer o crescimento celular. Esses aglomerados foram praticamente eliminados quando se iniciou o cultivo em frascos *spinners*, com agitação e utilização de *impeller* (Figura 4).

A linhagem CHO-S179D-hPRL também apresentou uma fácil adaptação, porém, um pouco mais demorada. Neste caso, diferentemente das outras duas linhagens, ocorreu uma maior tendência para formar aglomerados de células, que se estendeu por um período mais prolongado, ocorrendo mesmo durante o cultivo em frascos *spinner*. Para desagregar esses aglomerados utilizamos um método enzimático separando as células com uma solução de tripsina 0,02%. Após aproximadamente três passagens esse efeito não foi mais observado.

FIGURA 4: Microscopia óptica de células CHO-hPRL cultivadas em suspensão (cultivo estático), com aumento de 100x **(A)**, e em *spinner* com agitação e utilização de *impeller*, com aumento de 200x **(B)**.

4.2 Produção laboratorial

4.2.1 Produção laboratorial da hPRL

Para a produção da hPRL foram utilizados dois processos:

- Crescimento em *spinner* com capacidade nominal de 250 mL com troca diária de 100% do meio de cultivo, por 30 dias consecutivos. O número de células após a coleta foi ajustado para 1×10^6 céls/mL (volume de trabalho: 50 mL, incubação a 37 °C, 5% de CO₂ e 60 RPM);
- Crescimento em *spinner*, nas mesmas condições de cultivo supra mencionadas, porém com a troca diária de 50% do meio de cultivo de um volume total de trabalho de 100 mL. As células retiradas junto com o meio de cultura normalmente eram descartadas após a centrifugação do meio condicionado, ou excepcionalmente, caso necessário, eram em parte reutilizadas com o objetivo de manter o número de células iniciais em aproximadamente 1×10^6 céls/mL.

As alíquotas coletadas das trocas diárias foram analisadas por RP-HPLC (Soares *et al.*, 2002) e WB. Os resultados são apresentados na Figura 5.

A produção de hPRL em ambos os experimentos se manteve constante durante os 30 dias com um valor final de 7,3 µg hPRL/mL, no caso da troca de 100% (Fig. 5B) e de 5,4 µg hPRL/mL, no estudo com troca de 50% do meio (Fig. 5A). Essa constatação também pode ser observada no WB, de forma mais imprecisa, onde são comparados os dois experimentos, com amostras coletadas em diferentes dias (Fig. 5C).

A nosso ver a condição com troca de 100% do meio de cultivo é mais interessante para produção em escala laboratorial, onde a centrifugação de volumes relativamente pequenos de meios de cultura é perfeitamente viável, e justificada pela maior produtividade volumétrica, renovação celular mais apropriada, e obtenção da proteína de interesse coletada no máximo após 24h de secreção para o meio. Porém, é importante ressaltar as vantagens decorrentes do experimento com troca de 50% do meio: praticidade na produção em maior escala, minimização da manipulação e dos riscos de contaminação, alta produtividade juntamente com uma boa qualidade da proteína e crescimento das

células, que aparentemente não apresentaram nenhum comprometimento importante.

FIGURA 5: (A e B) Exemplos de análise por RP-HPLC de 500 μ L de meio condicionado do experimento com troca de 50% e 100% de meio, respectivamente. As flechas indicam a posição da hPRL, de acordo com o padrão de referência. (C) Análise por Western Blotting (1) padrão de referência interno de hPRL P35; (2 a 5) coletas relativas à troca de 50% do meio, após 1, 10, 20 e 30 dias, respectivamente; (6 a 9) coletas relativas à troca de 100% do meio, após 1, 10, 20 e 25 dias, respectivamente.

É importante ressaltar que pela primeira vez foi quantificada diretamente por RP-HPLC a hPRL recombinante presente no meio de cultivo condicionado. Isso foi possível devido à alta concentração de hPRL no meio, a ausência de SFB e à baixa quantidade de proteínas contaminantes presentes no meio CHO-S-SFM II. Na Figura 6 temos um exemplo de análise por RP-HPLC de dois meios de cultura comerciais antes de serem utilizados para o cultivo das células. Para isso foi necessário aplicar um volume de 500 µL de meio. Uma dificuldade encontrada nessa metodologia foi o próprio perfil cromatográfico do meio de cultivo que apresentou na região próxima da eluição da hPRL alguns picos de eluição lenta que necessitam ser considerados para uma quantificação mais exata.

Figura 6: (A e B) Exemplo de análise por RP-HPLC dos meios de cultivo CHO-S-SFM II e Select CHO, respectivamente, antes de serem utilizados para o cultivo celular.

4.2.2 Produção laboratorial dos antagonistas G129R-hPRL e S179D-hPRL

Para a produção laboratorial dos antagonistas G129R-hPRL e S179D-hPRL foram utilizadas as linhagens secretoras CHO-G129R-hPRL e CHO-S179D-hPRL já adaptadas para o crescimento em suspensão na ausência de soro e em frascos *spinners*.

Para isso foi utilizada a metodologia de troca de 100% do meio de cultivo. Alíquotas diárias foram coletadas durante todo o processo de produção para análise qualitativa da produtividade como pode ser observado na Figura 7A e 7B.

FIGURA 7: (A) Análise por Western Blotting dos diferentes dias de produção do antagonista G129R-hPRL; (1) padrão de referência interno de hPRL P35 – 20ng; (2 a 7) 15µL de meio coletado após 1, 3, 5, 7, 9 e 11 dias de cultivo, respectivamente; **(B)** Análise por Western Blotting dos diferentes dias de produção do antagonista S179D-hPRL (1) padrão de referência interno de hPRL P35 – 20ng; (2 a 8) 15µL de meio coletado após 1, 3, 5, 8, 10, 13 e 15 dias de cultivo, respectivamente.

4.3 Crescimento em *spinner* com altas densidades celulares

As células CHO adaptadas para o crescimento em suspensão, na ausência de soro e em frascos *spinners* foram submetidas ao crescimento em diferentes densidades celulares. Para esse procedimento foi realizada a condição de troca diária de 100% do meio de cultivo.

Os resultados estão apresentados na Figura 8. A maior produtividade volumétrica (8,7 µg hPRL/mL meio/24h) ocorreu na concentração celular inicial de 2×10^6 céls/mL. Já no cultivo inicialmente com 1×10^6 céls/mL, após 24h a produtividade volumétrica foi de 5,0 µg hPRL/mL meio/24h e no cultivo com 3×10^6 céls/mL, após 24h a produtividade volumétrica caiu, passando a 6,6 µg hPRL/mL meio/24h.

É importante destacar nesses resultados a possibilidade de melhorarmos a produtividade volumétrica ainda em escala laboratorial abrindo perspectivas para novos estudos. Não está claro se essa condição com 2×10^6 céls/mL pode se perpetuar por longo prazo, ou ainda se ocorreu alteração na pureza inicial da proteína de interesse (fração de massa), já que o número de células iniciais é o dobro do estabelecido anteriormente. A queda na produção volumétrica com o aumento no número de células pode ser devida a diferentes causas, entre as quais: diminuição na capacidade nutricional do meio, como consequência do rápido consumo de nutrientes; alteração de pH, provocada pela presença maior de metabólitos celulares; ou deficiência na oxigenação devida ao aumento do número de células.

É importante destacar também a alta concentração celular de 4×10^6 céls/mL obtida após 24h de cultivo partindo-se de 3×10^6 céls/mL. Esse fato reflete a plena adaptação dessas células em suspensão. Além disso, confirma do ponto de vista prático a importância e o potencial de aplicação do cultivo de células em suspensão.

FIGURA 8: (A, B e C) Exemplos de análises por RP-HPLC de 500µL do meio de cultivo condicionado obtido com as concentrações celulares de 1×10^6 , 2×10^6 e 3×10^6 células/mL, respectivamente. Os valores calculados de hPRL foram de 5,0 µg/mL **(A)**, 8,7 µg/mL **(B)** e 6,6 µg/mL **(C)**. As flechas indicam a posição da hPRL, de acordo com o padrão de referência.

4.4 Comparação entre diferentes meios de cultivo

Foi realizado em frascos *spinners* um estudo comparativo de crescimento celular e produção entre três meios de cultivo diferentes. Utilizamos as células CHO-hPRL adaptadas para o crescimento em suspensão.

Meios de cultivo estudados:

- 1°) α -MEM;
- 2°) Select CHO;
- 3°) CHO-S-SFM II.

Para essa comparação foi utilizada a metodologia de troca de 100% do meio de cultivo. Alíquotas diárias foram estocadas para análises por RP-HPLC (Soares *et al.*, 2002), SDS-PAGE, WB e posterior purificação.

O meio de cultivo α -MEM, apresentou resultados insatisfatórios quanto à produtividade e viabilidade celular. O cultivo utilizando esse meio durou apenas quatro dias. Podemos acompanhar o decréscimo da produção com esse meio na Figura 9, onde podemos ver que o máximo de produtividade foi após dois dias de cultivo com 0,78 μ g hPRL/mL e que com quatro dias de cultivo a produção caiu para 0,14 μ g hPRL/mL.

FIGURA 9: (A e B) Exemplos de análise por RP-HPLC de 500 μ L de meio de cultivo α -MEM condicionado do segundo e quarto dia de produção respectivamente com $0,94 \times 10^6$ céls/mL e $0,43 \times 10^6$ céls/mL. A produtividade volumétrica caiu de 0,78 μ g hPRL/mL para 0,14 μ g hPRL/mL.

Foram realizadas comparações entre o crescimento celular e a produtividade com os meios de cultivo Select CHO e CHO-S-SFM II. Podemos verificar na Figura 10 que o meio de cultivo CHO-S-SFM II, apresentou melhor desempenho em relação ao crescimento celular quando comparado com o meio Select CHO.

Figura 10: Comparação entre o crescimento celular utilizando o meio de cultivo CHO-S-SFM II e Select CHO. Após cada 24 h de cultivo, 50mL (100%) do meio foi trocado e o número de células corrigido para 1x10⁶ céls/mL.

A produção diária foi analisada por SDS-PAGE e Western Blotting (Fig. 11 A e B). Verificamos pelo SDS-PAGE que o meio Select CHO apresenta menos proteínas com alta massa molecular que o CHO-S-SFM II, um fator a ser considerado quando se pensa em purificar as proteínas de interesse utilizando esse meio de cultivo. Já pelo WB verificamos que a produção utilizando o meio CHO-S-SFM II foi melhor, o que pode ser explicado pelo fato que o número de células sempre foi maior com esse meio. A produtividade específica, quando comparada com o meio Select CHO, também foi maior, como pode ser observado na Tabela 1.

FIGURA 11: (A) Análise em SDS-PAGE, em condições não redutoras, de coletas de diferentes dias da produção, comparando o meio de cultivo CHO-S-SFM II com o Select CHO. (1) marcador de massa molecular; (2) meio condicionado CHO-S-SFM II 2º dia; (3) meio condicionado Select CHO 2º dia; (4) meio condicionado CHO-S-SFM II 5º dia; (5) meio condicionado Select CHO 5º dia; (6) meio condicionado CHO-S-SFM II 10º dia; (7) meio condicionado Select CHO 10º dia; (8) meio condicionado Select CHO após 18 dias de cultivo; (9) meio condicionado Select CHO, após 19 dias de cultivo; (10) padrão de referência interno de hPRL P35. **(B)** Análise por Western Blotting das mesmas amostras utilizadas no SDS-PAGE. (1) padrão de referência interno de hPRL P35.

TABELA 1: Comparação entre os meios de cultivo CHO-S-SFM II e Select CHO

	CHO-S-SFM II		Select CHO	
	hPRL $\pm$ CV (%)	n	hPRL $\pm$ CV (%)	n
Produtividade volumétrica ($\mu\text{g/mL}$)	4,72 $\pm$ 20,55	3	2,53 $\pm$ 30,19	5
Produtividade específica ($\mu\text{g}/\times 10^6 \text{ céls/dia}$)	2,31 $\pm$ 4,54	3	1,62 $\pm$ 20,00	5
céls/mL após 24 h ($\times 10^6 \text{ céls/mL}$)	2,03 $\pm$ 12,84	10	1,54 $\pm$ 14,29	10

n= número de coletas diárias analisadas

Na Figura 12 temos exemplos de análises por RP-HPLC de meio de cultivo condicionado coletados durante os dias do experimento, onde mais uma vez o meio CHO-S-SFM II apresentou melhor resultado, com uma produtividade volumétrica e específica maior. Verificamos também que durante a análise por RP-HPLC do meio de cultivo condicionado Select CHO, a proteína de interesse, neste caso hPRL, apresentou um tempo de retenção aproximadamente 2 minutos maior que o do padrão, provavelmente devido à influencia dos componentes estranhos presentes nesse meio de cultivo. Pois, a análise por RP-HPLC da hPRL purificada a partir desse meio apresentou t_R idêntico ao do padrão.

FIGURA 12: (A e B) Exemplos de análises por RP-HPLC de 500 μ L de meio de cultivo CHO-S-SFM II e Select CHO, respectivamente. As amostras correspondem ao quarto dia de coleta. As respectivas produções volumétricas de hPRL foram de 4,7 μ g/mL e 2,3 μ g/mL, com produtividades específicas de 2,22 μ g/10⁶cél/dia e 1,37 μ g/10⁶cél/dia. As setas indicam o t_R correspondente à hPRL do padrão de referência (P35).

4.4.1 Purificação da prolactina

A purificação da prolactina foi realizada seguindo técnicas cromatográficas convencionais em uso no laboratório (Soares *et al.*, 2000) e ocorreu em duas etapas:

1ª: Foi utilizada uma coluna cromatográfica contendo resina de troca iônica, do tipo catiônica (SP-Sepharose Fast Flow), na qual o meio condicionado foi aplicado. O perfil cromatográfico e o SDS-PAGE referente à análise de amostras correspondentes ao pico de eluição da hPRL é apresentado na Figura 13;

2ª: A fração correspondente a hPRL coletada da coluna SP-Sepharose Fast Flow por sua vez foi aplicada em uma coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 High Resolution e também analisada por SDS-PAGE (Fig. 14).

A partir dessa segunda etapa de purificação obtivemos a hPRL com um alto grau de pureza e suas principais isoformas parcialmente isoladas (Prolactina Não Glicosilada e Glicosilada) (Fig. 15).

A isoforma Glicosilada (G-hPRL) necessitou de mais uma etapa de purificação, dessa vez através de uma coluna de Exclusão Molecular de Alta Eficiência (HPSEC) (Fig. 16).

FIGURA 13: (A) Perfil cromatográfico obtido do meio condicionado aplicado na coluna SP-Sepharose Fast Flow, o pico correspondente à eluição da hPRL, entre os tubos #27 e #34 foi confirmado por SDS-PAGE. **(B)**, (1) Marcador de massa molecular; (2) padrão interno de hPRL P35; (3) #25; (4) #26; (5) #27; (6) #28; (7) #29; (8) #30; (9) #32; (10) #34.

FIGURA 14: (A) Perfil cromatográfico obtido da fração coletada da coluna SP-Sepharose Fast Flow e aplicado na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 High Resolution. O pico principal, correspondente à eluição da hPRL, entre os tubos #60 e #70 foi confirmando por SDS-PAGE. **(B)**, (1) Marcador de massa molecular e padrão interno de hPRL P35; (2) #60; (3) #61; (4) #62; (5) #63; (6) #64; (7) #65; (8) #67; (9) #69; (10) #71.

FIGURA 15: Análise por HPSEC das frações obtidas após purificação mediante cromatografia em Sephacryl S-100 High Resolution. **(A)** padrão de referência de hPRL (CRS) da Organização Mundial da Saúde (OMS), mostrando as duas isoformas de hPRL (6,6µg). **(B)** Fração # 58 (500µL) composta principalmente pela isoforma G-hPRL. **(C)** Fração # 67 (100µL) composta pela isoforma NG-hPRL.

FIGURA 16: **(A)** Análise por HPSEC de 500 μ L da fração #58 composta principalmente pela isoforma G-hPRL (ver Fig. 14A). **(B)** G-hPRL presente na fração #58 coletada da coluna Sephacryl S-100 High Resolution e re-purificada por HPSEC (coletada a parte central do pico da Fig. 16A).

4.4.1.1 Purificação da prolactina produzida com meio de cultivo Select CHO

A hPRL presente no meio de cultivo Select CHO utilizado no experimento de comparação de meios também foi purificada.

A metodologia empregada neste caso difere da utilizada com o meio CHO-S-SFM II, pois utilizamos apenas uma etapa: a purificação por resina de troca catiônica. Como este meio apresenta menos proteínas na sua composição (ver Fig. 11A) o processo de purificação foi mais efetivo. As frações onde a hPRL foi eluída (Fig. 17A) foram analisadas por SDS-PAGE (Fig. 17B) e podemos perceber que estão praticamente puras (sem nenhuma proteína contaminante).

FIGURA 17: (A) Perfil cromatográfico obtido do meio condicionado aplicado na coluna com resina SP-Sepharose Fast Flow, o pico correspondente à eluição da hPRL foi confirmado por SDS-PAGE. **(B)**, (1) marcador de massa molecular; (2) padrão de referência interno de hPRL P35; (3) fração #41; (4) fração #42; (5) fração #43; (6) fração #44; (7) fração #45; (8) fração #46; (9) fração #47; (10) fração #21.

Durante a análise por HPSEC (Fig. 18) podemos confirmar a pureza do produto, enquanto o tempo de retenção da proteína foi o mesmo do padrão, o que confirma a identidade da mesma, pois na análise por RP-HPLC do meio condicionado foi observada uma diferença no tempo de retenção (Fig. 12B). O pico que se observa após a eluição da proteína é devido a sais presentes no tampão no qual a amostra foi eluída.

FIGURA 18: (A e B) Análise por HPSEC de 50 μ L das frações #43 e #44 obtidas a partir da purificação mediante resina cromatográfica SP-Sepharose Fast Flow. A concentração de hPRL calculada foi de 17 μ g/mL e 15,5 μ g/mL, respectivamente. As flechas indicam o tempo de retenção do padrão de hPRL.

4.4.2 Purificação dos antagonistas

4.4.2.1 Purificação dos antagonistas S179D-hPRL e G129R-hPRL

A purificação do antagonista S179D-hPRL foi realizada em duas etapas. Para a primeira etapa de purificação foi utilizada uma cromatografia clássica de troca catiônica, com a resina SP-Sepharose Fast Flow, como no caso da hPRL, e os picos correspondentes a proteína foram analisados por SDS-PAGE (Fig. 19).

FIGURA 19: (A) Perfil cromatográfico obtido da purificação do antagonista S179D-hPRL presente no meio de cultura condicionado de CHO-S179D-hPRL cultivada em suspensão, mediante coluna SP-Sepharose Fast Flow. O pico correspondente à eluição do antagonista foi confirmado por SDS-PAGE, **(B)** (1) marcador de massa molecular; (2) padrão interno de hPRL P35; (3) #41; (4) #42; (5) #43; (6) #44; (7) #45; (8) #46; (9) #50; (10) #52.

Na segunda etapa as frações que apresentaram maior concentração da proteína heteróloga foram purificadas em uma coluna de Exclusão Molecular de Alta Eficiência (HPSEC) (Fig. 20). Essa segunda etapa de purificação possibilitou a obtenção da proteína de interesse com alto grau de pureza.

FIGURA 20: (A) Análise por HPSEC do antagonista S179D-hPRL obtido a partir da purificação mediante coluna SP-Sepharose Fast Flow do meio condicionado de cultivo em suspensão da linhagem celular CHO-S179D-hPRL. **(B)** Análise por HPSEC do antagonista S179D-hPRL, obtido do pico com t_R 21.42 min. **(A)**, com concentração calculada de 6 $\mu\text{g/mL}$.

Para o antagonista G129R-hPRL foi utilizado o mesmo protocolo, porém o eluato foi analisado por RP-HPLC ao invés de SDS-PAGE (Fig. 21). As frações que apresentaram maior concentração da proteína heteróloga, como no caso do antagonista S179D-hPRL, foram submetidas a segunda etapa de purificação por HPSEC (Fig. 22).

FIGURA 21: (A) Perfil cromatográfico obtido na purificação do antagonista G129R-hPRL presente no meio de cultura de células CHO-G129R-hPRL cultivadas em suspensão, mediante coluna SP-Sepharose Fast Flow. (B e C) Análise por HPLC de fase reversa das diferentes frações do pico principal: #28 e #29. A hPRL utilizada como referência apresentou $t_R = 24,49$ min.

FIGURA 22: (A) Análise por HPSEC do antagonista G129R-hPRL obtido a partir da purificação mediante coluna SP-Sepharose Fast Flow (tubo #28) do meio condicionado de cultivo em suspensão da linhagem celular CHO-G129R-hPRL. **(B)** Análise por HPSEC do antagonista G129R-hPRL, obtido a partir da segunda etapa de purificação por HPSEC, (Fig. 22A) com concentração calculada de 14,4 $\mu\text{g/mL}$.

4.5 Bioensaio

4.5.1 Bioensaio com a hPRL

Utilizamos o bioensaio clássico com células Nb2 para avaliar a atividade biológica das isoformas de hPRL purificadas (Tanaka *et al.*, 1980; Glezer *et al.*, 2006). Foi utilizado o padrão de rec-hPRL (WHO 97/714) com potência declarada de $57,2 \pm 11,4$ UI/mg. A potência da NG-hPRL foi de $56,12 \pm 8,2$ UI/mg (n=4) e da G-hPRL foi de $8,46 \pm 1,2$ UI/mg (n=3) (Figura 23).

FIGURA 23: Exemplo de bioensaio proliferativo com células Nb2 comparando a atividade biológica das amostras purificadas de hPRL Glicosilada e Não Glicosilada obtidas a partir das células adaptadas em suspensão em comparação com o padrão de hPRL recombinante da Organização Mundial da Saúde (WHO) 97/714.

4.5.2 Bioensaio com os antagonistas

A potência biológica de cada antagonista foi determinada pelo bioensaio com células Ba/F3-LLP, conforme descrito em Soares *et al.* (2006) sendo que estas proteínas não deram atividade no ensaio com as células Nb2. As curvas correspondentes estão apresentadas nas Figuras 24 e 25.

A potência relativa foi avaliada para cada amostra com base na inclinação da curva e também com base nos “ED50”. Os resultados são apresentados na Tabela 2. Essa tabela também permite a comparação com dados da atividade biológica dos mesmos antagonistas obtidos a partir de células cultivadas aderidas, reportadas em Soares *et al.* (2006).

Os dados indicam que não houve perda da atividade biológica, observamos até uma atividade aparentemente maior com relação ao antagonista G129R-hPRL.

FIGURA 24: Exemplo de ensaio proliferativo com células Ba/F3-LLP comparando a atividade biológica do antagonista S179D-hPRL purificado a partir do meio condicionado das células em suspensão (-■-) e o padrão de hPRL recombinante da Organização Mundial da Saúde (WHO) 97/714 (-●-).

FIGURA 25: Exemplo de ensaio proliferativo com células Ba/F3-LLP comparando a atividade biológica do antagonista G129R-hPRL purificado a partir de meio condicionado das células em suspensão (-■-) e o padrão de hPRL recombinante da Organização Mundial da Saúde (WHO) 97/714 (-●-).

TABELA 2. Atividade proliferativa, avaliada pelo ensaio Ba/F3-LLP, dos dois análogos antagonistas S179D-hPRL e G129R-hPRL, relativa ao padrão de hPRL recombinante da (WHO) 97/714 em comparação com dados publicados anteriormente (Soares *et al.*, 2006).

	Potência relativa com base na inclinação		Potência relativa com base no "ED50"	
	Cultivo em suspensão	Literatura	Cultivo em suspensão	Literatura
hPRL (97/714)	--	--	--	--
S179D-hPRL	55 x 10 ⁻³	53 x 10 ⁻³	33 x 10 ⁻³	59 x 10 ⁻³
G129R-hPRL	240 x 10 ⁻⁵	70 x 10 ⁻⁵	380 x 10 ⁻⁵	130 x 10 ⁻⁵

5 DISCUSSÃO

Este trabalho descreve um novo processo de adaptação de linhagens CHO geneticamente modificadas, dependentes de ancoragem, para o crescimento em suspensão e em meio sem soro, na ausência de qualquer agente de desagregação. Utilizamos como modelo os clones de células CHO que expressam as proteínas heterólogas hPRL, S179D-hPRL e G129R-hPRL. Esse processo de adaptação consiste basicamente de três etapas e difere da maioria dos outros, porque ele executa as duas primeiras etapas em placas de cultura estática, enquanto a etapa final é realizada no *spinner*, sob agitação. A adequada oxigenação fornecida pela fina camada de meio (~0,5 cm) e ausência de agitação faz com que a adaptação em placas seja um processo menos estressante, além de ocupar menos espaço na incubadora.

A adaptação das células para o cultivo em meio livre de soro é geralmente realizada pela retirada gradual do soro (Chun *et al.*, 2001; Haldankar *et al.*, 1999), e muitas vezes é um processo demorado que pode durar de alguns dias até 5 a 6 meses (Link *et al.*, 2004; Sinacore *et al.*, 1996; 2000; Kim *et al.*, 2006). É muito comum iniciar o processo de adaptação a partir de culturas tratadas com solução de tripsina e passar essas células diretamente para os frascos *spinners* contendo meio de cultivo suplementado com soro (Sinacore *et al.*, 1996; 2000; Beyer *et al.*, 2009; Le Floch *et al.*, 2006) ou em meios de cultivo livres de proteínas (Haldankar *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 2009).

Segundo Link *et al.*, (2004) existe a possibilidade de transferência direta das placas sem a necessidade de uma fase de adaptação, mas, em geral, a maioria dos meios de cultivo comerciais sem soro e/ou livre de proteínas podem não fornecer as condições necessárias para o crescimento celular após uma mudança direta de uma cultura aderente contendo soro para a cultura em suspensão, sem soro.

Já Chun *et al.*, (2001) sugerem em seu trabalho que devem ser realizadas etapas de adaptação das células aderentes para o crescimento em suspensão, utilizando meio de cultivo sem soro ou/e livre de proteínas. Apesar de ser possível

adaptar células que originalmente necessitam de suporte para o crescimento em suspensão, nem todas as linhagens celulares são passíveis de adaptação para o crescimento em suspensão em meio sem soro e/ou livre de proteínas (Haldankar *et al.*, 1999; Chun *et al.*, 2001). O maior problema durante a adaptação à suspensão é a apoptose celular, que pode ser induzidas pela privação de soro (Koo *et al.*, 2009). Existem várias proteínas celulares que foram estudadas e mostraram serem capazes de inibir a apoptose e sua expressão pode retardar esse processo, por exemplo, Bcl-2, Bcl-xL, 30Kc6, (Koo *et al.*, 2009). A adição de nutrientes específicos ou surfactantes é frequentemente usada para melhorar a adaptação reduzindo a apoptose, como por exemplo: o ácido plurônico, suramina, insulina, transferrina e alguns aminoácidos (Sinacore *et al.*, 2000; Zanghi *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2001; Koo *et al.*, 2009). É bem sabido que hPRL tem ação anti-apoptótica (Fernandez *et al.*, 2010). Talvez um efeito direto da presença de hPRL no meio ou no citoplasma, explique em parte, a rápida adaptação ao meio sem soro e ao crescimento em suspensão, como observado em nosso caso. Mas esta hipótese precisa de confirmação experimental.

Pelo menos três autores também descreveram protocolos semelhantes ao descrito neste trabalho (Sinacore *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2001; Link *et al.*, 2004). Como mencionado, seguimos basicamente o protocolo descrito por Sinacore *et al.* (2000) que se baseia em três etapas: gerar uma linhagem independente de ancoragem em frascos *spinners* utilizando meio de cultivo suplementado com soro; adaptar ao meio sem soro em frascos *spinners*; adaptar às condições de alta densidade celular em biorreatores. O processo descrito, porém, leva vários meses. No nosso caso a retirada do soro durou praticamente uma passagem e foi realizada em quatro etapas, com redução gradativa de soro enquanto Chun *et al.*, (2001) em seu método de retirada do soro, demoraram 10 passagens em cultura estática e mais 7 passagens em cultura de suspensão, diminuindo em seguida, o SFB em 5 passos, de 2,5% para 0%. Esses autores levaram aproximadamente 50 dias para adaptarem suas linhagens celulares, mais ou menos como no nosso processo. Ressaltamos, contudo, que no nosso caso a fase de adaptação B (adaptação para crescimento em suspensão em placas de cultura, com crescimento estático) foi realizada com aproximadamente 8 passagens, e quando o tempo de duplicação celular atingiu cerca de 24h, assim como ocorre no crescimento com células aderidas, a adaptação ao crescimento em suspensão foi

considerada concluída. Essas passagens foram necessárias para conseguir biomassa suficiente para iniciar a adaptação ao crescimento em frascos *spinners* com agitação e a altas densidades celulares para fins de produção.

Enquanto Chun *et al.*, (2001), desenvolveram seu próprio meio de cultivo (GC-CHO-PI), Link *et al.*, (2004) utilizaram Pro CHO4-CDM, um meio de cultivo comercial da BioWhittaker Europa (Verviers, Bélgica) e deram ênfase especial à criação de um processo de perfusão contínua. No caso desses autores, as células CHO geneticamente modificadas foram diretamente transferidas do crescimento aderido com meio de cultura contendo soro, para o crescimento em suspensão, em meio de cultura livre de proteínas Pro-CHO4-CDM. A adaptação a suspensão foi realizada primeiro em garrafa de cultura celular desenvolvida para esse tipo de cultivo celular e em seguida, após a concentração celular atingir 2×10^6 células viáveis/mL, foi iniciada a cultura em frascos *spinner*. Link *et al.*, (2004) descreveram em seu trabalho que a etapa de adaptação ao crescimento em suspensão e meio sem soro pode ser evitada, mas não forneceram muitos detalhes sobre processo e o tempo utilizado também não é mencionado, mas ao que tudo indica trata-se uma das metodologias mais rápidas já descritas.

Duas estratégias foram utilizadas em nosso protocolo para a produção laboratorial em frascos *spinner*. Na primeira 100% do meio de cultivo foi trocado a cada 24h, e foram obtidos 7,3 µg de hPRL/mL, enquanto no segundo foi trocado apenas 50% do meio, obtendo 5,4 µg de hPRL/mL. Essa segunda estratégia, além de evitar a centrifugação diminui a manipulação, minimizando os riscos de contaminação, além de certamente ser mais prática, no caso de produção em larga escala utilizando biorreatores de grande porte.

O processo de adaptação pode provocar efeitos quantitativos e qualitativos no produto, especialmente em sua glicosilação (Sinacore *et al.*, 2000; Le Floch *et al.*, 2006). A desialilação da eritropoetina produzida por células CHO, por exemplo, mostrou ser devida à presença de soro no meio de cultivo, como descrito por Le Floch *et al.* (2006) em seu trabalho. Utilizamos o bioensaio *in vitro*, baseado em células de linfoma de rato, Nb2, para avaliar a atividade biológica da NG-hPRL produzida em suspensão nesse estudo, que foi de 56,1 UI/mg, ou seja, não foi encontrada diferença significativa quando comparada com aquela do padrão de referência da Organização Mundial da Saúde de hPRL (57,14 UI/mg), enquanto que a bioatividade da G-hPRL foi de 8,5 UI/mg. Este valor foi

significativamente diferente quando comparado com a potência da G-hPRL da OMS (16 UI/mg) e da G-hPRL produzida em nosso laboratório por células CHO dependentes de ancoragem, na presença de cicloheximida ($14,7 \pm 5,70$ UI/mg) (Heller *et al.*, 2010). A cicloheximida é um inibidor da síntese proteica que potencia a produção da isoforma glicosilada (Bergman *et al.*, 1981; Shelikoff *et al.*, 1994). A menor atividade biológica observada na isoforma produzida no presente trabalho pode estar relacionada à influência do meio de cultivo utilizado, à adaptação ao cultivo em suspensão ou a alterações ocorridas durante o processo de purificação.

Realizamos uma produção laboratorial também com as linhagens dos antagonistas CHO-S179D-hPRL e CHO-G129R-hPRL adaptadas para a suspensão, seguindo a mesma metodologia utilizada para a linhagem CHO-hPRL, porém apenas com a troca de 100% do meio de cultivo. Obtivemos assim as duas proteínas heterólogas, purificadas e caracterizadas. Os resultados obtidos nesse trabalho são comparáveis com resultados anteriores obtidos pelo grupo (Soares *et al.*, 2006). Um resultado particularmente interessante foi o fato que os dois antagonistas não apresentaram atividade biológica pelo ensaio clássico com células Nb2, nas repetidas tentativas. Mesmo existindo diferença com dados da literatura (Bernichtein *et al.*, 2001), não podemos esquecer que este resultado apresenta uma certa lógica, pois antagonistas não deveriam apresentar atividade agonista. Este resultado merece um estudo mais aprofundado, pois estes mesmos antagonistas apresentaram atividade biológica no ensaio com células Ba/F3-LLP. Uma possível explicação é a homologia desse ensaio, já que as células Ba/F3-LLP apresentam receptores humanos para hPRL, mais específicos, enquanto as células Nb2 apresentam receptores murinos.

Nesse trabalho foram obtidas altas densidades celulares, de até 4×10^6 céls/mL, após uma adaptação para o crescimento em suspensão relativamente rápida (~45 dias). Observamos que a concentração de 2×10^6 céls/mL foi a melhor condição para a produção, pois com 3×10^6 céls/mL ocorreu um decréscimo na produção, o que pode estar relacionado à falta de nutrientes no meio de cultivo, à alterações de pH devida a presença maior de metabolitos celulares ou à deficiência de oxigenação devido ao aumento do número de células.

Realizamos um estudo comparativo entre os meios de cultura α -MEM, Select-CHO e CHO-S-SFM II, onde o meio α -MEM, por ser um meio deficiente em

nutrientes, não foi capaz de “sustentar” o crescimento celular nos *spinners*, diferentemente de quando utilizado para produção em placas de cultura (Heller *et al.*, 2010; Rodrigues Goulart *et al.*, 2010).

O meio de cultivo Select CHO quando comparado ao meio “tradicional” CHO-S-SFM II, mostrou-se menos eficiente tanto no crescimento celular quanto na produtividade, além do fato de observarmos durante todo o cultivo a presença de “debris”. Contudo, esse meio de cultivo apresentou uma grande vantagem relacionada ao processo de purificação, pois o fato de ele possuir menos proteínas na sua composição facilita o processo de purificação, resultando possivelmente em melhores rendimentos finais. Esses dados abrem possibilidades para novos estudos mais criteriosos, comparando diferentes meios de cultura comerciais ou mesmo preparados *in house*.

O presente trabalho cria, portanto interessantes perspectivas futuras, a aplicação dessa técnica na adaptação ao crescimento em suspensão de outras linhagens produzidas no nosso laboratório como a CHO-hTSH produtora da tireotrofina humana, e no estudo da influencia de íons divalentes ou de drogas como o butirato de sódio, cicloheximida ou de fatores físico-químicos como temperatura, pH, etc., no cultivo de células em suspensão, tanto em *spinners* como em biorreatores. A metodologia apresentada também facilita uma possível produção de outras proteínas heterólogas para aplicação em pesquisa e como biofármacos de interesse para indústria farmacêutica.

6 CONCLUSÕES

- Foi desenvolvida uma nova metodologia de adaptação de células CHO aderidas para o crescimento em suspensão, caracterizada pela praticidade e rapidez.
- As linhagens CHO-hPRL, CHO-G129R-hPRL e CHO-S179D-hPRL foram adaptadas com sucesso para o crescimento em suspensão.
- Após a adaptação e cultivo em suspensão não foi observada diminuição na vitalidade e expressão celular ou alterações ou perda de atividade biológica nas proteínas heterólogas produzidas.
- O experimento baseado na troca de 50% do meio de cultura mostrou-se bastante prático e eficiente. Não ocorreram comprometimentos importantes no crescimento celular e na expressão da proteína em comparação com o experimento de troca de 100% do meio. Esse fato é significativo, pois esse processo caracterizado por uma simples e prática reposição de 50% do meio é mais fácil de ser aplicado para ampliação de escala, principalmente em biorreatores que operam com volume bem maior, minimizando os riscos de contaminação e mantendo uma produtividade diária constante e industrialmente interessante.
- O melhor meio de cultivo tanto para o crescimento quanto para a produção das proteínas heterólogas foi o CHO-S-SFM II. O α -MEM não funcionou em *spinners* e o Select CHO teve um desempenho inferior, mesmo mostrando-se interessante pelo fato de facilitar a purificação da hPRL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BEN-JONATHAN, N.; MERSHON, J. L.; ALLEN, D. L.; STEINMETZ, R. W. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*, v.17, n.6, p.639-69, 1996.
- 2 BERGMAN, L. W.; HARRIS, E.; KUEHL, W. M. Glycosylation causes an apparent block in translation of immunoglobulin heavy chain. *J Biol Chem*, v.256, n.2, p.701-6, 1981.
- 3 BERNICHTEIN, S.; JEAY, S.; VAUDRY, R.; KELLY, P. A.; GOFFIN, V. New homologous bioassays for human lactogens show that agonism or antagonism of various analogs is a function of assay sensitivity. *Endocrine*, v.20, n.1-2, p.177-90, 2003.
- 4 BERNICHTEIN, S.; KINET, S.; JEAY, S.; LLOVERA, M.; MADERN, D.; MARTIAL, J. A.; KELLY, P. A.; GOFFIN, V. S179D-human PRL, a pseudophosphorylated human PRL analog, is an agonist and not an antagonist. *Endocrinology*, v.142, n.9, p.3950-63, 2001.
- 5 BEYER, T.; LOHSE, S.; BERGER, S.; PEIPP, M.; VALERIUS, T.; DECHANT, M. Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies. *J Immunol Methods*, v.346, n.1-2, p.26-37, 2009.
- 6 BOWEN, B.; STEINBERG, J.; LAEMMLI, U. K.; WEINTRAUB, H. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. *Nucleic Acids Res*, v.8, n.1, p.1-20, 1980.
- 7 CHEN, N. Y.; HOLLE, L.; LI, W.; PEIRCE, S. K.; BECK, M. T.; CHEN, W. Y. In vivo studies of the anti-tumor effects of a human prolactin antagonist, hPRL-G129R. *Int J Oncol*, v.20, n.4, p.813-8, 2002.
- 8 CHEN, T. J.; KUO, C. B.; TSAI, K. F.; LIU, J. W.; CHEN, D. Y.; WALKER, A. M. Development of recombinant human prolactin receptor antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. *Endocrinology*, v.139, n.2, p.609-16, 1998.
- 9 CHEN, W. Y.; CHEN, N. Y.; YUN, J.; WIGHT, D. C.; WANG, X. Z.; WAGNER, T. E.; KOPCHICK, J. J. Amino acid residues in the third alpha-helix of growth hormone involved in growth promoting activity. *Mol Endocrinol*, v.9, n.3, p.292-302, 1995.
- 10 CHEN, W. Y.; RAMAMOORTHY, P.; CHEN, N.; STICCA, R.; WAGNER, T. E. A human prolactin antagonist, hPRL-G129R, inhibits breast cancer cell proliferation through induction of apoptosis. *Clin Cancer Res*, v.5, n.11, p.3583-93, 1999.

- 11 CHUN, B. H.; BANG, W. G.; PARK, Y. K.; WOO, S. K. Stable expression of recombinant human coagulation factor XIII in protein-free suspension culture of Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology*, v.37, n.3, p.179-87, 2001.
- 12 COLE, E. S.; LEE, K.; LAUZIERE, K.; KELTON, C.; CHAPPEL, S.; WEINTRAUB, B.; FERRARA, D.; PETERSON, P.; BERNASCONI, R.; EDMUNDS, T.; ET AL. Recombinant human thyroid stimulating hormone: development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma. *Biotechnol* v.11, n.9, p.1014-24, 1993.
- 13 DALMORA, S.; OLIVEIRA, J. E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M. T.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. *J Chromatogr A*, v.782, n.2, p.199-210, 1997.
- 14 FERNANDEZ, I.; TOURAINE, P.; GOFFIN, V. Prolactin and human tumourogenesis. *J Neuroendocrinol*, v.22, n.7, p.771-7, 2010.
- 15 FREEMAN, M. E.; KANYICKSKA, B.; LERANT, A.; NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, v.80, n.4, p.1523-631, 2000.
- 16 FUH, G.; CUNNINGHAM, B. C.; FUKUNAGA, R.; NAGATA, S.; GOEDEL, D. V.; WELLS, J. A. Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science*, v.256, n.5064, p.1677-80, 1992.
- 17 FUJIKAWA, T.; SOYA, H.; TAMASHIRO, K. L.; SAKAI, R. R.; MCEWEN, B. S.; NAKAI, N.; OGATA, M.; SUZUKI, I.; NAKASHIMA, K. Prolactin prevents acute stress-induced hypocalcemia and ulcerogenesis by acting in the brain of rat. *Endocrinology*, v.145, n.4, p.2006-13, 2004.
- 18 GINSBURG, E.; VONDERHAAR, B. K. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res*, v.55, n.12, p.2591-5, 1995.
- 19 GLEZER, A.; SOARES, C. R.; VIEIRA, J. G.; GIANNELLA-NETO, D.; RIBELA, M. T.; GOFFIN, V.; BRONSTEIN, M. D. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab*, v.91, n.3, p.1048-55, 2006.
- 20 GOFFIN, V.; BINART, N.; TOURAINE, P.; KELLY, P. A. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol*, v.64, p.47-67, 2002.
- 21 GOFFIN, V.; STRUMAN, I.; MAINFROID, V.; KINET, S.; MARTIAL, J. A. Evidence for a second receptor binding site on human prolactin. *J Biol Chem*, v.269, n.51, p.32598-606, 1994.
- 22 GOODMAN, G.; BERCOVICH, D. Prolactin does not cause breast cancer and may prevent it or be therapeutic in some conditions. *Med Hypotheses*, v.70, n.2, p.244-51, 2008.

- 23 HALDANKAR, R.; KOPCHICK, J. J.; RIDGWAY, D. Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. *Biotechnol Prog*, v.15, n.3, p.336-46, 1999.
- 24 HELLER, S. R.; RODRIGUES GOULART, H.; ARTHUSO, F. S.; OLIVEIRA, T. L.; BARTOLINI, P.; SOARES, C. R. Synthesis, purification and characterization of recombinant glycosylated human prolactin (G-hPRL) secreted by cycloheximide-treated CHO cells. *J Biotechnol*, v.145, n.4, p.334-40, 2010.
- 25 HOUSE, W.; SHEARER, M.; MAROUDAS, N. G. Method for bulk culture of animal cells on plastic film. *Exp Cell Res*, v.71, n.2, p.293-6, 1972.
- 26 KIM, D. Y.; LEE, J. C.; CHANG, H. N.; OH, D. J. Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, n.3, p.426-433, 2006.
- 27 KOO, T. Y.; PARK, J. H.; PARK, H. H.; PARK, T. H. Beneficial effect of 30Kc6 gene expression on production of recombinant interferon-beta in serum-free suspension culture of CHO cells. *Process Biochemistry*, v.44, n.2, p.146-153, 2009.
- 28 LE FLOCH, F.; TESSIER, B.; CHENUET, S.; GUILLAUME, J. M.; CANS, P.; GOERGEN, J. L.; MARC, A. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. *Cytotechnology*, v.52, n.1, p.39-53, 2006.
- 29 LEWIS, U. J.; SINGH, R. N.; LEWIS, L. J.; SEAVEY, B. K.; SINHA, Y. N. Glycosylated ovine prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.81, n.2, p.385-9, 1984.
- 30 LEWIS, U. J.; SINGH, R. N.; SINHA, Y. N.; VANDERLAAN, W. P. Glycosylated human prolactin. *Endocrinology*, v.116, n.1, p.359-63, 1985.
- 31 LINK, T.; BACKSTROM, M.; GRAHAM, R.; ESSERS, R.; ZORNER, K.; GATGENS, J.; BURCHELL, J.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; HANSSON, G. C.; NOLL, T. Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium. *J Biotechnol*, v.110, n.1, p.51-62, 2004.
- 32 LLOVERA, M.; PICHARD, C.; BERNICHTEIN, S.; JEAY, S.; TOURAINE, P.; KELLY, P. A.; GOFFIN, V. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*, v.19, n.41, p.4695-705, 2000.
- 33 LOUMAYE, E.; DREANO, M.; GALAZKA, A.; HOWLES, C.; HAM, L.; MUNAFO, A.; ESHKOL, A.; GIUDICE, E.; DE LUCA, E.; SIRNA, A.; ANTONETTI, F.; GIARTOSIO, C. E.; SCAGLIA, L.; KELTON, C.; CAMPBELL, R.; CHAPPEL, S.; DUTHU, B.; CYMBALISTA, S.; LEPAGE, P.; GRP, R. H. F. P. D. Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. *Human Reproduction Update*, v.4, n.6, p.862-881, 1998.

- 34 ORMANDY, C. J.; CAMUS, A.; BARRA, J.; DAMOTTE, D.; LUCAS, B.; BUTEAU, H.; EDERY, M.; BROUSSE, N.; BABINET, C.; BINART, N.; KELLY, P. A. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev*, v.11, n.2, p.167-78, 1997.
- 35 PRICE, A. E.; LOGVINENKO, K. B.; HIGGINS, E. A.; COLE, E. S.; RICHARDS, S. M. Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. *Endocrinology*, v.136, n.11, p.4827-33, 1995.
- 36 REYNOLDS, C.; MONTONE, K. T.; POWELL, C. M.; TOMASZEWSKI, J. E.; CLEVENGER, C. V. Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. *Endocrinology*, v.138, n.12, p.5555-60, 1997.
- 37 RIBELA, M. T.; GOUT, P. W.; BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v.790, n.1-2, p.285-316, 2003.
- 38 RICHARDS, S. M.; GARMAN, R. D.; KEYES, L.; KAVANAGH, B.; MCPHERSON, J. M. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunol*, v.184, n.2, p.85-91, 1998.
- 39 RIDDLE, O.; BATES, R. W.; DYKSHORN, S. W. The preparation, identification and assay of prolactin - A hormone of the anterior pituitary. *American Journal of Physiology*, v.105, n.1, p.191-216, 1933.
- 40 RIGGIN, R. M.; SHAAR, C. J.; DORULLA, G. K.; LEFEBER, D. S.; MINER, D. J. High-performance size-exclusion chromatographic determination of the potency of biosynthetic human growth hormone products. *J Chromatogr*, v.435, n.2, p.307-18, 1988.
- 41 RODRIGUES GOULART, H.; ARTHUSO FDOS, S.; CAPONE, M. V.; DE OLIVEIRA, T. L.; BARTOLINI, P.; SOARES, C. R. Enhancement of human prolactin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. *J Biomed Biotechnol*, v.2010, p.405872, 2010.
- 42 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, v.1, 2 ed, p.6.36-6.44, 1989.
- 43 SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.65, n.4, p.363-72, 2004.
- 44 SHELIKOFF, M.; SINSKEY, A. J.; STEPHANOPOULOS, G. The effect of protein synthesis inhibitors on the glycosylation site occupancy of recombinant human prolactin. *Cytotechnology*, v.15, n.1-3, p.195-208, 1994.

- 45 SINACORE, M. S.; CHARLEBOIS, T. S.; HARRISON, S.; BRENNAN, S.; RICHARDS, T.; HAMILTON, M.; SCOTT, S.; BRODEUR, S.; OAKES, P.; LEONARD, M.; SWITZER, M.; ANAGNOSTOPOULOS, A.; FOSTER, B.; HARRIS, A.; JANKOWSKI, M.; BOND, M.; MARTIN, S.; ADAMSON, S. R. CHO DUKX cell lineages preadapted to growth in serum-free suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng*, v.52, n.4, p.518-28, 1996.
- 46 SINACORE, M. S.; DRAPEAU, D.; ADAMSON, S. R. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Mol Biotechnol*, v.15, n.3, p.249-57, 2000.
- 47 SINHA, Y. N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, v.16, n.3, p.354-69, 1995.
- 48 SOARES, C. R.; CAMARGO, I. M.; MORGANTI, L.; GIMBO, E.; EZEQUIEL DE OLIVEIRA, J.; LEGOUX, R.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. *J Chromatogr A*, v.955, n.2, p.229-36, 2002.
- 49 SOARES, C. R.; GLEZER, A.; OKAZAKI, K.; UEDA, E. K.; HELLER, S. R.; WALKER, A. M.; GOFFIN, V.; BARTOLINI, P. Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Protein Expr Purif*, v.48, n.2, p.182-94, 2006.
- 50 SOARES, C. R.; MORGANTI, L.; MILOUX, B.; LUPKER, J. H.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem*, v.32, p.127-35, 2000.
- 51 TANAKA, T.; SHIU, R. P.; GOUT, P. W.; BEER, C. T.; NOBLE, R. L.; FRIESEN, H. G. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*, v.51, n.5, p.1058-63, 1980.
- 52 UEDA, E.; OZERDEM, U.; CHEN, Y. H.; YAO, M.; HUANG, K. T.; SUN, H.; MARTINS-GREEN, M.; BARTOLINI, P.; WALKER, A. M. A molecular mimic demonstrates that phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone. *Endocr Relat Cancer*, v.13, n.1, p.95-111, 2006.
- 53 UEDA, E. K.; LO, H. L.; BARTOLINI, P.; WALKER, A. M. S179D prolactin primarily uses the extrinsic pathway and mitogen-activated protein kinase signaling to induce apoptosis in human endothelial cells. *Endocrinology*, v.147, n.10, p.4627-37, 2006b.
- 54 VAN WEZEL, A. L. Cultivation of Anchorage-Dependent Cells and Their Applications. *J. Chem. Tech. Biotech*, v.32, n.1, p.318-323, 1982.
- 55 WALKER, A. M. Phosphorylated and nonphosphorylated Prolactin isoforms. *Trends Endocrinol Metab*, v.5, n.5, p.195-200, 1994.

- 56 WALKER, A. M. Unmodified and phosphorylated prolactin and gamma delta T cell development and function. *Lupus*, v.10, n.10, p.735-41, 2001.
- 57 WALKER, A. M. S179D prolactin: antagonistic agony! *Mol Cell Endocrinol*, v.276, n.1-2, p.1-9, 2007.
- 58 WEISS, R. E.; SCHLEICH, J.B. A Multisurface Tissue Propagator for Mass-Scale Growth of Cell Monolayers. *Biotechnol Bioeng*, v.10, n.5, p.601-&, 1968.
- 59 WOODY, M. A.; WELNIAK, L. A.; SUN, R.; TIAN, Z. G.; HENRY, M.; RICHARDS, S.; RAZIUDDIN, A.; LONGO, D. L.; MURPHY, W. J. Prolactin exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. *Exp Hematol*, v.27, n.5, p.811-6, 1999.
- 60 XU, X.; KREYE, E.; KUO, C. B.; WALKER, A. M. A molecular mimic of phosphorylated prolactin markedly reduced tumor incidence and size when DU145 human prostate cancer cells were grown in nude mice. *Cancer Res*, v.61, n.16, p.6098-104, 2001.
- 61 YOKOMIZO, A. Y.; ANTONIAZZI, M. M.; GALDINO, P. L.; AZAMBUJA, N., JR.; JORGE, S. A.; PEREIRA, C. A. Rabies virus production in high vero cell density cultures on macroporous microcarriers. *Biotechnol Bioeng*, v.85, n.5, p.506-15, 2004.
- 62 YOON, S. K.; SONG, J. Y.; LEE, G. M. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, v.82, n.3, p.289-98, 2003.
- 63 ZANGHI, J. A.; RENNER, W. A.; BAILEY, J. E.; FUSSENEGGER, M. The growth factor inhibitor suramin reduces apoptosis and cell aggregation in protein-free CHO cell batch cultures. *Biotechnol Prog*, v.16, n.3, p.319-25, 2000.
- 64 ZHANG, W. C.; SUN, R.; ZHANG, J.; TIAN, Z. Recombinant human prolactin protects against irradiation-induced myelosuppression. *Cell Mol Immunol*, v.2, n.5, p.379-85, 2005.