



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Síntese de prolactina humana em citoplasma de E.coli com renaturação por  
alta pressão hidrostática para radiomarcção com I-131**

**STEPHANIE ANGELO POMIN**

**Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares**

**São Paulo  
2023**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Síntese de prolactina humana em citoplasma de E.coli com renaturação por  
alta pressão hidrostática para radiomarcção com I-131**

**Versão Corrigida**

**STEPHANIE ANGELO POMIN**

**Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:  
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares**

**São Paulo  
2023**

Fonte de Financiamento: CNEN, FAPESP

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

ANGELO POMIN, S. . ***Síntese de prolactina humana em citoplasma de E.coli com renaturação por alta pressão hidrostática para radiomarcção com I-131***. 2023. 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: 08/02/2024)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Angelo Pomin, Stephanie

Síntese de prolactina humana em citoplasma de E.coli com renaturação por alta pressão hidrostática para radiomarcção com I-131 / Stephanie Angelo Pomin; orientador Carlos Roberto Jorge Soares. -- São Paulo, 2023.  
80 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2023.

1. Prolactina Humana. 2. Radiomarcção. 3. Corpos de inclusão. I. Jorge Soares, Carlos Roberto , orient. II. Título.

*“And I fell from the pedestal, right down the rabbit hole,  
long story short, it was a bad time.  
Pushed from the precipice, climbed right back up the cliff.  
Long story short, I survived.”*

– Taylor Swift

## **Agradecimentos**

A palavra, ao verbo e a vida, no princípio, já existia. A palavra estava com Deus, e era Deus. Ao que existia no princípio com Deus, e por meio dele, todas as coisas criou, sem ele nada foi criado. Obrigado Deus, por suas misericórdias, que são novas a cada manhã, e pelo seu amor, quão profundo, alto e largo é.

Aos meus pais Kelly Cristina Angelo Pomin e William Cruz Pomin, pelo apoio incondicional em tudo que eu preciso, pelo incentivo constante. Vocês sempre foram e serão a minha grande inspiração na vida, meus melhores amigos e o meu lar. Amo vocês!

Ao Israel Fellipe de Rezende Souza, que me escuta, enxuga lágrimas, incentiva e apoia como ninguém. Com cada cicatriz de corda de violão na minha mão, eu juro ser eternamente grata pela sua companhia e lealdade. Amo você.

Aos meus avós Maria das Dores, Gentil Romano, Maria do Socorro e João Carlos, pelo amor e incentivo.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, por todo suporte, incentivo constante, e pela oportunidade de trabalhar no Centro de Biotecnologia desde a minha graduação. Sua receptividade me trouxe até aqui, e sou eternamente grata.

À Dra. Miriam Fussae Suzuki, que me orientou na iniciação científica e me fez dar os primeiros passos na ciência. Obrigada Mimi, sua amizade, seus ensinamentos e sua gentileza mudaram minha vida pra sempre.

À Dra. Ligia Ely Morganti, por toda orientação e tempo dedicado para me introduzir no mundo dos corpos de inclusão, sem sua ajuda esse trabalho não seria possível. Obrigada!

Aos pesquisadores do Cebio que me auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho, Dr. João Ezequiel de Oliveira, Dra. Cibele Nunes Peroni, Dr. Paolo Bartolini, por todo suporte técnico.

À *startup* Biolinker e colaboradores, que me proporcionaram a oportunidade de estagiar e aprender um pouco mais sobre síntese de proteínas em sistemas livre de células. Aprendi muito em todo o tempo que estive lá, e sou eternamente grata por todos os diálogos, ensinamentos e acolhimento que recebi.

Às amigadas do Centro de Biotecnologia, gostaria de agradecer a Larissa Andrade Almeida, minha grande parceira e amiga, obrigada por todas as vivências e risadas, você foi muito importante nesse processo todo. Aos amigos do centro, Mayelle Paz, Giovanna Dias, Thaís Monteiro, Noemy Rosan, Leonardo Wilians, Amanda Palermo, Filipe Menezes, Valentina Dutton, Vanessa Luna, Ana Cristina Gomes, Matheus Di Lela, Alex Alves Rodrigues, Eliana Lima, Dr. Daniel Perez, Dra. Patrícia Lima Falcão, Dr. Patrick Spencer, Dra Regina Affonso. Obrigada por todos os momentos de descontração compartilhados, vocês estavam sempre lá pra me animar depois de um dia difícil.

Aos ex-alunos e amigos, Felipe Douglas Silva, Renan Passos Freire, Alissandra Gomes, Thaís Caramori, Thaís Sevilhano. Obrigada por todos os ensinamentos desde a iniciação científica, sem vocês tudo seria muito mais difícil.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia do IPEN: Ruth, Marlene, Junqueira, e a todos os colaboradores que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos do coração, Camila Ormundo, Larissa Zinek, Rebeca Silva, Adrielly Santana, Lucas Melo, Gabriel Pires e Gustavo Fernandes. Obrigada por todo apoio, torcida e consolo, todos os dias são como uma batalha, mas todas as noites com vocês são alegres, como um sonho.

À CNEN pela concessão da bolsa de mestrado, e a FAPESP pelo financiamento e suporte ao trabalho.

## RESUMO

Pomin, S. A. **Síntese de prolactina humana em citoplasma de *E. coli* com renaturação e solubilização por alta pressão hidrostática para radiomarcção com I-131**. 2023. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

A prolactina humana é uma proteína hormonal de 23 kDa produzida principalmente pela glândula pituitária, e desempenha várias funções biológicas, como por exemplo: regulação do sistema imunológico, hematopoiese e indução da lactação. No entanto, alterações em seu nível sérico estão diretamente associadas ao desenvolvimento de tumores de mama, próstata e ovário. O objetivo desse estudo foi a produção de hPRL recombinante, contendo 6 histidinas residuais e uma metionina na região N-terminal, que pudesse ser marcada com o radioisótopo I<sup>131</sup> para uso como uma ferramenta diagnóstica de cânceres relacionados a prolactina. Neste estudo, a hPRLhis foi produzida no citoplasma de bactérias *E. coli* e os corpos de inclusão gerados foram solubilizados sob alta pressão hidrostática. Foi utilizado o plasmídeo pET28a(+) com o cDNA da prolactina humana na cepa BL21(DE3). Os corpos de inclusão foram isolados e lavados. Diversas condições de solubilização foram testadas, incluindo diferentes níveis de pH e agentes redutores. A proteína foi caracterizada e sua atividade biológica foi avaliada usando células BaF/3-LLP. A radiomarcção com <sup>131</sup>I seguiu o método de marcação direta. A prolactina humana (hPRL) foi renaturada com sucesso em condições de alta pressão (2,4 kBar) e pH 10 com incubação por 16 horas em GSSH e GSH. Cerca de 3 mg de prolactina foram obtidos a partir deste processo em um volume total de 5 mL de meio dialisado. A radiomarcção da proteína atingiu um rendimento de até 75% com 100 µCi de Iodo e 10 µg de CLT. Este estudo estabeleceu as condições para produzir hPRLhis no citoplasma bacteriano usando renaturação de alta pressão. A hPRLhis demonstrou alto nível de expressão, pureza e atividade biológica, confirmada em ensaios com células. Além disso, foi radiomarcada para futuras pesquisas com receptores em células tumorais.

**Palavras chave:** Prolactina humana, corpos de inclusão, radiomarcção

## ABSTRACT

Pomin, S. A. **Synthesis of human prolactin in the cytoplasm of *E. coli* with renaturation and solubilization through high hydrostatic pressure for radiolabeling with I-131.** 2023. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Human prolactin is a 23 kDa hormonal protein primarily produced by the pituitary gland, playing various biological roles such as immune system regulation, hematopoiesis, and induction of lactation. However, alterations in its serum levels are directly associated with the development of breast, prostate, and ovarian tumors. The aim of this study was the production of recombinant hPRL, containing 6 residual histidines and one methionine in the N-terminal region, which could be labeled with the radioisotope I131 for use as a diagnostic tool for prolactin-related cancers. In this study, hPRLhis was produced in the cytoplasm of *E. coli* bacteria, and the generated inclusion bodies were solubilized under high hydrostatic pressure. The pET28a(+) plasmid with human prolactin cDNA in the BL21(DE3) strain was used. The inclusion bodies were isolated and washed. Various solubilization conditions were tested, including different pH levels and reducing agents. The protein was characterized, and its biological activity was evaluated using BaF/3-LLP cells. The <sup>131</sup>I radiolabeling followed the direct labeling method. Human prolactin (hPRL) was successfully renatured under high-pressure conditions (2.4 kBar) and pH 10 with 16 hours of incubation in GSSH and GSH. Approximately 3 mg of prolactin were obtained from this process in a total volume of 5 mL of dialysate medium. Protein radiolabeling achieved a yield of up to 75% with 100 µCi of iodine and 10 µg of CLT. This study established the conditions for producing hPRLhis in bacterial cytoplasm using high-pressure renaturation. The hPRLhis demonstrated a high level of expression, purity, and biological activity, confirmed in cell assays. Additionally, it was radiolabeled for future research with receptors on tumor cells

**Keywords:** Human prolactin, inclusion bodies, radiolabeling.



## Lista de Tabelas

Tabela 1. Condições utilizadas para avaliar a solubilização dos corpos de inclusão em alta pressão.....	33
Tabela 2. Extrações de DNA plasmidial pET28a(+) hPRL.....	39
Tabela 3. Condições para radiomarcagem do padrão de hPRL.....	60
Tabela 4. Condições para a radiomarcagem da hPRLhis. ....	62

## Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura primária da prolactina humana .....	15
Figura 2. Gene da hPRL e estrutura secundária .....	16
Figura 3. Estrutura do PRLR e etapas da ligação da PRL com o receptor .....	18
Figura 4. Esquema das etapas de tratamento dos CI .....	22
Figura 5. Estrutura química do iodo, das moléculas de histidina e tirosina .....	24
Figura 6. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos do cDNA da prolactina humana inserida no vetor pET28a(+)	27
Figura 7. Vetor pET28a(+) sem o inserto .....	28
Figura 8. Colônias de <i>E. coli</i> transformadas com o plasmídeo pET28a(+) hPRL .....	38
Figura 9. Gel de agarose 1% da digestão do plasmídeo .....	40
Figura 10. Reação cell free da GFP e da hPRLhis. ....	41
Figura 11. Cromatograma da IMAC referente a produção de hPRLhis por CFPS .....	41
Figura 12. Análise por SDS-PAGE das amostras produzidas por CFPS .	42
Figura 13. Análise por <i>Western Blotting</i> das amostras eluídas por IMAC..	43
Figura 14. Análise por SDS-PAGE (15%) dos CI de prolactina.....	44
Figura 15. Análise da fluorescência intrínseca do triptofano dos CI de hPRL .....	45
Figura 16. Análise por SDS-PAGE das diferentes condições de solubilização em alta pressão .....	46
Figura 17. Análise por SDS-PAGE das condições de renaturação (pH 10 e 11) pós diálise .....	47

Figura 18. Análise por HPSEC da amostra renaturada em alta pressão (pH 10 sem aditivos) .....	48
Figura 19. Curva de atividade biológica com células BaF/3-LLP .....	49
Figura 20. Curva de atividade biológica com células BaF/3-LLP .....	50
Figura 21. Análise por SDS-PAGE do efeito da presença de GSSG + GSH na renaturação da hPRL. ....	51
Figura 22. Análise por WB do efeito da presença de GSSG + GSH na renaturação da hPRL .....	52
Figura 23. Gráfico da análise por IMAGEJ da quantidade de hPRLhis estimada (ng) em cada uma das bandas do WB.....	53
Figura 24. Cromatogramas da análise por HPSEC.....	54
Figura 25. Análise por WB das frações coletadas da HPSEC .....	55
Figura 26. Ensaio de atividade biológica da hPRLhis tratada com 3 mM GSH + 1 mM GSSG .....	56
Figura 27. Análise por HPSEC com o protocolo da renaturação estabelecido (5 mL).....	57
Figura 28. Análise por SDS-PAGE com o protocolo de renaturação estabelecido .....	58
Figura 29. Espectro de massas da análise por MALDI-TOF da hPRL padrão .....	59
Figura 30. Espectro de massas da análise por MALDI-TOF da hPRLhis...59	
Figura 31. Cromatogramas da cromatografia com fitas de iTLC do padrão de hPRL .....	61
Figura 32. Cromatogramas da cromatografia com fitas de iTLC da hPRLhis .....	63

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 O câncer de mama e de próstata no Brasil .....	14
1.2 Prolactina humana .....	15
1.3 Sinalização intracelular da prolactina humana .....	17
1.4 Renaturação por alta pressão hidrostática .....	19
1.5 Radiomarcção com <sup>131</sup> I .....	22
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>25</b>
2.1 Objetivos específicos .....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 Construção do vetor .....	26
3.2 Clonagem e transformação .....	28
3.3 Confirmação da sequência de DNA e quantificação .....	29
3.4 Produção da hPRLhis em sistema livre de células.....	29
3.5 Purificação por cromatografia por afinidade a metais .....	30
3.6 Expressão da hPRLhis em corpos de inclusão .....	31
3.7 Lavagem e Isolamento dos CI.....	31
3.8 Análise da fluorescência intrínseca do triptofano .....	31
3.9 Solubilização e pressurização dos CI.....	32
3.10 Análise por SDS-PAGE .....	33
3.11 Análise por <i>Western Blotting</i> .....	34
3.12 Cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular	34
3.13 Ensaio de atividade biológica .....	35
3.14 Análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF).....	36
3.15 Radiomarcção da hPRL e da hPRLhis.....	36
3.16 Controle de qualidade do radiomarcado .....	37
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>

4.1 Confirmação do plasmídeo.....	38
4.2 Produção de hPRL em sistema livre de células .....	40
4.3 Análise da produção dos CI .....	43
4.4 Análise da fluorescência intrínseca do triptofano .....	44
4.5 Renaturação por pressão hidrostática.....	45
4.6 Purificação por Cromatografia líquida de alto desempenho – exclusão molecular.....	47
4.7 Ensaio de Atividade Biológica .....	48
4.8 Avaliação do efeito da presença de glutatona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) na renaturação .....	50
4.9 Análise da renaturação com o protocolo já estabelecido .....	56
4.10 Análise da hPRLhis por espectrometria de massas (MALDI-TOF) ..	58
4.11 Radiodação da hRPL e da hPRLhis .....	60
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
5.1 Produção da hPRLhis em CFPS .....	64
5.2 Solubilização e renaturação dos CI de hPRLhis .....	65
5.3 Purificação por HPSEC .....	67
5.4 Atividade biológica <i>in vitro</i> .....	68
5.5 Análise por espectrometria de massas – MALDI-TOF .....	68
5.6 Análise da radiomarcção com <sup>131</sup> I .....	69
<b>6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 O câncer de mama e de próstata no Brasil**

No grupo de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), quatro principais áreas de estudos se destacam: doenças circulatórias, respiratórias crônicas, diabetes e câncer. Essas doenças são responsáveis pelo maior número de mortes no país (INCA., 2023). O câncer por sua vez, se destaca tanto no cenário nacional como no mundial devido às altas taxas de incidência e mortalidade (SUNG et al., 2021). Ele representa um desafio significativo para o sistema de saúde pública do Brasil, que busca encontrar não apenas soluções, mas também estratégias de prevenção para a população nacional.

É importante considerar a multifatorialidade que abrange o câncer como o envelhecimento demográfico, as dificuldades de diagnóstico da doença na atenção básica à saúde, fatores genéticos, nutricionais e climáticos, todos eles podem ser relacionados ao crescimento desordenado de células em tecidos saudáveis. Tendo em vista as informações acima, fez-se necessário destacar que segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) a estimativa de cânceres mais incidentes no Brasil para os anos de 2023 até 2025, são o câncer de mama com 74 mil novos casos, seguido do câncer de próstata, com 72 mil novos casos (desconsiderando o câncer de pele não melanoma) (INCA, 2023).

O câncer de mama pode ser definido como um tumor maligno causado pelo crescimento desordenado de células do tecido mamário saudável, alguns dos seus sintomas são alterações na textura da pele mamária e secreções expelidas pelo mamilo, além da presença palpável do nódulo endurecido (SBP). O diagnóstico depende de um conjunto de fatores clínicos e laboratoriais, e a literatura científica indica o aumento da presença de receptores para o hormônio prolactina em alguns desses tumores, acompanhados da presença de altos níveis séricos do hormônio em pacientes oncológicos (GUTZMAN et al., 2007).

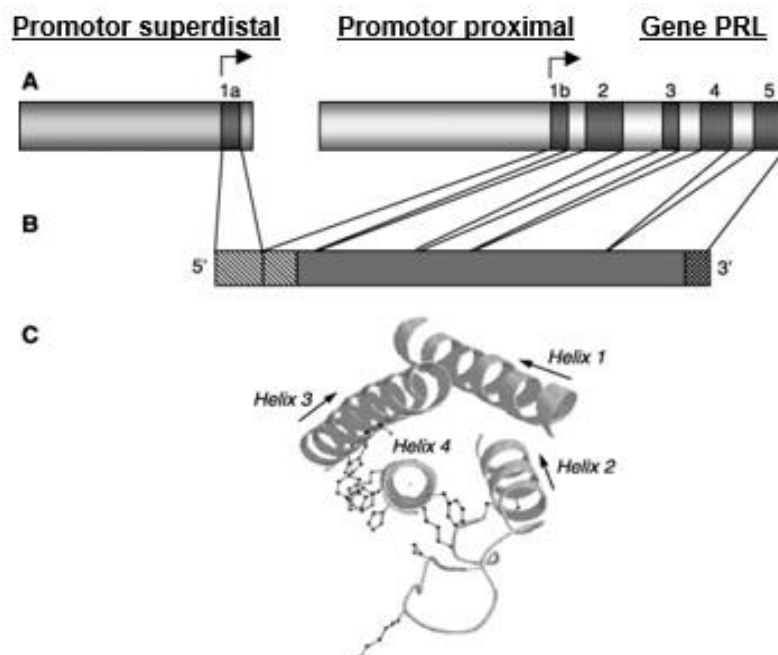


Fonte: (BONDY; ROSEMBERG., 1980)

A prolactina é produzida majoritariamente pela parte anterior da glândula hipófise, sob regulação do hipotálamo, todavia pode ser sintetizada ainda de forma extrapituitária por tecidos como mama e próstata (GUELHO et al., 2016). Esse hormônio apresenta mais de 300 funções biológicas, entre elas se destacam: modulação do sistema imune, auxílio na formação de vasos e trombos, amadurecimento de ovócitos, regulação da glicose através da atuação no crescimento de células  $\beta$  pancreáticas e por fim, sua principal função, a indução de células da glândula mamária para a lactação durante a gravidez e no período do puerpério (UEDA et al., 2006)

O gene que codifica a proteína está localizado no cromossomo 6, contém quatro íntrons e cinco éxons conforme apresentado na figura 2 (TRUONG et al., 1984), e sua sequência genética se assemelha em torno de 23% com a sequência do hormônio de crescimento, o qual também pertence a família das citocinas (TEILUM et al., 2005).

**Figura 2.** Em A está representado o gene da hPRL no cromossomo 6 com os cinco éxons. Em B, a região promotora, e em C, a estrutura secundária da proteína com as quatro alfa hélices.





Fonte: Adaptado de (MARTINO et al., 2004).

A prolactina pode apresentar algumas formas variadas, resultado da produção local em tecidos supracitados, e da diferença entre alguns processos pós-traducionais como glicosilações, fosforilações, e dimerizações, variando não apenas em seu peso molecular, mas em sua função também (FREEMAN et al., 2000).

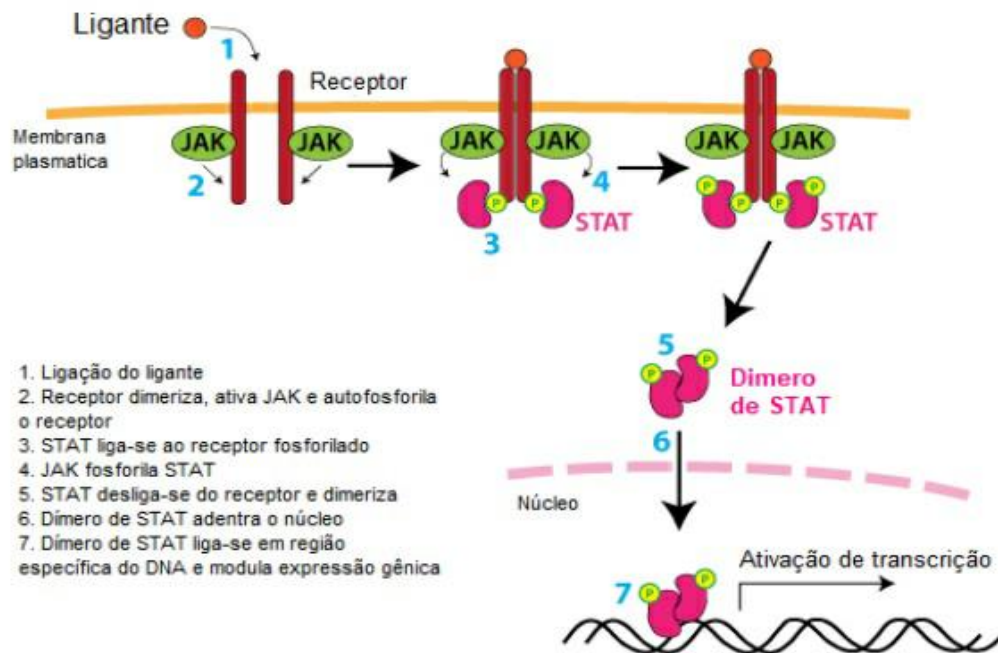
### **1.3 Sinalização intracelular da prolactina humana**

O receptor celular da prolactina (PRLR) pertence à família de super receptores de citocinas, e apresenta três domínios, o extracelular, o transmembrana e o intracelular. O domínio extracelular é formado pela dimerização de dois receptores o 1 e o 2, onde a hPRL se liga primeiro no sítio 1, formado por duas pontes dissulfeto e logo depois se liga no segundo receptor para então iniciar a transdução do sinal. O domínio transmembrana atravessa a membrana celular, e o domínio intracelular, pode variar quanto ao seu tamanho (curto, intermediário ou longo), gerando diferentes isoformas de PRLR (CONSTANTINO et al., 2017).

Após se ligar aos domínios do PRLR, a prolactina ativa uma proteína chamada de Janus tirosina quinase-2, a qual está associada com o domínio intracelular do PRLR, essa ativação resulta no recrutamento de proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (família STAT), chamadas de STAT5. Ao chegarem ao complexo do receptor ativado, as STAT5 também são ativadas através de sua fosforilação, para então dimerizarem e se translocarem até o núcleo celular afim de modularem a transcrição de genes responsáveis pelo crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (FREEMAN et al., 2000) conforme apontado na figura 3.

Outros membros da família STAT também podem ser ativados pela ligação da prolactina ao receptor, como STAT1 e STAT3 em algumas células de origem linfóide e mamária. (AHONEN et al., 2002).

**Figura 3.** Representação da ligação da prolactina com o PRLR, para ativar genes responsáveis pela transcrição gênica.



Fonte: (RODRIGUES, 2018)

O nível sérico normal da hPRL está entre 5-20 ng/mL, podendo chegar até 200 ng/mL durante a gravidez. Aumentos superiores a 100 ng/mL em seu nível sérico podem estar associados ao desenvolvimento de tumores de mama e de próstata, (TWOROGER et al., 2004; LÓPEZ-OZUNA et al., 2016). A secreção extrapituitária de prolactina e sua atuação de forma autócrina e/ou parácrina tem demonstrado correlação ao aumento da agressividade do câncer de próstata e mama, quando há excesso de fosforilação das proteínas STAT5 no complexo de ligação ao receptor (LI et al., 2006; HATHAWAY et al., 2023).

Na busca de um modelo para estudar melhor a prolactina e sua potencial ação proliferativa em células tumorais, o trabalho atual propõe a produção de hPRL com adição de um resíduo de 6 histidinas possibilitando um leque de utilizações para a proteína, não só facilitando a sua purificação, mas visando sua utilização em testes imunohistoquímicos, fluorescentes que envolvam a utilização de um anticorpo anti-histidina (HELLMAN et al., 2011). Para inserir a *tag* de histidina foi projetado um vetor voltado para a

expressão no citoplasma de bactérias *Escherichia coli*.

Inicialmente, nesse estudo se propôs a produção da hPRL com histidina em um sistema de síntese proteica livre de células (*Cell-Free Protein Synthesis – CFPS*). O CFPS é uma ferramenta biotecnológica de transcrição e tradução *in vitro*, essa técnica se baseia na utilização de um lisado celular (o qual contém a maquinaria molecular necessária para a transcrição e tradução), complementado com aditivos como: DNA plasmidial, nucleotídeos, aminoácidos e tampões para manter o pH da reação de síntese (DOPP; JO; REUEL, 2019).

Algumas das vantagens principais do CFPS é a viabilidade para a produção de proteínas citotóxicas, além de ser uma síntese direcionada unicamente para a proteína de interesse, sem haver convergência entre as melhores condições para a expressão da proteína alvo, e as condições para a sobrevivência da célula hospedeira (CHIBA et al., 2021). Além disso, a síntese de proteínas de membrana como por exemplo CRF e ETB, já está relatada na literatura, com rendimento de até 3 mg/mL (KLAMMT et al., 2004). Outro fator a ser mencionado são as vantagens legislativas de não envolver organismos geneticamente modificados.

#### **1.4 Renaturação por alta pressão hidrostática**

A utilização da alta pressão hidrostática é uma metodologia que supera o grande desafio da produção de proteínas em corpos de inclusão (CI), os quais são agregados insolúveis que impedem que a proteína adote sua conformação correta (ativa) (FAHNERT; LILIE; NEUBAUER, 2004) . A técnica apresenta algumas importantes vantagens com relação a outras técnicas de renaturação, como: alto nível de pureza e diminuição das etapas de purificação.

Além disso, pode ser uma técnica mais branda, preservando melhor a estrutura nativa da proteína quando comparada a agentes químicos comumente usados em outros processos de renaturação, os quais podem alterar irreversivelmente o enovelamento da biomolécula. Quando os corpos de inclusão são formados, a proteína pode permanecer com sua

estrutura secundária e terciária intactas em determinadas partes do agregado. A renaturação por alta pressão pode ajudar a solubilização proteica preservando as estruturas intactas.

A desnaturação de proteínas por agentes como uréia (8 M) ou hidrocloreto de guanidina (Gnd HCl) solubiliza os CI através da perturbação da estrutura da molécula de água (solvente) atuando principalmente nas ligações de hidrogênio. Além disso, essa perturbação também permite que o agente desnaturante se ligue às partes mais hidrofílicas da proteína, quebrando as pontes de hidrogênio e as interações eletrostáticas que ajudam a manter a estrutura proteica, promovendo sua desnaturação (VALLEJO, 2013).

As proteínas contidas nos corpos de inclusão, quando em solução e submetidas a alta pressão, mudam seu rearranjo estrutural com o solvente, permitindo a entrada de água nas regiões mais hidrofóbicas da molécula. Isso garante que os CI sejam solubilizados, ao mesmo tempo que preserva as estruturas da proteína contidas nos CI. Ensaios de alta pressão já confirmaram que pressões na escala de 2.000 a 2.500 bares desfavorecem interações intermoleculares hidrofóbicas da proteína, ajudando também no dobramento correto de estruturas monoméricas (MALAVASI et al., 2011).

Outro ponto a ser mencionado é que pressões na ordem de 2.000 a 3.000 bares não estão relacionadas à perda de estruturas secundárias e terciárias da proteína dissociada, além disso, também não quebram pontes dissulfeto de macromoléculas, logo, é interessante adicionar agentes que podem atuar como redutores, como DTT, na solução pressurizada, para facilitar a quebra das pontes dissulfeto intermoleculares e a posterior formação de pontes dissulfeto nativas (CHURA-CHAMBI et al., 2008). A literatura também aborda o uso do aminoácido Arginina nos protocolos de renaturação por alta pressão como um agente redutor de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, ao interagir com cadeias laterais de outros aminoácidos.

A renaturação por alta pressão pode apresentar algumas

ferramentas comumente utilizadas para otimização do processo de solubilização do CI. A primeira ferramenta a ser destacada é o pH, usualmente, nesses processos, pHs alcalinos são priorizados, visto que na maioria dos casos, estão mais distantes do ponto isoelétrico da proteína a ser trabalhada, aumentando assim a repulsão eletrostática da solução, evitando a formação de agregados indesejados.

Outra ferramenta utilizada em processos de renaturação é o tratamento da amostra com agentes óxido-redutores. A incubação da proteína renaturada com Glutathione oxidada (GSSG) e Glutathione reduzida (GSH) já demonstrou ter ação redutora, podendo reduzir a formação de pontes dissulfeto intramoleculares, interagindo com íons presentes na cadeia lateral de aminoácidos, e gerando um micro-ambiente mais redutor (CHURA-CHAMBI et al., 2008).

O processo de obtenção de proteínas em sua forma nativa a partir de corpos de inclusão pode ser dividido em etapas, sendo a primeira delas o isolamento desses CI, através da lise das células por centrifugação, seguida da lavagem desses CI para retirada de proteínas de membrana ou contaminantes do produto de interesse, a terceira e quarta etapa são a solubilização dos agregados e renaturação das proteínas, como apresentado no esquema da figura 4.

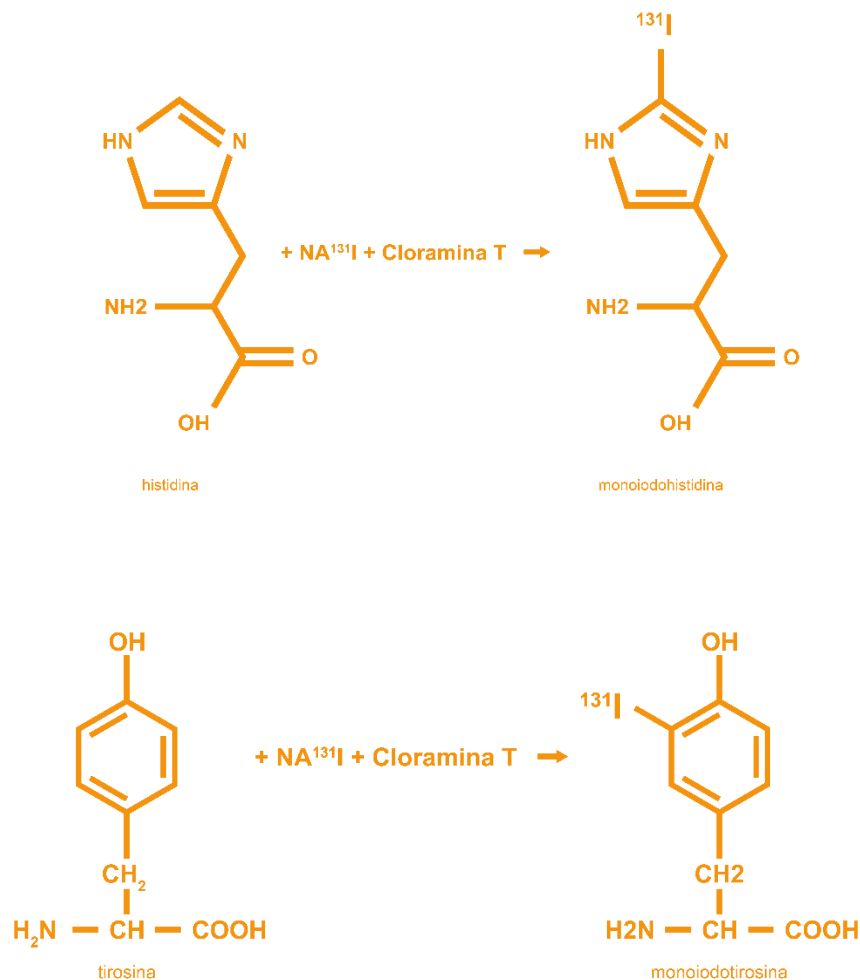


Existem diferentes protocolos de radiodação de proteínas e peptídeos, os principais se dividem em método direto e indireto. O método direto se baseia em substituição eletrofílica oxidativa com os grupos funcionais ativos da proteína, a reação geralmente ocorre com o anel fenólico do aminoácido tirosina, ou no anel imidazólico do resíduo de histidina. Pontuam-se três maneiras de usar o método direto: através do uso de agentes oxidantes, como a Cloramina T (CLT) ou o Iodogen, por substituição eletrofílica com o uso de células especiais eletrolíticas, e por fim, por oxidação enzimática utilizando a enzima lactoperoxidase (LAVINAS, 2004)

O método indireto de radiodação envolve a utilização de moléculas chamadas grupos prostéticos, os quais possuem um núcleo ativado que recebe o iodo radioativo, ao mesmo tempo que possuem um conector que permite a ligação covalente à proteína ou peptídeo.

Embora o método direto seja mais fácil, algumas de suas desvantagens são a rápida desiodação *in vivo* e a formação de agregados ou alterações nas pontes internas da proteína, causadas pela reação de oxidação com cloramina T (NORMAN; TURTER, 1968). Considerando isto, é importante assumir que o agente oxidativo mantenha a integridade proteica, e seja de fácil separação após o processo de marcação, a figura 5 esquematiza a ligação química entre uma espécie positiva de iodo e o aminoácido histidina (acima) e tirosina (abaixo).

**Figura 5.** Imagem representando a ligação da estrutura química do iodo com a molécula de histidina (acima) e tirosina (abaixo).



Fonte: Própria autora.

A radiomarcção da prolactina com Iodo-131 é a etapa final deste trabalho, e consiste principalmente no estabelecimento de um protocolo padrão de radiomarcção para a prolactina humana. Visando promover a estabilidade e manter a atividade biológica da proteína, a radiomarcção poderá abrir um leque de opções para o uso da hPRL em estudos voltados para o rastreamento de tumores que expressem em excesso o seu receptor. Ademais, o uso da prolactina humana como radiotraçador de células tumorais pode ser um promissor recurso diagnóstico para neoplasias malignas.



## **2. OBJETIVO**

O desenvolvimento de um radiotraçador para o diagnóstico por imagem, baseado na marcação da prolactina humana produzida em citoplasma de *E. coli* e renaturada por alta pressão hidrostática.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Escolher um vetor apropriado para a produção de hPRL com cauda de histidina;
- Produzir prolactina humana em citoplasma com altos rendimentos, e caracterizá-la através de métodos físico-químicos;
- Estabelecer um protocolo de desnaturação e renaturação eficaz;
- Avaliar a atividade biológica da hPRLhis *in vitro*;
- Radiomarcá-la com iodo-131, e estabelecer um protocolo de radiomarcagem para a proteína;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Construção do vetor

O vetor escolhido para a síntese foi o pET28a(+) composto por 5369 pares de base, acrescido da região codificadora para o cDNA da prolactina humana (600 pares de base – GenBank: X54393.1), otimizado para *E. coli*, ficando assim com um tamanho previsto para 5969 pb. A figura 6 apresenta a sequência otimizada de nucleotídeos e aminoácidos do cDNA da hPRL.

O vetor pET28a(+) conta com uma região codificadora para resistência a canamicina, uma cauda de histidina (6 histidinas) na região do N-terminal, além de uma tag de trombina composta por seis aminoácidos: Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser (para a clivagem da cauda de histidina se necessário).

Após o projeto do vetor, o mesmo foi sintetizado como serviço pela empresa *Twist Bioscience*. O vetor possui o promotor T7, o qual garante níveis de expressão mais elevados, quando comparado a de outros vetores (STUDIER et al., 1990). Apresenta ainda a região de controle *operon lac* como demonstrado na figura 7. O cDNA da prolactina humana foi inserido entre a região das enzimas XhoI e NdeI no mapa de restrição do vetor. Como não foi utilizado o peptídeo sinalizador, a expressão será direcionada para o citoplasma, e portanto, a prolactina apresentará uma metionina a mais em sua porção N-terminal.

O padrão de prolactina humana que utilizamos em todas as análises, é o padrão interno produzido pelo Centro de Biotecnologia no periplasma de *E. coli*. Esse padrão não contém metionina inicial, e nem *tag* de histidina. A produção do padrão de prolactina no periplasma é realizada pelo grupo de hormônios hipofisários do CEBIO há alguns anos, e os trabalhos publicados pelo grupo, mostram um rendimento de 30 mg/L de hormônio autêntico (SOARES et al., 2008).

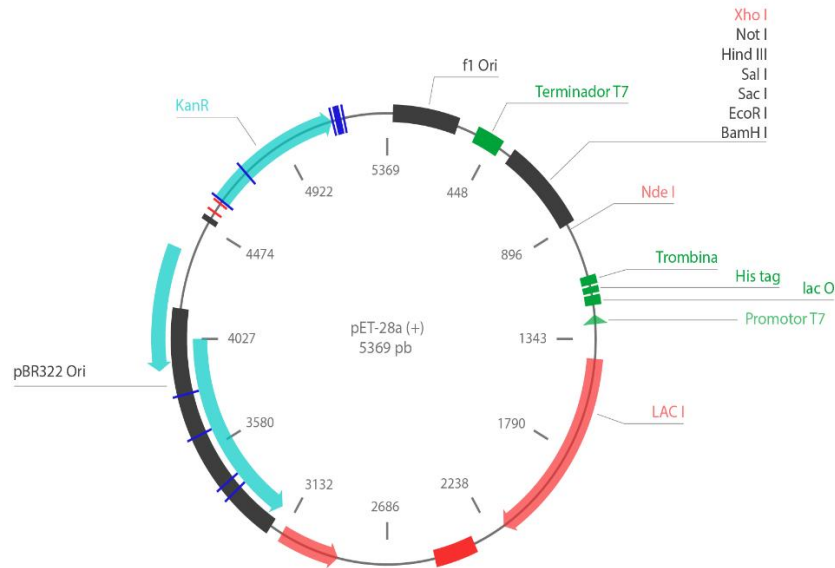
**Figura 6.** Sequência de nucleotídeos e aminoácidos do cDNA da prolactina humana inserida no vetor pET28a(+). A sequência foi obtida do site *NCBI – GenBank (X54393.1)*  
*H. Sapiens mRNA for prolactin.*

>hPRL Genscript otimizado

1	CTA	CCC	ATA	TGT	CCA	GGT	GGA	GCA	GCT	AGG	TGC	CAG	GTG	ACC	CTG	45
1	L	P	I	C	P	G	G	A	A	R	C	Q	V	T	L	15
46	CGT	GAT	CTG	TTT	GAC	AGA	GCG	GTG	GTG	CTG	AGC	CAC	TAC	ATT	CAT	90
16	R	D	L	F	D	R	A	V	V	L	S	H	Y	I	H	30
91	AAC	CTG	TCC	TCA	GAA	ATG	TTC	TCC	GAA	TTC	GAC	AAG	CGC	TAC	ACC	135
31	N	L	S	S	E	M	F	S	E	F	D	K	R	Y	T	45
136	CAT	GGT	CGT	GGC	TTT	ATC	ACT	AAG	GCT	ATC	AAC	TCT	TGT	CAT	ACC	180
46	H	G	R	G	F	I	T	K	A	I	N	S	C	H	T	60
181	AGC	AGC	TTA	GCC	ACC	CCG	GAG	GAT	AAG	GAG	CAG	GCA	CAG	CAG	ATG	225
61	S	S	L	A	T	P	E	D	K	E	Q	A	Q	Q	M	75
226	AAC	CAA	AAA	GAT	TTC	TTG	TCG	CTT	ATC	GTG	TCG	ATT	CTG	CGT	AGC	270
76	N	Q	K	D	F	L	S	L	I	V	S	I	L	R	S	90
271	TGG	AAT	GAA	CCG	CTG	TAT	CAC	CTG	GTT	ACG	GAA	GTT	CGT	GGT	ATG	315
91	W	N	E	P	L	Y	H	L	V	T	E	V	R	G	M	105
316	CAA	GAA	GCA	CCG	GAG	GCC	ATT	CTC	TCC	AAA	GCG	GTC	GAA	ATC	GAG	360
106	Q	E	A	P	E	A	I	L	S	K	A	V	E	I	E	120
361	GAA	CAG	ACC	AAG	CGC	TTG	CTG	GAA	GGT	ATG	GAG	CTG	ATT	GTC	AGC	405
121	E	Q	T	K	R	L	L	E	G	M	E	L	I	V	S	135
406	CAA	GTT	CAT	CCG	GAG	ACG	AAA	GAG	AAC	GAG	ATC	TAC	CCG	GTT	TGG	450
136	Q	V	H	P	E	T	K	E	N	E	I	Y	P	V	W	150
451	AGC	GGC	CTG	CCA	AGC	TTG	CAA	ATG	GCG	GAT	GAA	GAG	AGC	CGT	TTG	495
151	S	G	L	P	S	L	Q	M	A	D	E	E	S	R	L	165
496	TCT	GCG	TAT	TAC	AAT	CTG	CTG	CAC	TGC	CTC	CGC	CGT	GAC	AGC	CAC	540
166	S	A	Y	Y	N	L	L	H	C	L	R	R	D	S	H	180
541	AAA	ATC	GAC	AAT	TAT	CTG	AAA	CTG	CTT	AAG	TGC	CGT	ATT	ATC	CAC	585
181	K	I	D	N	Y	L	K	L	L	K	C	R	I	I	H	195
586	AAC	AAC	AAT	TGT	TAA											600
196	N	N	N	C	*											200

Fonte: Própria da autora.

**Figura 7.** Imagem do vetor pET28a(+) sem o inserto. A imagem apresenta o mapa de restrição, as tags do vetor, a região de controle do *operon lac*.



Fonte: Adaptado de (ADDCGENE, 2023)

### 3.2. Clonagem e transformação

O plasmídeo liofilizado (894 ng) com 5895 pares de base, foi ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água MiliQ autoclavada. Um tubo contendo 200  $\mu\text{L}$  de *E. coli* da cepa DH5 $\alpha$  competentes foram descongeladas, e seguiram o protocolo de transformação por choque térmico. Para a transformação, foi adicionado 100 ng do plasmídeo pET28a(+) hPRL em 200  $\mu\text{L}$  de bactérias descongeladas. Este foi incubado em gelo por 20 minutos, e logo em seguida, as bactérias com o DNA plasmidial foram transferidas para o banho-maria a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, para então serem transferidas para o gelo novamente.

Após o choque térmico, foi adicionado ao tubo 800  $\mu\text{L}$  de meio de

cultura Luria Bertani (LB) e a reação foi levada ao shaker a 37 °C durante 1 hora sob agitação de 50 RPM. Em seguida cerca de 100 µL do inóculo foi semeado em placa com ágar LB suplementada com 0,1 mg/mL de canamicina. A placa foi incubada em estufa a 37 °C por 16 horas para o crescimento de colônias resistentes a canamicina.

### **3.3. Confirmação da sequência de DNA e quantificação**

A confirmação da sequência de DNA plasmidial foi realizada através da digestão do plasmídeo com as enzimas de restrição Xho fastdigest™ e NdeI fastdigest™ (*New England Biolabs*, MA, EUA) a reação de digestão contou com 10 µL de pET28a(+) hPRL, 1 µL de cada uma das enzimas de restrição, 2 µL de tampão fast e 6 µL de água MiliQ autoclavada, as reações apenas com uma das enzimas contaram com 7 µL de água, totalizando ao final, um volume de 20 µL. A reação foi incubada em banho-maria a 37 °C por 20 minutos, a análise da digestão foi realizada por gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Com a confirmação do tamanho esperado do DNA plasmidial, o plasmídeo foi amplificado em bactérias. Uma colônia de DH5α transformada, foi inoculada em 100 mL de meio LB com 0,1 mg/mL de canamicina, durante 16 horas a 37 °C sob agitação de 150 RPM. Em seguida foi realizada a purificação do plasmídeo utilizando o protocolo do kit de extração por midi preparação. As quantificações após o processo foram realizadas no equipamento *Nanodrop*™ (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EUA).

### **3.4. Produção de hPRLhis em sistema livre de células**

Foram realizadas 9 sínteses de hPRLhis em sistema livre de células, com 1 mL de volume final, um plasmídeo responsável pela expressão da proteína fluorescente verde (GFP) foi usado como controle positivo em todas as reações. As produções nesse sistema ocorreram a 37 °C em banho-maria, por 16 horas, os elementos da reação foram adicionados em microtubos de centrífuga de 1,5 mL.

Cada reação de aproximadamente 1 mL continha os seguintes

componentes:

- DNA ( 63,4 ng/ $\mu$ L) - 50  $\mu$ L
- Aminoácidos - 50  $\mu$ L
- Aminoácidos insolúveis - 60  $\mu$ L
- rNTP's (pool) - 48  $\mu$  L
- Lisado celular - 300  $\mu$ L
- Sacarose 50% - 40  $\mu$ L
- Tampão biolinker - 588  $\mu$ L
- Inibidor de RNase - 10  $\mu$ L

### 3.5. Purificação por Cromatografia por afinidade a metais

As produções no sistema livre de células foram purificadas por Cromatografia Líquida de Afinidade a Metais, foi utilizada uma coluna Hisprep FF 16/10 (GE Healthcare, LC, Inglaterra) acoplada ao equipamento AKTA Purifier (GE Healthcare, LC, Inglaterra). Este equipamento possibilita controlar fatores como temperatura, pH, fluxo de amostra e de tampões, pressão, entre outros, cruciais no processo de purificação.

A coluna Hisprep FF apresenta em seu interior, uma resina com grânulos de agarose que contém um ligante quelante imobilizado, o qual é carregado com íons de  $Ni^{2+}$ . Essa metodologia foi escolhida pela afinidade da cauda de histidina ao níquel, podemos considerar também a afinidade da PRL por íons de metal divalentes (UEDA; GOUT; MORGANTI, 2001).

Antes de serem aplicadas à coluna, cada produção de hPRLhis de (1 mL ) foi centrifugada por 1 minuto, a 10.000 RPM, e diluídas para 20 mL em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,2 + NaCl 0,8M. A fase móvel da cromatografia contou com um step de 15% de tampão B (fosfato de sódio 0,05 M pH 7,2 + 0,8 M NaCl + 0,5 M imidazol) para a eluição da proteína, e foram coletadas frações de 5 mL para as análises de SDS-PAGE e *Western Blotting*.

### **3.6. Expressão da hPRLhis em CI**

A cepa BL21(DE3) de *E. coli* foi transformada por choque térmico com o plasmídeo pET28a(+) hPRL e uma única colônia foi inoculada em 500 mL de meio rico 2HKII com 0,1 mg/mL de canamicina (Sigma Aldrich, MO, EUA), o inóculo foi transferido para um agitador rotacional, com 200 RPM, a 37 °C durante 6 horas. Quando a densidade óptica chegou entre 2,0 e 3,0 foi adicionado 0,5 mM de IPTG para a indução do operon lac, afim de potencializar a expressão proteica, a rotação foi diminuída para 150 RPM, o cultivo foi mantido por 16 horas à 37 °C.

### **3.7. Isolamento e lavagem dos CI**

Após a produção, para o isolamento dos corpos de inclusão, o inóculo de bactérias foi centrifugado a 5000 RPM por 10 minutos à 4 °C, ao final, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* insolúvel seguiu um protocolo de lavagens, foi ressuspensão em 100 mM de TrisHCl + 5 mM de EDTA (pH 7,2) foi adicionado 50 µg/mL de lisozima, e a amostra ressuspensa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente.

Imediatamente após, 0,1% de deoxicolato de sódio foi adicionado e a mistura foi sonicada no gelo, até perder a viscosidade. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 RPM por 15 minutos a 4 °C, e ressuspensa em tampão 100 mM de Tris-HCl + 0,1% deoxicoladode sódio + 5 mM EDTA (pH 7,2) a solução foi sonicada novamente, centrifugada, e o pellet foi ressuspensa em 10 mL de 50 mM de Tris-HCl + 1 mM de EDTA (pH 7,2). A suspensão foi alíquotada e armazenada à -20 °C.

### **3.8. Análise da fluorescência intrínseca do triptofano**

Os CI de hPRL foram avaliados quanto a emissão de fluorescência intrínseca do aminoácido triptofano, essa técnica tem o objetivo de avaliar deslocamento de pico do CI. Através da avaliação da exposição do aminoácido triptofano em meio aquoso (não desnaturante) e meio desnaturante (GdnHCl 6M). A técnica foi realizada no espectrômetro de fluorescência *Cary Eclipse* (Varian). A amostra dos CI foi diluída em GdnHCl 6 M (condição desnaturante), e em água, em uma concentração de 1

mg/mL de CI. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, e foram excitadas a 285 nm, a emissão da fluorescência foi avaliada em um intervalo de 300 a 400 nm.

### **3.9. Solubilização e pressurização dos CI**

Para a solubilização dos corpos de inclusão é preciso estimar a quantidade de proteína produzida por mililitro, para isso a suspensão com corpos de inclusão é sonicada e diluída 50 vezes em GdnHCl 6 M, e a absorbância medida em 280 nm para gerar este valor estimado.

Para determinar o parâmetro ideal de solubilização, diferentes condições foram avaliadas. Testamos tampão CAPS nos pHs 9, 10 e 11, além de avaliar a presença e ausência de agentes usualmente utilizados em processos de renaturação como DTT e L-Arginina (tabela 1), posteriormente avaliamos a presença de NaCl e glutatona oxidada e reduzida.

Cada condição de estudo da solubilização foi planejada para apresentar um volume de 1 mL, concentração de 1 mg/mL de hPRLhis, 50 mM de CAPS (para cada pH testado), e 0,1 mM EDTA.

Cada amostra de 1 mL foi colocada em saco plástico individual e selada, em seguida todas foram colocadas em um único saco plástico maior, que foi selado à vácuo. O saco maior foi submerso no óleo dentro do vaso de pressão, e pressurizado a 2,4 kbar através de uma bomba injetora ligada a um compressor de ar. As amostras ficaram em alta pressão por 90 min, após a descompressão, foram centrifugadas a 12.000 RPM por 10 min a 4 °C.

Para a otimização do processo de renaturação, o par redoxi de glutatonas (GSSG e GSH) foi testado em diferentes concentrações com o sobrenadante da etapa anterior. A amostra de hPRL renaturada foi incubada em concentrações de 1 mM GSSG + 1 mM GSH; 3 mM GSSG + 1 mM GSH; 4 mM GSSG + 1 mM GSH; 2 mM GSSG + 2 mM GSH; 3 mM GSH + 1 mM GSSG; 4 mM GSH + 1 mM GSSG. A incubação ocorreu por 16 horas a 4 °C, em seguida as amostras foram dialisadas em 50 mM de



Tris-HCl pH 7.2 + 150 mM NaCl, sob agitação a 4 °C por 16 horas.

**Tabela 1.** Condições utilizadas para avaliar a solubilização dos corpos de inclusão em alta pressão, com um total de 9 condições diferentes, o “+” indica a presença e o “-” a ausência do item na determinada condição.

Cl hPRLhis	CAPS - pH (0,05 M)	L- Arginina (0,5 M)	DTT (1M)
1 mg	9	-	-
1 mg	9	+	-
1 mg	9	-	+
1 mg	10	-	-
1 mg	10	+	-
1 mg	10	-	+
1 mg	11	-	-
1 mg	11	+	-
1 mg	11	-	+

Fonte: Própria da autora

### 3.10. Análise por SDS-PAGE

As amostras solubilizadas nas diferentes condições foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 15% (SDS-PAGE). Para a análise por SDS-PAGE, as amostras pós-pressurização e pós-diálise foram diluídas na proporção de 1:3 com tampão de amostra 4 vezes concentrado (2 mL de glicerol 20%, 10 mg de azul bromofenol, 3 mL de SDS 20%, 2,5 mL TrisHCl pH 6,8 e água ultrapura). Os corpos de inclusão usados como controle negativo nos géis foram preparados como as amostras pressurizadas, no entanto, foram reduzidos com 10% de DTT 1 M antes da aplicação no gel.

O sistema utilizado foi a eletroforese vertical MiniVE (GE Healthcare, Suécia), com marcador de massa molecular de 10-170 kDa, e um padrão de massa de prolactina (produzida no próprio Centro) de 23 kDa, aplicando-se uma corrente com intensidade de 35 mA. A corrida teve duração de aproximadamente uma hora.

Após a corrida, o gel foi fixado com solução metanol 40% e ácido acético 10%, por uma hora, sob agitação. A coloração foi realizada com o gel imerso em solução corante composta por azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250). Em seguida foi realizada a descoloração em solução de ácido acético 10%, *overnight*, sob agitação.

### **3.11. Análise por Western Blotting (WB)**

Para o *Western blotting*, a técnica de transferência semi-seca foi seguida, utilizando membrana de nitrocelulose (Hybond™ C Extra - Amershan Biosciences) com porosidade de 45 µm, previamente mergulhada em tampão de transferência (pH 8,3). Esse processo teve duração de uma hora, e contou com o equipamento Sistema Multiphor II (Pharmacia LKB Novablot Electrophoretic Transfer Kit), com a aplicação de uma corrente de 70 mA.

Após a transferência, a membrana foi lavada duas vezes por 5 minutos, cada vez com solução de bloqueio composta por 5% de leite em pó desnatado (Itambé®) em PBS (pH 7,4). Utilizou-se soro anti-hPRL produzido em coelho (Bethesda, MD, EUA) diluído 1:1.000 em PBS + 5% leite em pó desnatado, para incubar a membrana sob agitação, em temperatura ambiente, *overnight*.

Após duas lavagens com a solução de bloqueio, a membrana foi incubada por mais uma hora com o anticorpo secundário (Bethesda, MD, EUA), produzido em cabra, contra IgG de coelho, conjugado com a enzima *Horseradish peroxidase* (HRP). O anticorpo secundário foi diluído 1:10.000 em solução de bloqueio de PBS com 5% de leite desnatado, e a membrana ficou sob agitação por 1 hora. Depois de duas lavagens com solução de bloqueio e uma lavagem com apenas PBS, a membrana foi revelada em câmara escura com luminol (Luminata, Millipore ®) e fotodocumentado (Uvitec, Londres).

### **3.12. Cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular (HPSEC).**

Para a análise da hPRLhis por cromatografia líquida de alto

desempenho, foi utilizada a técnica de exclusão molecular (HPSEC) com uma coluna de aço inoxidável TSK G2000 SW (60 cm de comprimento, diâmetro interno de 7,5 mm, tamanho de partícula de 10 µm, tamanho de poro de 125 Å); TosohHaas, (Montgomeryville, PA, EUA) acoplada a uma coluna de guarda TSK SW (7,5 cm comprimento x 7,5 mm diâmetro interno).

A fase móvel foi constituída de bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,0. O fluxo foi de 1 mL/min, monitorado em comprimento de onda de 220 nm. A temperatura da coluna foi mantida a temperatura ambiente (20 – 25 °C) e o volume máximo aplicado foi de 500 µL. Para a quantificação e determinação do tempo de retenção, utilizamos o padrão interno de hPRL (obtido de periplasma de *E. coli*) como referência em uma concentração de 5 µg/50 µL aplicados na coluna.

### **3.13. Ensaio de atividade biológica**

Para avaliar a atividade biológica da prolactina renaturada em alta pressão e sua capacidade de se ligar ao receptor celular da hPRL, foi realizado um ensaio com células da linhagem BaF/3-LLP, linhagem de linfoma de camundongos, prolactino dependentes e modificadas geneticamente pela introdução de receptores de prolactina humana. As células foram cultivadas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> em meio RPMI-1610 suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (SFB), 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 700 µg/mL de geneticina e 1 ng/mL de hPRL recombinante (padrão interno de hPRL obtido do periplasma de *E. coli*, produzido no Centro de Biotecnologia do IPEN).

Para o ensaio as células foram primeiramente lavadas por 3 vezes com meio de ensaio (meio RPMI1610 + 1% SFB + antibióticos na mesma concentração do meio de crescimento, e sem adição de rhPRL) e após isso, foram incubadas durante 4 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> com o mesmo meio de ensaio sem rhPRL. Posteriormente foram distribuídas em placa de 96 poços (2,0 x 10<sup>4</sup> células/poço), incubada com concentrações da hPRL (amostras e padrão).

A placa foi incubada por 72 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, e então

as células viáveis foram avaliadas por coloração com MTS/PMS, onde 2 mg/mL de MTS dissolvido em PBS foi adicionado a 0,92 mg/mL em PMS para uma proporção de 20:1. O volume de 20 µL da mistura foi adicionado em cada poço e a leitura ocorreu após 3 horas de incubação a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. A absorbância no comprimento de onda de 490 nm foi medida no leitor de placas (Original Multiskan EX Thermo Electron Corporation, USA).

### **3.14. Análise por Espectrometria de massas (MALDI-TOF)**

Para a determinação mais precisa da composição e relação massa/carga da hPRLhis, tanto a hPRLhis como o padrão foram enviados para o Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP- USP), para a análise por espectrometria de massas.

As amostras contendo 20 µg de hPRL cada (padrão e hPRLhis) foram previamente dessalinizadas em sistema AMICON por centrifugação, e ressuspendidas em 20 µL de água MiliQ autoclavada, conforme orientação do CEFAP.

A análise foi feita através da plataforma Autoflex MALDI-TOF/TOF, voltada para a determinação de proteínas intactas, oligossacarídeos e lípideos, utilizou-se o método de ionização MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), e a faixa de massa de aquisição foi de 10.000 a 45.000 Da. A matriz utilizada foi de HCCA em uma concentração de 10 mg/mL em meio de acetonitrila, a frequência do laser foi de 500 Hz, o parâmetro utilizado foi linear positivo.

### **3.15. Radiomarcção da hPRL e da hPRLhis**

Para a padronização da radiomarcção da hPRL com <sup>131</sup>I, realizamos os experimentos em parceria com o Centro de Radiofarmácia do IPEN (CR-IPEN). Utilizamos o método de marcação direta com cloramina T como agente oxidativo, primeiramente utilizamos 5 µg de hPRL (padrão interno) e 4 µg de hPRLhis, ambos dissolvidos em tampão bicarbonato de amônio 0,005 M pH 7,9.

As amostras do padrão foram incubadas com Na<sup>131</sup>I com diferentes

concentrações e atividades (18,5 MBq, 7,4 MBq, 3,7 MBq e 1,85 MBq). As concentrações de CLT testadas foram de 10 e 50 µg, com tempo de agitação de 45 minutos. Para parar a reação, foi adicionado 100 µg de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

As amostras de hPRLhis foram incubadas com atividades de I<sup>131</sup> de 14,8 MBq, 11,1 MBq, 3,7 MBq e 1,85 MBq. As concentrações de CLT utilizadas foram 10 e 50 µg.

### **3. 16. Controle de qualidade do radiomarcado**

A avaliação do controle de qualidade do produto marcado foi realizada através de cromatografia em papel ascendente com fase móvel de metanol 85%. O controle de qualidade avalia o rendimento da radiomarcção, obtendo a porcentagem de produto radiomarcado e porcentagem de iodo livre da reação. A porcentagem considerada mínima e ideal de rendimento da reação de radiomarcção (visando a aplicação de radiomarcados em animais) é de pelo menos 95% de produto radiomarcado, e 5% de iodo livre.

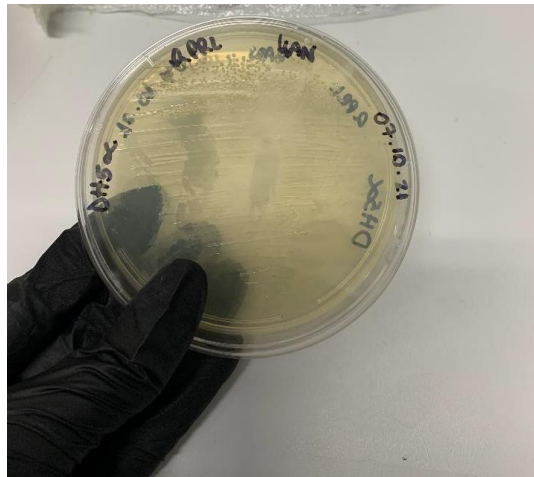
Foram utilizadas fitas iTLC Aluminium Sheets e em cada fita, foi aplicado 20 µL da reação da proteína radiomarcada, após a corrida, a radioatividade foi medida por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT-CT).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Confirmação do plasmídeo

O plasmídeo composto pelo vetor pET28a(+) contendo o cDNA da hPRL foi sintetizado pela empresa *Twist Bioscience* e utilizado para transformar pelo método do choque térmico a cepa DH5 $\alpha$  (figura 8). Um clone foi escolhido para criação de um *seedbank*. Foram realizadas várias ampliações do plasmídeo visando ter uma quantidade suficiente, para sua caracterização e estudos de expressão, inicialmente usando o sistema *cell free*, cada amplificação foi quantificada por nanodrop como mostra na tabela 2.

**Figura 8.** Colônias de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET28a(+) hPRL.



Fonte: Própria da autora.

**Tabela 2.** Extrações de DNA plasmidial (pET28a(+)-hPRL) para obter material genético para as produções em sistemas livre de células e *E. coli*.

Amostra	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)	260/280	Volume Final ( $\mu$ L)
Plasmídeo TwistBioscience	13,9	2,33	50
Miniprep 1	18,0	1,89	50
Miniprep 2 (amostra1)	38,2	2,06	75
Miniprep 2 (amostra 2)	53,8	1,53	75
Midiprep	63,4ng	1,85	200

Fonte: Própria da autora.

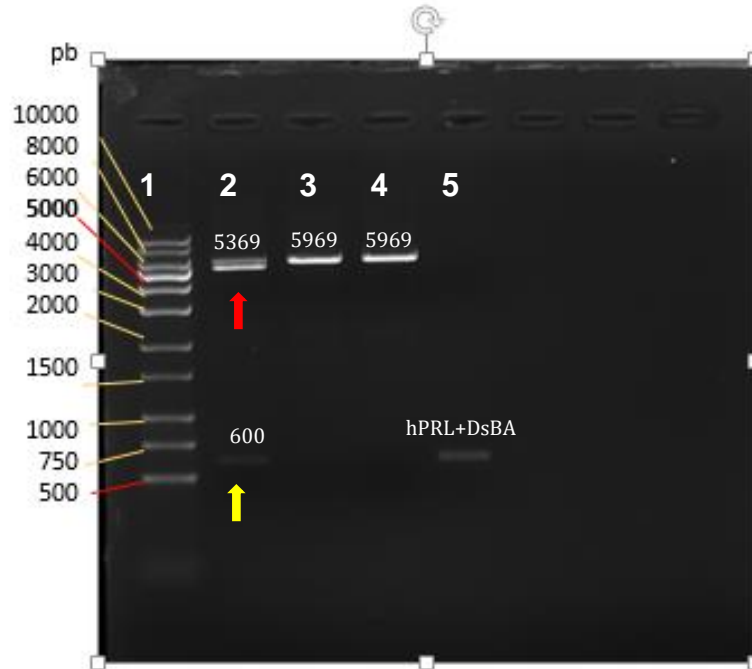
A fim de confirmar se a sequência de DNA plasmidial do pET28a(+)-hPRL estava presente, foi realizada a digestão do plasmídeo com enzimas de restrição, seguida da análise em gel de agarose 1%, a qual confirmou a presença dos fragmentos de DNA esperados (figura 9).

No segundo poço do gel é possível visualizar as duas bandas correspondentes aos dois fragmentos gerados pela reação do plasmídeo com ambas enzimas NdeI e XhoI, o fragmento que corresponde ao inserto (hPRL) com tamanho de 600 pb (seta amarela) e o fragmento do vetor de 5369 pb (seta vermelha).

Nos poços 3 e 4 é possível identificar o tamanho do plasmídeo inteiro (vetor + inserto) digerido com apenas uma das enzimas, no poço 3 a digestão apenas com NdeI, e o poço 4 com digestão apenas com XhoI. A banda aparente nesses dois poços ficou levemente acima da banda do primeiro poço, indicando a posição esperada para o tamanho teórico do plasmídeo (5969 pb).

Como controle positivo, foi aplicado no gel o fragmento de DNA correspondente à sequência da hPRL com peptídeo sinal DsbA (poço 5), que apresentou uma banda levemente acima quando comparada com a sequência de hPRL do poço 2, como esperado.

**Figura 9.** Gel de agarose 1%, com os fragmentos esperados depois da digestão do plasmídeo pET28a+hPRL com as enzimas de restrição NdeI e XhoI. 1 - Ladder 1Kb (Ludwig). 2- pET28a+hPRL digerido com NdeI e XhoI. 3- pET28a+ hPRL digerido apenas com NdeI. 4- pET28a+hPRL digerido apenas com XhoI. 5- Controle interno utilizando a sequência de DNA correspondente à hPRL com o peptídeo sinal DSBA (654 pb).



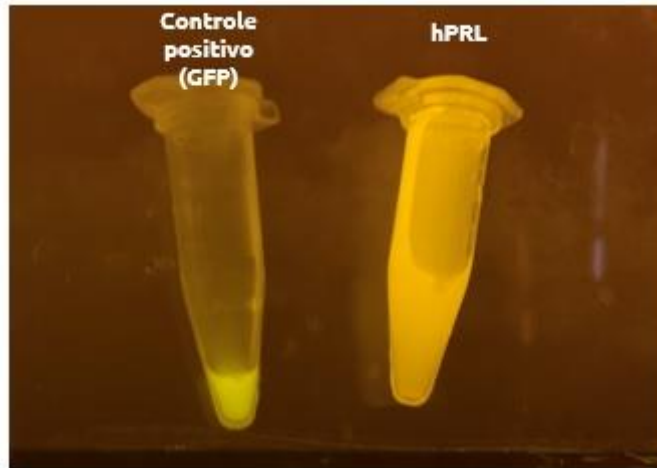
Fonte: Própria da autora.

#### 4.2 Produção de hPRL em sistema livre de células

As produções em CFPS foram feitas juntamente com o controle positivo (GFP) (figura 10). A primeira etapa de purificação foi realizada por cromatografia utilizando uma coluna de afinidade a metais (IMAC). Um cromatograma apresentando uma das purificações pode ser observado na figura 11. As frações coletadas no step de 75 mM de imidazol foram analisadas por SDS-PAGE (figura 12). O poço 8 contendo a fração coletada na IMAC, mostra que não houve uma separação eficaz da proteína de interesse pela técnica.

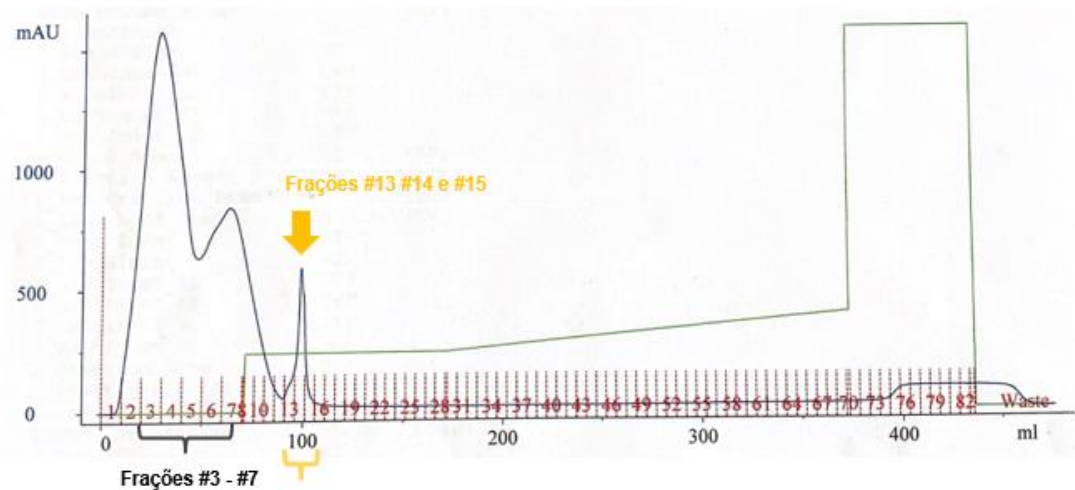


**Figura 10.** A imagem apresenta a reação controle positivo com GFP à esquerda, e a reação para a síntese de Prolactina à direita, o controle positivo ficou verde, como esperado, indicando que os reagentes e as condições para a reação estavam corretas.



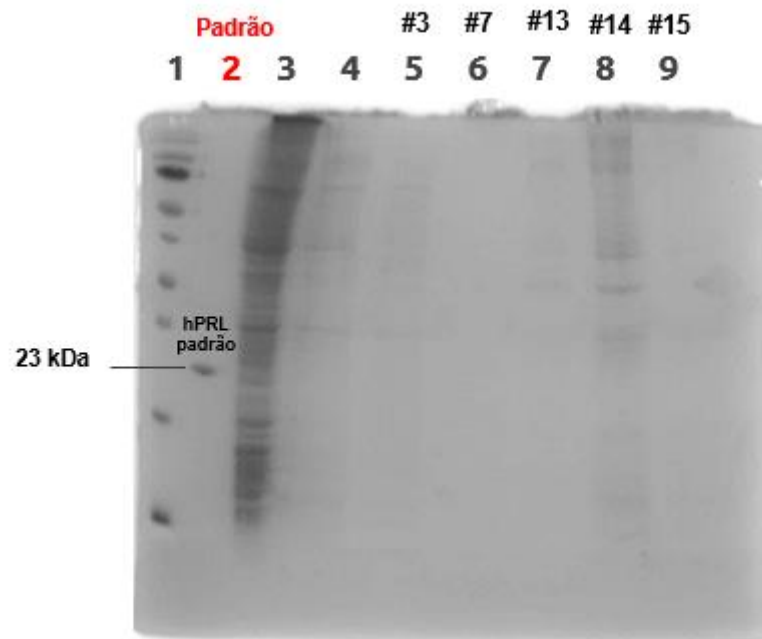
Fonte: Própria da autora.

**Figura 11.** Cromatograma da IMAC referente a produção de hPRLhis por CFPS. A seta amarela indica o pico que saiu no primeiro step (75 mM imidazol), com as frações que foram coletadas do pico (#13,14,15). Frações #3 a #7 correspondem à entrada da amostra.



Fonte: Própria da autora.

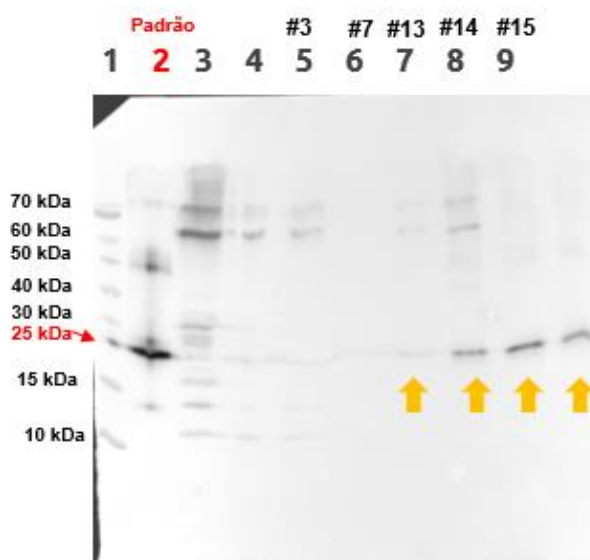
**Figura 12.** Análise por SDS-PAGE das amostras produzidas por CFPS após purificação por IMAC. 1- Marcador de massa molecular (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder). 2- Padrão de hPRL (1 µg). 3- Reação *cell free* antes da purificação. 4- Reação *cell free* centrifugada antes da purificação. 5- Fração #3 (não retido). 6- Fração #7. 7- Fração #13 (75 mM imidazol). 8- Fração #14 (75 mM imidazol). 9- Fração #15 (75 mM imidazol).



Fonte: Própria da autora.

A figura 13 apresenta o *western blotting* correspondente à análise das frações coletadas do AKTA, é possível confirmar a presença da proteína nas frações #13 #14 e #15, embora ela não tenha apresentado diferença aparente de tamanho quando comparada ao padrão. Outro ponto da figura 13 é que os poços 3, 4, 5 e 8 apresentaram bandas de alto peso molecular, o que pode ser agregados proteicos, ou seja, oligômeros da hPRLhis.

**Figura 13.** Análise por *Western Blotting* das amostras eluídas por IMAC. 1- Marcador de massa molecular (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder). 2- Padrão de hPRL (1 µg – P41). 3- Reação *cell free* antes da purificação. 4- Reação *cell free* centrifugada antes da purificação. 5- Fração #3 ( não retido). 6- Fração #7 (não retido). 7- Fração #13 (75 mM imidazol). 8- Fração #14 (7 5mM imidazol). 9- Fração #15 (75 mM imidazol). Setas amarelas indicando a hPRL produzida, com o pico correspondendo ao padrão.



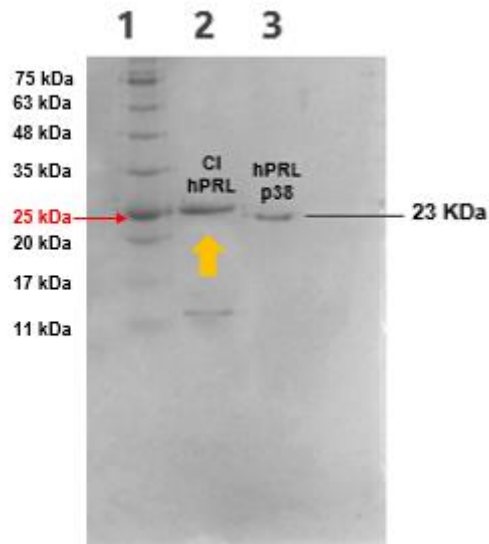
Fonte: Própria da autora.

### 4.3. Análise da produção dos CI

Após produção, os corpos de inclusão seguiram o protocolo de lavagens, e foram aliquotados (10 mL). Os CI lavados foram quantificados por espectrofotometria a 280 nm em 38 mg/mL. Em seguida, foram avaliados por SDS-PAGE como é observado na figura 14. No gel, a seta amarela indica a banda referente aos CI, que aparece acima da posição do padrão de prolactina já que os CI foram reduzidos com DTT e possuem massa teórica aproximada de 25 kDa pela presença da cauda de 6 histidinas e do sítio de trombina.

É importante destacar que o grau de pureza do CI após as lavagens, sem nenhum processo de purificação, é muito alto, quando comparado ao padrão produzido no periplasma e já purificado.

**Figura 14.** Análise por SDS-PAGE (15%) dos CI de prolactina, após o protocolo de lavagens. 1- Marcador de massa molecular (Sigma™ Pre-stained Protein Ladder Blueye). 2- Corpos de inclusão hPRL (reduzidos com DTT 1 M). 3- Padrão de hPRL interno (1 µg) de 23 kDa (não reduzido).

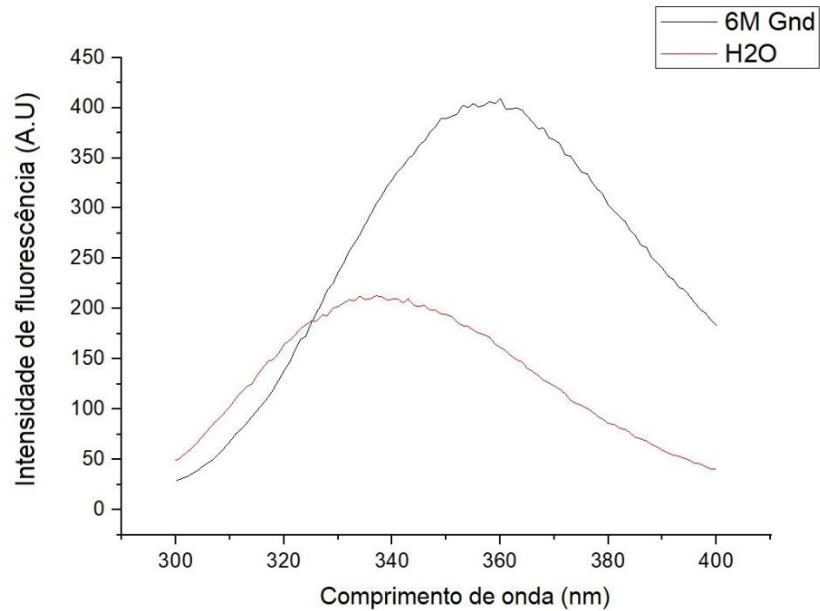


Fonte: Própria da autora.

#### 4.4. Análise da fluorescência intrínseca do triptofano

Os CI de hPRL foram avaliados quanto a emissão da fluorescência intrínseca do triptofano, as duas condições testadas são apresentadas na figura 15. Como o esperado, em água (meio polar) o CI apresentou um deslocamento de pico menor do que em GndHCl 6M (meio desnaturante), já que o triptofano no meio com guanidina fica mais exposto, e conseqüentemente sua curva de deslocamento aumenta. Podemos observar que enquanto a curva do CI em água está em torno de 335 nm, a de CI em guanidina se deslocou para aproximadamente 360 nm, o que pode indicar que o CI preserva sua estrutura terciária.

**Figura 15.** Análise da fluorescência intrínseca do triptofano dos CI de hPRL. Em preto a emissão dos CI em Gnd 6M, em vermelho a emissão dos CI em água.



Fonte: Própria da autora.

#### 4.5. Renaturação por pressão hidrostática.

A partir do resultado acima, os CI foram então pressurizados, para isto, foram testadas diferentes condições de solubilização, com o ob

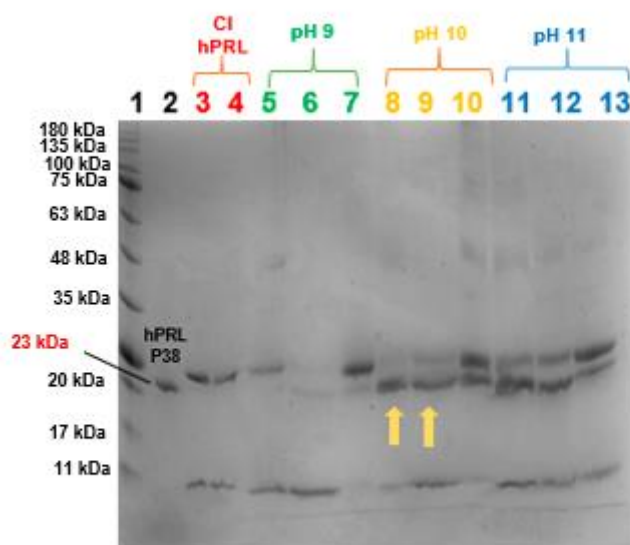
jetivo de encontrar a melhor condição (menos agressiva e mais eficiente) de renaturação da hPRL. Para os testes iniciais, algumas condições já trabalhadas anteriormente pelo grupo com o hormônio do crescimento (CHURA-CHAMBI; FARAH; MORGANTI, 2022), foram testadas para a prolactina, já que os dois hormônios possuem algumas características próximas como: peso molecular (hGH com 22 kDa e hPRL com 23 kDa), número de pontes dissulfeto intramoleculares ( hGH com duas pontes dissulfeto entre as quatro cisteínas e hPRL com três pontes dissulfeto entre as seis cisteínas) além de ambos serem produzidos pela adeno-hipófise.

Após a pressurização as amostras foram centrifugadas e analisadas por SDS-PAGE (figura 16), no qual é possível observar que as condições

em que a proteína teve melhor solubilização são as indicadas pelas setas amarelas, referentes aos poços 8 e 9, respectivamente corpos de inclusão renaturados em pH 10 sem presença de arginina e sem DTT, e em pH 10 + Arginina. O gelda figura 16 apresenta as bandas mais distorcidas porque as amostras foram analisadas antes da diálise.

As outras condições apresentaram bandas mais acima, na mesma posição que os corpos de inclusão reduzidos com DTT (não renaturados), o que indica que provavelmente a solubilização e a renaturação não foi tão eficaz, visto que as bandas na posição do padrão de hPRL ficaram menos intensas.

**Figura 16.** Análise por SDS-PAGE das diferentes condições de solubilização em alta pressão. 1- Marcador de massa molecular (Sigma™ Pre-stained Protein Ladder Blueye). 2- Padrão hPRL (1 µg) reduzido. 3- Controle CI hPRL reduzido com DTT. 4- Controle CI hPRL reduzido com DTT. 5- Condição pH 9. 6- Condição pH 9 + Arginina. 7- Condição pH 9 + DTT. 8- Condição pH 10. 9- Condição pH 10 + Arginina. 10- Condição pH 10 + DTT. 11- Condição pH 11. 12- Condição pH 11 + Arginina. 13- Condição pH 11 + DTT.



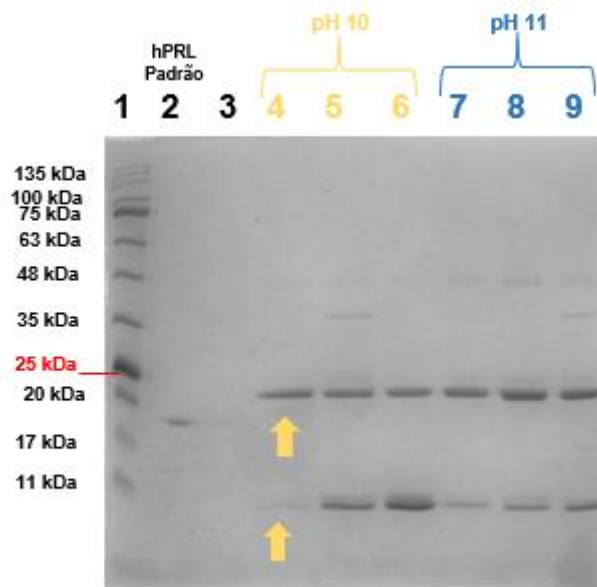
Fonte: Própria da autora.

Após esse resultado, a renaturação em pressão foi repetida apenas para as condições de pH 10 e 11, no entanto, dessa vez foi adicionado NaCl como outro parâmetro também, afim de melhorar a solubilização.

Em sequência as amostras foram dialisadas por 16 horas a 4 °C de refrigeração e sob agitação, em 50 mM Tris-HCl pH ajustado para 7,2, a

figura 17 é o SDS-PAGE das amostras após diálise. A seta amarela confirma que a condição de pH 10 sem arginina, sem DTT e sem NaCl gerou menos contaminantes de *E. coli* ao final do processo, por isso, foi a condição escolhida para seguir com o projeto.

**Figura 17.** Análise por SDS-PAGE das condições de renaturação (pH 10 e 11) pós diálise. 1- Marcador de massa molecular (Sigma™ Pre-stained Protein Ladder Blueye). 2- Padrão hPRL (1 µg). 3- Sem amostra. 4- Condição pH 10. 5- Condição pH 10 + Arginina. 6- Condição pH 10 + arginina + NaCl. 7- Amostra pH 11. 8- Condição pH 11 + arginina. 9- Condição pH 11 + arginina + NaCl.



Fonte: Própria da autora.

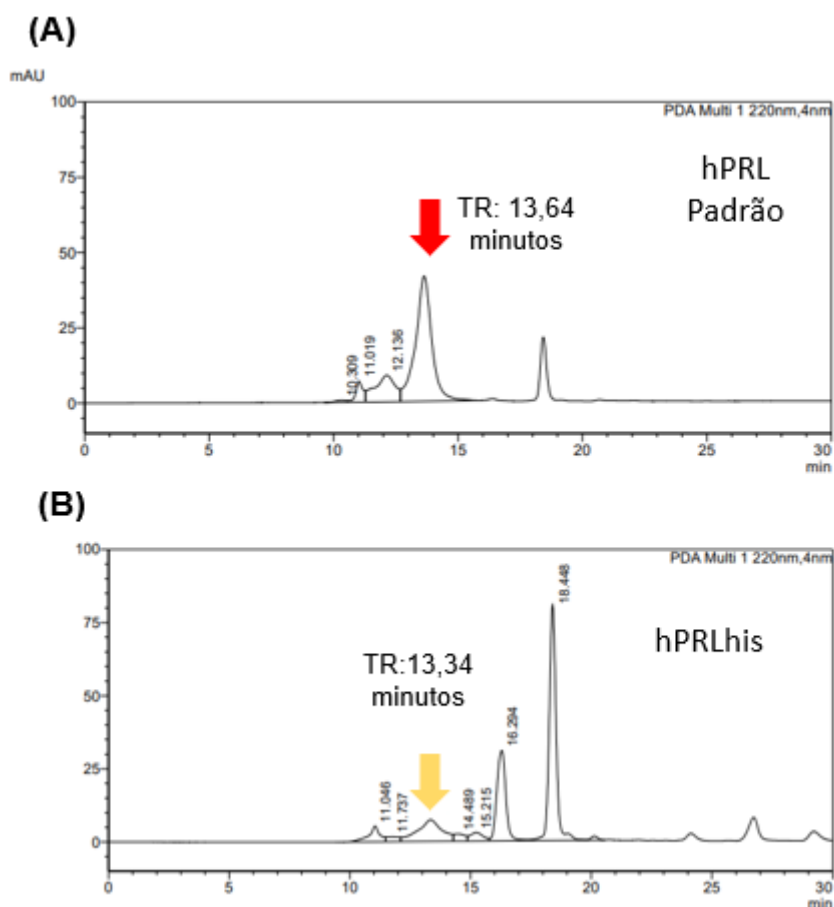
#### 4.6. Purificação por cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular.

A amostra dialisada (solubilizada em pH 10) foi analisada por cromatografia líquida de alto desempenho em uma coluna de exclusão molecular, a figura 18 apresenta os cromatogramas do padrão interno de hPRL (prolactina autêntica) e o da hPRLhis solubilizada em alta pressão.

A seta amarela indica o pico obtido no tempo de retenção de 13,34 minutos, o qual deveria corresponder à hPRLhis. Considerando que o tempo de retenção do padrão foi de 13,64 minutos, e que a hPRLhis possui a mais uma cauda de histidina (6 histidinas), uma tag de trombina (6 aa) e

uma metionina na porção N-terminal, sua massa molecular seria maior, portanto a hPRLhis sairia com um tempo de retenção ligeiramente anterior ao tempo da hPRL autêntica.

**Figura 18.** Análise por HPSEC da amostra renaturada em alta pressão (pH 10 sem aditivos). (A)- Cromatograma referente ao padrão interno de hPRL (5 µg) com o pico saindo no tempo de retenção de 13,64 minutos, seta vermelha indica o pico do monômero da hPRL. (B)- Cromatograma referente a amostra de hPRLhis (solubilizada em pH 10 e dialisada) a seta amarela indica o pico esperado correspondente á hPRLhis. Foi aplicado um volume de 100 µL de amostra.



Fonte: Própria da autora.

#### 4.7. Ensaio de atividade biológica

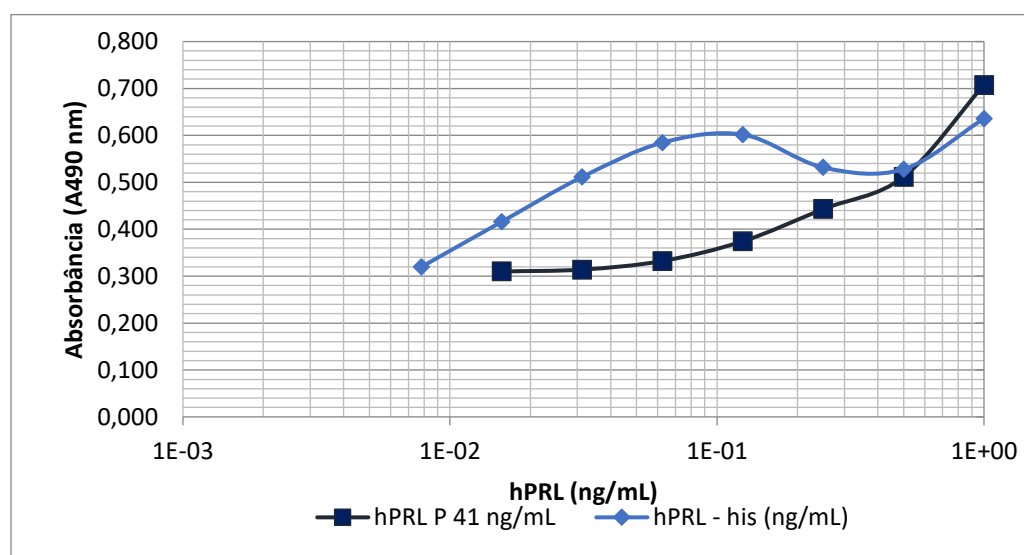
Após a análise por HPSEC, o pico da hPRLhis foi quantificado (área do pico) em aproximadamente 1 µg/mL, e a atividade biológica foi avaliada através do ensaio de proliferação com células BaF/3-LLP. O ensaio foi realizado de acordo com a quantificação da amostra, e na placa de 96



poços. A prolactina padrão e hPRLhis foram distribuídas por diluição seriada: de 1 ng/mL de proteína até 0,015625 ng/mL.

A figura 19 apresenta a curva de atividade da hPRLhis comparada ao padrão interno de hPRL (P41). É possível afirmar que a curva da hPRLhis atingiu saturação mais rapidamente que a curva do padrão hPRL, o que poderia ser excesso de prolactina no ensaio, indicando a possibilidade do pico quantificado na HPSEC ser subestimado.

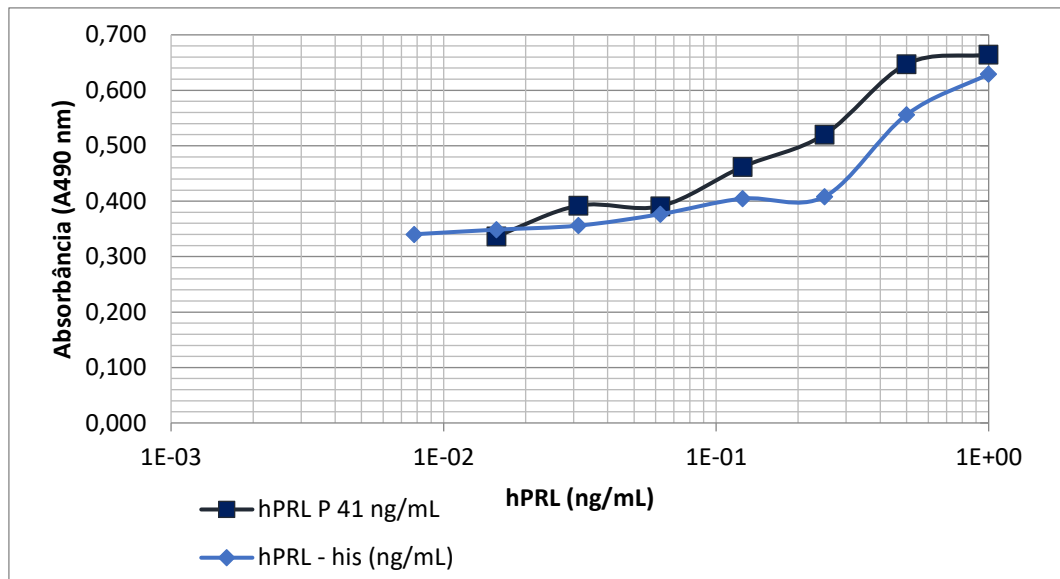
**Figura 19.** Curva de atividade biológica com células BaF/3-LLP, a curva em preto corresponde ao padrão de hPRL (P41), enquanto a curva azul indica a curva de atividade da hPRLhis.



Fonte: Própria da autora.

Com esse resultado, foi necessário repetir o ensaio de atividade biológica, foi colocado desta vez 10 vezes menos hPRLhis do que o utilizado no ensaio anterior, repetindo as mesmas concentrações finais, e então a curva de atividade da hPRLhis ficou muito semelhante à curva do padrão (figura 20), o que confirmou o erro de quantificação, considerando que ambas amostras tenham atividade biológica similar.

**Figura 20.** Curva de atividade biológica com células BaF/3-LLP, a curva em preto corresponde ao padrão interno de hPRL (P41), enquanto a curva azul indica a curva de atividade da hPRLhis.



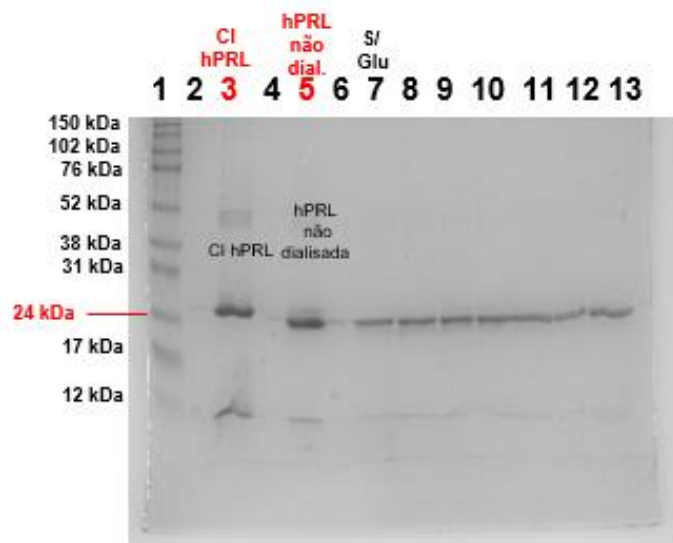
Fonte: Própria do Autora.

#### 4.8. Avaliação do efeito da presença de Glutathiona Oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) na renaturação.

Considerando os resultados anteriores, a proteína parecia apresentar algum tipo de instabilidade quanto a sua conformação, como a análise cromatográfica não ficou clara, uma nova renaturação em pH 10 foi feita. Após a renaturação, a amostra de hPRLhis foi incubada com diferentes concentrações de glutathiona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH), afim de criar um ambiente menos propício para a formação de pontes dissulfeto não nativas, evitando interações intermoleculares e agregações incorretas que pudessem interferir na estabilidade proteica.

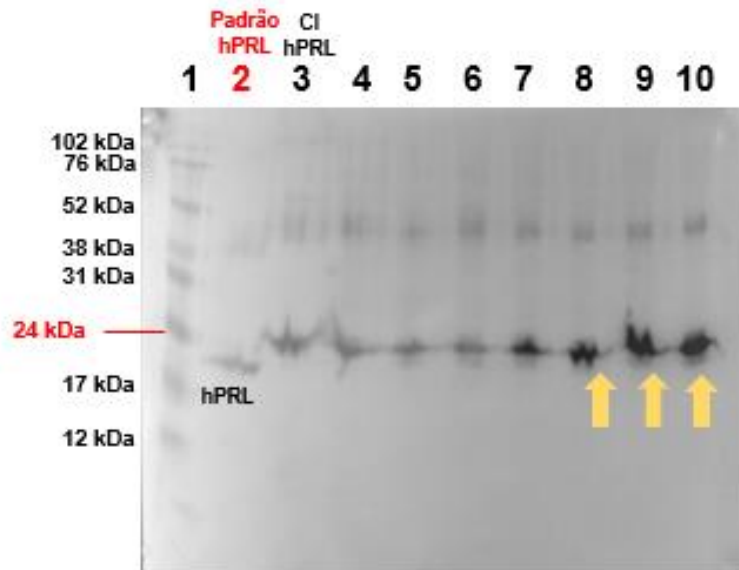
As amostras em diferentes concentrações de glutathiona oxidada e reduzida foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blotting* como mostra as figuras 21 e 22, respectivamente. No SDS-PAGE, a intensidade das bandas não apresentou diferença significativa com relação à melhor concentração de GSSG e GSH. No entanto, no WB as melhores condições são indicadas pelas setas amarelas, onde se pode observar maior intensidade das bandas, em comparação com as outras amostras do gel.

**Figura 21.** Análise por SDS-PAGE do efeito da presença de GSSG + GSH na renaturação da hPRL. 1- Marcador de massa molecular (Sigma™ Full-Range Rainbow Marker). 2- Sem amostra. 3- Corpo de Inclusão reduzido com DTT. 4- Sem amostra. 5- hPRL após pressão (antes do tratamento com glutatonas e diálise). 6- Sem amostra. 7- hPRL dialisada sem glutatona. 8- hPRL dialisada com 1 mM de GSSG + 1 mM GSH. 9- hPRL dialisada com 3 mM GSSG + 1 mM GSH. 10- hPRL dialisada com 4 mM GSSG + 1 mM GSH. 11- hPRL dialisada com 2 mM GSSG + 2 mM GSH. 12- hPRL dialisada com 3 mM GSH + 1 mM GSSG. 13- hPRL dialisada com 4 mM GSH + 1 mM GSSG.



Fonte: Própria da autora.

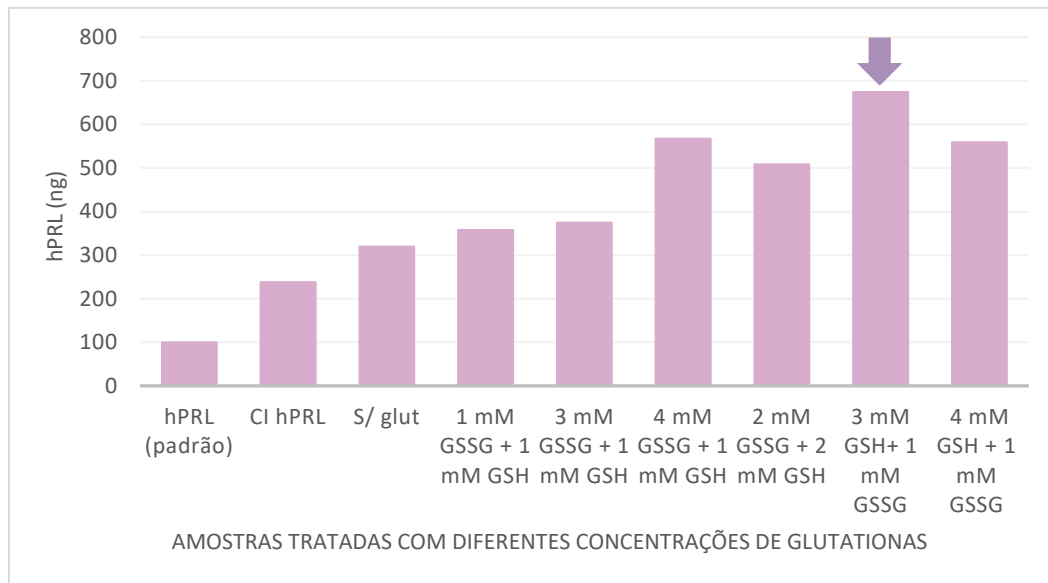
**Figura 22.** Análise por WB do efeito da presença de GSSG + GSH na renaturação da hPRL. 1- Marcador de massa molecular (Sigma™ Full-Range Rainbow Marker). 2- hPRL (0,1 µg) - padrão. 3- Corpo de Inclusão reduzido com DTT. 4- hPRL dialisada sem glutathione. 5- hPRL dialisada com 1 mM GSSG + 1 mM GSH. 6- hPRL dialisada com 3 mM GSSG + 1 mM GSH. 7- hPRL dialisada com 4 mM GSSG + 1 mM GSH. 8- hPRL dialisada com 2 mM GSSG + 2 mM GSH. 9- hPRL dialisada com 3 mM GSH + 1 mM GSSG. 10- hPRL dialisada com 4 mM GSH + 1 mM GSSG.



Fonte: Própria da autora.

Segundo o WB, as bandas de maior intensidade foram correspondentes às três últimas condições, para confirmar isso, a intensidade das bandas foi analisada pelo programa ImageJ, o qual identificou a concentração estimada de hPRL pela área da bandas. A figura 23 apresenta o gráfico da quantidade de hPRL estimada conforme a análise no ImageJ, a análise mostra que a condição que apresentou melhor resultado (maior área e maior quantidade de proteína estimada) foi a tratada com 3 mM GSH + 1 mM GSSG (poço 9 da figura 22).

**Figura 23.** Gráfico da análise por IMAGEJ da quantidade de hPRLhis estimada (ng) em cada uma das bandas do WB. A seta indica a condição tratada com glutatonas que apresentou maior quantidade de hPRLhis.

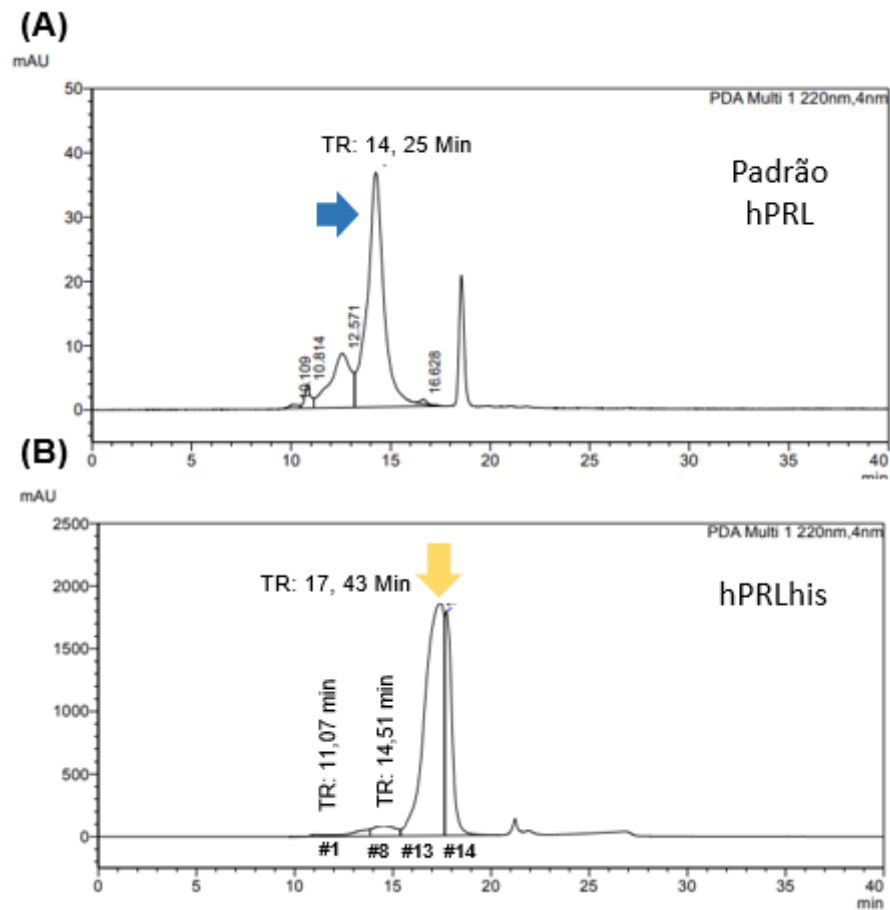


Fonte: Própria da autora.

Após isso a amostra foi analisada por HPSEC como mostra o cromatograma da figura 24, a seta amarela indica o pico que saiu em 17,43 minutos. Embora esteja em tempo de retenção diferente do esperado para a proteína, ao ser coletado e analisado por *western blotting*, confirmou que era a resposta imunológica da hPRLhis. A figura 24 (B) também mostra um pico com o tempo de retenção menor (14,51 minutos) referente a fração 8, o qual também foi coletado e avaliado por WB, e não apresentou interação com o anticorpo anti hPRL.

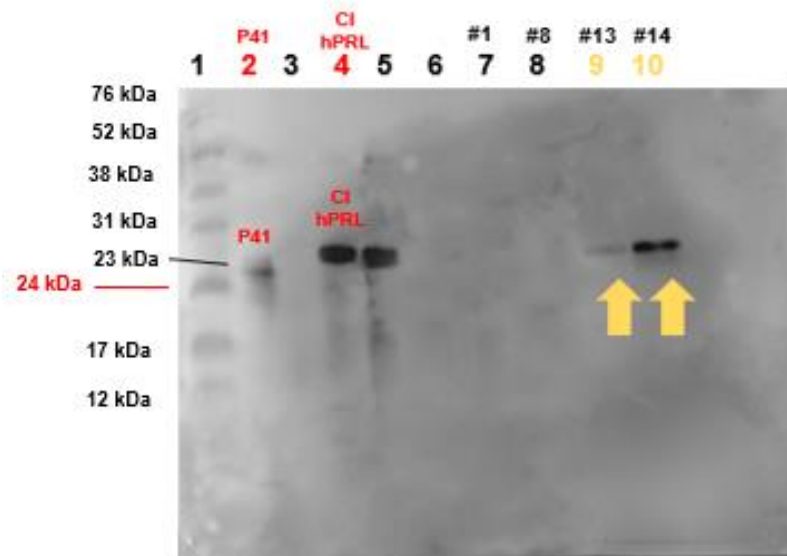
No *western blotting* da figura 25, as setas amarelas indicam as frações #13 e #14 coletadas referentes ao pico de 17,43 minutos, o volume de eluição foi de 1 mL por fração.

**Figura 24.** Cromatogramas da análise por HPSEC. Em A, o cromatograma do padrão de hPRL (5 µg), com um tempo de retenção de 14,25 minutos. Em B, o cromatograma da amostra de hPRLhis tratada com 3 mM GSH + 1 mM GSSG, o pico saiu com um tempo de retenção de 17,43 minutos, correspondente às frações #13 e #14. Os picos anteriores também foram coletados, o com TR: 11,07 minutos (fração #1) e o com TR: 14,51 minutos (fração #8).



Fonte: Própria da autora.

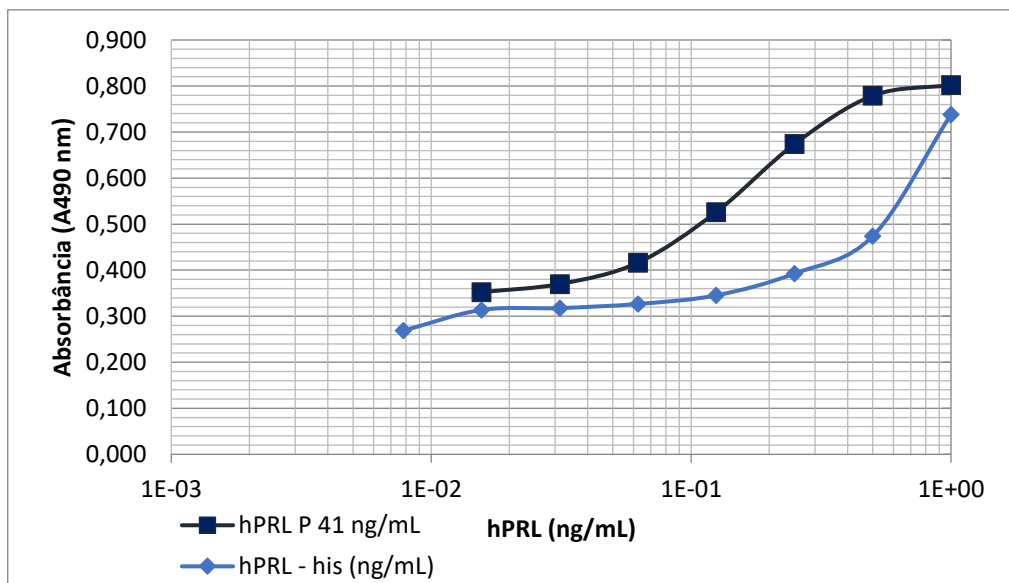
**Figura 25.** Análise por WB das frações coletadas da HPSEC. 1- Marcador de massa molecular (Sigma™ Full-Range Rainbow Marker). 2- Padrão interno de hPRL (P41) - 0,5 µg (P41). 3- Sem amostra. 4- Corpo de inclusão reduzido com DTT. 5- hPRLhis após pressão (não dialisado). 6- Sem amostra. 7- Coletado da HPSEC fração #1 (TR: 11,07 minutos). 8- Coletado da HPSEC fração #8 (TR: 14,51 minutos). 9- Coletado da HPSEC fração #13. 10- Coletado da HPSEC fração #14.



Fonte: Própria da autora.

A amostra avaliada em HPSEC também foi submetida a ensaio de atividade biológica, e apresentou curva semelhante a curva da amostra padrão como é apresentado na figura 26.

**Figura 26.** Ensaio de atividade biológica da hPRLhis tratada com 3 mM GSH + 1 mM GSSG e dialisada. A curva em preto corresponde ao padrão de hPRL (P41), e a curva em azul se refere a atividade da hPRLhis.



Fonte: Própria da autora.

#### 4.9. Análise da renaturação com o protocolo estabelecido.

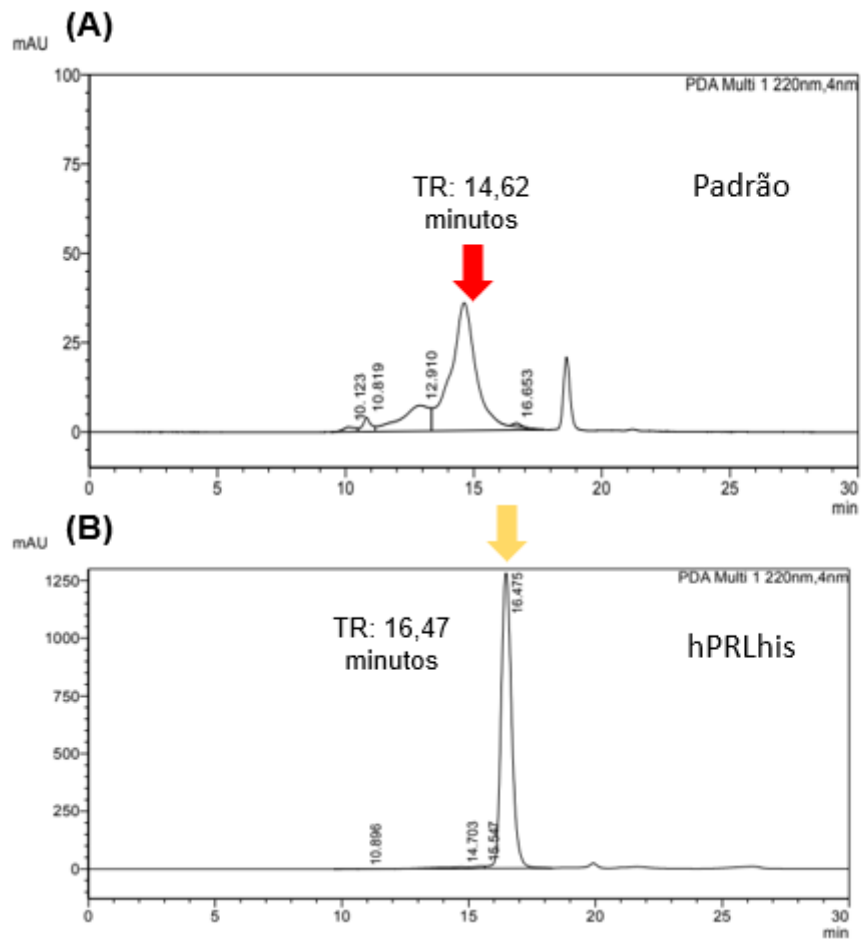
Com a atividade biológica confirmada, o método de renaturação foi definido: solubilização em pH 10 por 90 minutos em 2,4 kbar de pressão, incubação com 3 mM GSH + 1 mM GSSG por 24 horas, e diálise em 50 mM de Tris HCl pH 7,2 + 150 mM de NaCl

Uma outra renaturação repetindo este método foi realizada com volume de 5 mL e concentração inicial de 1 mg/mL, quando analisada em HPSEC, foi confirmada a posição do pico, que saiu novamente no tempo de retenção perto de 16 minutos (16,47 minutos - figura 27). A quantificação pela área do pico (com relação ao pico do padrão) apontou que ao final do processo, obtivemos 3 mg em um total de 5 mL de produto dialisado.

A análise por SDS-PAGE aponta a banda correspondente a proteína na posição esperada, pouco acima da hPRL padrão, e com alto grau de pureza (figura 28) sem nenhuma etapa de purificação.

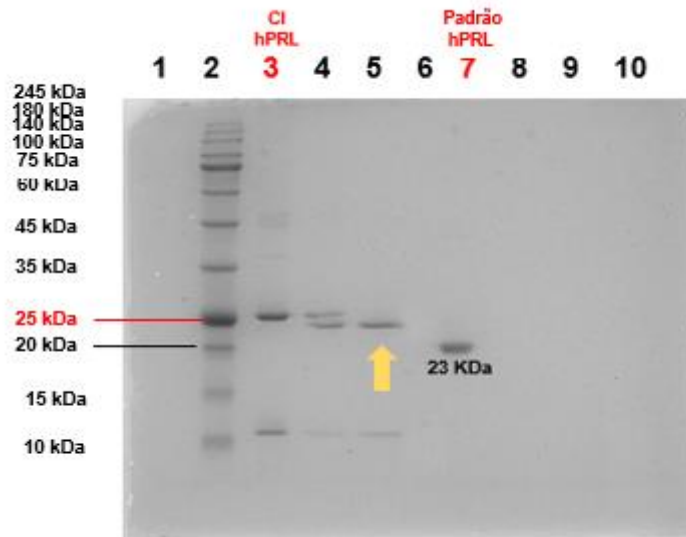


**Figura 27.** Análise por HPSEC com o protocolo da renaturação estabelecido (5 mL). Em (A)- Cromatograma do padrão de hPRL na primeira imagem, e pico com tempo de retenção de 14,62 minutos seta vermelha indica o pico da proteína. Em (B)-Cromatograma da hPRLhis, com pico de retenção em 16,47 minutos, seta amarela indicando o pico da hPRLhis.



Fonte: Própria da autora.

**Figura 28.** Análise por SDS-PAGE com o protocolo de renaturação estabelecido. 1- Sem amostra. 2- Marcador de massa molecular (Sinapse TrueColor High Range Protein Marker). 3- Corpos de inclusão reduzidos com DTT. 4- hPRLhis após pressão (não dialisada). 5- hPRLhis dialisada. 6- Sem amostra.. 7- Padrão hPRL (1µg).



Fonte: Própria da autora.

#### 4.10. Análise da hPRLhis por espectrometria de massas – MALDI-TOF

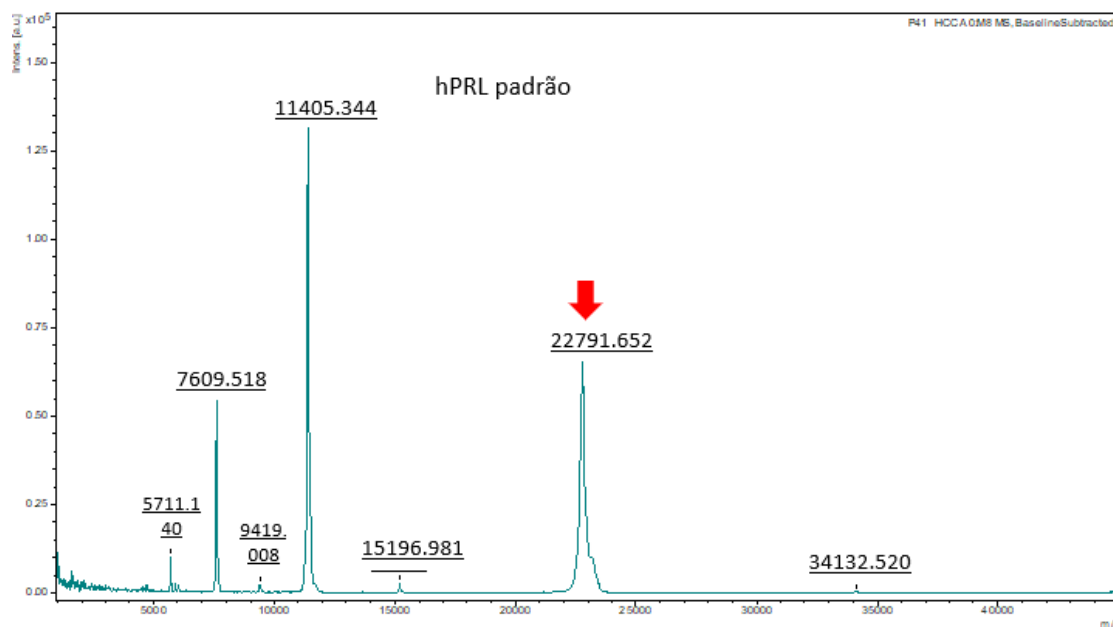
A hPRLhis foi analisada por espectrometria de massas, para isso a amostra dialisada em tampão bicarbonato de amônia 0,025 M pH 7,2 foi dessalinizada em sistema AMICON por centrifugação, e ressuspendida em água MiliQ autoclavada. O produto dessalinizado, e o padrão de hPRL (também dessalinizado) foram analisados por MALDI-TOF como os espectros apresentam.

Os resultados da análise do padrão, indicaram um pico com a massa aproximada de 22 kDa no espectro da amostra padrão de prolactina (seta vermelha da figura 29). O espectro da amostra de hPRLhis, apresenta um pico espalhado e baixo com massa aproximada de 25 kDa (indicado pela seta amarela na figura 30), que poderia corresponder a hPRLhis.

Essa análise indica que a proteína apresentou instabilidade, ou degradação em alguma etapa, entre a sua preparação e a análise, como

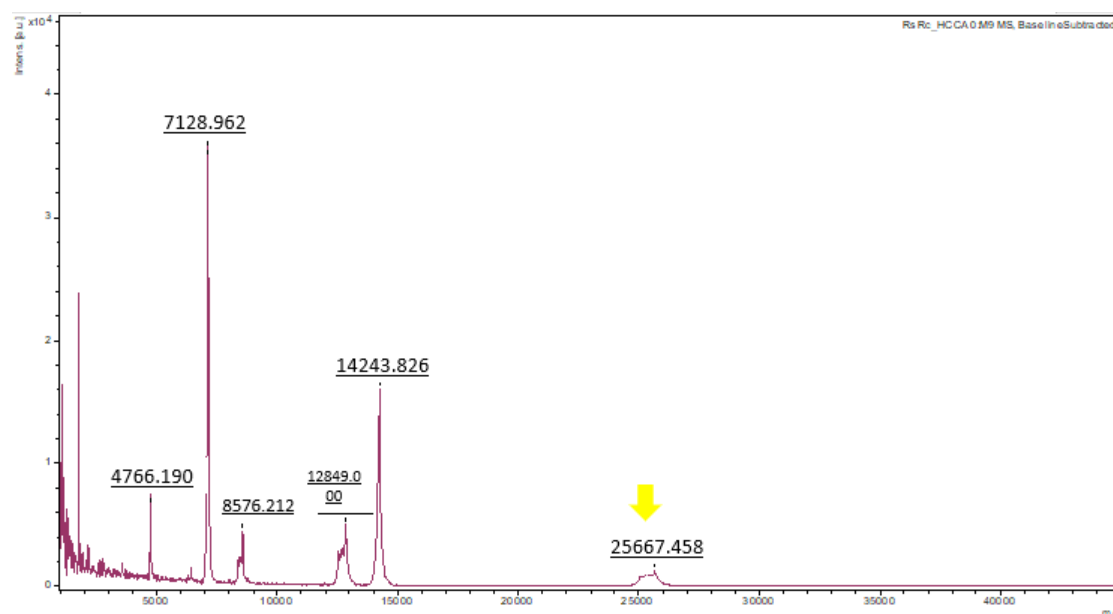
por exemplo, na etapa de troca de tampão por água deionizada, ou durante o processo de ionização.

**Figura 29.** Espectro de massas da análise por MALDI-TOF da hPRL padrão produzida em periplasma de *E. coli*. A seta vermelha indica o pico com massa da hPRL (22 kDa).



Fonte: Própria da autora.

**Figura 30.** Espectro de massas da análise por MALDI-TOF da hPRLhis produzida em citoplasma de *E. coli*. O espectro apresenta a relação massa/carga de cada um dos picos em m/z (número acima de cada pico), a seta amarela indica o pico correspondente a ~25 kDa.



Fonte: Própria da autora.

#### 4.11. Radioiodação da hPRL e hPRLhis

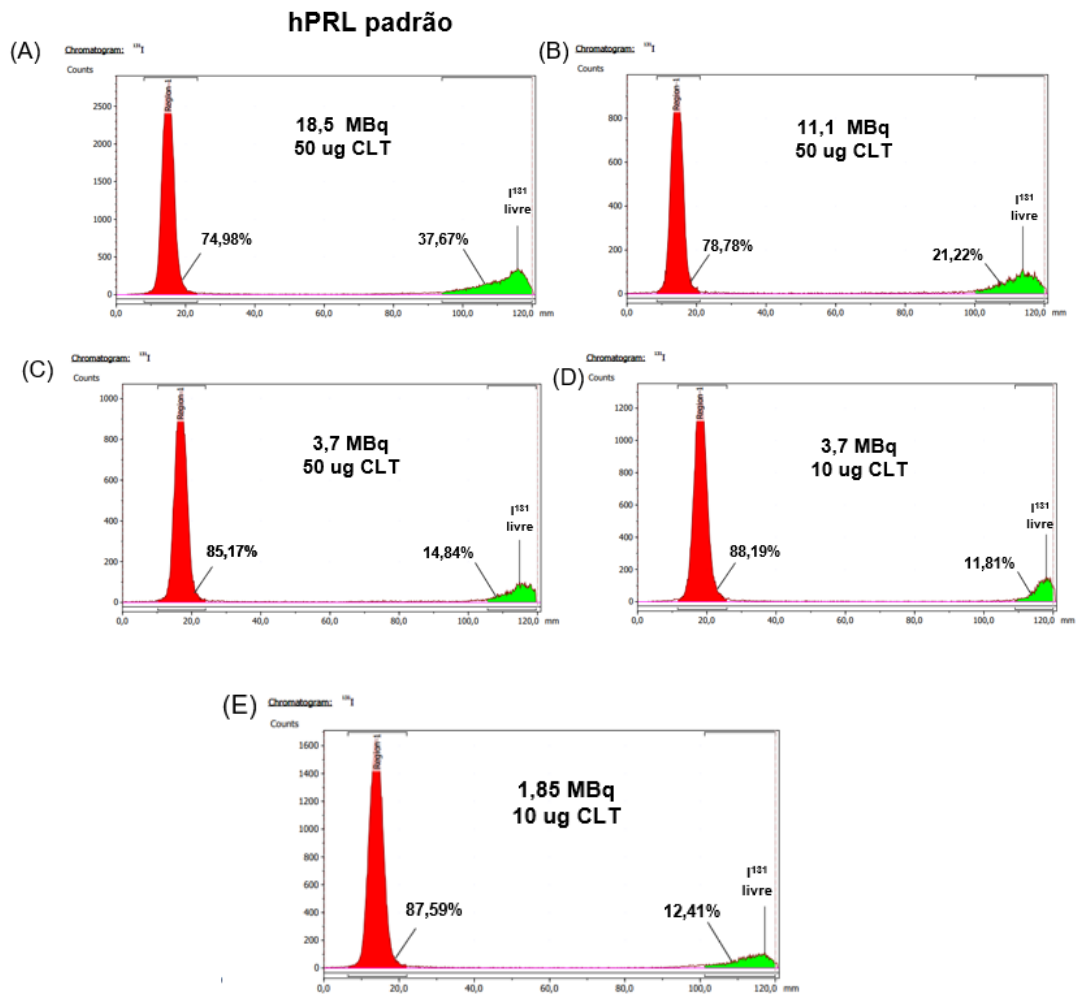
Para avaliar a radiomarcagem da hPRL com  $^{131}\text{I}$  foi utilizado o método de marcação direta com cloramina T, a princípio foram avaliadas diferentes condições para a radioiodação da hPRL padrão, visando estabelecer um protocolo eficaz. A tabela 3 apresenta as condições testadas para o padrão de hPRL. O tempo de reação para todas as condições foi de 45 minutos, a figura 31 apresenta os cromatogramas relacionados ao controle de qualidade da marcação da hPRL padrão (cromatografia em papel ascendente com fitas de iTLC).

**Tabela 3.** Tabela das condições para marcação do padrão de hPRL, com a quantidade de hPRL de 5  $\mu\text{g}$  e tempo de reação de 45 minutos para todas as condições.

hPRL padrão ( $\mu\text{g}$ )	CLT ( $\mu\text{g}$ )	$^{131}\text{I}$ (MBq)
5	50	18,5
5	50	7,4
5	50	3,7
5	10	3,7
5	10	1,85

Fonte: Própria da autora.

**Figura 31.** Cromatogramas da cromatografia com fitas de iTLC, os picos em vermelho correspondem a hPRL padrão radiomarcada, e os picos verdes, ao iodo livre. Em (A), a reação contendo 5 µg de hPRL padrão + 50 µg CLT + 18,5 MBq <sup>131</sup>I. Em (B), a reação contendo 5 µg de hPRL padrão + 50 µg de CLT + 7,4 MBq <sup>131</sup>I. Em (C), a reação contendo 5 µg de hPRL padrão + 50 µg CLT + 3,7 MBq <sup>131</sup>I. Em (D), a reação contendo 5 µg de hPRL padrão + 10 µg CLT + 3,7 MBq <sup>131</sup>I. Em (E), a reação contendo 5 µg de hPRL padrão + 10 µg CLT + 1,85 MBq <sup>131</sup>I.



Fonte: Própria da autora.

Nos cromatogramas da figura 31 é possível observar que a condição de radiomarcagem que apresentou maior rendimento de proteína marcada, e menor porcentagem de iodo livre nesse estudo, foi o cromatograma (D), com a condição de 5 µg de hPRL padrão + 10 µg CLT + 3,7 MBq (100 µCi) de <sup>131</sup>I.

Para a radiomarcção da hPRLhis, foi avaliado alguns parâmetros descritos na tabela 4, para cada reação de radioiodação, foi utilizado 4 µg de hPRLhis, com diferentes tempos de reação e diferentes concentrações de Iodo e CLT. A figura 32 apresenta os cromatogramas com o rendimento da radiomarcção.

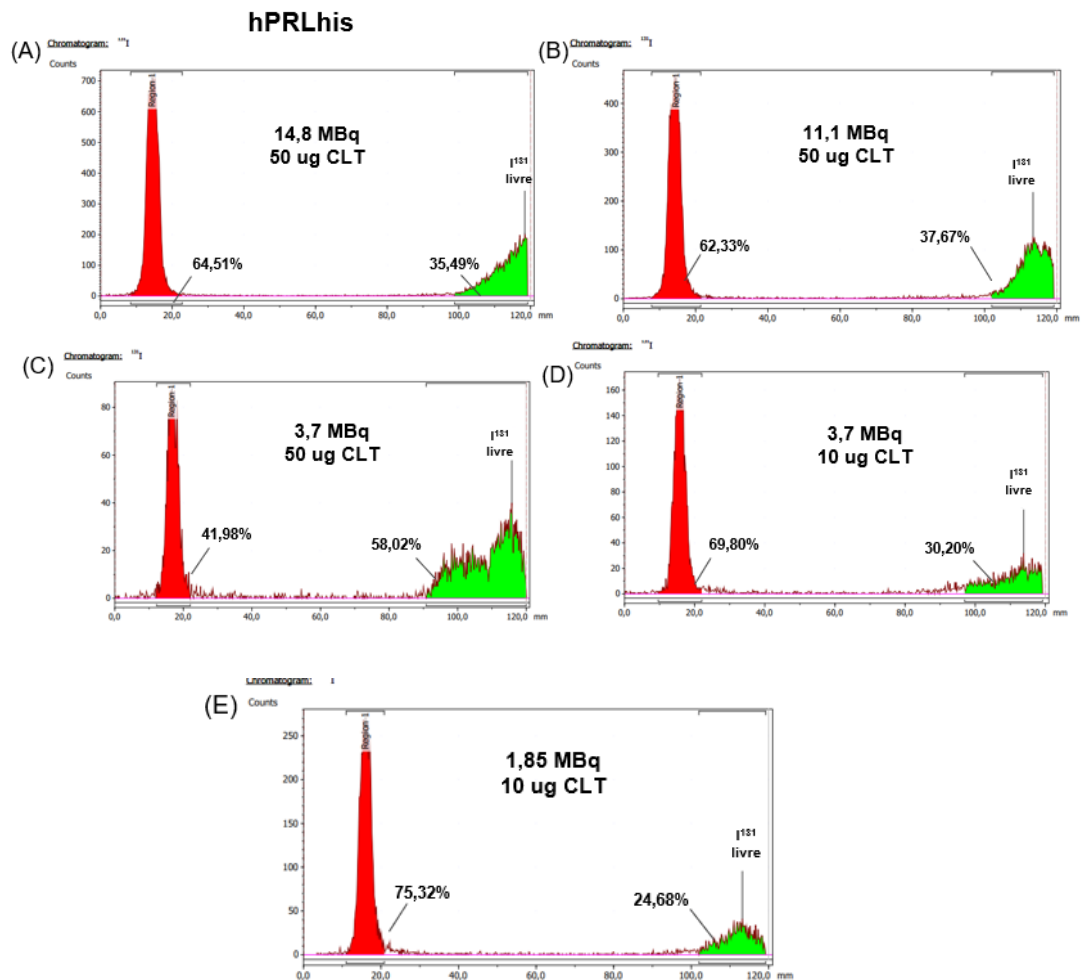
**Tabela 4.** Tabela das condições para marcação da hPRLhis, com a quantidade de hPRLhis de 4 µg e tempo de reação de 45 minutos para todas as condições.

hPRLhis (µg)	CLT (µg)	<sup>131</sup> I (MBq)
4	50	14,8
4	50	11,1
4	50	3,7
4	10	3,7
4	10	1,85

Fonte: Própria da autora.

Para a radiomarcção da hPRLhis, pode-se observar no percentual dos cromatogramas da figura 32, que a melhor condição do estudo foi a do cromatograma (E), diferente do padrão de hPRL, essa condição utilizou apenas 1,85 MBq na reação, e ao final, apresentou um percentual de rendimento de 75,32%. Embora essa porcentagem não esteja próxima de 95% de proteína radiomarcada, avaliamos que os testes iniciais apresentaram um resultado promissor.

**Figura 32.** Cromatogramas da cromatografia com fitas de iTLC, os picos em vermelho correspondem a proteína radiomarcada, e os picos verdes, o iodo livre. Em (A), a reação contendo 4 µg de hPRLhis + 50 µg CLT + 14,8 MBq <sup>131</sup>I. Em (B), a reação contendo 4 µg de hPRLhis + 50 µg de CLT + 11,1 MBq <sup>131</sup>I. Em (C), a reação contendo 4 µg de hPRLhis + 50 µg CLT + 3,7 MBq <sup>131</sup>I. Em (D), a reação contendo 4 µg de hPRLhis + 10 µg CLT + 3,7 <sup>131</sup>I. Em (E), a reação contendo 4 µg de hPRLhis + 10 µg CLT + 1,85 MBq <sup>131</sup>I .



Fonte: Própria da autora.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Produção de hPRLhis em CFPS

A hPRL é um hormônio amplamente estudado. Para entender o motivo, é essencial levar em consideração a atuação dessa proteína em diferentes processos fisiológicos e patológicos (LOPEZ-VICCHI et al., 2020). O objetivo inicial desse trabalho, visou a produção da hPRL em um sistema livre de células, utilizando o vetor pET28a(+).

O modelo de produção de proteínas recombinantes mais tradicional atualmente é o sistema baseado em células, tanto em células de mamíferos como de não mamíferos. Esse modelo apresenta vantagens e desvantagens, as principais vantagens a serem citadas são: altos níveis de produção, fácil manuseamento das células em laboratório, baixo custo de produção e no caso de células de mamífero, modificações pós traducionais mais semelhantes a proteína sintetizada *in vivo* (ROSANO; CECCARELLI, 2014; TAN et al., 2021; (PALOMARES; ESTRADA-MONCADA; RAMÍREZ, 2004)

O grupo de hormônios hipofisários do Centro de Biotecnologia do IPEN já utiliza protocolos de produções de proteínas em células há alguns anos, incluindo trabalhos recentes para a produção de prolactina recombinante em bactérias (AFFONSO et al., 2018; SOARES et al., 2006; SUZUKI et al., 2012). Esse estudo é o primeiro do grupo com o objetivo de produzir uma proteína em um sistema sem células. Embora existam muitas evidências a respeito da eficácia desse modelo, as produções de hPRLhis no sistema *cell free* apresentaram alguns problemas como dificuldades na purificação, baixo rendimento e agregação da proteína.

Embora a hPRL tenha afinidade a metais como o níquel, usado na IMAC, além da construção do vetor de expressão utilizado no trabalho ter uma *tag* de histidina com o objetivo de aumentar a afinidade ao níquel, a proteína repetiu um padrão em todas as produções realizadas. As amostras avaliadas em SDS-PAGE não aparentavam um processo eficiente de separação de outras proteínas contaminantes. Mesmo após a cromatografia por afinidade a metais, a hPRLhis não aparentava estar purificada, pelo contrário, ainda parecia estar com muitos contaminantes



como pode ser observado no SDS-PAGE, poço 8 da figura 12.

Estudos mais aprofundados da técnica podem ser realizados para otimizar a produção de prolactina humana, no entanto, essa metodologia pode ser mais vantajosa para proteínas recombinantes que são mais complexas de se obter pelos meios convencionais de produção (TATE., 2004). A técnica apresenta ótimos resultados para produção de proteínas citotóxicas (ORTH et al., 2011) e proteínas de membrana (KLAMMT et al., 2004) por exemplo.

Com base nos nossos resultados, a expressão e purificação da hPRLhis não foram satisfatórios com a técnica utilizando o Sistema *Free Cells*, o que frustrou parte dos nossos planos. De fato, a prolactina tem demonstrado ser uma proteína termosensível (SOARES et al., 2003) e principalmente susceptível a ação de proteases presentes tanto em meio de cultura celular (SOARES et al., 2000) quanto no ambiente citoplasmático bacteriano (SOARES et al., 2003).

No caso do Sistema *Free Cell*, o fato de usar produtos obtidos do lisado bacteriano pode ter contribuído com a presença de possíveis enzimas proteolíticas. Além disso, a instabilidade enzimática da prolactina pode ter sido aumentada com a introdução da tag-histidina.

Esse conjunto de fatores podem ter potencializado a degradação desse hormônio, o que justificaria o baixo rendimento obtido nos nossos estudos.

## **5.2. Solubilização e renaturação dos CI de hPRLhis**

O Centro de Biotecnologia possui relevante experiência na expressão e renaturação de CI (RODRIGUES, 2012; ROSA DA SILVA et al., 2018; CHURA-CHAMBI et al., 2022) otimizadas com renaturação em alta pressão, em respostas a diferentes condições de solubilização baseadas em variações de pH e uso de aditivos.

Os resultados apresentados no SDS-PAGE da figura 16 mostram os efeitos dessas condições de solubilização na expressão da hPRLhis produzida em corpos de inclusão. Nota-se que as amostras solubilizadas em pH 9 apresentaram bandas apenas na posição correspondente aos corpos de inclusão reduzidos com DTT (não renaturados). Isso indica que

provavelmente a solubilização e a renaturação não foram tão eficazes nessas condições, haja vista que as bandas na posição do padrão de hPRL ficaram menos intensas.

Os CI solubilizados em pH 10 com arginina e DTT apresentaram bandas mais intensas na posição dos corpos de inclusão do que a amostra solubilizada apenas em pH 10 sem aditivos. Outro fator a ser observado é que na amostra solubilizada apenas em CAPS pH 10, a banda que parece ser de um contaminante de baixo peso molecular é muito menos intensa do que nas outras condições, o que é um ponto positivo.

As solubilizações em pH 11 apresentaram bons resultados, no entanto, todas elas possuíam bandas muito intensas na mesma posição da banda dos corpos de inclusão, além de apresentarem bandas intensas na região do contaminante de baixo peso molecular.

Um trabalho a ser mencionado e que foi bem útil no nosso estudo, se refere à renaturação do hGH, reportado pela Dra. Ligia Morganti e Dra. Rosa Chura-Chambi (CHURA-CHAMBI; FARAH; MORGANTI, 2022) desenvolvido no Centro de Biotecnologia. Nesse estudo, a melhor condição encontrada para a solubilização do hGH foi também em CAPS pH 10. Embora esses dois hormônios sejam muito semelhantes, a melhor condição descrita no trabalho de 2022 apresenta 0,25 M arginina e 10 mM de DTT, o que não foi o melhor resultado encontrado para a hPRLhis.

A reagregação de proteínas em processos de renaturação é algo comum, isso resulta por muitas vezes no enovelamento incorreto da biomolécula e a formação de agregados não nativos da proteína. Com a finalidade de evitar isso, muitos protocolos de renaturação utilizam pequenas concentrações de compostos químicos como osmólitos, agentes redutores e surfactantes, esses aditivos aumentam o rendimento final do processo de renaturação, promovendo um enovelamento correto das proteínas (RANDOLPH; SEEFELDT; CARPENTER, 2002)

Em 1999, ST. JOHN; CARPENTER; RANDOLPH, sugeriram o uso de 0,75 M de guanidina para auxiliar na renaturação de CI de hGH, já no trabalho do UMETSU et al., 2003, a presença de aditivos como L-arginina, glutatona oxidada (GSSG) e guanidina tiveram um efeito positivo na formação de pontes dissulfeto corretas nas imunoglobulinas. Nosso estudo

apresentou outra diferença com relação ao trabalho de CHURA-CHAMBI (2022), a melhor concentração para o tratamento com glutatona encontrada para o hGH foi de 2 mM de GSH e 1 mM GSSG, já no caso da hPRLhis foi de 3 mM GSH e 1 mM de GSSG.

### 5.3. Purificação por HPSEC

Na análise por HPSEC da hPRLhis renaturada em alta pressão (pH 10 e sem aditivos) foram observados vários picos, além daquele esperado para a hPRLhis no cromatograma da figura 18 (B).

O pico com o tempo de retenção de 13,34 minutos deveria ser correspondente ao esperado, já que a hPRLhis apresenta uma cauda de histidina, uma tag de trombina e uma metionina no N-terminal, o que lhe confere uma massa molecular maior, portanto teria um tempo de retenção um pouco menor que o padrão apresentado pela hPRL autêntica (13,64 minutos).

No entanto, não foi o que observamos na prática. Analisando os resultados obtidos por *western blotting* (WB) da figura 25 (B), verificamos que o pico de 13,34 minutos não era o da hPRLhis, e sim o pico correspondente ao TR de 17,43 minutos enquanto o padrão foi de 14,25 minutos. Entretanto, foi observado também que no último cromatograma (figura 27), o tempo de retenção do pico da hPRLhis saiu em torno de 16,47 minutos, demonstrando certa oscilação quanto ao tempo de retenção na coluna de exclusão molecular. O tempo de retenção maior, sugere que a proteína sofreu quebra ou perda de massa.

No entanto, embora as análises por HPSEC apontem para algum tipo de degradação ou quebra da hPRLhis, a proteína apresenta o tamanho esperado (aproximadamente 24 kDa) nas análises por SDS-PAGE e *Western blotting*, além de apresentar atividade biológica similar à hPRL autêntica nos ensaios com células prolactino dependentes, BAF/3-LLP, como discutiremos a seguir.

É importante destacar também que comparando as análises de HPSEC, podemos perceber uma diferença no tempo de retenção do próprio padrão de hPRL produzido em periplasma. O primeiro cromatograma (Figura 18 A) o TR da hPRL padrão é 13,64 minutos, enquanto no último

(Figura 27 A) o TR do padrão saiu com 14,62 minutos, isso pode acontecer devido ao uso rotineiro e desgaste da coluna de purificação.

#### **5.4. Atividade biológica *in vitro***

A atividade biológica da hPRLhis foi avaliada em linfomas de camundongos que possuem receptores de hPRL, os resultados apresentados nas figuras 18, 19 e 25 comprovam que a hPRLhis induz a proliferação dessas células prolactina-dependentes, com comportamento de dose/resposta muito semelhante ao da hPRL padrão. O ensaio de atividade biológica com células BAF/3-LLP tem sido frequentemente utilizado pelo nosso grupo.

Resultados reportados por SILVA, 2018 utilizam esse mesmo ensaio de proliferação, nesse caso, a prolactina glicosilada produzida em células de rim de embrião humano (HEK293T) é comparada ao padrão de prolactina glicosilada (G-hPRL) produzida em células de ovário de hamster chinês. A diferença de carboidratos entre as duas prolactinas avaliadas no trabalho de Silva e colaboradores foi o suficiente para gerar respostas diferentes no ensaio de proliferação.

No nosso estudo, a presença da cauda composta por 6 histidinas, o sítio de clivagem da *tag* de trombina, e a metionina inicial na porção N-terminal são modificações que se diferem da hPRL autêntica, e que podem influenciar a interação da proteína com os receptores de hPRL nas células. Embora os resultados de proliferação sejam semelhantes, a hPRLhis apresentou atividade biológica levemente menor.

A figura 26 exemplifica bem a curva de atividade biológica da hPRLhis e da hPRL, onde o comportamento da curva de hPRLhis aparenta uma resposta mais lenta do que a curva das amostras que receberam a hPRL. Mas, analisando a concentração de 1 ng/mL, em ambas as amostras a proliferação celular foi similar.

#### **5.5. Análise por espectrometria de massas - MALDI-TOF**

A análise por MALDI-TOF da hPRL padrão apresentou uma massa de 22.791,652 Da, essa massa molecular obtida difere um pouco da massa de hPRL de outros trabalhos do grupo (22.906 kDa) em análises anteriores

por espectrometria de massas (SOARES et al., 2008). A análise da amostra de hPRLhis apresentou diferentes relações massa/carga, o pico com a massa esperada mais aproximada da proteína seria o de 25.667,458 Da, no entanto, esse pico apresentou uma área pequena.

Esse resultado pode explicar como a hPRLhis está se comportando na análise cromatográfica ao sair com um tempo de retenção maior, o que indica uma massa molecular menor da proteína. Não se sabe ainda se a proteína está sendo degradada ou clivada por alguma proteína contaminante.

Considerando que no nosso processo não realizamos a purificação por afinidade com níquel, já que a centrifugação e lavagem dos CI aparentemente gerou uma proteína pura. Não podemos descartar a presença, mesmo em pouca quantidade, de proteases provenientes do citoplasma bacteriano. Uma forma de minimizar essa possível clivagem por proteínas contaminantes é o uso de inibidores de proteases, como por exemplo o PMSF, nas etapas de isolamento e lavagem dos corpos de inclusão, alguns estudos de renaturação de proteínas já utilizam o PMSF como inibidor (VINCENTELLI et al., 2009; JÜRGEN et al., 2010).

### **5.6. Análise da radiomarcação com <sup>131</sup>I**

A radiomarcação do padrão de hPRL com <sup>131</sup>I pela técnica de marcação direta com cloramina T atingiu um percentual de 88,19% de eficiência do produto marcado. Para chegar nele, foi utilizado 3,7 MBq de <sup>131</sup>I com 50 µg de CLT (figura 31 – D). Esse protocolo de marcação foi desenvolvido com base no trabalho de GREENWOOD; HUNTER; GLOVER, (1963) sobre a radioiodação do hGH, Esse trabalho também serviu de referência para outros projetos do grupo de hormônios hipofisários envolvendo a radiomarcação do hGH.

É importante destacar que Greenwood e Hunter obtiveram cerca de 76% de rendimento na radiomarcação utilizando 5 µg de hormônio, 14-28 MBq de <sup>131</sup>I (ou 380-720 µCi) e 100 µg de CLT. Os parâmetros testados no nosso estudo continham no máximo 50 µg de CLT, e pelos testes de padronização, notamos que ao diminuir a quantidade de CLT (de 50 µg para 10 µg), o rendimento da radiomarcação aumentou.

Esse resultado de marcação é positivo, considerando-se que muitos fatores podem influenciar o rendimento dessa reação, como por exemplo, o tempo de reação, a quantidade de reagentes e de produto a ser marcado, e a preservação da integridade da proteína marcada, haja vista que ela não pode perder sua atividade biológica e conformação estrutural (MARTAL; CHÊNE; DE LA LLOSA, 1985). No entanto, para testes futuros e aplicações *in vivo*, seria ideal que a eficiência da radioiodação chegasse em 95%, ou que a amostra radiomarcada fosse purificada em algum sistema cromatográfico, ou até mesmo um sistema de separação por centrifugação com o objetivo de separar o iodo livre da proteína radiomarcada.

Quanto à radioiodação da hPRLhis, o melhor rendimento obtido nesse estudo foi de 75,32%, para isso a condição utilizada foi de 1,85 MBq com 10 µg de CLT. Em trabalho anterior do nosso grupo (BARTOLINI; RIBELA, 1986) foi constatado que altas concentrações de CLT e metabissulfito de sódio não impactam significativamente na atividade biológica do hGH, no entanto, um ponto interessante no nosso estudo, é que tanto no caso da hPRL como para a hPRLhis, menores concentrações de CLT apresentaram um rendimento de marcação mais alto.

Como a hPRLhis possui 6 histidinas residuais, o esperado era que a marcação direta com o <sup>131</sup>I apresentasse um rendimento maior até que o da hPRL, já que espécies positivas de iodo podem interagir tanto com o anel fenólico da tirosina como com o anel imidazólico da histidina (LAVINAS., 2004), o que não foi observado.

Tanto para ensaios *in vitro* como *in vivo*, padronizar um protocolo de radioiodação que atinja um rendimento de pelo menos 95% ainda é necessário. A partir desses resultados iniciais, podemos avaliar a reação de marcação em diferentes tempos de incubação e diferentes concentrações de hPRL com o objetivo de otimizar esses resultados.

## 6. CONCLUSÃO

A prolactina humana apresenta características de suma importância quanto ao seu papel biológico, e sua relevância aumenta ainda mais em processos patológicos ao ser associada à tumores e distúrbios hipofisários. Sua construção com a cauda de histidina abre perspectivas para análises futuras em diferentes técnicas, utilizando anticorpos anti-histidina, como por exemplo, imunohistoquímica. A imunohistoquímica é amplamente utilizada em diversas áreas da medicina, incluindo patologia cirúrgica, oncologia, pesquisa em doenças, estudos de diagnóstico e prognóstico de câncer, entre outras aplicações.

Nesse caso em particular, a hPRLhis poderá desempenhar um papel crucial para a identificação de marcadores tumorais, na classificação de tumores, na avaliação da expressão de receptores hormonais de prolactina em câncer de mama, e na caracterização de condições patológicas.

A produção de hPRLhis no citoplasma com renaturação por alta pressão hidrostática revelou ser uma técnica capaz de conseguir altos rendimentos proteicos e conservar a estrutura nativa da proteína ao fazer o refolding apropriado.

É indiscutível que ao trabalhar com corpos de inclusão, a técnica eliminou grande parte dos contaminantes citoplasmáticos, e a proteína consegue ser obtida com alto grau de pureza sem nenhuma etapa prévia de purificação. O estudo atual conseguiu em torno de 3 mg de proteína em um total de 5 mL de produto dialisado, a partir de 1 mL de corpos de inclusão isolados, de uma concentração inicial de 38 mg/mL.

Embora existam dados consolidados para afirmar sua atividade biológica, ainda se faz necessária sua caracterização quanto a sua estrutura e tamanho. Não está bem elucidado alguns dos resultados obtidos pela análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF) e HPLC. A proteína parece se comportar de forma instável, mesmo apresentando potencial proliferativo em células tumorais de camundongos.

Quanto a radioiodação, os testes iniciais se mostraram ser promissores, e o desenvolvimento de um protocolo padrão pode otimizar a técnica de radiomarcção tanto para a hPRL autêntica quanto para a hPRLhis.

Este trabalho abre perspectivas futuras de prosseguir com ensaios de ligação da proteína radiomarcada aos receptores de células tumorais, e então poder realizar testes *in vivo* com a proteína radiomarcada para diagnóstico e terapia.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDGENE. Disponível em: <https://www.addgene.org/search/catalog/plasmids/>. Acesso: 25/set/20223.

AFFONSO, R., SOARES, C., RIBELA, M., BARTOLINI, P. High production and optimization of the method for obtaining pure recombinant human prolactin. **Protein Expression and Purification**, v. 152, p. 131–136, dez. 2018.

AHONEN, T. J., HÄRKÖNEN, P., RUI, H., NEVALAINEM, M. PRL Signal Transduction in the Epithelial Compartment of Rat Prostate Maintained as Long-Term Organ Cultures in Vitro. **Endocrinology**, v. 143, n. 1, p. 228–238, 1 jan. 2002.

BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Influence of Chloramine T Iodination on the Biological and Immunological Activity or the Molecular Radius of the Human Growth Hormone Molecule. **Journal of Immunoassay**, v. 7, n. 3, p. 129–138, set. 1986.

CHIBA, C. H., KNIRSCH, M., AZZONI, A., MOREIRA, A., STEPHANO, M. Cell-free protein synthesis: advances on production process for biopharmaceuticals and immunobiological products. **BioTechniques**, v. 70, n. 2, p. 126–133, fev. 2021.

CHURA-CHAMBI, R. M., GENOVA, L., AFFONSO, R., MORGANTI, L. Refolding of endostatin from inclusion bodies using high hydrostatic pressure. **Analytical Biochemistry**, v. 379, n. 1, p. 32–39, ago. 2008.

CHURA-CHAMBI, R. M., PIETRO-DA-SILVA, A., DI LELA, M., OLIVEIRA, J., ABREU, P., ANDRADE JÚNIOR, H., MORGANTI, L. High level SARS-CoV-2 nucleocapsid refolding using mild condition for inclusion bodies solubilization: Application of high pressure at pH 9.0. **PLOS ONE**, v. 17, n. 2, p. e0262591, 3 fev. 2022.

CHURA-CHAMBI, R. M.; FARAH, C. S.; MORGANTI, L. Human growth hormone inclusion bodies present native-like secondary and tertiary structures which can be preserved by mild solubilization for refolding. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 164, 2022.

CONSTANTINO, F. B., CAMARGO, A., SANTOS, S., COLOMBELLI, K., MARTIN, L., SILVA, M., FELISBINO, S., JUSTULIN, L. The prostate response to prolactin modulation in adult castrated rats subjected to testosterone replacement. **Journal of Molecular Histology**, v. 48, n. 5, p. 403–415, 2017.

DOPP, J. L.; JO, Y. R.; REUEL, N. F. Methods to reduce variability in E. Coli-based cell-free protein expression experiments. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 204–211, dez. 2019.

FAHNERT, B.; LILIE, H.; NEUBAUER, P. Inclusion Bodies: Formation and Utilisation. **Adv Biochem Eng Biotechnol** v. 89, p. 93–142, abr. 2004.

FREEMAN, G. J., LONG, A., IWAI, Y., BOURQUE, K., CHERNOVA, T.,

NISHIMURA, H., FITZ, L., MALENKOVCHI, N., OKAZAKI, T., BYRNE, M., HORTON, H., FOUSER, L., CARTER, L., LING, V., BOWMAN, M., CARRENO, B., COLLINS, M., WOOD, C., HONJO, T. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 1027–1034, 2 out. 2000.

GREENWOOD, F.; HUNTER, W.; GLOVER, J. THE PREPARATION OF <sup>131</sup>I-LABELLED HUMAN GROWTH HORMONE OF HIGH SPECIFIC RADIOACTIVITY. **Biochemical Journal**, v. 89, n. 1, p. 114–123, 1 out. 1963.

GUELHO, D., GOMES, L., PAIVA, I., CARRILHO, F. Prolactina e metabolismo – uma perspetiva diferente de uma hormona multifuncional. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 11, n. 2, p. 268–276, jul. 2016.

GUTZMAN, J. H., RUDOWSKI, D., NIKOLAI, S., SCHULER, L. Stat5 activation inhibits prolactin-induced AP-1 activity: distinct prolactin-initiated signals in tumorigenesis dependent on cell context. **Oncogene**, v. 26, n. 43, p. 6341–6348, 20 set. 2007.

HATHAWAY, C. A., RICE, M., COLLINS, L., CHEN, D., FRANK, D., WALKER, S., CLEVINGER, C., TAMIMI, R., TWOROGGER, S., HANKINSON, S. Prolactin levels and breast cancer risk by tumor expression of prolactin-related markers. **Breast Cancer Research**, v. 25, n. 1, p. 24, 2023.

HELLMAN, L. M., ZHAO, C., MELIKISHVILI, M., TAO, X., HOPPER, J., WHITEHEART, S., FRIED, M. Histidine-tag-directed chromophores for tracer analyses in the analytical ultracentrifuge. **Methods**, v. 54, n. 1, p. 31–38, maio. 2011.

HORSEMAN, N. D.; YU-LEE, L.-Y. Transcriptional Regulation by the Helix Bundle Peptide Hormones: Growth Hormone, Prolactin, and Hematopoietic Cytokines. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 5, p. 627–649, out. 1994.

JÜRGEN, B., BREITENSTEIN, A., URLACHER, V., BÜTTNER, K., LIN, H., HECKER, M., SHWEDER, T., NEUBAUER, P. Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 41, 28 dez. 2010.

KLAMMT, C., LOHR, F., SCHAFFER, B., HAASE, W., DOTSCHE, V., RUTERJANS, H., GLAUBITZ, C., BERNHARD, F. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 3, p. 568–580, fev. 2004.

LAVINAS, T. **RADIOIODAÇÃO DE PROTEÍNA POR VIA DIRETA E INDIRETA: ESTUDO COMPARATIVO DA MARCAÇÃO DE PEPTÍDEO QUIMIOTÁTICO**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2004.

LI, Y., CLEVINGER, C., MINKOVSKY, N., KUMAR, K., RAGHUNATH, P., TOMASZEWSKI, J., SPIEGELMAN, V., FUCHS, S. Stabilization of prolactin

receptor in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 25, n. 13, p. 1896–1902, 23 mar. 2006.

LÓPEZ-OZUNA, V. M., HACHIM, I., HACHIM, M., LEBRUN, J., ALI, S. Prolactin Pro-Differentiation Pathway in Triple Negative Breast Cancer: Impact on Prognosis and Potential Therapy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30934, 2 ago. 2016.

LOPEZ-VICCHI, F., De WINNE, C., BRIE, B., SORIANELLO, E., LADYMAN, S., BECU-VILLA-LOBOS, D. Metabolic functions of prolactin: Physiological and pathological aspects. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 32, n. 11, 24 nov. 2020.

MALAVASI, N. V., FOGUEL, D., BONAFE, C., BRAGA, C., CHURA-CHAMBI, R., VIEIRA, J., MORGANTI, L. Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 512–518, 2011.

MARTAL, J.; CHÊNE, N.; DE LA LLOSA, P. Involvement of lysine residues in the binding of hGH and bGH to somatotropic receptors. **FEBS Letters**, v. 180, n. 2, p. 295–299, 28 jan. 1985.

MAXON, H. R.; SMITH, H. S. Radioiodine-131 in the diagnosis and treatment of metastatic well differentiated thyroid cancer. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 685–718, set. 1990.

MENG, J.; TSAI-MORRIS, C.-H.; DUFAU, M. L. Human Prolactin Receptor Variants in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 16, p. 5677–5682, 15 ago. 2004.

NEVALAINEN, M. T. VALVE, E., INGLETON, P., NURMI, M., MARTIKAINEN, P., HARKONEN, P. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 4, p. 618–627, 15 fev. 1997.

NORMAN, N.; TURTER, AA. R. RADIOIMMUNOASSAY STUDIES WITH HUMAN GROWTH HORMONE AND A PITUITARY LIPID MOBILIZING FACTOR. **Acta Endocrinologica**, v. 58, n. 2, p. 318–338, jun. 1968.

ORTH, J. H. C., SCHORCH, B., BOUNDY, S., FFRENCH-CONSTANT, R., KUBICK, S., AKTORIES, K. Cell-free synthesis and characterization of a novel cytotoxic pierisin-like protein from the cabbage butterfly *Pieris rapae*. **Toxicon**, v. 57, n. 2, p. 199–207, 2011.

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONCADA, S.; RAMÍREZ, O. T. Production of Recombinant Proteins. Em: BALBÁS, P.; LORENCE, A. (Eds.). **Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. p. 15–51.

RANDOLPH, T. W.; SEEFELDT, M.; CARPENTER, J. F. High hydrostatic pressure as a tool to study protein aggregation and amyloidosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1595, n. 1–2, p. 224–234, mar. 2002.

RODRIGUES, D. **UTILIZAÇÃO DE ALTAS PRESSÕES HIDROSTATICAS PARA O ESTUDO E RENATURAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ESTRUTURA QUARTERNARIA**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2012.

ROSA DA SILVA, C. M., CHURA-CHAMBI, R., RAMOS PEREIRA, L., CORDEIRO, Y., de SOUZA FERREIRA, L., MORGANTI, L. Association of high pressure and alkaline condition for solubilization of inclusion bodies and refolding of the NS1 protein from zika virus. **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 78, 12 dez. 2018.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 17 abr. 2014.

SAPIENZA, M. T., ENDO, I., CAMPOS NETO, G., TAVARES, M., MARONE, M.. Tratamento do carcinoma diferenciado da tireóide com iodo-131: intervenções para aumentar a dose absorvida de radiação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 3, p. 341–349, jun. 2005.

SILVA, F. D. **Estudo dos perfis de N-glicosilação da prolactina recombinante humana expressa em células humanas HEK293**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 12 nov. 2018.

SOARES, C. R. J., MORGANTI, L., MILOUX, B., LUPKER, J., FERRARA, P., BARTOLINI, P. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-hamster ovary cells. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 127, 1 out. 2000.

SOARES, C. R. J., GOMIDE, F., UEDA, E., BARTOLINI, P. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the PL promoter: use of HPLC for product quantification. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 16, n. 12, p. 1131–1138, 1 dez. 2003.

SOARES, C. R. J., GLEZER, A., OKAZAKI, K., UEDA, E., HELLER, S., WALKER, A., 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 Expression and Purification**, v. 48, n. 2, p. 182–194, ago. 2006.

SOARES, C. R. J., UEDA, E., OLIVEIRA, T., GOMIDE, F., HELLER, S., BARTOLINI, P. Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: Temperature plays a major role in protein yields. **Journal of Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 27–35, 2008.

ST. JOHN, R. J.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 23, p. 13029–13033, 9 nov. 1999.

SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I.,

JEMAL, A., BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

SUZUKI, M. F., ARTHUSO, F., OLIVEIRA, J., OLIVEIRA, T., GOULART, H., CAPONE, M., RIBELA, M., BARTOLINI, P., SOARES, C. Expression, purification, and characterization of authentic mouse prolactin obtained in Escherichia coli periplasmic space. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 178–185, 1 maio 2012.

TAN, E., CHIN, C., LIM, Z., NG, S. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 13 dez. 2021.

TATE, C.G. Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *Febs Letters*, v.504, n.3, p. 94-98, out. 2004

TEILUM, K., HOCH, J., GOFFIN, V., KINET, S., MARTIAL, J., KRAGELUND, B. Solution Structure of Human Prolactin. **Journal of Molecular Biology**, v. 351, n. 4, p. 810–823, ago. 2005.

TRUONG, A. T., DUEZ, C., BELAYEW, A., RENARD, A., PICTET, R., BELL, J., MARTIAL, J. Isolation and characterization of the human prolactin gene. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 2, p. 429–437, fev. 1984.

TWOROGGER, S. S., ELIASSEN, A., ROSNER, B., SLUSS, P., HANKINSON, S. Plasma Prolactin Concentrations and Risk of Postmenopausal Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 18, p. 6814–6819, 15 set. 2004.

UEDA, E., OZERDEM, U., CHEN, Y., YAO, M., HUANG, K., SUN, H., MARTINS-GREEN, M., BARTOLINI, P., WALKER, A. A molecular mimic demonstrates that phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone. **Endocrine-Related Cancer**, v. 13, n. 1, p. 95–111, mar. 2006.

UEDA, E. K. M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic Escherichia coli extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 922, n. 1–2, p. 165–175, jul. 2001.

UMETSU, M., TSUMOTO, K., HARA, M., ASHISH, K., GODA, S., ADCHIRI, T., KUMAGAI, I. How Additives Influence the Refolding of Immunoglobulin-folded Proteins in a Stepwise Dialysis System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 8979–8987, mar. 2003.

VALLEJO, N. **ESTUDOS DE RENATURAÇÃO DE PROTEÍNAS AGREGADAS UTILIZANDO ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2013.

VINCENELLI, R., CANAAN, S., CAMPANACCI, V., VALENCIA, C., MAURIN, D.,

FRASSINETTI, F., SCAPPUCINI-CALVO, L., BOURNE, Y., CABBILLAU, C., BIGNON, C. High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. **Protein Science**, v. 13, n. 10, p. 2782–2792, 1 jan. 2009.

WILLIAM STUDIER, F., ROSENBERG, A., DUNN, J., DUBERDONFF, J. [6] Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in Enzymology**.v. 185 p. 60–89. 1990.

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino**  
**Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000**  
**Fone/Fax(0XX11) 3133-8908**  
**SÃO PAULO – São Paulo – Brasil**  
**<http://www.ipen.br>**

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**