

Expressão da tireotrofina humana (hTSH) em células de rim de embrião humano (Expi293F™) cultivadas em suspensão

Renan Passos Freire e Carlos Roberto Jorge Soares
Centro de Biotecnologia – IPEN

INTRODUÇÃO

O grupo de pesquisa sobre hormônios hipofisários do Centro de Biotecnologia do IPEN, possui vasta experiência na expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos e bactérias *Escherichia coli* [1-2]. Células derivadas de ovário de hamster chinês (CHO) e de rim de embrião humano (HEK293) são amplamente utilizadas para expressão de proteínas recombinantes, tanto em culturas aderentes como em suspensão, pela facilidade de serem cultivadas e apresentarem altos níveis de expressão [3]. Neste projeto foram utilizadas células HEK293 adaptadas para o crescimento em suspensão, chamadas de Expi293F™, para a expressão transiente da tireotrofina humana (hTSH).

A tireotrofina é um hormônio pituitário heterodimérico que possui duas subunidades unidas não covalentemente (α e β) que atua na regulação de funções da tireoide, como a captação de iodo, indução da produção de hormônios tireoidianos (T3 e T4) e crescimento da glândula [4]. Esta pesquisa se justifica, pois após revisão da literatura constatamos que não há relatos sobre a expressão da tireotrofina em células humanas em suspensão, o que poderá contribuir para um produto muito similar ao hipofisário humano quanto aos padrões de glicosilação.

Estas características nos impulsionaram a estudar essa metodologia quanto aos níveis de expressão e caracterização físico-química.

OBJETIVO

O trabalho teve como objetivo a expressão da tireotrofina humana (hTSH) em células Expi293™ cultivadas em suspensão e sua caracterização físico-química.

METODOLOGIA

As subunidades α e β do hTSH foram inseridas no vetor pcDNA 3.4 TOPO® separadamente. Após amplificação na cepa DH5 α , 15 μ g de cada plasmídeo purificado foram utilizados para transfectar 75×10^6 células Expi293F™ em 30 mL de meio em um erlenmeyer de 125 mL, usando 81 μ L do agente transfectante Expifectamine™. Após 16 horas da transfecção, foram adicionados 150 μ L do *enhancer* 1 e 1,5 mL do *enhancer* 2 no meio transfectado. A cultura foi mantida por dois dias em uma incubadora a 37 °C, 8% de CO₂ sobre um agitador orbital ajustado para 125 rpm.

O meio condicionado foi coletado no segundo dia após a transfecção e armazenado até o momento da purificação a -80 °C. As células, o agente transfectante, o vetor, os *enhancers* e o meio de cultura utilizados neste trabalho fazem parte do kit *Expi293™ expression system*® (ThermoFisher Scientific). Para a análise da expressão de hTSH foram realizados eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condição não reduzida (SDS-PAGE) e análise do meio condicionado em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e de exclusão molecular (HPSEC), comparando com o produto comercial expresso em células CHO (Thyrogen, Genzyme).

RESULTADOS

A análise em SDS-PAGE confirmou a presença de hTSH (28 a 30 kDa) no meio condicionado coletado após dois dias da transfecção com os plasmídeos contendo o cDNA das subunidades α e β do hTSH (Figura 1A). A expressão foi quantificada por RP-HPLC (Figura 1B). A concentração no meio foi de $76,95 \pm 16,05 \mu\text{g hTSH/mL}$ ($n = 2$) no segundo dia de produção. O pico coletado da RP-HPLC foi analisado por HPSEC e o tempo de retenção de 17,8 min foi o mesmo do padrão comercial Thyrogen® (Genzyme) produzido em células CHO (Figura 1C), confirmando a identidade do produto hTSH.

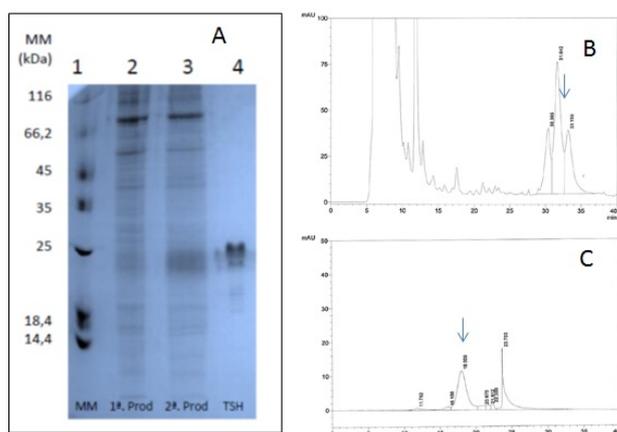


Figura 1. (A) SDS-PAGE do meio condicionado de células Expi293™ transfectadas com pcDNA 3.4 TOPO® hTSH α e pcDNA 3.4 TOPO® hTSH β . 1) Marcador de massa molecular; 2) meio condicionado contendo hTSH (1ª. Produção); 3) meio condicionado contendo hTSH (2ª. Produção); 4) padrão comercial de hTSH (Thyrogen®, Genzyme). **(B)** Cromatograma do meio condicionado analisado em RP-HPLC. **(C)** Cromatograma obtido em HPSEC do pico coletado da RP-HPLC. A seta em azul indica o tempo de retenção do padrão comercial de hTSH.

Enquanto no sistema de cultivo em suspensão de células Expi293F™ utilizamos 120 mL de meio condicionado em dois dias, a produção correspondente para células HEK293T aderentes necessitaria de 3000 mL em cinco dias [5]. Além da redução do tempo de produção e da manipulação para obtenção da

quantidade necessária e suficiente de hTSH para futuras análises *in vivo* e *in vitro*.

CONCLUSÕES

A expressão de hTSH em células humanas Expi293F™ em suspensão foi obtida com sucesso. As análises por técnicas físico-químicas confirmaram o tamanho, os níveis de expressão e a identidade do produto. Estudos futuros serão conduzidos para a produção e purificação da proteína em maior escala visando a caracterização da cadeia de glicanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SOARES, C.R.J. *Síntese de prolactina humana em células de ovário de hamster chinês (CHO)*. 2000. 94 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- [2] SUZUKI, M.F. *et al.* **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 178-185, 2012.
- [3] LIU, C. *et al.* **Molecular Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 141-153, 2008.
- [4] SZKUDLINSKI, M.W. *et al.* **Physiological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 473-502, 2002.
- [5] SANT'ANA, P.M. *Expressão de tireotrofina humana em células de embrião de rim humano (HEK293)*. 2016. 68 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

Este projeto foi financiado pelo CNPq (101573/2017-0 e 147019/2017-6) e pela FAPESP (2015/26058-0).