

Aplicação do bioensaio Ba/F3-LLP na determinação da potência biológica da prolactina humana glicosilada (G-hPRL)

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

INTRODUÇÃO

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

É mais conhecida por estimular a lactação, crescimento e desenvolvimento da glândula mamária, mas está também relacionada com mais de trezentas funções diferentes. Possui importante uso diagnóstico, porém suas possíveis aplicações clínicas ainda estão em fase de estudo. Apresenta duas isoformas principais a Prolactina Não Glicosilada (NG-hPRL) e a Prolactina Glicosilada (G-hPRL) [1]. Nesse estudo a atividade ou potência das diferentes isoformas de prolactina foram avaliadas por dois bioensaios: o bioensaio clássico utilizando células Nb2, derivadas de linfoma de rato e outro desenvolvido em nosso laboratório utilizando células Ba/F₃-LLP. Essas últimas, além de serem prolactino-dependentes foram transfectadas com receptor humano para prolactina, apresenta, portanto a vantagem em relação ao bioensaio com células Nb2 de ser um ensaio espécie-específico.

OBJETIVO

O projeto tem como meta a padronização e aplicação de bioensaios *in vitro* Ba/F₃-LLP e Nb2 para a avaliação da potência biológica de isoformas de prolactina humana.

METODOLOGIA

A atividade lactogênica da hPRL e de seus análogos foi determinada utilizando o ensaio de proliferação de células de linfoma de rato Nb2 e/ou Ba/F₃-LLP. Estas células por serem prolactino-dependentes têm sua multiplicação relacionada à quantidade e à potência da PRL presente na amostra, gerando assim uma curva dose-resposta. Foi utilizado como padrão de referência o 3º Padrão

Internacional de Prolactina Humana WHO 84/50 de 1988 ou o WHO 97/714 de 2001, com atividade específica de 21,2 UI/mg e 57,2 UI/mg, respectivamente. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços (20 a 50k células/poço). Após incubação por 72h, a 37°C e com 5% CO₂ as células foram quantificadas por leitura a 490 nm, após adição da solução MTS-PMS (Cell Titer 96 Aqueous Kit, Promega Corp., Madison, WI) segundo especificações do fabricante [2].

RESULTADOS

Um exemplo de curva de proliferação utilizando células Ba/F₃-LLP é apresentado na Figura 1. Esse ensaio apresenta uma sensibilidade de resposta da ordem de 50 picogramas de hPRL/mL e a leitura após 2 horas de incubação com MTS-PMS foi a que apresentou melhor resposta.

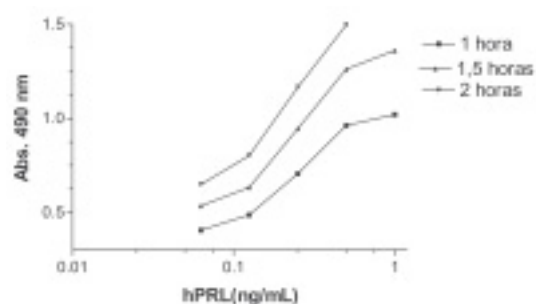


Figura 1. Exemplo de ensaio proliferativo com células Ba/F₃-LLP utilizando o padrão de hPRL recombinante WHO-CRS. São comparadas curvas dose-resposta obtidas com diferentes tempos de incubação após adição da solução MTS-PMS

Na Figura 2 temos um exemplo de ensaio com células Ba/F₃-LLP, onde são comparadas as potências de amostras de G-hPRL e NG-hPRL. Esses dados mostram que a G-hPRL apresenta uma potência de 37,4 UI/mg, inferior à potência da NG-hPRL calculada em 111,8 UI/mg.

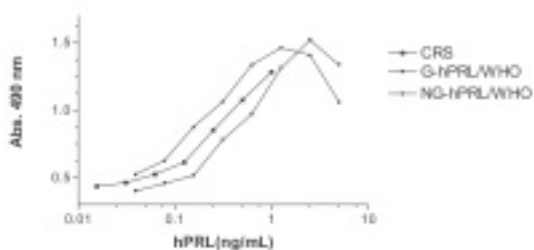


Figura 2: Ensaio proliferativo com células Ba/F₃-LLP comparando a curva dose-resposta da G-hPRL e NG-hPRL frente ao padrão de hPRL 97/714 da WHO

Na Figura 3 temos um exemplo de ensaio em células Nb2 onde são comparadas as potências de amostras de G-hPRL e NG-hPRL fornecidas pela WHO. Esses dados mostram que a G-hPRL apresenta uma potência cerca de 3 vezes inferior à potência da NG-hPRL, neste caso a sensibilidade de resposta foi da ordem de 20 pghPRL/mL.

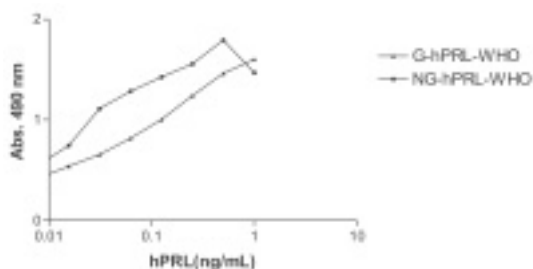


Figura 3: Ensaio proliferativo com células Nb2 comparando a curva dose-resposta da G-hPRL e NG-hPRL

CONCLUSÕES

O ensaio de proliferação com células Ba/F3-LLP apresenta alta sensibilidade (~ 50 pghPRL/mL), similar à sensibilidade do ensaio clássico com células Nb2 (~ 20 pghPRL/mL). A melhor resposta foi obtida com 2 horas de incubação, após adição do reagente MTS-PMS.

A G-hPRL, tanto no ensaio com células Ba/F3-LLP como com células Nb2, apresentou atividade biológica menor, aproximadamente 30% do valor da isoforma NG-hPRL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Soares, C.R.J., Morganti, L., Miloux, B., Lupker, J.H., Ferrara, P., and Bartolini, P. 2000. High level synthesis of human prolactin in Chinese Hamster Ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32:127-135.
- [2] Soares, C. R., A. Glezer, K. Okazaki, E. K. Ueda, S. R. Heller, A. M. Walker, V. Goffin, and P. Bartolini. 2006. Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial

bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Protein Expr Purif* 48:182-94.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/PIBIC e FAPESP