

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**SECRETARIA DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
HUMANO À MEMBRANA MICROSSOMAL DE FÍGADO  
DE MULHER GRÁVIDA**

Esther Piltcher Haber

Tese de Doutorado como parte dos  
requisitos para obtenção do Título de  
"Doutor na Área de Concentração em  
Tecnologia Nuclear Básica".

**Orientador: Dr. Wilian Nicolau**

**São Paulo**  
**1990**

---

## ERRATA

Devido falha técnica, o texto da página 44 segue na página 46.

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

**CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
HUMANO À MEMBRANA MICROSSOMAL DE FÍGADO  
DE MULHER GRÁVIDA**

**Esther Piltcher Haber**



**Tese de Doutorado apresentada como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor na Área de Concentração em  
Tecnologia Nuclear Básica**

**Orientador: Dr. Wilian Nicolau**

**SÃO PAULO**

**1990**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP - IPEN**

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Wiliam Nicolau, pela orientação e pela oportunidade que me concedeu de realizar a parte experimental deste trabalho no Laboratório de Pesquisas Clínicas da 1a. Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP.

Ao Dr. Homero D' Abronzo, por sua inestimável colaboração na orientação do presente trabalho, durante o qual muito me ensinou.

À Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, por seu constante apoio e suas valiosas sugestões e orientações.

À Dra. Vânia Cairá Borghi, pela orientação inicial e por seu estímulo para que eu efetivasse o Doutorado.

Ao Dr. José Roberto Rogero, por seu apoio na realização desta tese.

Ao Dr. Renato M.E. Sabbatini, por seu apoio e interesse em minha formação.

Ao Dr. Marcelo Zugaib e Dr. Wun N. Kans, pela participação na coleta de amostras séricas de mulheres grávidas no Ambulatório de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da USP.

Aos colegas do Laboratório de Radioimunoensaio da 1a. Clínica Médica do Hospital das Clínicas, Laboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas e Laboratório de Carboidratos da Faculdade de Medicina da USP e Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, por sua colaboração direta ou indireta.

À Maria do Carmo Costa Falcão, por sua colaboração no processamento dos dados experimentais junto ao Centro de Processamento de Dados do IPEN/CNEN-SP.

À Renata Maia, pela digitação e composição estética da tese de Doutorado.

À minha família, pelo constante apoio e compreensão.

## INDICE

	PAG.
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	9
2. MATERIAL E MÉTODO .....	15
2.1. Obtenção de fígado de mulher grávida .....	15
2.2. Preparo de receptores de hGH .....	15
2.3. Hormônios usados .....	17
2.4. Radioiodação dos hormônios .....	18
2.5. Purificação do hormônio iodado .....	19
2.6. Procedimento da incubação .....	21
2.7. Determinação dos níveis de prolactina e hormônio lactogênio placentário .....	22
2.8. Processamento e análise dos dados experimentais obtidos .....	22
3. RESULTADOS .....	25
3.1. Efeito da concentração do receptor na ligação específica de 125I-hGH .....	25
3.2. Efeito de tempo e temperatura na ligação específica de 125I-hGH .....	25
3.3. Efeito de cátions mono e divalentes na ligação específica de 125I-hGH .....	27
3.4. Efeito de poliaminas na ligação específica de 125I-hGH .....	29
3.5. Efeito do soro sem hGH na ligação específica de 125hGH .....	29
3.6. Análise dos parâmetros de ligação de 125I-hGH .....	31
3.7. Comparação do soro de pacientes acromegálicos com hGH padrão para determinação do paralelismo .....	33
3.8. Correlação entre os níveis séricos de hGH dosados por ra- dioreceptorensaio, ensaio imunorradiométrico e radioimuno- ensaio .....	36
3.9. Especificidade dos sítios de ligação .....	38
3.10. Dosagem de hGH em amostras séricas de mulheres grávidas .....	40
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
HUMANO À MEMBRANA MICROSSOMAL DE FÍGADO  
DE MULHER GRÁVIDA

Esther Piltcher Haber

RESUMO

O presente trabalho descreve algumas das características da ligação do hormônio de crescimento em um sistema homólogo, usando GH humano e membrana microssomal obtida de fígado de mulher grávida. Com a adição de 15000 cpm de  $^{125}\text{I-hGH}$  a 20  $\mu\text{L}$  de membrana microssomal (2.5 mg/mL), a ligação específica variou de 20 a 40%. A ligação de  $^{125}\text{I-hGH}$  à fração microssomal de fígado de mulher grávida depende da concentração de receptores, tempo e temperatura de incubação, da presença de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$  ou  $\text{Mg}^{+2}$ ) e do soro sem hGH.

À análise de Scatchard, constatou-se a existência de uma nova classe de receptor específico para hGH, sugerindo a presença de dois sítios de ligação com afinidades diferentes no fígado humano. Um dos sítios de ligação tem uma constante de afinidade ( $K_A$ ) da mesma ordem de magnitude dos previamente encontrados em fígado humano ( $0.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) e linfócitos ( $1.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) enquanto que o outro tem um valor de  $K_A$  20 vezes maior.

A prolactina humana não teve efeito no deslocamento de  $^{125}\text{I}$ -hGH em concentrações até 250 ng/mL. O hormônio lactogênio placentário em altas concentrações deslocou  $^{125}\text{I}$ -hGH com uma potência relativa de 0,3%. A competição de hPL com o hGH na ligação a seus receptores hepáticos ocorre pelo fato do hPL apresentar 85% de homologia em sua estrutura primária em relação ao hGH.

Quando amostras com diferentes concentrações de hGH foram testadas pelo presente ensaio, uma boa correlação foi observada entre as estimativas das concentrações séricas obtidas por radioimunoensaio e ensaio imunoradiométrico. Assim sendo, este radioreceptorensaio, com uma sensibilidade de 0,6 ug/L GH no soro, pode ser usado para dosagem dos níveis séricos de hGH fora da gravidez.



CHARACTERIZATION OF HUMAN GROWTH HORMONE BINDING  
TO MICROSOMAL MEMBRANE FROM  
PREGNANT WOMAN LIVER

Esther Piltcher Haber

ABSTRACT

The present investigation describes some characteristics of growth hormone binding in an homologous system, using hGH and microsomal membrane obtained from liver of pregnant woman. With the addition of 15000 cpm  $^{125}\text{I}$ -hGH to 20  $\mu\text{L}$  of microsomal membrane (2.5 mg/mL), the specific binding ranged from 20 to 40%. The  $^{125}\text{I}$ -hGH binding to the microsomal fraction of pregnant liver depends on the receptor concentration, time and temperature of incubation, presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{+2}$  or  $\text{Mg}^{+2}$ ) and serum without hGH.

Scatchard analysis indicated the existence of a new class of specific receptor to hGH, suggesting the presence of two binding sites with different affinities in the liver of pregnant women. One of these binding sites has one affinity constant ( $K_A$ ) of the same order of magnitude as previously reported to human liver ( $0.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) and lymphocytes ( $1.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ), while the  $K_A$  of the other is 20 times higher.

Human prolactin was ineffective in displacing  $^{125}\text{I}$ -hGH in concentration up to 250 ng/mL. Lactogen placental hormone in higher serum levels displaced  $^{125}\text{I}$ -hGH with a 0.3% relative potency. The competition of hPL with  $^{125}\text{I}$ -hGH in binding to its hepatic receptors occurs due to the fact that hPL shows 85% homology with GH in primary structure.

When samples with different serum levels of hGH were tested by the present assay, a good correlation was observed with the estimates of serum concentrations obtained by radioimmunoassay and immunoradiometric assay. Thus, this radioreceptor, with a 0.6 ug/L GH serum sensitivity, may provide a useful assay for the dosage of serum levels of hGH out of pregnancy.

---

## 1. INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

O hormônio de crescimento humano (hGH), produzido pela glândula pituitária, exibe múltiplos efeitos biológicos *in vivo* sendo que algumas ações metabólicas são induzidas diretamente, em associação com cortisol, como intolerância a glicose, efeito anti-insulina, aumento de lipólise e cetogênese.

Este hormônio atua também indiretamente, interagindo com os sítios receptores presentes no fígado com produção de somatomedina (IGF-1), que, na presença de hormônios tireoideanos, exerce influência preponderante no crescimento estatural (73). Além disso, o hGH estimula a síntese de proteínas e RNA polimerase no fígado (48) e a atividade de enzimas como ornitina descarboxilase (44) e glutamato desidrogenase (13)

Embora muitos detalhes concernentes à forma de atuação deste hormônio peptídico sejam ainda desconhecidos, sabe-se que a primeira etapa na ação biológica do hormônio de crescimento (GH) reside na ligação do hormônio ao seu receptor específico situado na superfície da membrana plasmática do tecido alvo (70). Esta interação hormônio-receptor é precedida por uma série de eventos celulares

que possibilitam a expressão de um ou mais eventos metabólicos do hormônio de crescimento humano (25).

Ensaios com radiorreceptores (RRE) têm sido desenvolvido para vários hormônios polipeptídicos e proteínas, incluindo GH (25). Na maioria dos radiorreceptores, frações de membrana plasmática obtidas por homogeneização e centrifugação diferencial de tecidos tem sido utilizado como fonte de receptores hormonais. Lesniak (50) usou cultura de linfócitos humanos para desenvolver um radioreceptorensaio para  $^{125}\text{I}$ -hGH. Devido a considerável evidência que um dos principais sítios de ação do hGH é o fígado (64), outros pesquisadores examinaram a ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH a frações de membrana hepática de ratos, coelhos e outras espécies (Tabela 1).

Uma maior dificuldade na interpretação dos dados no mecanismo de ação do GH, a nível celular, tem sido o uso frequente do hGH como ligante marcado para a análise de ligação em sistemas heterólogos. A maioria dos estudos tem sido realizado com roedores (ratos, camundongos) ou coelhos usando GH humano como ligante. É surpreendente, portanto, que relativamente poucos estudos existem com o uso de sistemas ligante e receptor homólogos, isto é, a ligação do GH humano a tecidos humanos (17, 43).

Entretanto, observou-se que a quantidade de receptores para o hGH depende do sexo e estado fisiológico do qual as

TABELA I  
Distribuição de receptores de GH em tecidos

Tecido	Espécie	Referência
Adiposo	Rato	Gorin et al, 1984
		Roupas et al, 1988
		Fagin et al, 1980
		Grichting et al, 1988
		Gavin et al, 1982
Coração	Ovelha	Chan et al, 1978
	Macaco	Posner et al, 1974
Rim	Coelho	Herington et al, 1986
	Coelho	Roguin et al, 1981
Fígado	Rato	Herington et al, 1986
		Roguin et al, 1981
	Cobaya	Posner et al, 1974
		Humano
	Camundongo	D'Abronzo, 1985
		Posner et al, 1976
	Pombo	Herington et al, 1988
		Posner et al, 1974
	Coelho	Posner et al, 1974
		Carvalho et al, 1979
Fibroblasto	Rato	Webb, 1986
		Hughes et al, 1979
	Ovelha	Waters and Friesen, 1979
		Postel-Vinay, 1977
	Vaca	Moore et al, 1981
		Ranke et al, 1976
	Porco	Turyn and Dellacha, 1978
		Posner et al, 1974
	Humano	Chan et al, 1978
		Gluckman et al, 1983
Camundongo	Badinga et al, 1987	
	Breier et al, 1980	
Humano	Chung and Etherton, 1986	
	Murphy et al, 1983	
Linfócitos	Humano	Murphy et al, 1983
		Lesniak et al, 1973, 1974, 1977
Músculo	Rato	Asakawa et al, 1986
		Kiess and Butenendt, 1985
		Posner et al, 1974
	Coelho	Herington, 1986

membranas hepáticas são obtidas (33, 34, 42, 45, 67) Assim, por ensaio com radioreceptores, obteve-se maiores níveis de ligação específica do  $^{125}\text{I}$ -hGH a receptores de microsossoma hepático de mulheres grávidas que em não-grávidas (17)

Estudos prévios (15, 16, 39, 79) indicam que perfis de filtração em gel e padrões eletroforéticos de  $^{125}\text{I}$ -hGH eram alterados pela adição de ou pré-incubação com soro humano, de coelhos e de ratos nas reações de ligação do hormônio de crescimento ao seu receptor específico. Entretanto, nenhum resultado quanto a natureza, caracterização ou especificidade destas alterações foi revelado.

Em adição, uma proteína específica carregadora de GH (PC-GH) tem sido demonstrada por técnica de filtração em gel em soro de coelhos (87) com características estruturais semelhantes ao receptor de GH em membranas plasmáticas de coelhos. Foi também reconhecido em soro humano (5, 38) uma proteína com ligação específica ao hormônio de crescimento humano. Em nenhum destes casos, a proteína carregadora foi detectada previamente por não precipitar no ensaio de ligação geralmente usado para medir a ligação do GH ao receptor (35, 36, 38, 76, 87).

Pesquisas realizadas com anticorpos monoclonais contra o receptor de fígado de coelhos têm sugerido que a proteína carregadora plasmática é bastante relacionada ao receptor hepático (4, 6, 87) tanto estruturalmente quanto funcionalmente.

A purificação do receptor de GH em fígado de coelhos e da proteína carregadora de GH em soro de coelhos tem sido recentemente investigada (53, 76). As sequências de aminoácidos da porção terminal do receptor de GH e da proteína carregadora sérica são idênticas, comprovando que a proteína carregadora é a porção extra-celular do receptor específico do GH situado na membrana (53, 72).

O reconhecimento que fígado de mulher grávida contém receptores para hormônio de crescimento (17) é de interesse desde que o fígado pode ser o principal tecido alvo do hormônio de crescimento e também porque o fígado de mulher grávida tem sido usado com êxito em radioreceptorensaio para hormônio de crescimento. Entretanto, características de interação entre o hormônio de crescimento e o seu sítio de ligação no fígado não tem sido descrito em detalhes.

Foi descoberto, recentemente, por ensaio com anticorpos monoclonais, uma variante placentária do hormônio de crescimento humano (hPGH), distinta do hormônio de crescimento pituitário (hGH) (22, 31, 32). Esta variante de GH aparece na segunda metade da gravidez e seus níveis séricos aumentam progressivamente até o termo, enquanto que a concentração do hGH declina após a segunda metade da gravidez (31). Pela técnica de DNA recombinante (40) foi demonstrado que a variante placentária do hormônio de crescimento difere do GH pituitário em 14 aminoácidos. A capacidade de ligação do GH



pituitário aos receptores de superfície celulares foi testada por ensaio com radioreceptores usando linfócitos humanos (33, 51) e membrana de fígado de coelha grávida (47, 80, 81) como sítios de ligação. O GH placentário apresentou 50 e 100% de atividade em relação ao GH pituitário, respectivamente, no ensaio com linfócitos e com receptores hepáticos, apresentando curvas dose-resposta paralelas em ambos sistemas (62).

Como uma primeira etapa no entendimento do comportamento dos sítios de ligação, a caracterização da reação de ligação é requerida. O presente trabalho descreve, portanto, algumas das características da ligação do hormônio de crescimento em um sistema homólogo, usando GH humano e membrana microsossomal obtida de fígado de mulheres grávidas normais.

Outro propósito desta investigação é o de estudar a validade do uso de receptores de fígado de mulher grávida na determinação da concentração sérica do hormônio de crescimento pituitário para fins de diagnóstico de desordens de crescimento.

Em adição, testou-se a capacidade de ligação do GH placentário, presente em amostras séricas de mulheres grávidas, aos microsossoma hepáticos de mulheres grávidas.

---

## 2. MATERIAL E METODO

## 2 MATERIAL E MÉTODO

### 2.1. Obtenção de fígado de mulher grávida

Foram obtidos quatro fígados de mulheres grávidas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (São Paulo) durante as sessões de autópsias, até 12 horas após o óbito. Foram selecionados fígados com aspecto macroscópico normal, preferindo-se as mortes decorrentes de doenças cardiovasculares.

### 2.2. Preparo de receptores de hGH

As amostras hepáticas obtidas foram picadas em frações de 50 g com uma tesoura de ponta fina e armazenadas em placas de Petri a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou processadas imediatamente. Cada amostra de 50 g foi homogeneizada em um liquidificador WalitaR com 250 mL de sacarose 0,3 M, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por dois minutos (FIG.1). O homogeneizado foi centrifugado a  $10000 \times g$  por 10 minutos em uma centrífuga Sorvall e o sobrenadante foi recentrifugado a  $100000 \times g$  por 2 horas, a  $4^{\circ}\text{C}$ .

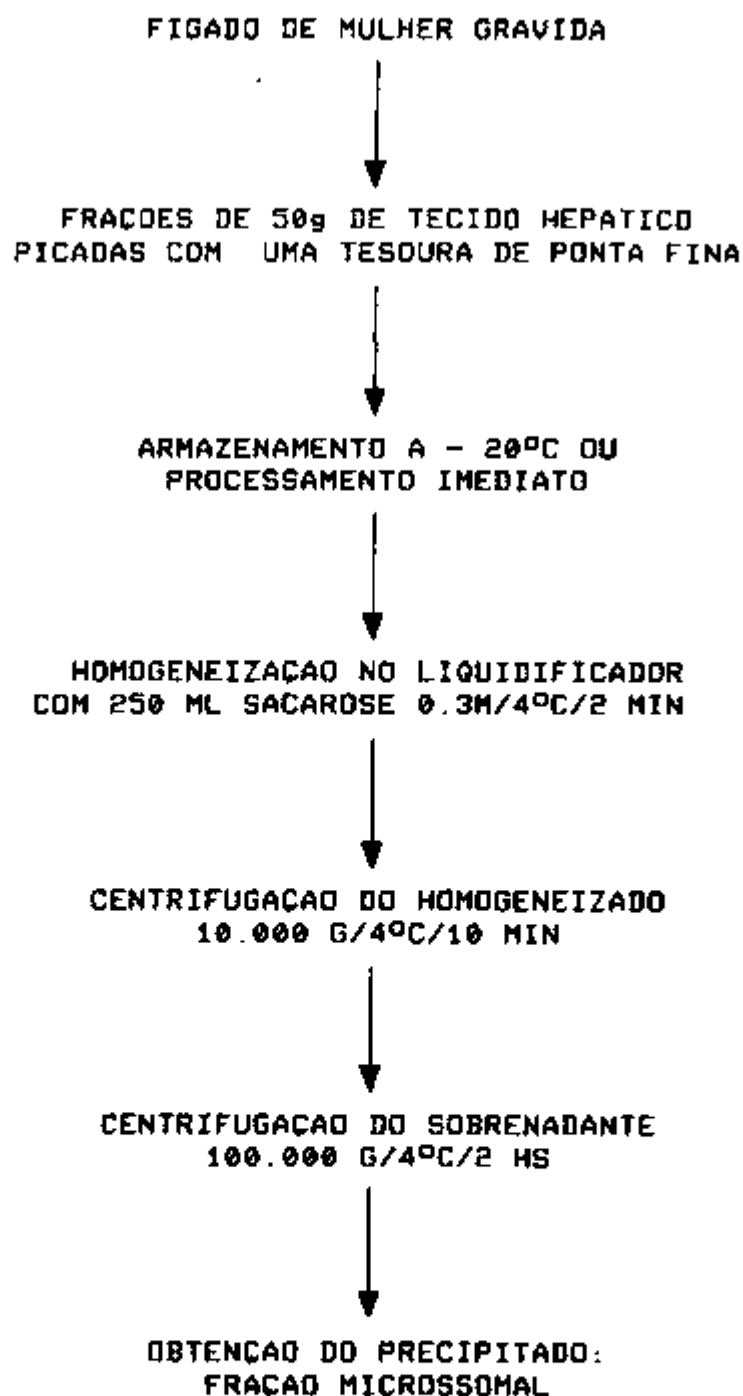


FIG.1. ESQUEMA RESUMIDO DO PROCESSO DE PREPARAÇÃO DA FRACAO MICROSSOMAL DO FIGADO DE MULHER GRAVIDA.

O precipitado, contendo membranas citoplasmáticas, polirribossomas e aparelho de Golgi, constitui a chamada fração microsomal. Nestas membranas encontram-se receptores hormonais, por exemplo, do hormônio de crescimento e insulina. Os microsomas foram suspensos em tampão Tris (Tris 25 mM, pH 7.4, azida sódica 0.2%) e alíquotas de 2 mL foram armazenados a -20°C até seu uso. A quantidade de microsomas das suspensões foi determinada pelo teor de proteínas (75).

### 2.3 Hormônios usados

Duas preparações de hGH foram usadas: preparação hGH AFP-4793B, generosamente fornecida pelo NIADDK (National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases - NIH) e hGH-HC, preparado no Laboratório de Pesquisas Clínicas da 1a. Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP (61).

Doutros hormônios usados no teste de especificidade da ligação foram hormônio lactogênio placentário humano (hPL) e prolactina humana (hPRL), fornecidos pela NIADDK.

#### 2.4 Radioiodação dos hormônios

O hormônio de crescimento humano foi marcado com  $^{125}\text{I}$  de acordo com o método de Greenwood e Hunter (28) com algumas modificações (59). Adicionaram-se, sequencialmente, em um tubo de vidro 12 x 60 mm, 5  $\mu\text{g}$  de GH-HC diluído em 20  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0.2 M, pH 7.4 e 1 mCi de  $^{125}\text{I}$  sob a forma de iodeto de sódio livre de carreador. Após homogeneização, foram pipetados 20  $\mu\text{L}$  de solução de cloramina T contendo 1.4 mg/mL em tampão fosfato 0.05 M, pH 7.4. Após 10 segundos de agitação suave, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de solução de metabissulfito de sódio contendo 2.0 mg/mL em tampão fosfato 0.05 M, pH 7.4, seguido de 1 mL de Tris-BSA (tampão Tris 10 mM mais soroalbumina bovina 0.1%, pH 7.4).

O hormônio lactogênio placentário humano e a prolactina humana foram marcados da mesma forma.

## 2.5 Purificação do hormônio iodado

Todo livre e hormônio degradado foram separados do  $^{125}\text{I}$ -hGH intacto por filtração em gel. A mistura de iodação foi aplicada em uma coluna de vidro (10 x 550 mm), contendo Sephadex G-75 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, contendo albumina bovina 0.1%. Coletaram-se alíquotas de 0.8 mL com um fluxo de 22.5 mL/hora, em um coletor de frações 7000 Ultrorac LKB, a 4°C, em 80 tubos de vidro (15 x 100 mm). Para determinação do perfil de eluição, contaram-se 10  $\mu\text{L}$  de cada tubo no detector de radiação gama (Gamma 4000, Beckman)

A FIG.2 apresenta o perfil de filtração em Sephadex G-75 do hGH marcado. A posição do pico no perfil de cromatografia permite a identificação e rendimento da marcação do hormônio de crescimento marcado com  $^{125}\text{I}$ . Assim sendo, foram identificados 3 picos neste perfil o primeiro correspondendo ao hGH agregado e a albumina iodada, o segundo ao  $^{125}\text{I}$ -hGH íntegro e o terceiro ao  $^{125}\text{I}$  livre. Os conteúdos dos tubos que apresentaram maiores níveis de atividade no segundo pico foram misturados de modo a se obter, no final, 2.4 mL de  $^{125}\text{I}$ -hGH íntegro. A seguir, esta mistura foi congelada a -20°C por um período de 30 dias. Considerou-se uma boa eficiência de marcação quando 70% ou mais da radioatividade total correspondia ao pico do  $^{125}\text{I}$ -hGH no perfil de cromatografia. A atividade específica do  $^{125}\text{I}$ -hGH variou de 50 a 160 Ci/g

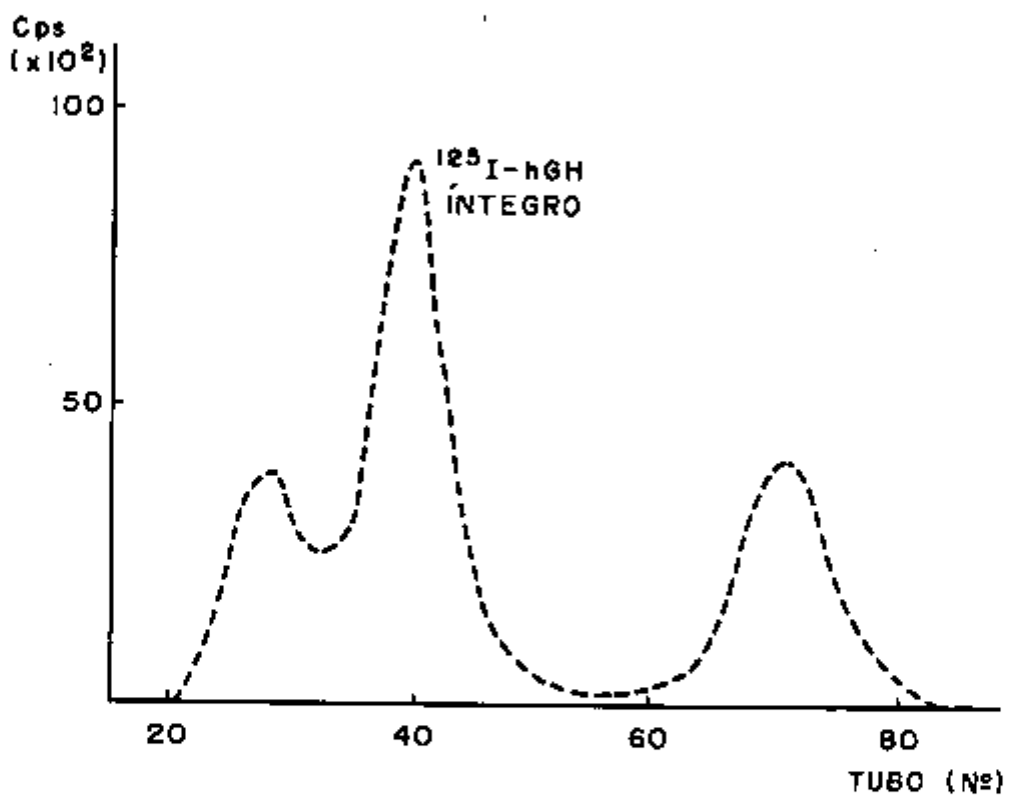


FIG. 2 - CROMATOGRÁFIA DA PURIFICAÇÃO DO  $^{125}\text{I}$ -hGH EM SEPHADEX G-75 .



## 2.6 Procedimento da incubação

Em um volume final de 0.2 mL com tampão Tris-BSA os tubos continham 10000 a 20000 contagens por minuto de  $^{125}\text{I}$ -hGH, 1 a 5 mg/mL de proteína microsomal e  $\text{MgCl}_2$  1 M, exceto nos experimentos onde os efeitos de NaCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ , espermina e espermidina foram estudados. hGH não marcado foi adicionado em um volume de 0.1 mL em concentrações crescentes para o estudo do deslocamento competitivo da ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH. Quando concentrações séricas do hGH são medidas pelo presente método, a mesma quantidade de soro de humanos foi adicionada à curva padrão devido às proteínas séricas presentes nas amostras analisadas. As incubações foram feitas em duplicata por 24 horas, a 24°C, exceto nos experimentos referentes ao efeito de tempo e temperatura de incubação na ligação específica do  $^{125}\text{I}$ -hGH aos receptores hepáticos. Ao final do período de incubação a reação foi bloqueada pela adição de 2 mL de tampão Tris-BSA a 4°C, seguida por centrifugação a 10000 gravidades por 20 minutos. Aspirou-se o sobrenadante e o precipitado, contendo o complexo hormônio-receptor, foi contado no detector gama. A ligação inespecífica de  $^{125}\text{I}$ -hGH foi determinada pela quantidade residual de radiação na presença de 1 µg de hGH não marcado por tubo e, então, subtraída dos outros tubos para determinação da ligação específica, expressa em porcentagem das contagens totais.

## 2.7. Determinação dos níveis séricos de prolactina e hormônio lactogênio placentário

Os níveis séricos de prolactina foram determinados em duplicata pelo "kit" comercial de radioimunoensaio "Double Antibody Prolactine" (Diagnostic Products Corporation, CA, USA), segundo o método de separação por segundo anticorpo.

O hormônio lactogênio placentário foi dosado em duplicata no soro em um "kit" comercial de radioimunoensaio, "Coat-A-CountR Placental Lactogen" (Diagnostic Products Corporation, CA, USA), pela técnica de fase sólida (anticorpo ligado à parede do tubo)

## 2.8. Processamento e análise dos dados experimentais obtidos

Os cálculos da curva dose-resposta e da concentração das amostras desconhecidas foram realizados por um programa de computação denominado GARLA (27), disponível no Centro de Processamento de Dados do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP. Este programa, redigido em Fortran IV, possibilita a automatização do traçado da curva dose-resposta nas escalas "linear-linear", "linear-logarítmica" e "logito-logarítmica", segundo os critérios propostos por Rodbard e col. (68)

O perfil de precisão da curva de deslocamento competitivo na presença de soro sem hGH aparece na FIG.3. O radiorreceptorensaio de hGH apresentou maior precisão na faixa de concentração entre aproximadamente 2.5 e 150 ng/mL com erro da ordem de 5 a 15%, num nível de significância de 0.05.

A dose mínima detectável (DMD), calculada em 7 ensaios, usando diferentes preparações de receptores de hGH, foi de 0.6 ng GH/tubo, equivalente a 0.6 ug/l GH no soro.

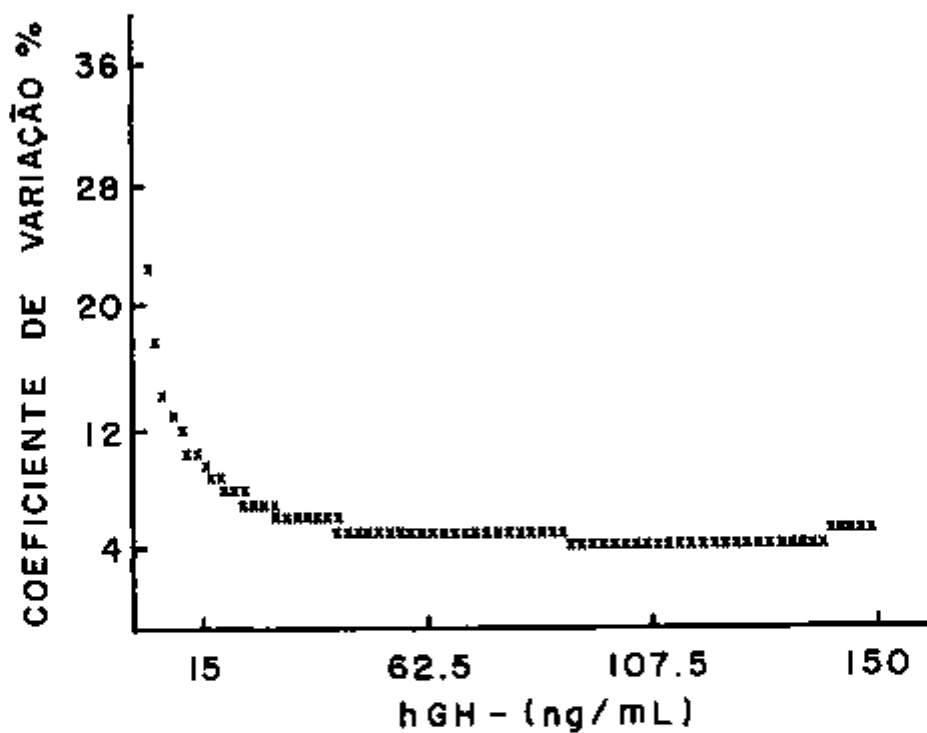


FIG. 3 - PERFIL DE PRECISÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DE hGH NO RADIORRECEPTOR ENSAIO DE  $^{125}$ I-hGH COM MICROSSOMA DE FÍGADO DE MULHER GRÁVIDA NA PRESENÇA DE 50  $\mu$ L DE SORO SEM hGH.

### 3. RESULTADOS

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito da concentração do receptor na ligação específica de $^{125}\text{I}$ -hGH

A ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH foi mostrada ser diretamente proporcional à concentração microsomal na mistura de incubação, na faixa de 1.0 a 5.0 mg/mL (FIG.4). A ligação específica máxima variou de 30 a 50% em diferentes experimentos devido variações na preparação do receptor e hormônio marcado. A adição de soro humano à mistura de incubação resultou em uma diminuição da ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH ao receptor hepático.

#### 3.2. Efeito de tempo e temperatura na ligação específica de $^{125}\text{I}$ -hGH

A ligação específica do  $^{125}\text{I}$ -hGH ao microsoma de fígado de mulher grávida foi medida após diferentes períodos de incubação a 4°C, 24°C e 37°C (FIG.5). Embora diferentes níveis de ligação máxima tenham sido obtidos, o tempo para atingir o máximo foi semelhante em cada caso. A ligação inespecífica foi inaceitavelmente

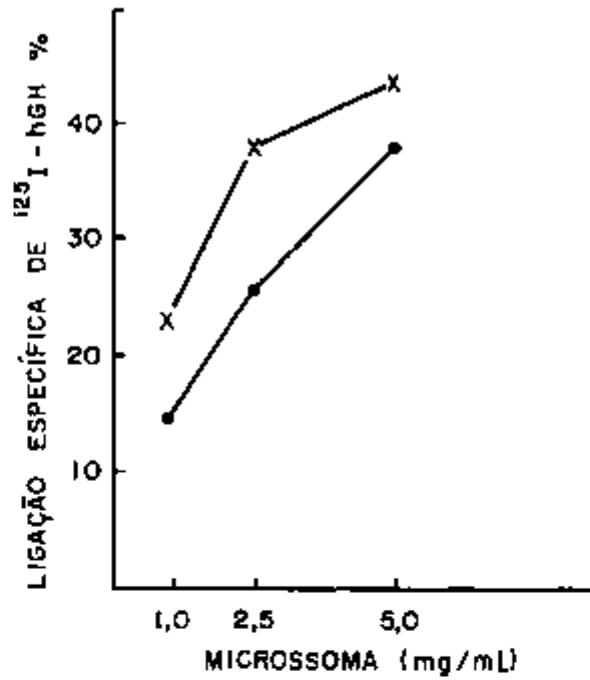


FIG. 4 - LIGAÇÃO ESPECÍFICA DE <sup>125</sup>I-hGH EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MICROSSOMA DE FÍGADO DE MULHER GRÁVIDA SEM SORO (x-x) E COM 50 µL DE SORO SEM hGH (•-•).

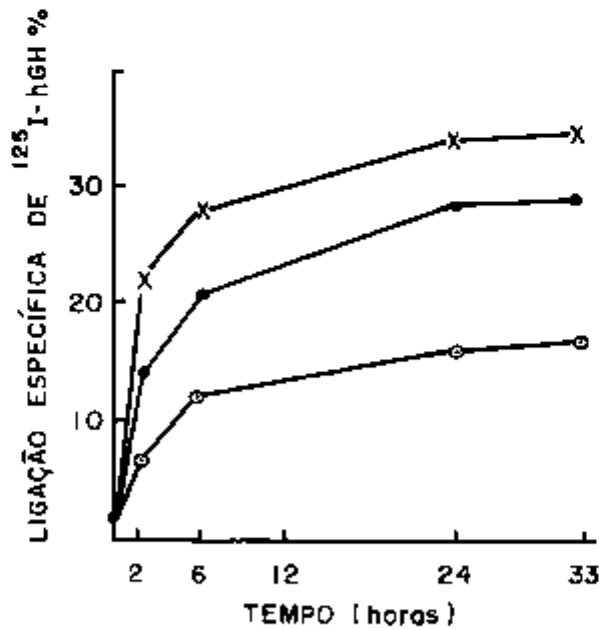


FIG. 5 - LIGAÇÃO ESPECÍFICA DE <sup>125</sup>I-hGH COM MICROSSOMA DE FÍGADO DE MULHER GRÁVIDA EM FUNÇÃO DO TEMPO E DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NA PRESENÇA DE 50 µL DE SORO SEM hGH, 37°C (x-x), 24,2°C (•-•), 24,2°C (o-o).

alta a 37°C, de modo que 24°C foi escolhida como temperatura de incubação por 24 horas nos estudos subsequentes. Nestes ensaios, a concentração microsomal foi de 2.0 mg/mL.

### 3.3 Efeito de cátions mono e divalentes na ligação específica de $^{125}\text{I}$ -hGH

Usando fração microsomal de fígado de mulheres grávidas e hormônio de crescimento humano (hGH) marcado com  $^{125}\text{I}$ , na presença de 50  $\mu\text{L}$  de soro sem hGH, determinou-se o nível de ligação específica para  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{CaCl}_2$  (FIG.6). Os cátions  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  aumentam significativamente a ligação específica. Contudo, maiores níveis de ligação específica foram obtidos com a adição de  $\text{MgCl}_2$  ou  $\text{CaCl}_2$  à mistura de incubação. Assim sendo, nos ensaios subsequentes, usou-se  $\text{MgCl}_2$  por apresentar menores níveis de ligação inespecífica que o  $\text{CaCl}_2$  nas mesmas condições do ensaio.



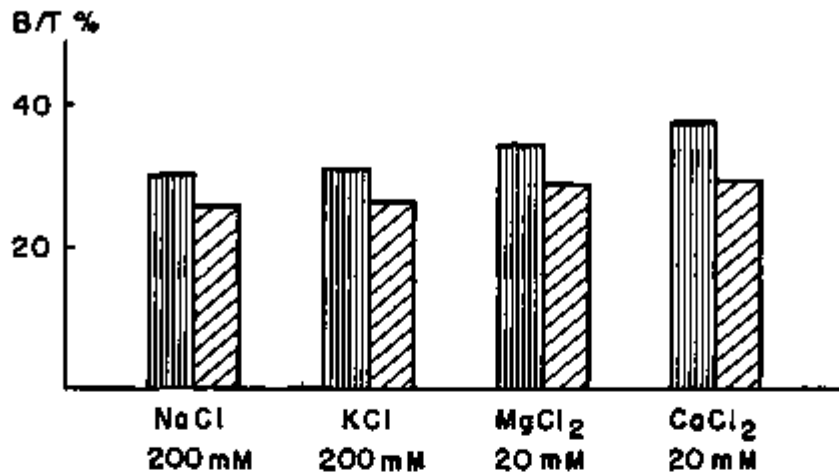


FIG.6 - EFEITO DE CÁTIONS MONO E DIVALENTES NA LIGAÇÃO TOTAL (▨) E ESPECÍFICA (▩) DE  $^{125}\text{I}$ -hGH COM MICROSSOMA DE FÍGADO DE MULHER GRÁVIDA NA PRESENÇA DE  $50\mu\text{L}$  DE SORO SEM hGH.

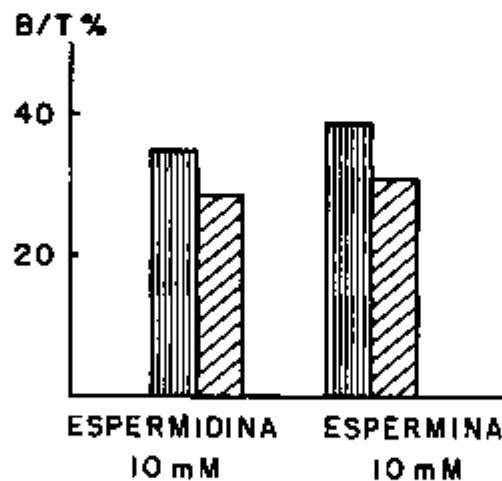


FIG.7. - EFEITO DE POLIAMINAS NA LIGAÇÃO TOTAL (▨) E ESPECÍFICA (▩) DE  $^{125}\text{I}$ -hGH COM MICROSSOMA DE FÍGADO DE MULHER GRÁVIDA NA PRESENÇA DE  $50\mu\text{L}$  DE SORO SEM hGH.

#### 3.4 Efeito de poliaminas na ligação específica de $^{125}\text{I}$ -hGH

A ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH aos receptores hepáticos, em presença de 50  $\mu\text{l}$ . de soro sem hGH (FIG.7), aumenta com a adição de espermina 10 mM atingindo 37,5% de ligação específica. A espermidina 10 mM também estimula a ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH ao receptor, sendo a espermina mais potente que a espermidina.

#### 3.5. Efeito do soro sem hGH na ligação específica de $^{125}\text{I}$ -hGH

A influência do soro sobre o grau de precipitação do complexo  $^{125}\text{I}$ -hGH-receptor hepático nas reações de ligação foi previamente testada. Soro humano ("pool" de soro de nanicos e indivíduos normais previamente submetidos ao teste de intolerância a glicose oral) com níveis ausentes de hGH foi acrescentado à mistura de incubação em um volume de 50  $\mu\text{L}$  para a comparação da curva de deslocamento competitivo da ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH por quantidades crescentes de hGH frio no radiorreceptor ensaio incubado sem soro. Na curva dose-resposta do  $^{125}\text{I}$ -hGH (FIG.8), em presença de 50  $\mu\text{L}$  de soro sem hGH, observou-se uma diminuição sistemática para todos os níveis de concentração de hGH frio em relação à curva de deslocamento incubada sem soro. Estes dados demonstram a necessidade da adição do

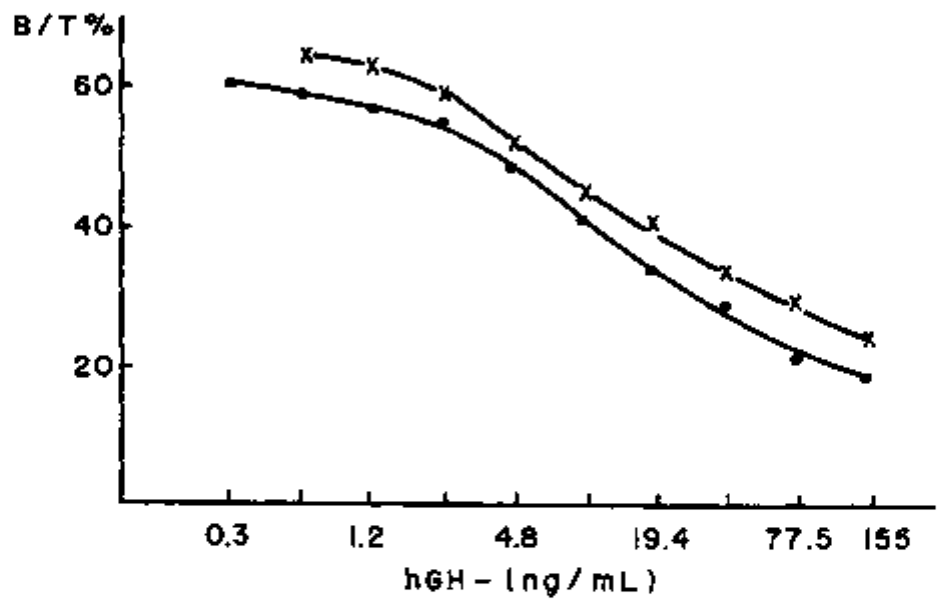


FIG. 8 - CURVAS DE DESLOCAMENTO COMPETITIVO POR hGH FRIO DA LIGAÇÃO DE  $^{125}\text{I}$ -hGH COM MICROSSOMA DE FÍGADO DE MULHER GRÁVIDA SEM SORO (x—x) E COM 50 µL DE SORO SEM hGH (•—•).

soro sem hGH a curva padrão para determinação dos níveis séricos de hGH nas amostras analisadas, com a finalidade de se igualar à concentração de proteínas séricas em todos os tubos de um determinado ensaio.

### 3.6 Análise dos parâmetros de ligação de $^{125}\text{I}$ -hGH

A constante de afinidade e concentração dos sítios receptores de  $^{125}\text{I}$ -hGH em fígado de mulheres grávidas na presença de quantidades crescentes de hGH frio e quantidades fixas de  $^{125}\text{I}$ -hGH e microsomas foram calculados pela análise de Scatchard (73), usando o programa de Rodbard (68).

Duas classes de sítios de ligação foram reveladas pela decomposição de curva dose-resposta em duas retas (FIG.9). A constante de afinidade de um dos sítios de ligação foi aproximadamente 20 vezes maior que o segundo sítio de ligação, independente da presença ou não do soro sem hGH no ensaio, e é inteiramente compatível com as concentrações séricas do hormônio,  $10^{-9}$  a  $10^{-11}$  M.

Os parâmetros de ligação obtidos das curvas dose-resposta elaboradas sem soro e com 50  $\mu\text{L}$  soro sem hGH foram comparadas

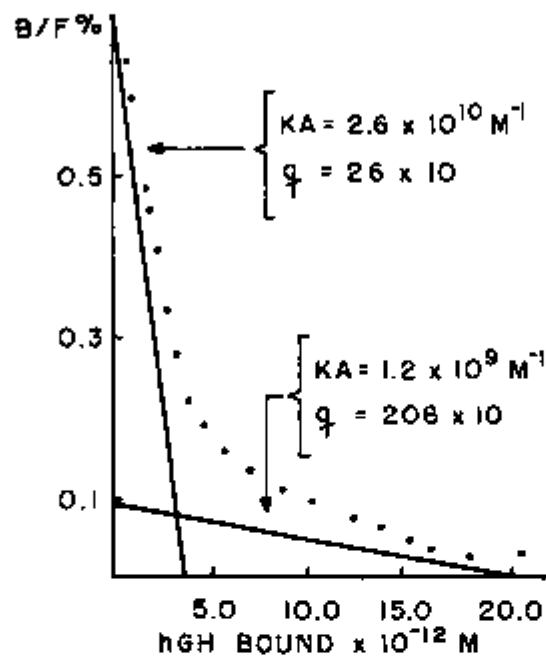


FIG. 9— DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO (KA) DA LIGAÇÃO DE hGH E CONCENTRAÇÃO (q) DOS SÍTIOS RECEPTORES HEPÁTICOS PARA hGH EM FÍGADO DE MULHER GRÁVIDA CALCULADO POR ANÁLISE DE SCATCHARD.

pelos seus respectivos valores de constante de afinidade e concentração dos receptores (Tabela 2). A adição de 50  $\mu$ L sem hGH ao ensaio levou a uma redução de aproximadamente 40% das constantes de afinidade dos dois sítios ligantes, sem alteração significativa das concentrações dos respectivos receptores hepáticos.

### 3.7 Comparação do soro de pacientes acromegálicos com hGH padrão para determinação de paralelismo

Com o sistema de receptor em condições ótimas (pH 7.4,  $MgCl_2$  20 mM e 2.0 mg de proteína microsomal/mL), procedeu-se à realização das curvas dose-resposta com diluições seriadas (1/2 a 1/32 em tampão de ensaio) de pool de soros de pacientes acromegálicos, contendo níveis altos de GH, e com GH-NIH. As curvas de deslocamento obtidas foram comparadas entre si para determinação do paralelismo (inclinação das curvas estatisticamente não diferentes entre si) indicando que o soro de pacientes acromegálicos tem comportamento biológico semelhante ao GH padrão no radioreceptorensaio de fígado de mulher grávida (FIG.10)

TABELA 2. Parâmetros da ligação de  $^{125}\text{I}$ -hGH aos receptores hepático de mulheres de mulheres grávidas calculados pela análise de Scatchard das curvas dose-resposta sem soro e com 50 uL soro sem hGH.

Sítio de ligação	Cte. Afinidade ( $\text{M}^{-1}$ )	Concentração dos receptores (fmol/mg)
sem soro		
Classe I	$2.6 \times 10^{10}$	26
Classe II	$1.2 \times 10^9$	208
com 50 uL soro		
Classe I	$1.2 \times 10^{10}$	24
Classe II	$0.8 \times 10^9$	198

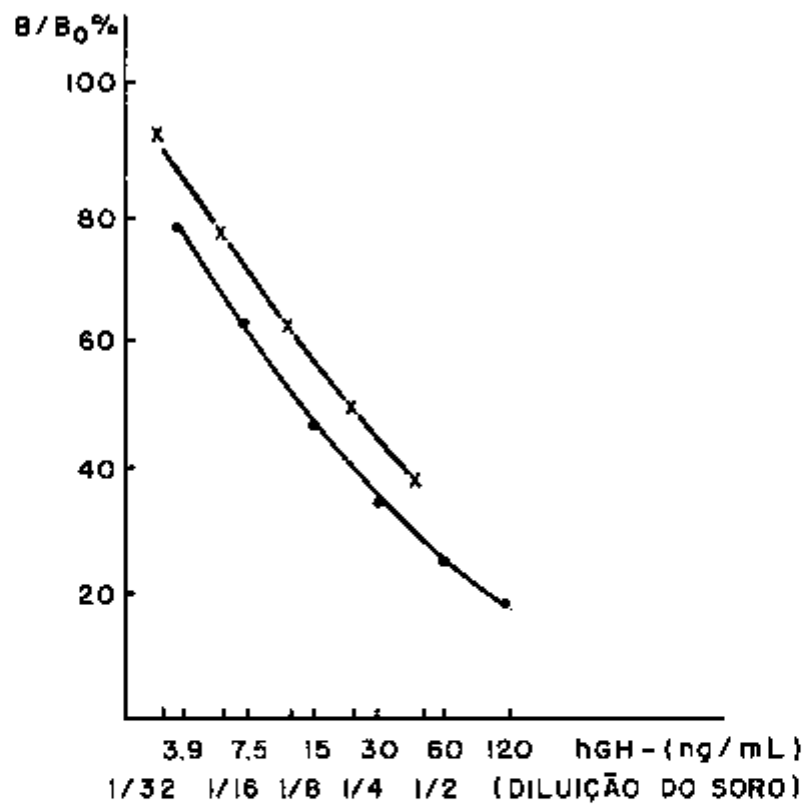


FIG. 10—DEMONSTRAÇÃO DE PARALELISMO DE SORO DE ACROMEGALIA EM VÁRIAS DILUIÇÕES COM hGH PADRÃO NO RADIORRECEPTORSAIO COM FÍGADO DE MULHER GRÁVIDA. hGH PADRÃO (●—●); SORO DE ACROMEGALIA (x—x).



### 3.9 Correlação entre os níveis séricos de hGH dosados por radiorreceptoreensaio,ensaio imunorradiométrico e radioimunoensaio

Amostras séricas de diferentes concentrações de hGH previamente estimadas pelo radiorreceptoreensaio (RRE) de fígado de mulher grávida foram medidas por radioimunoensaio (RIE) usando reagentes fornecidos pelo National Institute of Health (NIH) e por um "kit" comercial da Pharmacia que quantifica hGH por ensaio imunorradiométrico (IRMA), usado rotineiramente no Laboratório de Pesquisas Clínicas da 1ª Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP. O estudo da correlação foi realizado pela análise de regressão linear e os valores obtidos pelos dois métodos referenciais foram bastante próximos aos determinados pelo RRE (FIG.11 e 12). Assim sendo, uma boa correlação foi observada entre as estimativas das concentrações séricas individuais obtidas para cada um dos métodos ( $r > 0.95$ )

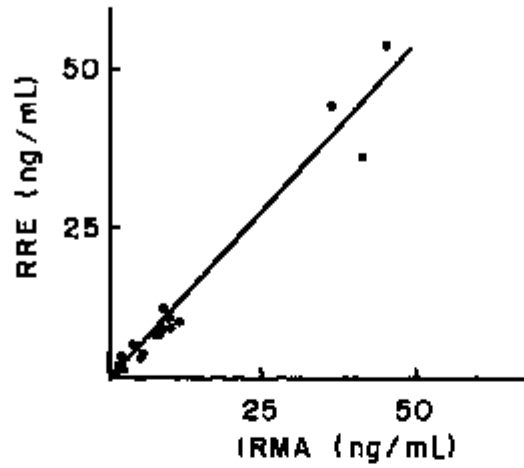


FIG.11 - CORRELAÇÃO DE NÍVEIS DE hGH DOSADOS POR RADIORRECEPTOREN- SAIO DE FÍGADO DE MULHER GRÁ VIDA E POR ENSAIO IMUNORRA - DIOMÉTRICO (IRMA).

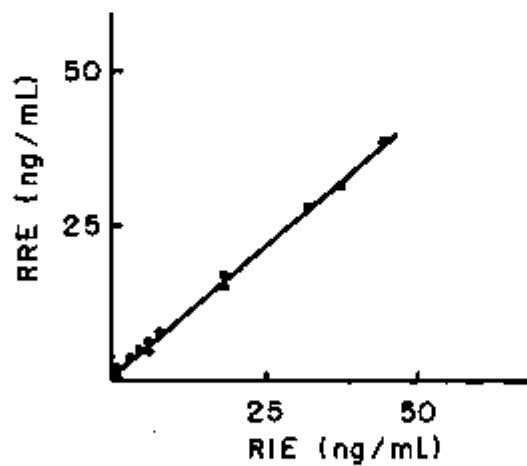


FIG.12 - CORRELAÇÃO DE NÍVEIS DE hGH DOSADOS POR RADIORRECEPTOREN SAIO (RRE) DE FÍGADO DE MU - LHER GRÁVIDA E POR RADIOIMU NOENSAIO (RIE).

### 3.9 Especificidade dos sítios de ligação

A especificidade dos sítios de ligação ao  $^{125}\text{I}$ -hGH nos microsomas hepáticos de mulheres grávidas foi testada contra prolactina humana (hPRL) e hormônio lactogênio placentário humano (hPL), devido a proximidade destes hormônios quanto a estrutura molecular e ação fisiológica (56, 60) (FIG.13). A prolactina humana também compete na ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH mas com uma potência relativa reduzida (0.6%) comparado com o hormônio de crescimento humano. Entretanto, níveis séricos máximos de hPRL ocorrem durante a gravidez com valores entre 200 e 250 ng/mL (11) e estas concentrações têm capacidade mínima para competir na ligação aos sítios receptores de  $^{125}\text{I}$ -hGH. Assim, nenhuma interação de hPRL com estes sítios de ligação é esperado ocorrer "in vivo".

As curvas de inibição competitiva de ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH aos microsomas hepáticos por hGH e hPL foram divergentes (slope = 0.3) e a potência relativa do hPL foi de 0.3% no ponto de 50% da curva dose-resposta (FIG.13). Por outro lado, durante a gravidez hPL atinge níveis séricos entre 4000 e 12000 ng/mL (11) e estas concentrações, nos experimentos realizados com amostras séricas de mulheres grávidas (FIG.14), foram capazes de deslocar mais de 50% de ligação do  $^{125}\text{I}$ -hGH.

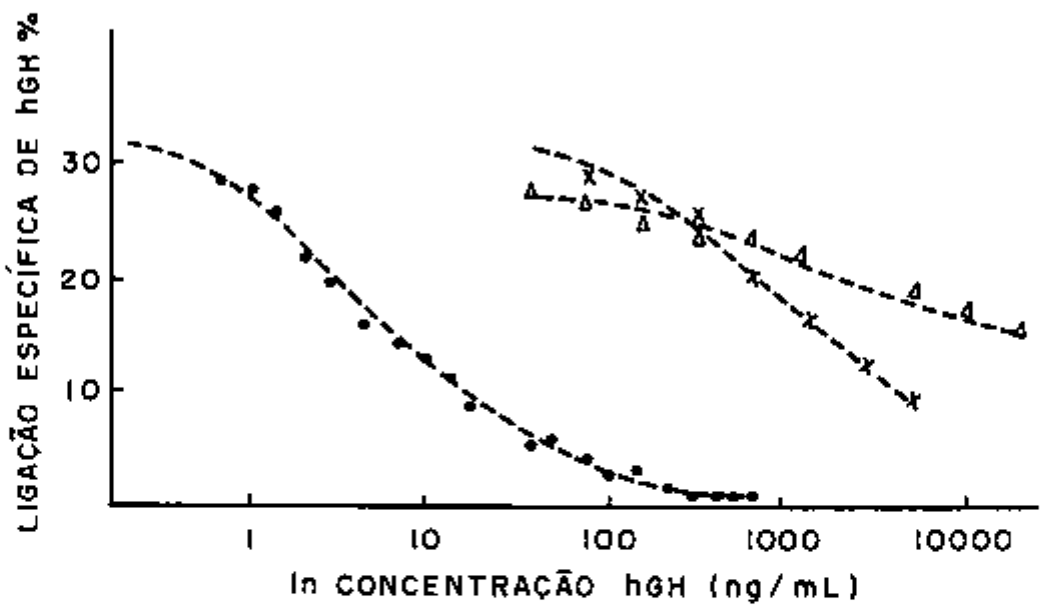


FIG. 13 - DESLOCAMENTO COMPETITIVO DA LIGAÇÃO DE  $^{125}\text{I}$ -hGH AOS MICROSSOMAS HEPÁTICOS POR hGH (●-----●), hPRL (x-----x) E hPL (Δ-----Δ).

### 3.10. Dosagem de hGH em amostras séricas de mulheres grávidas

Foram realizadas curvas dose-resposta com diluições seriadas de pool de soro de primeiro e terceiro trimestres de gravidez e quantidades crescentes de GH-NIH e hPL-NIH (FIG.14). As curvas de deslocamento obtidas com os dois pools séricos não apresentaram inclinação paralela à curva de hGH-NIH e nem à curva do hPL-NIH. Entretanto, ambas as curvas de deslocamento apresentaram uma inclinação estatisticamente mais próxima à da curva do hPL-NIH no radioreceptoreensaio de fígado de mulher grávida.

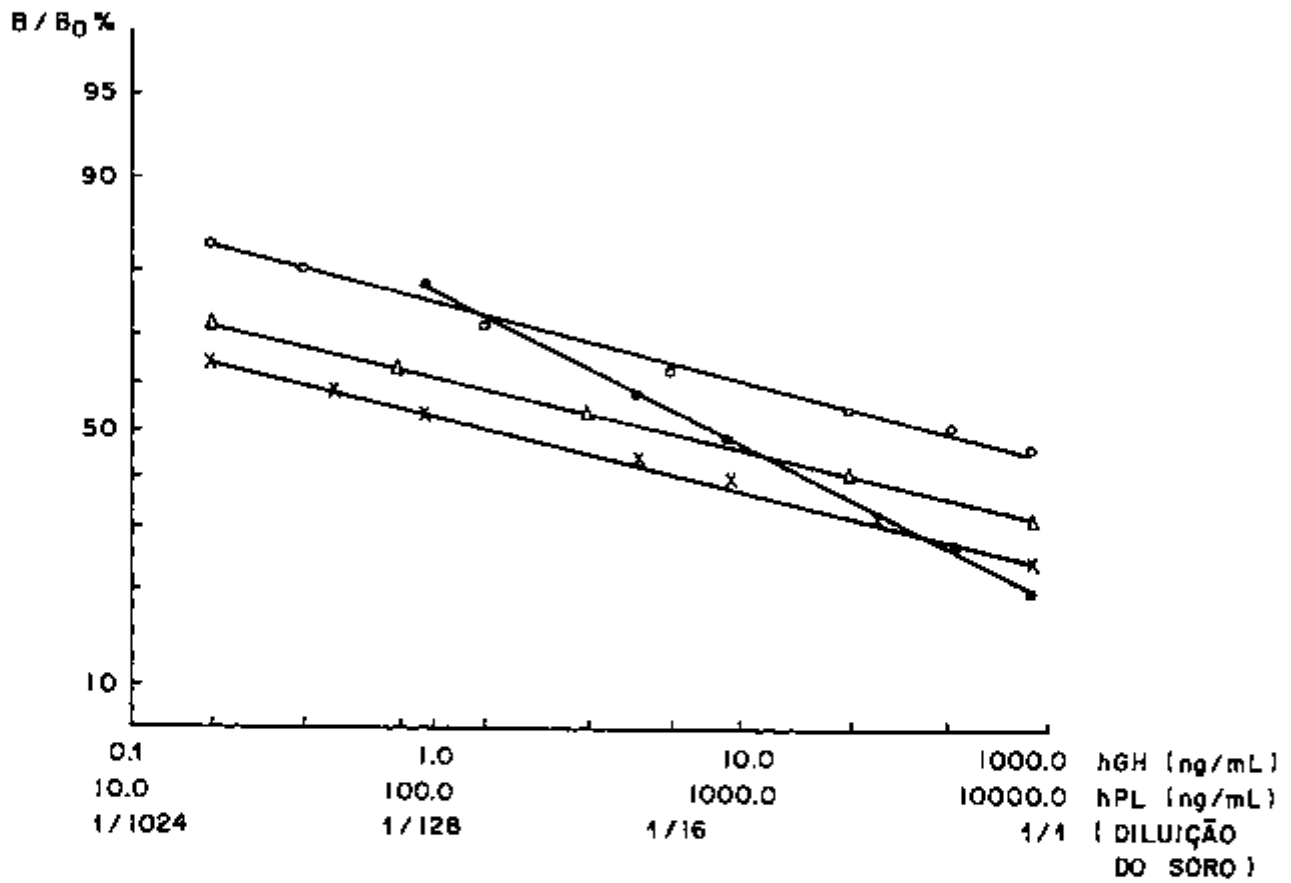


FIG.14 - CURVAS DE DESLOCAMENTO DO  $^{125}\text{I}$  - hGH DOS MICROSSOMAS HEPÁTICOS POR hGH - NIH (●), hPL - NIH (x), POOL SÉRICO DE 1º TRIMESTRE (○) E 3º TRIMESTRE (△) DE GRAVIDEZ.

---

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

#### 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A ligação de hGH a diferentes tecidos em uma variedade de espécies tem sido descrita (8, 56, 67, 77), mas pouco se sabe sobre as características fundamentais da ligação do fígado de mulher grávida em particular. Os estudos realizados aqui descrevem alguns dos detalhes básicos da ligação do hGH a membrana microsossomal do fígado de mulher grávida.

Recentes pesquisas (8, 17, 43, 45, 63, 67) têm identificado a variação da capacidade de ligação específica do hormônio de crescimento em microsossomas hepáticos de animais da mesma espécie, mas em diferentes estados fisiológicos. Ratas adultas apresentam maior ligação que ratos adultos e ratas ou ratos em fase de pré-puberdade ou hipofisectomizados. O uso de membrana microsossomal de fígado de ratas grávidas resultou em um aumento da ligação de duas a três vezes assim como maiores níveis de ligação puderam ser induzidos em animais previamente tratados com estrógenos (34, 67). Assim sendo, a ligação de  $^{125}\text{I}$ -hGH foi estudada, no presente trabalho, apenas em membrana microsossomal obtida de fígado de mulheres grávidas, desde que estudo anterior (17) mostrou maior capacidade de ligação deste hormônio em receptores de microsossoma hepático de mulheres grávidas que em não-grávidas. Cada uma destas situações reflete os diferentes estados estrogênicos sugerindo a participação dos estrógenos na indução e manutenção dos sítios de ligação em microsossomas hepáticos



Alguns autores têm enfatizado, recentemente, a importância do uso de sistemas homólogos para pesquisas de ligação de receptores por hGH (43, 55, 72, 77). GH de primatas deslocam o  $^{125}\text{I}$ -hGH de seus sítios ligantes no fígado humano, mas GH de não-primatas não são capazes de deslocar. Isto correlaciona com a conhecida incapacidade de GH de não-primatas induzir crescimento em humanos. Alternativamente, o uso de um sistema heterólogo em que  $^{125}\text{I}$ -hGH é usado para ligação a receptores de fígado de não-primatas também torna difícil a interpretação do significado biológico dos resultados obtidos. No presente estudo, descrevemos, portanto, a interação do GH em um sistema homólogo usando GH humano e fração microsomal de fígado de mulheres grávidas normais.

A interação do hormônio de crescimento humano com receptores hepáticos depende de vários parâmetros incluindo tempo de incubação, temperatura, concentração da membrana microsomal e traçador (25). Sabe-se que a ligação de  $^{125}\text{I}$ -hGH é dependente da presença de cátions divalentes (4, 18); no nosso experimento  $\text{Mg}^{+2}$  foi algo mais efetivo que  $\text{Ca}^{+2}$ , sendo adicionado, portanto, em todos os ensaios descritos neste trabalho. As poliaminas espermina e espermidina são capazes de promover a ligação de hGH a receptores hepáticos, quando presentes na mistura de incubação, em concentrações inferiores às dos cátions divalentes  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  (19, 21). Entretanto, observamos no presente trabalho que o uso de cátions divalentes oferece vantagens, pois sua contribuição em termos de custo é

irrisória, além de uma maior facilidade de obtenção em um laboratório clínico ou experimental.

A diminuição da ligação específica nas curvas de deslocamento competitivo de  $^{125}\text{I}$ -hGH por hGH foi observada na curva incubada com soro sem hGH em relação a incubada sem soro. A diminuição relativa da ligação específica em presença do soro sem hGH foi observada também com concentrações diferentes de microsossoma. Ao compararmos os parâmetros de ligação obtidos das curvas dose-resposta elaboradas sem soro e com soro sem hGH pelos seus respectivos valores de constante de afinidade e concentração dos receptores, notamos que a adição de soro sem hGH ao ensaio levou a uma redução de aproximadamente 40% das constantes de afinidade dos dois sítios ligantes, sem alteração significativa das concentrações dos respectivos receptores hepáticos. Estes dados comprovam a presença de uma substância estranha no soro que pode interferir na reação de competição com o  $^{125}\text{I}$ -hGH na ligação aos receptores hepáticos. Assim sendo, a diminuição da ligação específica do  $^{125}\text{I}$ -hGH aos microsossomas hepáticos de mulheres grávidas poderia advir da presença da proteína carregadora de hGH no soro (5, 6, 38, 39, 53, 87) que estaria competindo pela ligação do hGH.

As análises de Scatchard dos receptores humanos de hGH em linfócitos (51) e fígado humano (9) revelaram apenas um receptor. No estudo com radioreceptor em fígado de mulheres grávidas, constatou-se a existência de uma nova classe de receptor específico para hGH, sugerindo a presença de dois sítios de ligação com



afinidades diferentes pelo fígado humano. O processamento das curvas dose-resposta, realizadas no presente trabalho, pelo programa de computação GARIA, mostra-nos que um dos sítios de ligação tem uma constante de associação (KA) da mesma ordem de magnitude dos normalmente encontrados em fígado humano ( $0.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) (9), linfócitos ( $1.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) (51) e fígado de coelhas ( $1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) (81), enquanto que o outro tem um valor de KA 20 vezes maior. Portanto, os achados presentes indicam que a elevada ligação específica do  $^{125}\text{I}$ -hGH em microsomas hepáticos de mulher grávida é devido à presença de um segundo sítio de ligação com afinidade 20 vezes maior pelo hormônio. A existência de duas classes de sítios é também interessante no que concerne às múltiplas ações do GH humano. Estudos usando vários fragmentos de GH (49) indicam que as moléculas de GH contém mais de um simples sítio ativo; assim, parece possível que um simples tecido possa possuir sítios que viabilizam duas ou mais ações independentes do hormônio. A produção de somatomedina pode ser uma ação mediada pelos sítios de ligação hepáticos, desde que McConaghey & Sledge (54) registraram a liberação de somatomedina por perfusão de fígado de ratos com GH bovino.

Heterogeneidade de receptores de GH em fígado de coelhas grávidas tem sido descrita também por Barnard et al (3), usando anticorpos monoclonais anti-receptores e Hughes et al (41) com base em estudos de ligação cruzada. De fato, diferentes sítios de

ligação do hGH com diferentes especificidades têm sido demonstrados por deslocamento com GH e hormônios estruturalmente relacionados, prolactina e hormônio lactogênio placentário (8, 66, 83, 85). Uma possível explicação para estes resultados é que a proporção dos diferentes sítios ligantes com afinidades diferentes varia de acordo com o estado fisiológico do animal.

O perfil de precisão das curvas de deslocamento competitivo de  $^{125}\text{I}$ -hGH por hGH mostrou-se bom e de acordo com o esperado para sistemas de dosagem por radioreceptor.

A identidade entre as duas curvas dose-resposta obtidos com hGH-NIH e diluições seriadas de pool de soros de pacientes acromegálicos confirma o comportamento idêntico dos dois hormônios no radioreceptoreensaio padronizado no presente trabalho.

A prolactina e o hormônio lactogênio placentário circulam em altas concentrações na gravidez (11). Estes hormônios têm estrutura primária muito parecida com a do hGH e poderiam interagir com este sítio receptor no fígado das mulheres grávidas durante a gestação. Para tanto, investigou-se, através de curvas dose-resposta, a reação cruzada dos hormônios ( $\text{ED}_{50}$ ) com os receptores hepáticos de  $^{125}\text{I}$ -hGH em fígado de mulher grávida. Prolactina humana não teve efeito no deslocamento do  $^{125}\text{I}$ -hGH em concentrações até 250 ng/mL. Hormônio lactogênio placentário em altas concentrações deslocou  $^{125}\text{I}$ -hGH com uma potência relativa de 0.3%. A reação cruzada do hPL com o hGH na ligação a seus sítios receptores

ocorre por hPL apresentar 85% de homologia na estrutura primária com o hGH (FIG.15) (56, 60). Cinco das 29 diferenças reveladas na sequência de aminoácidos do hPL e hGH residem num segmento (resíduos 30-50) que pode ser o sítio receptor do hGH.

Na tentativa de avaliar a presença do hormônio de crescimento placentário em amostras séricas de mulheres grávidas, comparamos as concentrações de hGH, prolactina e hormônio lactogênio placentário no soro de amostras em vários tempos da gestação por ensaio com radiorreceptores em fígado de mulheres grávidas. Entretanto, as curvas dose-resposta de diluição de pool de soro de mulheres grávidas de primeiro e terceiro trimestres resultaram divergentes às curvas de hGH-NIH e de hPL-NIH, embora mais próximas deste último. Em função da reação cruzada e dos níveis de hPL encontrados na gravidez, concluímos que o radiorreceptorensaio está medindo, provavelmente, o efeito de uma mistura dos diferentes hormônios.

Se, por um lado, o radiorreceptorensaio de hGH de microssoma de fígado de mulher grávida não possibilita a avaliação quantitativa do nível sérico de hGH placentário durante a gravidez, o presente método indica a existência de atividade de hGH símile no soro de mulheres grávidas que é "detectada" por este receptor de fígado de mulher grávida. Por fim, quando amostras séricas com diferentes

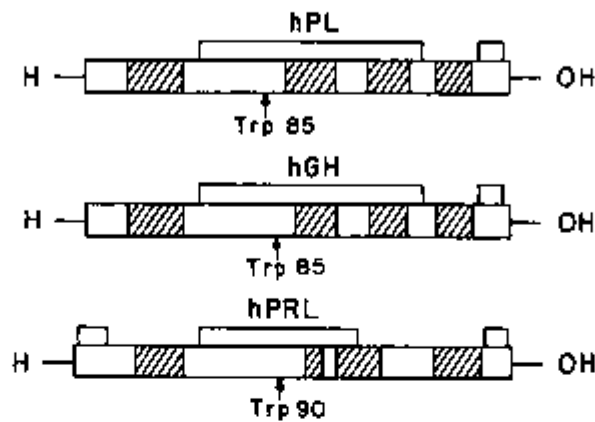


FIG.15- REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DAS MOLÉCULAS DE hPL, hGH E hPRL. AS REGIÕES RASURADAS DE CADA CADEIA POLIPEPTÍDICA REPRESENTAM AS SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS. ALÉM DAS HOMOLOGIAS INTERNAS EM CADA MOLÉCULA, OS 3 HORMÔNIOS APRESENTAM CONSIDERÁVEL HOMOLOGIA UM EM RELAÇÃO A OUTRO, COMO INDICADO PELA POSIÇÃO SEMELHANTE DAS PONTES DISSULFETO E DA POSIÇÃO 85 DO RESÍDUO TRIPTOFANO EM hPL E hGH E DA POSIÇÃO 90 DESTES RESÍDUO EM hPRL.

concentrações de hGH foram testadas pelo presente ensaio, uma boa correlação foi observada entre as estimativas das concentrações séricas obtidas por radioimunoensaio e ensaio imunorradiométrico.

Assim sendo, este radiorreceptorensaio, com uma sensibilidade de 0.6 ug/L GH no soro, possibilita a mensuração quantitativa dos níveis séricos de hGH fora da gravidez e pode ser de grande valia em pesquisas de desordens do crescimento.



---

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asakawa, K.; Hedo, J.A.; McElduff, A.; Rouiller, G.G.; Water, M.J.; Gordon, P. The human growth hormone receptor of cultured human lymphocytes. Biochem J. 238:379-86, 1986.
2. Badinga, L.; Collier, R.J.; Thatcher, W.W.; Quintana, S.J.; Bazer, F.W. - Covalent coupling of bovine growth hormone to its receptor in bovine liver membranes. Mol. Cell. Endocrinol. 52:85-89, 1987.
3. Barnard, R.; Waters, M.J. - Serum and liver cytosolic growth-hormone-binding proteins are antigenically identical with liver membrane "receptor" types 1 and 2. Biochem. J. 237:885-92, 1986.
4. Barnard, R. and Waters, J. - Use of calcium dependence as a means to study the interaction between growth hormone and their binding proteins in rabbit liver. Biochem. J. 250:533-38, 1988.

5. Baumann, G.; Stolar, M.W.; Amburn, K.; Barsano, C.P., De Vries, B.C. - A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. J.Clin.Endocrinol.Metab. 62:134-41, 1986.

6. Baumann, G.; Shaw, M.A. - Immunochemical similarity of the human plasma growth hormone-binding protein and the rabbit liver growth hormone receptor. Bioch.Bioph.Res.Communic. 152:573-78, 1988

7. Breier, B.H.; Gluckman, P.D., Bass, J.J. - The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status and oestradiol-17 on hepatic high- and low-affinity somatotrophic binding sites. J.Endocrinol. 116:166-69, 1988.

8. Cadman, H.F. and Wallis, M. - An investigation of sites that bind hGH in the liver of the pregnant rabbits. Biochem.J. 198:605-14, 1981.

6

9. Carr, D. and Friesen, H.G. - Growth hormone and insulin binding to human liver. J.Clin.Endocrinol.Metab. 42:484-93, 1976.

10. Carvalho, E.I., Bartolini, P.; Assis, L.M.; Fonseca, M.L.C. Q.; Pieroni, R.R. - A sensitive assay of human growth hormone (hGH), using an optimized concentration of rabbit liver solubilized membrane receptor and two different radioiodinated preparations Cancer Treat. Rep. 63:1160, 1979.

11. Casey, M.L.; MacDonald, P.C.; Simpson, E.R. - Alterações endocrinológicas da gravidez. In: Wilson, J.D.; Foster, D.W., eds. Tratado de Endocrinologia Williams Editora Manole Ltda., 1988. Cap.13, p.526-44.

12. Chan, J.S.D.; Robertson, H.A. and Friesen, H.G. - Distribution of binding sites for ovine placental lactogen in the sheep. Endocrinology 102:632-40, 1978.

13. Cheek, D.B. and Graystone, J.E. - The action of insulin, growth hormone, and epinephrine on cell growth in liver, muscle and brain of the hypophysectomized rat. Pediatr. Res. 3:433-40, 1969.

14. Chung, C.S. and Etherton, T.D. - Characterization of porcine growth hormone (pGH) binding to porcine liver microsomes: chronic administration of pGH induces pGH binding. Endocrinology 119:780-86, 1986.

15. Collip, P.J.; Kaplan, S.A.; Boyle, D.C. and Shimizu, C.S.N. - Protein bound human growth hormone. Metabolism **13**:532-38, 1964.
16. Collip, P.J. and Kaplan, S.A. - Interaction of <sup>14</sup>C-labelled human and bovine GH with serum proteins. Biochim. Biophys. Acta **117**:416-23, 1966.
17. D' Abronzo, F.H. - Receptores do hormônio de crescimento no fígado humano. São Paulo, 1985 (Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)
18. D' Abronzo, F.H.; Batista, M.C.; Nicolau, W.; Assis, L.M.; Mattar, E. - Efeito de cátions monovalentes e divalentes na ligação do hormônio de crescimento com o receptor hepático. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. **29**:6, 1985.
19. D' Abronzo, F.H.; Assis, L.M.; Nicolau, W.; Mattar, E. - Polyamines stimulate hGH receptor-binding in liver microsomes. Horm. Metab. Res. **17**:168, 1985.
20. Fagin, K.; Lackey, S.L.; Reagen, C.R.; Di Girolano, M. - Specific binding of growth hormones by rat adipocytes. Endocrinology **137**: 608-15, 1980.

- 
21. Folk, J.E.; Park, M.H.; Chung, S.; Schrode, J.; Lester, E.P.; Cooper, H.L. - Polyamines as physiological substrates for transglutaminases. J. Biol. Chem. 255:3695-3700, 1980.
22. Frankenne, F.; Delrue, F.R.; Scippe, M.L.; Martial, J.; Hennen, G. - Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. J. Clin. Endocrinol. Metab. 64:635-37, 1987.
23. Gavin III, J.R.; Saltman, R.J.; Tollefsen, S.E. - Growth hormone receptors in isolated rat adipocytes. Endocrinology 110:637-43, 1982.
24. Gluckman, P.D.; Butler, J.H. and Elliot, T.B. - The ontogeny of somatotrophic-binding sites in ovine hepatic membranes. Endocrinology 112:1607-12, 1983.
25. Gorden, P.; Weintraub, B.D. - Testes com radiorreceptores e outros testes hormonais funcionais. In: Wilson, J.D.; Foster, W.D., eds. Tratado de Endocrinologia Williams. Ed. Manole Ltda, 1988. Cap.6, p. 166-182.

26. Gorin, E.; Goodman, H.M. - Covalent binding of growth hormone to surface receptors on rat adipocytes Endocrinology 115:467-75, 1984

27. Granzoto, A.; Gouvea, A.S.; Lourencão, A.M. - Compilação dos resumos dos códigos nucleares disponíveis no CPD/IPEN. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1981 (IPEN-INF-7).

28. Greenwood, F.C.; Hunter, W.M.; Glover, J.S. - The preparation of <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89:114-23, 1963.

29. Grichting, G.; Levy, L.K.; Goodman, H.M. - Relationship between binding and biological effects of human GH in rat adipocytes. Endocrinology 113:1111-20, 1983.

30. Hadden, D.R.; Prout, T.E. - A growth hormone binding protein in normal human serum. Nature(London) 202:1342-43, 1964.

31. Hennen, G.; Frankenne, F.; Pirens, G.; Gomez, F.; Closset, J.; Schaus, G.H.; El Khayat, N. - New Chorionic GH-like antigen revealed by monoclonal antibody radioimmunoassays. Lancet 16:399, 1985.

32. Hennen, G.; Frankenne, F.; Pirens, G.; Closset, J.; Gomez, F.; Smal, J.; Beckers, A.; El Khayat, N.; Lambotte, R. - A human placental GH-like antigen: increasing levels during second half of pregnancy with pituitary GH suppression as revealed by monoclonal antibody radioimmunoassays. Int. J. Fert. 30:27-33, 1985.

33. Herington, A.C.; Phillipis, L.S.; Daughaday, W.H. - Pituitary regulation of human growth hormone binding sites in rat liver membranes. Metabolism 25:341-53, 1976.

34. Herington, A.C.; Veith, N.; Burger, H.G. - Characterization of the binding of human growth hormone to microsomal membranes from rat liver. Biochem. J. 158:61-69, 1976.

35. Herington, A.C.; Veith, N.M. - Solubilization of a GH specific receptor. Endocrinology 101:984-987, 1977.

36. Herington, A.C.; Elson, S.D.; Ymer, S.I. - Water soluble receptors for human growth hormone from rabbit liver. J. Recept. Res. 2:203, 1981.



37. Herington, A.C.; Harrison, D.; Graystone, J. - Hepatic binding of human and bovine growth hormones and ovine prolactin in the dwarf "little" mouse. Endocrinology 112:2032-38, 1983.

38. Herington, A.C.; Ymer, S.; Roupas, P.; Stevenson, J. - Affinity purification and structural characterization of a specific binding protein for hGH in human serum. Biochim. Biophys. Acta 881:236-240, 1986.

39. Herington, A.C.; Ymer, S.; Stevenson, J. - Identification and characterization of specific binding proteins for growth hormone in normal human sera. J. Clin. Invest. 77:1817-23, 1986.

40. Hizuka, N.; Hendricks, C.M.; Pavlakis, G.N.; Hamer, D.H.; Gordon, P. - Properties of human growth hormone polypeptides: purified from pituitary extracts and synthesized in monkey kidney cells and bacteria. J. Clin. Endocrinol. Metab. 55:545-50, 1982.

41. Hughes, J.P. - Identification and characterization of high and low affinity binding sites for growth hormone in rabbit liver. Endocrinology 105:414-20, 1979.

42. Hughes, J.P.; Friesen, H.G. - The nature and regulation of the receptors for pituitary growth hormone Ann Rev Physiol 47:469-82, 1985.

43. Hung, C.H.; Kover, K.; Moore, W.V. - Characterization of somatotropic growth hormone binding to homologous liver plasma membranes. Mol Cell Endocrinol 39:189-96, 1985.

44. Janne, J.; Raina, A. - On the stimulation of ornithine decarboxylase and RNA polymerase activity in rat liver after treatment with growth hormone. Biochim Biophys Acta 474:769-72, 1969.

45. Kelly, P.A.; Posner, B.I.; Tsushima, T.; Friesen, H.G. - Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: ontogenesis, effects of sex and pregnancy. Endocrinology 95:532-39, 1974.

46. Kiess, W.; Butenandt, D. Specific growth hormone receptors on human peripheral mononuclear cells: reexpression, identification and characterization. J Clin Endocrinol Metab 60:740-46, 1985.

47. Kobberling, J.; McIntosh, C.; Blossey, C. - Binding capacity and affinity of membrane bound hGH-receptors from rabbit liver. Studies of age dependence, influence of hGH pretreatment and receptor stability. Acta Endocr. Suppl. 215:13, 1978.

48. Korner, A. - The effect of hypohysectomy of the rat and of treatment with growth hormone on the incorporation of aminoacids into liver proteins in a cell-free system. Biochem. J. 73:61-71, 1959.

49. Kostyo, J.L.; Wilhelmi, A.E. - Conference on the structure-function relationship of pituitary growth hormone: a report. Metabolism 25: 105-24, 1976

50. Lesniak, M.A.; Roth, J.; Gorden, P.; Gavin III, J.R. - Human growth hormone radioreceptor assay using cultured human lymphocytes. Nature New Biol. 241: 20-22, 1973.

51. Lesniak, M.A.; Gorden, P.; Roth, J. Gavin III, J.R. - Binding of  $^{125}\text{I}$ -hGH to specific receptors in human cultured lymphocytes: characterization of the interaction and a sensitive radioreceptorassay. J. Biol. Chem. 249 1661-67, 1974.

52. Lesniak, M.A., Gordon, P.; Roth, J. - Reactivity of non-primate growth hormones and prolactins with human growth hormone on cultured human lymphocytes. J.Clin.Endocrinol.Metab. 44:838-49, 1977
53. Leung, D.W.; Spencer, S.A.; Cachianes, G.; Hammonds, R.G.; Collins, G.; Henzel, W.J.; Barnard, R.; Waters, M.J.; Wood, W.I. - Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. Nature 330:537-43, 1987.
54. McDonaghey, P.; Sledge, C.B. - Production of "sulfation factor" by the perfused liver. Nature 225:1249-50, 1970
55. Moore, W.V.; Leppert, P.; Fix, J.A. - Comparison of human growth hormone binding to rat liver plasma and Golgi membranes. Horm. Metab. 13:621-26, 1981.
56. Moore, W.V.; Draper, S.; Hunger, C.H. - Species variation in the binding of hGH to hepatic membranes. Hormone Res. 21: 33-45, 1985.

57. Murphy, L.J.; Vrhovsek, E.; Lazarus, L. - Identification and characterization of specific growth hormone receptors in culture human fibroblasts J Clin Endocrinol Metab. 57:1117-1124, 1983.
58. Murphy, L.J.; Vrhovsek, E.; Lazarus, L. - Characterization of specific growth hormone binding sites in mouse fibroblasts. Endocrinology 113:750-57, 1983.
59. Nakazone, A.; Pupo, A.A.; Pieroni, R.R. - Radioimunoensaio com duplo anticorpo para dosagem de hormônio de crescimento humano no soro. Arg Bras Endocrinol Metab. 22(1):29-33, 1978
60. Niall, H.D.; Hogan, M.L.; Saver, R.; Rosenblum, I.Y.; Greenwood, F.C. - Sequences of pituitary and placental lactogen and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. Proc Natl Acad Sci 68:866-69, 1971.
61. Nicolau, W.; Villares, S.M.; Cardia, R.G.; Palomino, A.; Bilharinho, B.M.; Bloise, W.; Assis, L.M.; Mattar, E. - Extração e purificação de hormônio de crescimento de hipófises humanas congeladas (hGH-HC). Arg Bras Endocrinol Metab. 28:83-86, 1984.

62. Pavlakis, G ; Hizuka, N.; Gordon, P ; Seeburg, P.; Hamer, D.H. - Expression of two human growth hormone genes in monkey cells infected by simion virus 40 recombinants. Biochemistry 28:7398-7402, 1981.
63. Posner, B.I.; Kelly, P.A.; Shiu, R.P.C.; Friesen, H G - Studies of insulin, GH and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. Endocrinology 95:521-31, 1974.
64. Posner, B.I. - Characterization and modulation of growth hormone and prolactin binding in mouse liver. Endocrinology 98:645-54, 1976.
65. Postel-Vinay, M.C.; Desbiquois, B. - Interaction of human growth hormone with isolated rat liver cells. Endocrinology 100:209, 1977.
66. Ranke, M.B ; Stanley, C.A.; Tenore, A.; Rodbard, D.; Bongiovanni, A.M.; Parlis, J.S. - Characterization of somatogenic and lactogenic binding sites in isolated rat hepatocytes. Endocrinology 99:1033-45, 1976.

67. Ranke, M.B.; Stanley, C.A.; Rodbard, D.; Baker, L.; Bongiovanni, A.; Parkis, J.S. - Sex differences in binding of human growth hormone to isolated rat hepatocytes. Proc. Natl Acad. Sci. 130:847-51, 1976.

68. Rodbard, D. - Quality control for RIA - radioimmunoassay and related procedures in medicine. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium held in Berlin, Oct 31-4 Nov, 1977. Vienna, 1978. V.1, p 469-514.

69. Roguin, L.P.; Sanchez, S.H.; Bonifacio, J.S.; Paladini, A.C. - Human somatotropin binding to rabbit kidney microsomal fraction. Biochem. J. 200:257-64, 1981.

70. Roth, J.; Grunfeld, C. - Mecanismos de ação de hormônios peptídicos e catecolaminas. In: Wilson, J.D.; Foster, W.D., eds. Tratado de Endocrinologia William. Ed. Manole Ltda., 1988. Cap.4, p.96-153.

71. Roupas, P., Herington, A.C. - Intracellular processing of growth hormone receptors by adipocytes in primary culture. Mol Cell Endocrinol 57:93-99, 1988.

72. Roupas, P.; Herington, A.C. - Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. Mol Cell Endocrinol 61:1-12, 1989.

73. Salmon, W.D.; Daughaday, W. - A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. J.Lab Clin Med 49:825, 1957.

74. Scatchard, G. - The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann N.Y.Acad Sci 51:600-72, 1949.

75. Schacterle, G.R.; Pollack, R.L. - A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. Anal Biochem 51:654-55, 1973.

76. Spencer, S.A.; Hammonds, R.G.; Benzel, W.J.; Rodriguez, H.; Waters, M.J.; Wood, W.I. - Rabbit liver growth hormone receptor and serum binding protein. J.Biol.Chem 263:7862-67, 1988.



77. Thomas, H.; Green, I.C.; Wallis, M.; Aston, R. - Heterogeneity of growth hormone receptors detected with monoclonal antibodies to human growth hormone. Biochem. J. 243:365-72, 1987.
78. Tiong, T.S.; Freed, K.A.; Herington, A.C. - Identification and tissue distribution of messenger RNA for the growth hormone receptor in the rabbit. Bioch. Bioph. Res. Commun. 158:141-48, 1989.
79. Touber, J.L.; Maingay, D. - Heterogeneity of human growth hormone. Its influence on a radioimmunoassay of the hormone in serum. Lancet i, 1403-05, 1963.
80. Tsushima, T.; Friesen, H.G. - Radioreceptorassay for growth hormone. J.Clin. Endocrinol. Metab. 37:334-37, 1973.
81. Tsushima, T.; Sasaki, N.; Imai, Y.; Matsuzaki, F.; Friesen, H.G. - Characteristics of solubilized human-somatotropin-binding protein from the liver of pregnant rabbits. Biochem. J. 187:479-92, 1980.
82. Turyn, D.; Dellacha, J.M. - Specific binding of iodinated growth hormone to rat liver in vivo. Endocrinology 103: 1190-95, 1978.

83. Wallis, M. - Growth hormone deletions in the protein and introns in the gene. Nature 284:512, 1980.

84. Waters, M.J.; Friesen, H.G. - Purification and partial characterization of a nonprimate GH receptor. J. Biol. Chem. 254:6815-25, 1979.

85. Webb, C.F.; Cadman, H.F.; Wallis, M. - The specificity of binding of growth hormone and prolactin to purified plasma membrane from pregnant rabbit liver. Biochem. J. 236:657-63, 1986.

86. Ymer, S.I.; Herington, A.C. - Water-soluble hepatic growth hormone receptors: structural studies using gel chromatography and chemical cross-linking. Endocrinology 114:1732-39, 1984.

87. Ymer, S.I.; Herington, A.C. - Evidence for the specific binding of growth hormone to a receptor-like protein in a rabbit serum. Mol. Cell. Endocrinol. 41:153-61, 1985.