

XU Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

28^o

Encontro de Iniciação Científica da UENF

20^o

Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

16^a

Jornada de Iniciação Científica da UFF



UIII Congresso Fluminense de Pós-Graduação

23^a

Mostra de Pós-Graduação da UENF

8^a

Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

8^a

Mostra de Pós-Graduação da UFF

Estabelecimento de protocolo de indução da secreção de proteínas do leite em cultura de células epiteliais de glândula mamária bovina

Paulo Vitor Maravilha Braga, Paula Magnelli Mangiavacchi, Letícia dos Santos Nascimento, Jéssica Macedo Rafael de Arruda, Mariana da Silva Mendonça, Carla Sobrinho Paes de Carvalho, Maria Clara Caldas Bussiere, Angelo José Burla Dias, Alvaro Fabricio Lopes Rios

Linhagens celulares têm sido utilizadas com êxito para produção de proteínas recombinantes de interesse humano, usando animais, plantas e/ou microrganismos geneticamente modificados. As células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) apresentam vantagens em relação à secreção de proteínas reguladas por promotores gênicos que respondem a estímulos hormonais, permitindo a produção de biofármacos para tratar diversas doenças humanas, com todas as modificações pós-traducionais necessárias. O desenvolvimento de linhagens de bMECs capazes de secretar proteínas do leite após protocolos de indução poderá servir de modelo para produção de proteínas recombinantes em animais transgênicos. Ao suplementar o meio de cultura com hormônios é possível obter níveis de proteínas semelhantes aos encontrados no tecido *in vivo*, permitindo o uso dessas linhagens celulares como doadoras de núcleo para produção de biorreatores geneticamente modificados pela técnica de clonagem por transferência nuclear. Para tal, o atual projeto visa estabelecer protocolos que promovam a indução das bMECs a secretarem proteínas do leite durante o cultivo *in vitro*, com ou sem matriz extracelular. Será realizada a identificação das proteínas do leite no meio de cultura, após indução, por Western-Blotting. Será ainda avaliada a expressão dos marcadores de expressão gênica da glândula mamária (*CSN2*, *BLG* e *BTN1A1*) por Real Time - qPCR. As culturas de bMECs serão distribuídas em quatro tratamentos, na presença ou ausência de matriz extracelular (concentração de 0,2mg e 5 mg), além de um cultivo de fibroblastos como controle negativo. A indução da secreção de proteínas será realizada pela suplementação do meio de cultura com insulina, hidrocortisona, progesterona, estradiol e EGF. Resultados preliminares mostram que as características morfológicas de bMECs foram perdidas após três passagens celulares em meio de cultivo sem indução e sem matriz, sendo esta confirmada após a não identificação dos marcadores gênicos. O cultivo de fibroblastos (até a décima passagem), apresentou transcrição gênica somente para *BLG*, corroborando com dados na literatura. Com o sucesso ao isolar as bMECs, o cultivo do grupo com indução e sem matriz foi iniciado e coletadas amostras até a segunda passagem, sendo no momento analisadas qualitativamente a presença dos marcadores gênicos da glândula mamária. Portanto, o protocolo de cultivo foi estabelecido após número satisfatório de tripsinizações, além da análise por Real-Time em um dos grupos. Sendo assim, com a progressão do projeto, a indução será realizada nos demais grupos, assim como a análise quantitativa da expressão das proteínas do leite designadas.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: UENF
Eixo temático: Biociências/Biotecnologia animal
Fomento da bolsa (quando aplicável): CNPq

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:



XU Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

28^o

Encontro de Iniciação Científica da UENF

20^o

Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

16^a

Jornada de Iniciação Científica da UFF



UIII Congresso Fluminense de Pós-Graduação

23^a

Mostra de Pós-Graduação da UENF

8^a

Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

8^a

Mostra de Pós-Graduação da UFF

Establishment of a protocol for inducing milk protein secretion in bovine mammary epithelial cell culture

Paulo Vitor Maravilha Braga, Paula Magnelli Mangiavacchi, Letícia dos Santos Nascimento, Jéssica Macedo Rafael de Arruda, Mariana da Silva Mendonça, Carla Sobrinho Paes de Carvalho, Maria Clara Caldas Bussiere, Angelo José Burla Dias, Alvaro Fabricio Lopes Rios

Cell lines have been successfully used for the production of recombinant proteins of human interest, using genetically modified animals, plants, and/or microorganisms. Bovine mammary epithelial cells (bMECs) offer advantages in terms of secreting proteins regulated by gene promoters that respond to hormonal stimuli, allowing the production of biopharmaceuticals to treat various human diseases, with all the necessary post-translational modifications. The development of bMEC lines capable of secreting milk proteins after induction protocols can serve as a model for the production of recombinant proteins in transgenic animals. By supplementing the culture medium with hormones, it is possible to obtain protein levels similar to those found *in vivo*, enabling the use of these cell lines as nucleus donors for the production of genetically modified bioreactors through nuclear transfer cloning techniques. To that end, the current project aims to establish protocols that promote the induction of bMECs to secrete milk proteins during *in vitro* cultivation, with or without extracellular matrix. The identification of milk proteins in the culture medium after induction will be performed using Western blotting. The expression of mammary gland gene expression markers (*CSN2*, *BLG* and *BTN1A1*) will also be evaluated by Real-Time qPCR. The bMEC cultures will be distributed into four treatments, in the presence or absence of extracellular matrix (at concentrations of 0.2 mg and 5 mg), in addition to a fibroblast culture as a negative control. The induction of protein secretion will be performed by supplementing the culture medium with insulin, hydrocortisone, progesterone, estradiol and EGF. Preliminary results show that the morphological characteristics of bMECs were lost after three cell passages in non-induced and matrix-free culture medium, which was confirmed by the absence of gene markers. The fibroblast culture (up to the tenth passage) showed gene transcription only for *BLG*, corroborating data in the literature. With successful isolation of bMECs, the culture of the induction group without matrix was initiated, and samples were collected up to the second passage, currently being qualitatively analyzed for the presence of mammary gland gene markers. Therefore, the culture protocol was established after a satisfactory number of trypsinizations, along with Real-Time analysis in one of the groups. As the project progresses, induction will be performed in the remaining groups, as well as quantitative analysis of the expression of the designated milk proteins.

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:

