

## PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA UTILIZAÇÃO EM TESTE DE DETECÇÃO DE DOPING COM ERITROPOETINA

CAMILA BONEMANN BENDER<sup>1</sup>; THAÍS FARIAS COLLARES<sup>2</sup>; GIZELE LIMA DE SÁ<sup>2</sup>; DIENE DE BORBA PACHECO<sup>2</sup>; BIANCA SICA SIEDLER<sup>2</sup>; CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Graduanda em Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – camilabbender@gmail.com*

<sup>2</sup> *Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – collares.thais@gmail.com; gezelha@hotmail.com; diene.pchc@hotmail.com; bssiedler@gmail.com.*

<sup>3</sup> *Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – hartlebenclaudia@gmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

A eritropoetina (EPO) é um hormônio glicoproteico responsável pela regulação homeostática da produção de células vermelhas do sangue. A Eritropoetina Humana Recombinante (rHuEPO) tem sido produzida com sucesso em culturas celulares de mamíferos desde os anos 80 e possui várias aplicações terapêuticas, tais como, o tratamento de anemia e policitemia em pacientes com doença renal crônica, em tratamento para AIDS e câncer (COLLARES, et al., 2013).

Devido à sua capacidade inerente de estimular a produção de glóbulos vermelhos e, com isso, aumentar o aporte de oxigênio para os tecidos, a utilização da EPO no esporte foi proibida pelo Comitê Olímpico Internacional (COI), considerando assim o uso de EPO e de seus análogos como casos de doping sanguíneo (BENTO, et al., 2003).

Estratégias de detecção do doping com rHuEPO incluem abordagens indiretas com marcadores da eritropoiese aumentada ou reduzida, bem como a detecção direta das isoformas recombinantes (EKBLÖM, 2000).

O estudo para o desenvolvimento de testes diagnóstico para o doping por eritropoetina faz-se necessário uma vez que tanto os testes hoje disponíveis como os anticorpos monoclonais utilizados possuem falhas e custo elevado. Por este motivo o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma proteína recombinante para uso na produção de anticorpos monoclonais, que serão utilizados em métodos de detecção do doping com eritropoetina.

### 2. METODOLOGIA

A proteína EPO recombinante (rEPO) foi produzida através da clonagem e expressão gênica em sistema procarioto segundo protocolo estabelecido (SAMBROOK and RUSSEL, 2001). Resumidamente, para a obtenção da rEPO um gene sintético foi construído com auxílio do programa Vector NTI10 (Invitrogen). A seqüência gênica da EPO presente no plasmídeo PUC foi inserida na bactéria *Escherichia coli* cepa DH5- $\alpha$  eletrocompetente e esta cultivada em meio Luria-Bertani líquido (LB), suplementado com ampicilina. Após, foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o Kit Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). O inserto EPO foi isolado utilizando as enzimas de restrição *Kpn* I e *Bam*HI e então inserido no vetor de expressão pAE utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). O produto da ligação foi utilizado na transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetente, e os plasmídeos recombinantes contendo o inserto na

orientação horária foram selecionados e denominados pAE/EPO. Dois plasmídeos já foram utilizados na transformação por choque térmico de células competentes de *E. coli* cepa BL21 Star™(DE3) as quais foram cultivadas em meio LB. Para avaliar a expressão e solubilidade da rEPO, a *E. coli* cepa BL21 Star™(DE3) contendo pAE/EPO foi cultivada em meio LB até a DO 0,6 (600 nm) e o cultivo submetido a centrifugação. Parte do pellet resultante foi ressuscitado em tampão de eluição (TE:10mM Tris-HCl pH=8 e 1mM EDTA), sonificado e centrifugado; o pellet e o sobrenadante derivados desta centrifugação foram submetidos à eletroforese e *Western blotting* a fim de aferir a solubilidade da proteína recombinante. Para o *Western blotting* foi utilizado anti-histidina (Sigma-Aldrich) produzido em camundongo como anticorpo primário e anti-mouse conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) como anticorpo secundário. As bandas foram visualizadas utilizando solução substrato/cromógena (0,6 mg diaminobenzidina, 0,03% de sulfato de níquel, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0 e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região codificadora da EPO foi clonada e expressa em sistema procarioto. A partir do produto da ligação foram obtidos doze clones recombinantes (pAE/EPO), dos quais dois liberaram um fragmento de tamanho esperado quando submetidos à digestão com as enzimas *Kpn* I e *Bam* HI. Os dois clones recombinantes obtidos foram utilizados para transformar *E. coli* BL21 STAR, e somente um deles expressou rEPO com eficiência, uma vez que na análise por SDS-PAGE 12 % e *Western Blotting*, identificou-se uma banda característica e de tamanho esperado (~ 21,5 KDa ) conforme ilustrado na Figura 1.



**Figura 1:** Avaliação da expressão e solubilidade da proteína recombinante EPO (~ 21,5 KDa) em *E. coli* BL21 STAR por *Western Blotting*. (1) Controle positivo: rLipL32 (~ 32 KDa); (2) Extrato bacteriano; (3) pAE/EPO 1, colônia transformada 1; (4) pAE/EPO 1, colônia transformada 3; (5) pAE/EPO 5, colônia transformada 1; (6) pAE/EPO 5, colônia transformada 2; (7) pAE/EPO 1 pellett da colônia sonicada 1; (8) pAE/EPO 1 pellett da colônia sonicada 3; (9) pAE/EPO 5 pellett da colônia sonicada 1; (10) pAE/EPO 5 pellett da colônia sonicada 2; (11) pAE/EPO 1 sobrenadante da colônia sonicada 1; (12) pAE/EPO 1 sobrenadante da colônia sonicada 3; (13) pAE/EPO 5 sobrenadante da colônia sonicada 1; (14) pAE/EPO 5 sobrenadante da colônia sonicada 2; (15) Full Range Rainbow Marker (GE. Healthcare). O agente de indução de expressão IPTG foi utilizado em todos os cultivos.

Atualmente algumas linhagens celulares, como a linhagem ovário de hamster chinês (CHO), são comumente utilizadas na produção de glicoproteínas humanas recombinantes (GHADERI et al., 2012), incluindo rHuEPO (JEONG et al., 2008). No entanto, este sistema é oneroso e laborioso quando comparado com um sistema procarioto. O baixo custo e a simplicidade do cultivo de bactérias fazem o sistema de expressão *E. coli* uma boa alternativa para a produção de proteínas recombinantes tanto em escala laboratorial como industrial (KAMIONKA, 2011). Como o presente estudo possui como objetivo a utilização da eritropoetina em testes laboratoriais como ELISA e *Western Blotting*, a rEPO não necessita de atividade biológica podendo ser expressa em sistema procarioto como a *E. coli*, o qual não possui maquinaria de glicosilação.

#### 4. CONCLUSÕES

A clonagem e expressão do gene sintético que codifica para a eritropoetina foi realizada com sucesso. O seguimento deste estudo inclui a utilização da rEPO para imunizar camundongos visando a produção de anticorpos monoclonais e ensaios de detecção do doping com eritropoetina.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENTO, R. M. A; DAMASCENO L. M. P; NETO, F. R. A. Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 9, n.3, p. 169-180.

COLLARES, T.F.; MONTE, L.G.; CAMPOS, V.F.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.V.; DELLAGOSTIN, O.; HARTLEBEN, C.P. Development of polyclonal antibodies for the detection of recombinant human erythropoietin. **African Journal of Biotechnology**, v. 12(37), p. 5595-5598, 2013.

EKBLOM, B.T. Blood boosting and sport. *Baillière's Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.14, n.1, p.89-98, 2000.

GHADERI D; ZHANG M; HURTADO-ZIOLA N; VARKI A. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact and challenges of non-human sialylation. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v.28, p. 147-175.

JEONG YT, CHOI O, LIM HR, SON YD, KIM HJ, KIM JH. Enhanced sialylation of recombinant erythropoietin in CHO cells by human glycosyltransferase expression. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1945-1952, 2008.

KAMIONKA, M. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.12, n.2, p. 268-274, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.