



CNEN/SP

**ipen** Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO HORMÔNIO  
TIREOTRÓFICO HUMANO RECOMBINANTE (rec-hTSH)  
CONTENDO UMA SUBUNIDADE BETA QUIMÉRICA  
( rec-hTSH $\beta$ -CTEP hCG  $\beta$  )**

**YOKO MURATA**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear.**

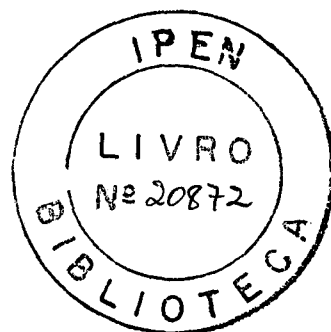
**Orientador:  
Dr. Paolo Bartolini**

**São Paulo  
1995**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR  
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO HORMÔNIO  
TIREOTRÓFICO HUMANO RECOMBINANTE (rec-hTSH)  
CONTENDO UMA SUBUNIDADE BETA QUIMÉRICA  
(rec-hTSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$ )**

**YOKO MURATA**



Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.

*Orientador:* Dr. PAOLO BARTOLINI

**São Paulo  
1995**

*Aos meus pais,  
por firmarem cada passo de minha vida;*

*À Kei-Lin,  
pela alegria;*

*Em especial ao Guck,  
pela paciência, apoio e constante incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao Dr. Paolo Bartolini pela orientação;*

*A Dra. Lata Joshi pela inestimável colaboração;*

*Ao Dr. Bruce Weintraub pelo apoio e por ter cedido as dependências e recursos do laboratório "Molecular and Cellular Endocrinology Branch" no "National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases" do "National Institutes of Health", Bethesda, MD, nos EUA;*

*Ao Dr. Carlos Henrique Mesquita e MSc. Maria Teresa C. P. Ribela pelo auxílio nas análises dos índices farmacocinéticos;*

*Ao Dr. José Roberto Rogero pelo apoio;*

*Aos colegas da Supervisão de Radioensaios e do "Molecular and Cellular Endocrinology Branch" pela participação e estímulo na realização deste trabalho;*

*Ao CNPq pela concessão de bolsa de especialização no exterior;*

*A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho;*

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO HORMÔNIO TIREOTRÓFICO HUMANO  
RECOMBINANTE (rec-hTSH) CONTENDO UMA SUBUNIDADE BETA  
QUIMÉRICA (rec-hTSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$ )**

**Yoko Murata**

**RESUMO**

O hTSH recombinante tem sido utilizado com sucesso em estudos pré-clínicos no câncer tiroideano. Devido ao seu potencial terapêutico, construímos um análogo de hTSH pela fusão do peptídeo da extensão do terminal carboxila do hCG $\beta$  com o hTSH $\beta$ . Quando esta construção foi co-expressa com o DNA complementar ou o minigene da subunidade  $\alpha$  em células de rim de macaco verde africano (Cos-7) ou células de rim de embrião humano (293), o gene de fusão produziu um hTSH quimérico com meia-vida plasmática prolongada e com atividade *in vivo* aumentada. A adição de 29 aminoácidos com quatro cadeias de oligossacarídeos de ligação-O não afetou a heterodimerização e a secreção do hTSH quimérico. O hTSH nativo ou quimérico secretado pelas células Cos-7 ou 293 apresentaram ampla diferença na meia-vida plasmática, provavelmente devido a diferenças no terminal de ácido siálico e sulfato das cadeias oligossacarídicas das mesmas. Em contraste, o hTSH nativo e quimérico secretados por ambas linhagens celulares demonstraram uma atividade *in vitro* similares (produção de AMPc e incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina em células FRTL-5), sugerindo que o terminal sialilado e sulfatado não alteram a bioatividade *in vitro*. A quimera produzida nas células Cos-7 mostrou o aumento máximo de meia-vida plasmática, indicando desta maneira a importância do ácido siálico para o prolongamento da mesma e na potência *in vivo*. A sulfatação de ambas subunidades, predominantemente na subunidade  $\beta$  e menos na  $\alpha$ , parece ser responsável, pelo menos parcialmente, pelo aumento dos coeficientes de eliminação plasmáticas do hTSH nativo e quimérico secretados pelas células 293. Além do potencial terapêutico o hTSH quimérico produzido em várias linhagens celulares poderá ser utilizado como um instrumento para se determinar a importância do sulfato e ácido siálico na depuração metabólica e, conseqüentemente, na bioatividade.

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HUMAN RECOMBINANT  
THYROTROPIN (rec-hTSH) WITH A CHIMERIC  $\beta$ -SUBUNIT  
(rec-hTSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$ )**

**Yoko Murata**

**ABSTRACT**

Recombinant hTSH is now successfully being used in clinical studies of thyroid cancer. Because of its therapeutic potential, we have constructed a longer acting analog of hTSH by fusing the carboxy terminal extension peptide (CTEP) of hCG $\beta$  onto hTSH $\beta$ . When coexpressed either with  $\alpha$ -subunit complementary DNA or  $\alpha$ -minigene in African green monkey (Cos-7) and human embryonic kidney (293) cells, the chimera was fully bioactive *in vitro* and exhibited enhanced *in vivo* potency associated with a prolonged plasma half-life. The addition of 29 amino acids with 4 O-linked oligosaccharide chains did not affect the assembly and secretion of chimeric TSH. Wild type (WT) and chimeric hTSH secreted by Cos-7 and 293 cells displayed wide differences in their plasma half-lives, presumably due to the difference in the terminal sialic acid and sulfate of their oligosaccharide chains. Chimeric and WT hTSH secreted by both cell lines demonstrated similar bioactivity in cAMP production, with some differences in [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation. Chimeric hTSH secreted by Cos-7 appears to be more active than that secreted by 293 cells, as judged by growth assay. Cos-7-produced chimeric hTSH showed the maximum increase in half-life, indicating the importance of sialic acid in prolonging half-life and *in vivo* potency. Sulfation of both subunits, predominantly  $\beta$  and to a lesser extent  $\alpha$ , appears to be responsible, at least in part, for the increased metabolic clearance of WT and chimeric TSH secreted by 293 cells. Apart from its therapeutic potential, chimeric TSH produced in various cell lines can be used as a tool to delineate the roles of sulfate and sialic acid in the *in vivo* clearance and, thereby in the *in vivo* bioactivity.

# SUMÁRIO

Página

## ***1 INTRODUÇÃO***

1.1 Aspectos gerais-----	1
1.2 Hormônios glicoprotéicos-----	2
1.2.1 Subunidade alfa ( $\alpha$ )-----	2
1.2.2 Subunidades beta ( $\beta$ )-----	3
1.2.3 Hormônio folículo estimulante (hFSH)-----	3
1.2.4 Hormônio luteinizante (hLH) e Gonadotrofina coriônica (hCG)-----	3
1.2.4.1 A extensão peptídica carboxi-terminal de hCG $\beta$ (CTEP)-----	4
1.2.4.2 Interação hCG-receptores de hTSH-----	6
1.2.5 Hormônio estimulador da tireóide (hTSH)-----	6
1.2.5.1 O terminal carboxílico de hTSH $\beta$ -----	7
1.2.5.2 Ligação do hTSH em seu receptor-----	8
1.2.6 Secreção das subunidades $\beta$ transfectadas isoladamente e em combinação com a subunidade $\alpha$ -----	8
1.3 Relação atividade biológica-oligossacarídeos-----	10
1.4 Situação atual das glicoproteínas recombinantes-----	15
1.5 Objetivos do trabalho-----	16

## ***2 MATERIAIS E MÉTODOS***

2.1 Purificação de fragmentos de DNA-----	17
2.1.1 Purificação em membranas de DEAE-celulose-----	17
2.2 Amplificação dos plasmídeos-----	17
2.3 Purificação de plasmídeos-----	18
2.4 Seqüenciamento de DNA-----	18
2.5 Modificação do gene da subunidade beta da tireotrofina humana (hTSH $\beta$ )-----	19
2.6 Construção da quimera-----	23
2.7 Inserção dos genes no vetor de expressão-----	26
2.8 Transfecção transiente das células 293 e Cos-7-----	27
2.9 Transfecção de células 293 para a obtenção de uma linhagem estável, secretora de TSH nativo ou quimérico-----	29
2.10 Imunoensaio-----	30

2.11	Avaliação da atividade biológica <i>in vitro</i> -----	31
2.11.1	Ensaio de produção de AMP cíclico (AMPC)-----	31
2.11.2	Ensaio de crescimento das células FRTL-5-----	32
2.11.3	Ensaio de ligação ao receptor de TSH-----	32
2.12	Avaliação da atividade biológica <i>in vivo</i> -----	33
2.13	Índices farmacocinéticos do rec-hTSH-----	33
2.14	Marcação metabólica-----	34
2.15	Marcação com Na <sub>2</sub> <sup>35</sup> SO <sub>4</sub> -----	35
2.16	Imunoprecipitação e análise em gel de poliacrilamida-----	35
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	
3.1	Construção dos genes hTSHβ e quimera hTSHβ-CTEP hCGβ-----	37
3.2	Transfecção transiente de células em cultura-----	41
3.3	Bioatividade <i>in vitro</i> do hTSH nativo e hTSH quimérico-----	42
3.4	Atividade biológica <i>in vivo</i> -----	46
3.5	Índices farmacocinéticos dos rec-hTSH nativo e quimérico-----	47
3.6	Marcação metabólica das células 293 e CHO com <sup>35</sup> S-metionina-----	51
3.7	Marcação metabólica das células 293 com <sup>35</sup> S-sulfato-----	55
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> -----	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> -----	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>64</b>



# 1 Introdução

## 1.1 Aspectos gerais

Muitas proteínas, com potencial terapêutico, têm sido obtidas através de técnicas de engenharia genética por expressão do DNA recombinante em sistemas heterólogos. Estas técnicas vem substituindo, por exemplo, a extração e purificação de hormônios realizada a partir de hipófises humanas, onde estes estão presentes entre outras proteínas em quantidades mínimas <sup>93</sup>. Além da dificuldade no isolamento destes hormônios devido às características físico-químicas extremamente similares entre os mesmos, existem graves dificuldades de ordem ético-legal na obtenção e utilização destas glândulas derivadas de autópsia. Existem também perigos de contaminações por vírus de Creutzfeld-Jacob, que são vírus lentos de ação letal, sendo conhecidos casos de óbito ocorridos no EUA e na Europa por injeção de hormônio de crescimento humano extraído de hipófises, além dos perigos devidos ao aumento na incidência de cadáveres contaminados pelo vírus da AIDS.

Entre as várias proteínas recombinantes obtidas em diferentes sistemas, temos como exemplos: proteína ativadora de plasminogênio (produzida em CHO, células de ovário de hamster chinês <sup>45</sup>), eritropoietina (produzida em CHO <sup>28, 71</sup>), gonadotrofina coriônica humana (produzida em células renais de macaco <sup>72</sup>, ou CHO <sup>59</sup>), hormônio tireotrófico humano (produzido em CHO <sup>11, 98</sup>, ou em células renais de macaco ou humanas <sup>102</sup>), hormônio folículo estimulante (produzido em CHO <sup>26, 27</sup>), hormônio luteotrófico humano (produzido em células tumorais de hipófise de rato <sup>5</sup>, ou em CHO <sup>60</sup>), imunoglobulinas (produzidas em CHO <sup>103</sup>), insulina (produzida em células corticotróficas <sup>20</sup>), hormônio de crescimento humano (produzido em *E. coli* <sup>3, 31</sup>), prolactina humana (produzida em *E. coli* <sup>63, 68</sup>), hormônio da paratireóide e citocinas. Estas proteínas recombinantes são utilizadas no tratamento das diversas doenças humanas ou em estudos da relação estrutura-função <sup>29, 71</sup>.

A maioria destas proteínas expressas em sistemas heterólogos, são glicoproteínas com oligossacarídeos ligados covalentemente à cadeia peptídica. As cadeias peptídicas são fielmente construídas quando expressas em bactérias ou diferentes linhagens celulares de mamíferos, o

que não acontece com as cadeias de oligossacarídeos. A glicosilação ocorre apenas nas células eucariotas e depende da disponibilidade e acessibilidade das várias glicosiltransferases e glicosidasas, desta maneira, os diferentes tipos celulares expressam a mesma proteína com estruturas glicosídicas variadas <sup>32, 67</sup>.

## 1.2 Hormônios glicoprotéicos

A família de hormônios glicoprotéicos que inclui o hormônio estimulador da tireóide ou tireotrofina (hTSH), hormônio foliculo estimulante ou foliculotrofina (hFSH), hormônio luteinizante ou luteotrofina (hLH), produzidos no lóbulo anterior da hipófise e a gonadotrofina coriônica (hCG), produzida na placenta, têm em comum uma subunidade alfa ( $\alpha$ ) unida por ligação não covalente a uma subunidade beta ( $\beta$ ) específica. As subunidades isoladas não apresentam atividades biológicas, sendo portanto a ação de cada hormônio dependente do arranjo correto entre as subunidades  $\alpha/\beta$  e do processamento das cadeias de carboidrato do heterodímero <sup>30, 37</sup>.

### 1.2.1 Subunidade alfa ( $\alpha$ )

Um único gene, localizado no cromossoma 6, codifica a subunidade  $\alpha$ . Seu cDNA de 621 pb foi isolado e clonado em 1979 por Fiddes & Goodman <sup>21</sup>, e o DNA genômico foi clonado, pelos mesmos autores, em 1981 <sup>23</sup>. Este gene apresenta 4 exons e 3 introns (exons I, II III e IV de 94, 95, 185 e 78 pb; e introns I, II e III de 6,4; 1,7 e 0,4 kb respectivamente) que traduzem uma proteína de 92 aminoácidos, com 10 cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto e peso molecular de 11 kDa. A esta subunidade são adicionadas duas cadeias de oligossacarídeos de ligação-N, nas asparaginas 52 e 78, aumentando o seu peso molecular para 21 kDa <sup>100</sup>. Numa mesma espécie, a sequência de aminoácidos é idêntica para os quatro hormônios glicoprotéicos <sup>7</sup>. No entanto, a estrutura de carboidratos pode variar, devido às mudanças na conformação da subunidade  $\alpha$  induzida pelas diferentes cadeias das subunidades  $\beta$ , ou em

consequência da presença de diferentes enzimas envolvidas no processamento de carboidratos na hipófise ou placenta <sup>100</sup>.

### **1.2.2 Subunidades beta ( $\beta$ )**

As subunidades  $\beta$  têm origem em diferentes genes e a sequência de aminoácidos também diferem, proporcionando especificidade imunológica e biológica para cada hormônio. Porém, há uma considerável homologia entre os aminoácidos das subunidades  $\beta$ , especialmente na conservação das posições das 12 cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto, sugerindo a possível similaridade nas estruturas terciárias das mesmas <sup>70</sup>.

### **1.2.3 Hormônio folículo estimulante (hFSH)**

O hFSH é um hormônio importante para o desenvolvimento das funções reprodutivas normais, estimulando o crescimento dos folículos ovarianos e as células de Sertoli dos túbulos seminíferos testiculares. Sua subunidade  $\beta$  tem o DNA genômico de 3,7 kb, localizado no cromossoma 11, inclui os exons I (61 pb), exon II (165 pb), exon III (1 kb) e 2 introns (0,7 e 1,35 kb, respectivamente). O gene de FSH $\beta$  é o único, entre os hormônios glicoprotéicos, a processar na porção 3' uma região não codificadora tão extensa, podendo estar envolvida na regulação da síntese de FSH, influenciando a estabilidade do mRNA. Este gene codifica uma proteína de 110 aminoácidos, que é glicosilada na asparagina 24, apresentando peso molecular aproximado de 21 kDa <sup>46</sup>.

### **1.2.4 Hormônio luteinizante (hLH) e Gonadotrofina coriônica (hCG)**

O hLH estimula os testículos e os ovários a produzirem esteróides que participam da espermatogênese e a ovulação, respectivamente. A hLH $\beta$  tem 121 aminoácidos, codificados em 3 exons (40, 168 e 159 pb, respectivamente) e 2 introns (350 e 230 pb), sendo glicosilada na asparagina 30. Esta subunidade tem cerca de 82% de

homologia, nos primeiros 114 aminoácidos, com a subunidade beta de hCG, composta de 145 aminoácidos, também codificada em 3 exons de 40, 168, 161 pb, respectivamente e com 2 introns de tamanho idêntico aos de hLH $\beta$  <sup>85</sup>. O hCG, produzido na placenta, atua no mesmo receptor do hLH, estimulando os ovários a sintetizar esteróides que são essenciais para a manutenção da gravidez. Ambas, hLH $\beta$  e hCG $\beta$ , estão localizadas no cromossoma 19. Neste cromossoma, encontram-se 1 cópia do gene de hLH $\beta$  e 7 cópias do gene hCG $\beta$ , tendo-se evidências de que pelo menos duas destas cópias são ativamente transcritas <sup>8, 42, 84, 85</sup>.

A hCG $\beta$  tem duas cadeias oligossacarídicas unidas às asparaginas 13 e 30 por ligação-N e, adicionalmente, 4 cadeias oligossacarídicas unidas às serinas das posições 121, 127, 132 e 138 da extensão peptídica carboxi-terminal (CTEP), por ligação-O.

#### 1.2.4.1 A extensão peptídica carboxi-terminal de hCG $\beta$ (CTEP)

A subunidade  $\beta$  de hCG tem as cadeias de carboidratos de ligações-O negativamente carregadas, ausentes nas outras subunidades  $\beta$ , na extensão peptídica de 29 aminoácidos hidrofílicos (CTEP) <sup>22, 84</sup>. Acredita-se que o CTEP confere à gonadotrofina coriônica maior estabilidade e alta atividade *in vivo*, devido ao aumento da meia-vida plasmática, quando comparada com os demais hormônios de sua classe <sup>96</sup>.

Para analisar a contribuição dos aminoácidos do terminal carboxílico na secreção de hCG, El-Deiry e colaboradores <sup>18</sup> construíram uma mutante da subunidade hCG $\beta$  sem os 24 aminoácidos Lys<sup>122</sup>-Gln<sup>145</sup>. Esta mutante, transfectada em células CHO, associou-se com a subunidade de CG $\alpha$  bovina, e o produto foi capaz de estimular a produção de AMP cíclico e a biossíntese de progesterona em células MA-10 (células de Leydig, tumorais de testículo de camundongo), verificando que os últimos 24 aminoácidos contribuem pouco nestas atividades biológicas *in vitro*. Estes resultados foram confirmados por Chen e Puett <sup>10</sup>, que construíram mutantes da hCG $\beta$ , retirando as sequências Gly<sup>101</sup>-Gln<sup>145</sup> ou Cys<sup>93</sup>-Gln<sup>145</sup>. Os autores observaram que a mutante des(101-145)hCG $\beta$  manteve a capacidade de associação com a subunidade  $\alpha$ , apresentando uma atividade biológica *in vitro* reduzida, enquanto a mutante des(93-145)hCG $\beta$  não foi

capaz de formar o heterodímero, mostrando a importância dos resíduos de aminoácidos Cys<sup>93</sup>-Cys<sup>100</sup>, no arranjo e bioatividade deste hormônio.

Para avaliar os efeitos da glicosilação nas serinas da hCG $\beta$ , na estrutura, heterodimerização e secreção de hCG, Matzuk e colaboradores <sup>59</sup> transfetaram, com os genes de hCG $\beta$  ou hCG $\beta$  e hCG $\alpha$ , células mutantes de CHO (deficientes em epimerase UDP-Gal/UDP-GalNAc 4, as quais permitem a inibição reversível na glicosilação de ligação-O). Os resultados confirmaram a hipótese de que a glicosilação de ligação-O ocorre no complexo de Golgi, e que as cadeias de glicosilação-O não são responsáveis pela rápida secreção ou pela eficiente dimerização com hCG $\alpha$  *in vitro*, não excluindo porém, a sua provável relevância na secreção placentária, onde é naturalmente produzida. Em 1990 <sup>56</sup>, os mesmos autores, confirmaram os resultados obtidos *in vitro* de deglicosilação da ligação-O e, ao realizarem estudos de atividade biológica *in vitro*, observaram que tanto a amostra sem os oligossacarídeos de ligação-O, como a amostra de hCG obtida com a subunidade  $\beta$  sem os últimos 30 aminoácidos, não apresentaram diferenças significativas na ligação ou ativação dos receptores de células MA-10, quando comparadas ao hCG nativo. Porém, os ensaios *in vivo* destas amostras demonstraram que a presença da extensão peptídica no terminal carboxílico, assim como as cadeias de oligossacarídeos de ligação-O, têm um papel importante no prolongamento da meia-vida circulatória, devido à diminuição da velocidade de depuração renal. Os autores sugeriram que o CTEP possa proteger o hCG da ação das proteases séricas, minimizando o metabolismo de hCG e, ainda, aumentar a solubilidade do hormônio na circulação, conseqüentemente permitindo mais longa permanência no plasma (o que aumenta a possibilidade de interação com seus receptores), ou alternativamente, que o CTEP, influencia na estabilidade do dímero, alterando o processamento dos oligossacarídeos de ligação-N.

Em conclusão, o peptídeo da extensão carboxi-terminal, embora não seja essencial na formação do heterodímero, nem na ação *in vitro* do hormônio, pode servir como um determinante crítico para manutenção dos altos níveis circulantes de hCG, durante um período fisiológico crítico de síntese no primeiro trimestre de gravidez <sup>56</sup>.

Em adição, os estudos realizados por Birken e colaboradores <sup>6</sup>, verificaram que anticorpos gerados a partir do peptídeo de 23 aminoácidos do terminal carboxílico, com ou sem as cadeias de oligossacarídeos, embora reagissem especificamente com hCG íntegro, não apresentavam suficiente

sensibilidade para a utilização dos mesmos em imunoenaios de hCG. Por sua vez, Dirnhofer e colaboradores <sup>14</sup> demonstraram que o peptídeo sintético, idêntico ao terminal carboxílico de 30 aminoácidos de hCG $\beta$  ou os anticorpos anti-hCG $\beta$ CTEP, não foram capazes de bloquear a ligação do hCG ao receptor ou a atividade biológica do hormônio íntegro.

#### 1.2.4.2 Interação hCG-receptores de hTSH

Há várias evidências da atividade intrínseca do hCG na estimulação dos receptores de hTSH <sup>66</sup>. Durante a fase inicial de uma gestação, há relatos de níveis elevados de T4 e T3 com diminuição dos níveis séricos de hTSH, sendo também observados hipertiroidismo clínico e bioquímicos em pacientes com coriocarcinomas <sup>47</sup>. De fato, tanto a linhagem celular de tireóide de rato Fisher (FRTL-5) <sup>40</sup> quanto células CHO transfectadas com receptores de TSH humanos <sup>92</sup>, responderam de forma dose-dependente à hCG purificada.

Carayon e colaboradores <sup>9</sup> propuseram a existência de uma relação entre a atividade tireotrófica do hCG e a estrutura primária do terminal carboxílico, visto que a remoção enzimática dos dois últimos aminoácidos da porção carboxílica de hCG $\beta$ , aumentou a estimulação da produção de AMP cíclico em membranas de tireóide humana, quando comparada à hCG nativa.

#### 1.2.5 Hormônio estimulador da tireóide (hTSH)

A tireotrofina humana ou hormônio estimulador da tireóide apresenta uma função fisiológica fundamental na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, estimulando a produção e a secreção dos hormônios tireoideanos. A hTSH $\beta$  tem o DNA genômico localizado no cromossoma 1 <sup>15</sup>, com o exon I de 37 pb, não traduzido, o exon II de 163 pb, que codifica o *lider peptide* de 20 aminoácidos e os primeiros 34 aminoácidos da hTSH $\beta$ , o exon III de 326 pb, que contem a região codificadora dos aminoácidos 35 a 118 e a sequência 3' não traduzida. Os exons são separados por 2 introns de 3,9 e 0,45 kb. A subunidade tem 12 cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto com o peso molecular aproximado

de 13 kDa, e quando é glicosilada na asparagina 23, tem seu peso molecular aumentado para 18 kDa <sup>35, 39, 101</sup>.

### 1.2.5.1 O terminal carboxílico de hTSH $\beta$

O gene de hTSH $\beta$  codifica uma proteína de 118 aminoácidos, no entanto, quando é isolada de hipófises, a subunidade  $\beta$  de hTSH apresenta 112 aminoácidos, terminando em tirosina. Este resíduo terminal não é comumente encontrado como consequência de reações de clivagens proteolíticas que ocorrem durante o processamento fisiológico de pré-hormônios. Além disso, estas reações geralmente envolvem dois aminoácidos básicos (lisina ou arginina) adjacentes ao resíduo da clivagem que, neste caso, não estão presentes. No entanto, é possível que este processamento fisiológico ocorra na biossíntese de hTSH, envolvendo uma enzima de clivagem proteolítica incomum, ou, alternativamente, a diferença encontrada pode ser uma consequência da clivagem proteolítica, durante a purificação do hormônio <sup>83, 100, 101</sup>.

Para elucidar a função dos 6 aminoácidos terminais, os pesquisadores Takata e colaboradores <sup>83</sup> construíram o cDNA de hTSH $\beta$  sem os últimos 6 aminoácidos do terminal carboxílico. Este gene foi co-transfectado em células CHO com o cDNA da subunidade  $\alpha$  e a linhagem celular transfectada secretou TSH na forma heterodimérica, demonstrando que o hexapeptídeo carboxi-terminal na subunidade  $\beta$  não é essencial na associação com a subunidade  $\alpha$ . Sua atividade biológica *in vitro*, analisada em células de tireóide de rato e comparada com o TSH nativo, também não foi alterada pela ausência deste peptídeo terminal. Outro resultado interessante observado pelos autores, é a heterogeneidade de subunidades  $\beta$ , produzidas pelas células CHO co-transfectadas com o cDNA da subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  codificando os 118 aminoácidos. Foram encontrados polipeptídeos terminados em Tyr<sup>112</sup>, assim como subunidades  $\beta$  terminadas em Leu<sup>113</sup>, Val<sup>114</sup>, Gly<sup>115</sup>, Phe<sup>116</sup>, Ser<sup>117</sup> e Val<sup>118</sup>, sugerindo a possibilidade de que o hTSH autêntico, secretado pela hipófise, também seja heterogêneo. A mesma mutação, realizada por Lash e colaboradores <sup>49</sup>, resultou num aumento na secreção da subunidade hTSH $\beta$ , em transfecções transientes em células 293. No entanto, como a atividade *in vivo* ou a velocidade de depuração metabólica destas variantes não foram analisadas, o significado da discrepância entre os produtos do gene codificando 118

aminoácidos e a subunidade purificada de 112 aminoácidos deverá ser futuramente elucidado.

### 1.2.5.2 Ligação do hTSH em seu receptor

A ligação do hTSH, aos receptores das células foliculares da tireóide, ocorre tanto pela subunidade  $\alpha$  como pela  $\beta$ , na sua forma heterodimérica. Na hTSH $\beta$ , são relatados quatro regiões importantes nesta interação, a região amino terminal (Phe<sup>1</sup> Glu<sup>15</sup>), a região entre Val<sup>71</sup>-Cys<sup>85</sup>, a região entre Cys<sup>31</sup>-Cys<sup>52</sup>, que corresponde ao *loop* intercisteína e a porção carboxi-terminal (Cys<sup>105</sup>-Tyr<sup>112</sup>), que é a mais relevante <sup>65</sup>. Na subunidade  $\alpha$ , foram identificadas duas regiões importantes <sup>64</sup>, entre Leu<sup>26</sup>-Thr<sup>46</sup> e Ala<sup>81</sup>-Ser<sup>92</sup>. A interação, com o receptor, multifacetada, depende da participação simultânea dos vários sítios de ligação.

### 1.2.6 Secreção das subunidades $\beta$ transfectadas isoladamente e em combinação com a subunidade $\alpha$ .

Como já foi citado anteriormente, as subunidades isoladas não apresentam atividades biológicas, sendo que a ação de cada hormônio depende do arranjo correto entre as subunidades  $\alpha/\beta$ . Na tentativa de compreender a relação estrutura-função das várias subunidades  $\beta$  na interação com a subunidade  $\alpha$ , alguns autores realizaram a expressão destas subunidades isoladamente, em células CHO.

Corless e colaboradores <sup>12</sup> observaram que as subunidades  $\beta$  de hCG ou hLH apresentam cinética de secreção diferentes quando transfectadas em células tumorais de mamas de camundongo (C-127). Em células CHO <sup>59</sup>, a hCG $\beta$ , é secretada como monômero rapidamente ( $t_{1/2} \approx 100$  min) e eficientemente ( $> 90\%$ ), porém, apenas 10% da hLH $\beta$  é recuperada no meio de cultura ( $t_{1/2} \approx 8$  h). Além disso, a hCG $\beta$  combina eficientemente com a hCG $\alpha$  ( $t_{1/2} \approx 70$  min), ao contrário da hLH $\beta$  que dimeriza lentamente com a subunidade  $\alpha$ , utilizando menos que 50% do monômero de hLH $\beta$  na formação do heterodímero, enquanto o restante é degradado intracelularmente. No caso do hTSH, Matzuk e colaboradores <sup>58</sup>



verificaram que somente 5% da hTSH $\beta$ , transfectada em células CHO, é secretada no meio ( $t_{1/2} \approx 6$  h), similarmente à hLH $\beta$ , no entanto, cerca de 95% da hTSH $\beta$  dimeriza rápida e quantitativamente quando a subunidade  $\alpha$  está presente, comparavelmente à hCG. Quando o gene de hFSH $\beta$  foi transfectado em células CHO, por Keene e colaboradores <sup>46</sup>, menos que 20% da subunidade hFSH $\beta$  foi lentamente secretada ( $t_{1/2} \approx 5$  h) da mesma forma que hLH $\beta$  e hTSH $\beta$ . No entanto a co-transfecção com a subunidade  $\alpha$  resultou em aproveitamento de 90% da hFSH $\beta$ , com  $t_{1/2} \approx 90$ , similarmente a hTSH e hCG.

As diferenças entre as eficiências de secreção das subunidades  $\beta$ , poderiam estar relacionadas com as porções terminais carboxílicas das mesmas. As sequências dos genes das hLH $\beta$  e hTSH $\beta$  têm uma extensão carboxílica de aminoácidos hidrofóbicos, que podem auxiliar na retenção destas subunidades intracelularmente, enquanto a hCG $\beta$  apresenta uma terminação de 29 aminoácidos hidrofílicos. No entanto, a hFSH $\beta$  que não é secretada eficientemente como monômero, não apresenta a porção hidrofóbica encontrada em hLH $\beta$  e hTSH $\beta$  (relembrando porém, que o gene de FSH $\beta$  é o único, a processar na porção 3' uma região não codificadora extensa, possivelmente envolvida na regulação da secreção do FSH $\beta$ ). Assim, concluiu-se que a presença da porção hidrofóbica no terminal carboxílico não era o fator principal, mas que possivelmente existiriam outros fatores em comum, a serem determinados, nas subunidades de origem hipofisária que auxiliariam na retenção intracelular destas subunidades <sup>46</sup>.

Ao contrário da hCG, que é secretada constitutivamente pelos trofoblastos, os hormônios glicoprotéicos hipofisários são armazenados em grânulos e sua secreção é regulada por fatores externos. É também, conhecido que a formação do heterodímero se inicia no retículo endoplasmático <sup>4, 99, 100</sup>. Desta maneira, os determinantes responsáveis pela retenção intracelular das subunidades  $\beta$  devem ter também uma participação na distribuição intracelular, armazenamento e secreção dos hormônios hipofisários, sendo regulados fisiologicamente <sup>46, 51, 60</sup>.

### 1.3 Relação atividade biológica-oligossacarídeos

As glicoproteínas, isoladas de fontes naturais ou produzidas em sistemas heterólogos por técnicas de DNA recombinante, são estruturalmente heterogêneas, de acordo com a espécie, tecido de origem, condições fiso-patológicas *in vivo*<sup>36</sup> e condições de crescimento das células *in vitro*. O significado desta heterogeneidade ainda não é bem conhecido mas sabe-se que os oligossacarídeos podem influenciar as propriedades físico-químicas e biológicas das proteínas, devido a sua localização na superfície da glicoproteína, modificando as propriedades hidrodinâmicas. A glicosilação pode alterar a solubilidade, resistência às quebras proteolíticas, resistência à inativação térmica, estrutura terciária e quaternária, atividade intrínseca, afinidade aos receptores, antigenicidade e meia-vida biológica da proteína em questão<sup>50, 90</sup>.

A heterogeneidade das glicoproteínas deve-se à adição ou não das cadeias de oligossacarídeos, ligadas covalentemente aos aminoácidos asparagina, serina ou treonina. A ligação ao nitrogênio das asparaginas (ligação-N), depende da presença e do reconhecimento do tripeptídeo (Asn-X-Thr/Ser/Cys), onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina. No caso das cadeias ligadas ao oxigênio das serinas ou treoninas (ligação-O), os sinais necessários para sua glicosilação, que estão localizados na estrutura protéica, ainda não são bem definidos. Sabe-se, no entanto, que a glicosilação é mais provável onde se encontra um agrupamento destes aminoácidos (Ser ou Thr), além da possível associação entre os sítios de glicosilação-O e a proximidade de resíduos de prolina<sup>28, 77, 81, 97</sup>. Além disso, os oligossacarídeos variam devido às glicosidases, localizadas no retículo endoplasmático e glicosiltransferases, encontradas no complexo de Golgi, que atuam na biossíntese dos mesmos<sup>50, 78, 79, 81</sup>.

A maioria dos oligossacarídeos de ligação-N são do tipo complexo, que tem um núcleo comum de manose bifurcado, sendo encontrados em menor proporção os tipos ricos em manose ou híbridos. No caso do hCG e hFSH, são encontradas geralmente cadeias oligossacarídicas com terminações de ácido siálico (NeuAc $\alpha$ 2,3), ou galactose, N-acetil glucosamina (6Gal- $\beta$ 1, 4-GlcNAc $\beta$ ). No hTSH e hLH são encontradas também terminações em sulfato-N-acetil galactosamina, N-acetil glucosamina (SO<sub>4</sub>-4GalNAc $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ ), devido à presença de GalNAc-transferase e sulfotransferase nas células tireotróficas e

luteotróficas <sup>13, 34, 41</sup>. O número de antenas varia de 1 a 4, dependendo do hormônio e da subunidade. Em geral, nestes hormônios, são encontradas estruturas bi-antênárias, com população menor de formas multi-antênárias, com excessão do hFSH onde são frequentemente encontradas cadeias tri- ou tetra-antênárias. Já as cadeias de carboidratos de ligação-O são menores, mono-antênárias, com alta densidade de carga <sup>33, 74, 90</sup>, como podemos observar na Figura 1.

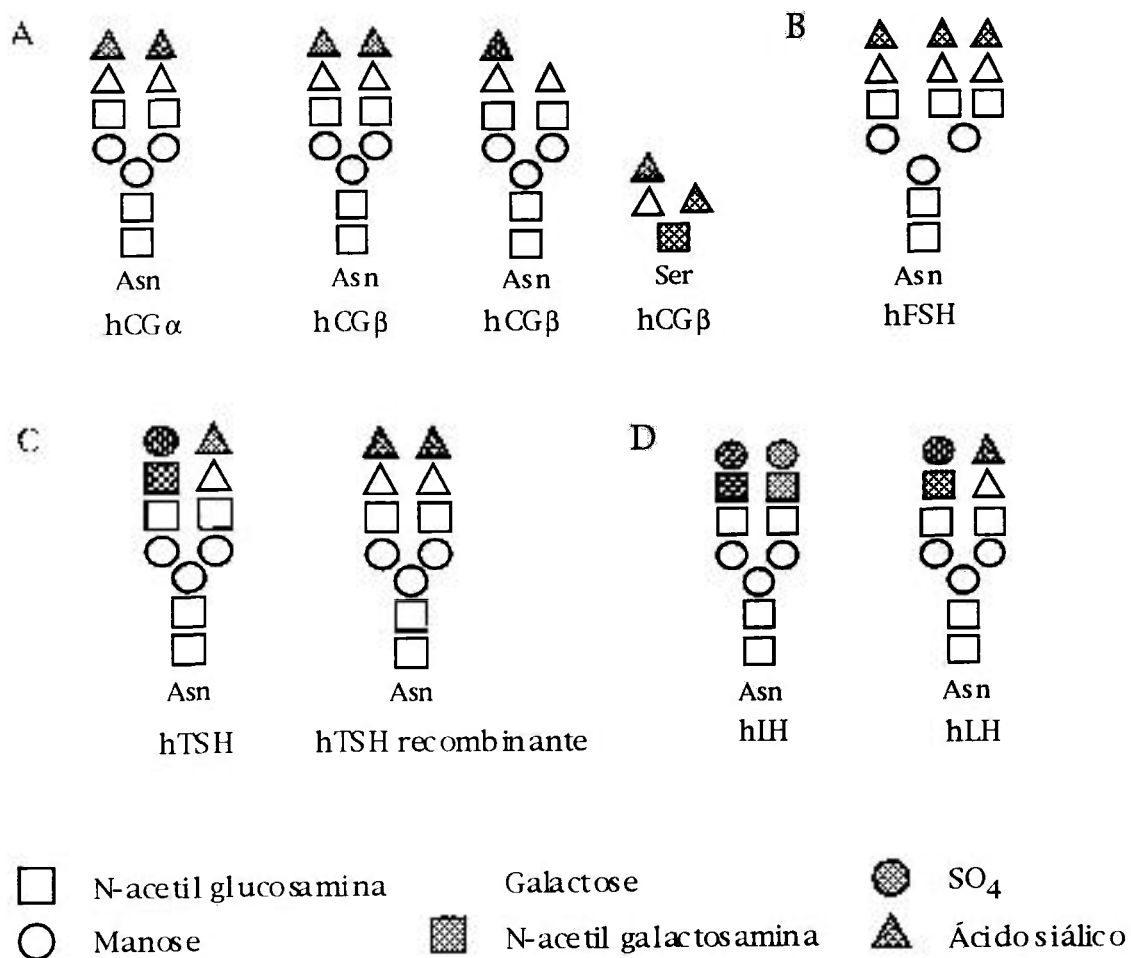


Figura 1 Exemplos de estruturas típicas das cadeias de oligossacarídeos ligadas às asparaginas ou serinas nos diferentes hormônios glicoprotéicos.

A contribuição das cadeias oligossacarídicas pode ser estudada mediante deglicosilação química ou enzimática, e também pelas técnicas de DNA recombinante.

As deglicosilações, química ou enzimática, permitiram verificar que a ausência das cadeias oligossacarídicas não inibem a ligação dos hormônios hLH, hCG, hFSH ou hTSH aos receptores teciduais <sup>16</sup>. De fato, a deglicosilação das subunidades  $\alpha$  aumenta a ligação ao receptor. Porém, as atividades pós-receptores, como a capacidade de ativar a enzima adenilato ciclase e a esteroidogênese, são reduzidas ou mesmo abolidas, demonstrando a participação dos oligossacarídeos nestas atividades <sup>2, 52, 74, 89, 99</sup>. Foi também relatado que glicopeptídeos e oligossacarídeos isolados, enzimaticamente, de diferentes glicoproteínas têm capacidade de inibir a ligação de hCG ao seu receptor, sugerindo uma interação do tipo lectina entre o hormônio e o receptor <sup>89</sup>.

As técnicas de DNA recombinante possibilitam alterar os sítios de glicosilação nas cadeias polipeptídicas, obtendo-se mutantes não glicosiladas. Matzuk e Boime <sup>54</sup>, demonstraram que a ausência do oligossacarídeo ligado à Asn<sup>13</sup> da subunidade hCG $\beta$  não afeta a secreção desta subunidade, enquanto a remoção da cadeia ligada à Asn<sup>30</sup> diminui a secreção da mesma. A ausência de ambas cadeias de ligação-N impediu a secreção da subunidade como monômero, no entanto todas as mutantes foram capazes de dimerizar com a subunidade  $\alpha$  íntegra. As mutações realizadas na subunidade  $\alpha$  demonstraram que o oligossacarídeo da Asn<sup>52</sup> é mais importante do que a cadeia ligada à Asn<sup>78</sup>, para a dimerização e secreção desta subunidade com hCG $\beta$  <sup>54</sup>. As combinações entre as mutantes na subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  comprovaram a importância do oligossacarídeo ligado à Asn<sup>52</sup> da subunidade  $\alpha$  na secreção e bioatividade da hCG <sup>57</sup>. Nos estudos sobre a contribuição das cadeias de ligação-O, em 1987, os mesmos autores <sup>59</sup> já haviam verificado que estas não são importantes na secreção do heterodímero.

Da mesma maneira, mutações realizadas no gene de hTSH $\beta$ , alterando os sítios de glicosilação, indicam que não só a presença do carboidrato na Asn<sup>23</sup> é importante na secreção e heterodimerização da mesma, assim como a substituição conservativa do aminoácido Gly<sup>29</sup> para Asn<sup>29</sup>, que está localizada em uma região conservada nas subunidades  $\beta$  das glicoproteínas, resulta em redução da secreção desta subunidade <sup>49</sup>.

Outro aspecto, decorrente do avanço nas técnicas de produção de glicoproteínas biossintéticas *in vitro*, é a possibilidade de estudar cadeias de carboidratos produzidas por linhagens celulares diferentes, comparando suas atividades com as das glicoproteínas nativas. Tipicamente as proteínas recombinantes produzidas em células CHO são consideradas de composição mais próxima à da proteína nativa. No entanto, diferenças sutis no resíduo terminal da cadeia glicosídica são conhecidas e têm sido observadas nos casos da tireotrofina e da foliculotrofina recombinantes, expressas nas células CHO, quando comparadas aos hormônios secretados pela hipófise anterior 7, 26, 30, 82, 87, 88.

Segundo Szkudlinski e colaboradores 82, a tireotrofina produzida em células CHO é composta de uma mistura de 5 isoformas de ponto isoelétrico variando entre 7,1-5,5, enquanto 6 isoformas de ponto isoelétrico variando entre 6,5-4,0 são encontradas no hTSH hipofisário. Esta variação se deve aos vários níveis de sialilação nas terminações das cadeias de oligossacarídeos presentes no hormônio. As diferentes isoformas de hTSH hipofisários terminam em N-acetil-galactosamina-sulfato e galactose-ácido siálico, enquanto os hTSH recombinantes são terminados em galactose-ácido siálico. As formas mais básicas e menos sialiladas do hTSH recombinante demonstram maior afinidade ao receptor e maior atividade *in vitro*, enquanto as formas mais ácidas, portanto mais sialiladas, mostram maior atividade *in vivo*. Os diferentes níveis de atividades *in vitro* e *in vivo*, devidos às diferentes terminações das cadeias oligossacarídicas, foram também observados por Thotakura e colaboradores 87, 88, 90 e por Morell e colaboradores 62.

Também Galway e colaboradores 26, 27, demonstraram que os genes de hFSH transfectados em células CHO mutantes deficientes no mecanismo de adição de ácido siálico ou N-acetil glucosamina, produziram hFSH sem os respectivos terminais nas cadeias oligossacarídicas. Estes produtos mantiveram a capacidade de ligação aos receptores *in vitro*, porém, apresentaram a atividade *in vivo* reduzida.

Estes estudos confirmam não só a importância da presença das cadeias oligossacarídicas, mas também das terminações das mesmas. Mais recentemente, a presença de GalNAc transferase e sulfotransferase, similares àquelas presentes na glândula pituitária, foram encontradas na linhagem celular de rim de embrião humano (293) 80. Em vista destes

dados, supõe-se que, ao expressar a proteína na linhagem celular 293 ou em outra de origem renal, seria possível produzir TSH recombinantes com estruturas oligossacarídicas similares, se não idênticas ao hTSH hipofisário. Estas estruturas seriam então fisiologicamente mais relevantes, além de permitir o estudo da influência da sulfatação no TSH recombinante e suas variantes.

#### 1.4 Situação atual das glicoproteínas recombinantes

A tireotrofina recombinante (rec-hTSH) tem sido produzida por transfecção transiente ou estável, utilizando-se o cDNA ou minigene da subunidade alfa co-transfectado com o gene modificado da subunidade beta, em CHO <sup>11, 58, 87, 98</sup> ou em linhagem de células renais, Cos-7 <sup>43, 102</sup> e 293 <sup>43, 49, 102</sup>. Atualmente o rec-hTSH expresso em células CHO tem sido utilizado no diagnóstico *in vitro* <sup>44, 73</sup> e também *in vivo*, como estimulador de captura de iodo radioativo, na detecção de tecidos de carcinoma tiroideanos residuais e lesões metastásicas, em pacientes com câncer de tireóide <sup>61</sup>. Portanto, a obtenção de rec-hTSH com potência aumentada poderia ser mais eficaz minimizando ainda mais os possíveis efeitos colaterais.

Recentemente, foi possível construir um híbrido de hFSH $\beta$  e CTEP de hCG $\beta$ , que prolonga a meia vida do hFSH e aumenta várias vezes a sua potência *in vivo* <sup>19</sup>. Da mesma forma, quando o CTEP de hCG $\beta$  foi adicionado à subunidade  $\alpha$  de hCG, a hCG quimérica teve sua ação biológica prolongada <sup>25</sup>. A atividade tireotrófica inerente ao hCG, sugere que a adição do CTEP de hCG $\beta$  ao gene de hTSH $\beta$ , resulte num produto com a atividade tireotrófica aumentada, que poderia ser então utilizado como agonista de hTSH, além de possibilitar o estudo dos efeitos, ainda desconhecidos, da adição de quatro cadeias de ligação-O na tireotrofina humana.

## 1.5 Objetivos do trabalho

Este estudo direcionou-se para duas questões principais.

1<sup>a</sup> Uma quimera hTSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$  manteria sua bioatividade intacta e teria a meia-vida plasmática aumentada?

2<sup>a</sup> Quando expresso em duas linhagens de células renais diferentes, seria possível produzir hTSH e hTSH quimérico de alta atividade *in vivo*, com oligossacarídeos em ligações N e/ou O que terminam em sulfato?

Em busca das respostas para as questões acima, dividimos este trabalho nas seguintes etapas:

Modificar o gene da subunidade beta de tireotrofina (hTSH $\beta$ ) clonado por Wondisford <sup>101, 102</sup>, a fim de melhorar a expressão de TSH em cultura celular.

Construir uma quimera de hTSH $\beta$  com o terminal carboxila (CTEP) do gene da subunidade beta da gonadotrofina coriônica (hCG $\beta$ ).

Estudar o comportamento da quimera hTSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$ , quanto à sua bioatividade e meia-vida plasmática, quando expressa em duas linhagens de células renais diferentes: células derivadas de linhagem primária de rim de embrião humano transformadas com adenovírus humano tipo 5 (293) e células de rim de macaco verde africano transformadas com vírus de macaco SV40 (Cos-7).

Verificar a natureza das terminações dos oligossacarídeos de ligações N- e/ou O-, visando a obtenção de uma forma de hTSH recombinante de composição próxima ao hTSH hipofisário.



## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Isolamento de fragmentos de DNA

Após digestão do DNA com as enzimas de restrição de interesse, obtidas da *GIBCO/BRL* (Gaithersburg, MD, EUA) ou da *Boehringer-Mannheim* (Indianapolis, IN, EUA), isolaram-se os fragmentos em gel de agarose, utilizando marcadores de peso molecular de DNA originários dos laboratórios supracitados. A agarose *SeaKem GTG* foi obtida da *FMC BioProducts*, (Rockland, ME, EUA). A concentração do gel foi modificada de acordo com o tamanho do fragmento de DNA a ser isolado: 0,5% a 4% de agarose dissolvido em solução tampão tris-hidroximetil aminometano-borato (Tris-borato) 0,09 M - ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 0,002 M.

#### 2.1.1 Purificação em membranas de DEAE-celulose

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose e transferidos para uma membrana de troca iônica, *DEAE* celulose (*NA-45*, *Schleicher & Schuell*, EUA). A membrana foi lavada utilizando-se uma solução de baixa concentração salina (NaCl 0,15 M; EDTA 0,1 mM e Tris 20 mM pH 8,0) e o DNA retido na membrana foi eluído por uma solução de alta concentração salina (NaCl 1,0 M; EDTA 0,1 mM e Tris 20 mM pH 8,0) <sup>53</sup>.

### 2.2 Amplificação dos plasmídeos

As bactérias *E.coli* cepa *DH5- $\alpha$*  da *GIBCO-BRL* (Bethesda, MD, EUA), transformadas com o plasmídeo de interesse, foram amplificadas, crescendo em meio LB (bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%) com ampicilina (100  $\mu$ g/ml), a 37° C sob agitação, até densidade de saturação: D.O.<sub>600nm</sub> = 4 - 6 unidades óticas (u.o.).

### 2.3 Purificação de plasmídeos

A purificação em larga escala dos plasmídeos foi realizada utilizando o método da lise alcalina das bactérias, purificando em colunas de afinidade denominadas, comercialmente, *QIAGEN®* da *DIAGEN GmbH*, (Hilden, Alemanha). O protocolo é baseado em trocas de tampões com alteração de pH, sendo que para a retenção do DNA na coluna foi utilizado um tampão pH 7,0 (NaCl 0,75 M; ácido propanosulfônico 3-N-morfolino (MOPS) 50 mM; Triton X-100 0,15% e etanol 15%). Para a sua eluição foi utilizado um tampão pH 8,5 (NaCl 1,25 M, Tris-HCl 50 mM e etanol 15%).

Nas preparações de menor escala foi utilizado o kit comercial da *PROMEGA* (Madison, WI, EUA). A resina retém os plasmídeos e é lavada com solução de NaCl 0,2 M, Tris 20 mM pH 7,5, EDTA 5 mM e etanol 50%. Em seguida, os plasmídeos foram eluídos em tampão pH 8,0 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).

### 2.4 Seqüenciamento de DNA

O DNA a ser seqüenciado (4 µg) foi desnaturado com uma solução contendo 2 µl de hidróxido de sódio 2 M - EDTA 2 mM e precipitado com 75 µl de etanol na presença de 2 µl de acetato de amônio 2,0 M e *primers* T7 e SP6. A seguir adotou-se o protocolo da *UBS Sequenase version 2.0®* da *United States Biochemical* (Ohio, EUA), que realiza a marcação com <sup>35</sup>S-DNTP e terminação de cadeia com dideoxinucleotídeos <sup>75</sup>. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 6,0% na presença de uréia. Os geis foram secos e auto-radiografados em filmes de raios-X *Kodak X-OMAT* (*Kodak*, St. Louis, MO, EUA)

## 2.5 Modificação do gene da subunidade beta da tireotrofina humana (hTSH $\beta$ )

A modificação do gene de hTSH $\beta$ , para obter um minigene, foi realizada a partir de amplificação de um fragmento genômico de 2000 pares de bases que contém 277 pb do intron I, exon II, intron II, exon III e aproximadamente 800 pb da porção 3' não transcrita do DNA genômico. Este fragmento estava inserido no plasmídeo pAV2.TSH $\beta$ , doado por Wondisford <sup>102</sup>. (Na Figura 2 mostra-se a sequência do DNA genômico de hTSH $\beta$ ).

Os oligonucleotídeos utilizados como *primers* para o *PCR*, (*Polimerase Chain Reaction*), que foram sintetizados num aparelho da *Applied Biosystems* (modelo 394, Foster City, CA, EUA), contendo além de um sítio de restrição sintético, três nucleotídeos para possibilitar a digestão enzimática, são os seguintes:

*primer* A = 5' TGCTCTAGAGGGTCACCACAGCATCTGCTCACCAATGC  
AAAGTAAGC ATG ACT GCT CTC TTT 3' 62 mero.  
(sítio de restrição sintético XbaI sublinhado)

*primer* B = 5' TTT GGA TCC TTA GAC AGA AAA TCC TAC CAG ATA  
AGA 3' 36 mero.  
(sítio de restrição sintético BamHI sublinhado)

A reação de *PCR* foi realizada num aparelho de ciclo térmico, *Perkin Elmer* da *Perkin Elmer/Cetus*, (Norwalk, CT, EUA), nas seguintes condições:

- 100 ng de DNA *template*,
- 10  $\mu$ l de tampão 10 vezes mais concentrado com relação a concentração final para DNA polimerase TaqI (concentração final: Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, gelatina 0,01%),
- 8  $\mu$ l de solução com 2,5 mM da mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos, dNTP (conc. final 0,2 mM),
- 100 pmol (1  $\mu$ M) de cada *primer*,
- 0,5  $\mu$ l (2,5 unidades) de DNA polimerase TaqI,
- água destilada para completar o volume para 100  $\mu$ l,
- a mistura da reação foi coberta com 100  $\mu$ l de óleo mineral.

A amplificação utilizou a seguinte programação:

denaturação inicial do DNA a 94° C, durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de denaturação a 94° C, de 1 minuto, *primer annealing* a 50° C, durante 1 minuto *primer extension* a 72° C por 2 minutos, seguido de 10 minutos a 72° C para a *final extension*.

O produto da *PCR* foi digerido com enzimas XbaI e BamHI e o fragmento clonado nos sítios respectivos do vetor pGEM®-7Zf(-), da *Promega*, (Madison, WI, EUA) gerando pGEM7Z.hTSH $\beta$  (Figura 3). Este vetor de clonagem foi utilizado para a confirmação da sequência amplificada por *PCR*.



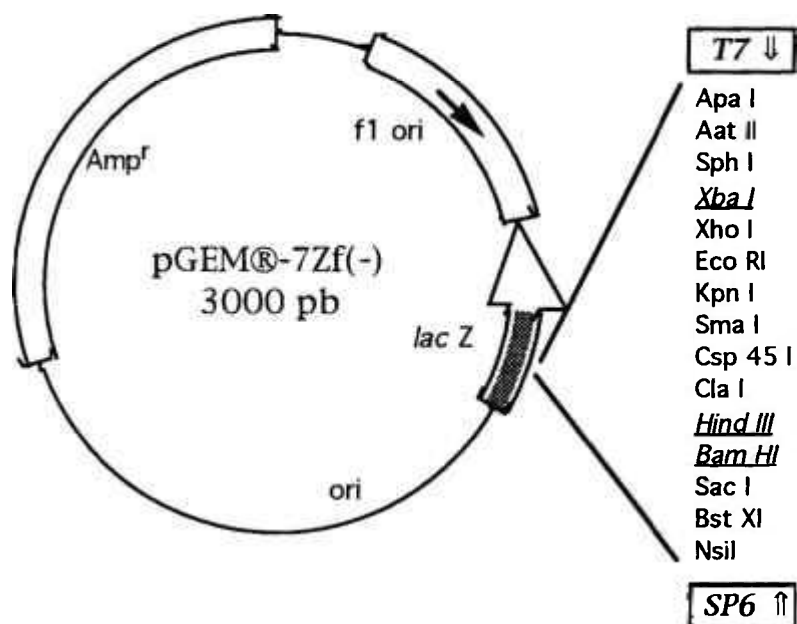


Figura 3 Mapa circular do vetor pGEM®-7Zf(-), da Promega. Indicando o gene de resistência a ampicilina ( $Amp^r$ ), a origem de replicação do plasmídeo (ori), região de replicação do fago (f1 ori), sequência do operon de  $\beta$ -lactamase (lacZ) e os sítios de clonagem do vetor. Os sítios de restrição utilizados estão sublinhados e os primers para sequenciamento, enquadrados.

## 2.6 Construção da quimera

O minigene para a construção da quimera foi obtido como na etapa anterior, a partir de pAV2.TSH $\beta$ , amplificando sob idênticas condições de reação e incubação, apenas substituindo o *primer* B, com o *primer* C.

Do *primer* B retirou-se o codon terminal, TTA, e criou-se um sítio HindIII no lugar do sítio BamHI, obtendo-se o *primer* C:

*primer* C = 5' TTT AAG CTT GAC AGA AAA TCC TAC CAG ATA  
AGA 3' 33 mer.  
(sítio de restrição sintético HindIII sublinhado)

O produto da *PCR* foi digerido com enzimas XbaI e HindIII e clonado nos respectivos sítios de restrição, do vetor pGEM7Z, gerando pGEM7Z.hTSH $\beta$ q.

Para a amplificação do fragmento de hCG $\beta$  correspondente ao domínio do peptídeo carboxílico terminal (CTEP), de 27 aminoácidos que inclui as 4 serinas glicosiladas, foi utilizado o hCG $\beta$  genômico como *template*. O DNA genômico foi cedido pelo Dr. J. Chou (*National Institute of Child Health, NIH, Bethesda, MD, EUA*). Na figura 4 mostra-se o DNA genômico de hCG $\beta$ .

Os *primers* utilizados para a amplificação do CTEP são:

*primer* D = 5' GAT AAG CTT TCT TCC TCA AAG GCC CCT CCC CCC  
AGC 3' 36 mero  
(sítio de restrição sintético HindIII sublinhado).

*primer* E = 5' TTT GGA TCC TTA TTG TGG GAG GAT CGG GGT GTC  
CGA GGG CCC 3' 42 mero  
(sítio de restrição BamHI sintético sublinhado)

As condições da reação foram idênticas àquelas utilizadas na amplificação do minigene da subunidade TSH $\beta$ , utilizando-se as condições de incubação a seguir:

denaturação inicial a 94° C, durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de denaturação a 94° C, de 1 minuto, *primer annealing* a 60° C durante 1 minuto, *primer extension* a 72° C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos nas mesmas condições para a *final extension*.

Após amplificação, o fragmento CTEP foi digerido com HindIII e BamHI, e o produto clonado no plasmídeo pGEM7Z.TSH $\beta$ q. Este plasmídeo continha a sequência confirmada do TSH $\beta$ , resultando na formação do pGEM7Z.TSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$  que contém o TSH quimérico de 996 pb.



511 gaggtataaagccaggtacaccaggcaggggacgcaccaagg ATG GAG ATG TTC CAG  
Met Glu Met Phe Gln

-20

gtaagactgcagggcccctgggcacctccacctcctccaggaacatcactggcatgagaagggggcagaccag  
tgtgagctgtggaaggagcctctttctggaggagcgtgacccccagtaagctcaggtggggcagttcctaag  
ggtggggatctgaaatgttggggcatctcaggtcctctgggctgtggggtggactctgaaaggcaggtgtccg  
ggtggtgggtcctgaataggagatgccgggaagggctctgggtctttgtgggtgggtgtgccacgtgggatgg  
gaaggccggggctcggggctcgggtctcagaccgggtgaagcagtgctcctgtcccag GGG CTG CTG  
Gly Leu Leu  
-15

CTG TTG CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA TCC AAG GAG CCG CTT CGG CCA  
Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro  
+1

CGG TGC CGC CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG GAG GGC TGC CCC GTG TGC  
Arg Cys Arg Pro Ile Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys

ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC ACC ATG gtagactgcccgg  
Ile Thr Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met  
+41

ggccggggcaggtgctgccacctcagggccagaccacagaggcagcgggggaggaaggggtggtctgct  
ctctggtcaggggctcggaatgggggtgtgggagggcaggaacagagggtctccggacctgagtctga  
gacctgtgggggcaactggggagctcagctgagggcgtggccaggcacatgctcattccccactcacag  
gctccag ACC CGC GTG CTG CAG GGG GTC CTG CCG GCC CTG CCT CAG GTG GTG TGC AAC  
Thr Arg Val Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn  
+42

TAC CGC GAT GTG CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC CCT GGC TGC CCG CGC GGC GTG AAC  
Tyr Arg Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val Asn

CCC GTG GTC TCC TAC GCC GTG GCT CTG AGC TGT CAA TGT GCA CTC TGC CGC CGC AGC  
Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu Cys Arg Arg Ser

ACC ACT GAC TGC GGG GGT CCC AGG GAC CAC CCC TTG ACC TGT GAT GAC CCC CGC TTC  
Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe

⇒CTEP

CAG GAC TCC TCT TCC TCA AAG GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGC CCA TCC CGA CTC  
Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu

CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC CTC CCA CAA TAA AGGCTTCTCAATCCGC[A] 540  
Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
+145

Figura 4 Sequência de nucleotídeos do DNA genômico da subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana <sup>22</sup>. As seqüências reconhecidas pelos *primers* para a amplificação do peptídeo do terminal carboxílico (CTEP) estão duplamente sublinhadas, e os aminoácidos glicosilados sublinhados.

## 2.7 Inserção dos genes no vetor de expressão

Os minigenes, de TSH nativo e TSH quimérico construídos, foram retirados dos vetores derivados de pGEM7Z por digestão com as enzimas XbaI e BamHI e inseridos, por clonagem direcional, no vetor de expressão transiente p $\beta\Delta^{127}$ , de onde o gene Oct1 foi retirado utilizando-se as mesmas enzimas de restrição <sup>86</sup>. Os plasmídeos de expressão com os genes de interesse foram então chamados de pLBCM.V.hTSH $\beta$  (TSH $\beta$  nativo) e pLBCM.V.hTSH $\beta$ -CTEP (TSH $\beta$  quimérico), sendo suas sequências confirmadas por digestão enzimática e por seqüenciamento de nucleotídeos.

Os vetores de expressão assim obtidos, contém o promotor de citomegalovírus (CMV), o 5' *untranslated leader* do gene da timidina quinase do vírus de herpes simples (HSV *tk*), o codon de iniciação de transcrição (ATG), os sítios de subclonagem (XbaI e BamHI) e o segmento de beta globina de coelho contendo os sinais de processamento do RNA (*splicing* e poliadenilação). (Figura 5)

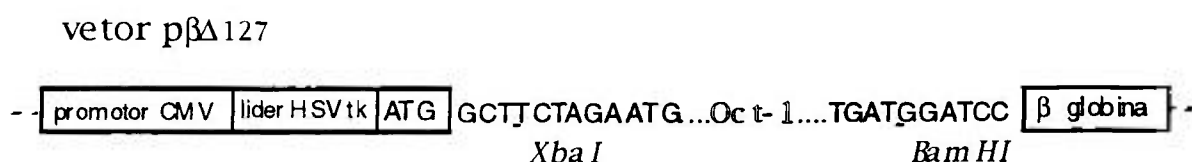


Figura 5 Detalhe do vetor p $\beta\Delta^{127}$  apresentando o promotor de citomegalovírus (CMV), o 5' *untranslated leader* do gene da timidina quinase do vírus de herpes simples (HSV *tk*), o codon de iniciação (ATG), os sítios únicos de clonagem XbaI e BamHI, o segmento de  $\beta$ -globina de coelho contendo os sinais de *splicing* e poliadenilação e o gene de Oct-1 que foi substituído pelos genes hTSH ou hTSH quimérico <sup>86</sup>.

## 2.8 Transfecção transiente das células 293 e Cos-7

As linhagens celulares 293 (linhagem de células primárias de rim de embrião humano transformadas com DNA de adenovírus tipo 5) e Cos-7 (linhagem celular de rim de macaco verde africano, transformada com SV40 defectivo na origem de replicação) foram co-transfectadas com pLBCMV.TSH $\beta$  ou pLBCMV.TSH $\beta$ -CTEP, pAV2.cDNA $\alpha$ hCG (o plasmídeo que contém o cDNA da subunidade  $\alpha$  de gonadotrofina coriônica humana <sup>102</sup>) e pVARNA, na obtenção do TSH nativo e do TSH quimérico respectivamente. A transfecção foi feita pelo método da precipitação com fosfato de cálcio <sup>53</sup>. As mesmas linhagens celulares foram transfectadas com os vetores sem os genes de hTSH ou hCG, e os meios de cultura obtidos destas transfecções foram utilizados como controle negativo (*mock*).

O cDNA da subunidade  $\alpha$ , de 621 pb, foi doado por Dr. J.C. Fiddes (*Cold Spring Harbor Laboratory*, New York, NY, EUA). Este tinha sido subclonado por Wondisford <sup>102</sup>, no vetor de expressão pAV2, que contém os promotores P5, P19 e P40 e o sítio de poliadenilação, todos elementos derivados do vírus adeno-associado (Figura 6). O plasmídeo pVARNA codifica os genes de adenovírus VA<sub>I</sub> e VA<sub>II</sub>, que aumentam a tradução neste sistema de transfecção transiente pelo aumento dos níveis de transcrição, transporte e estabilidade do mRNA <sup>102</sup>. As células Cos-7 foram adquiridas da *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EUA, e as células 293 foram gentilmente doadas pelo Dr. Barrie Carter, *NIDDK, NIH*, Bethesda, MD, EUA. O meio de cultura celular e o soro fetal bovino foram obtidas da *ABI* (Columbia, MD, EUA) e o kit para transfecção pelo método de fosfato de cálcio foi obtido da *Pharmacia* (Uppsala, Suécia).

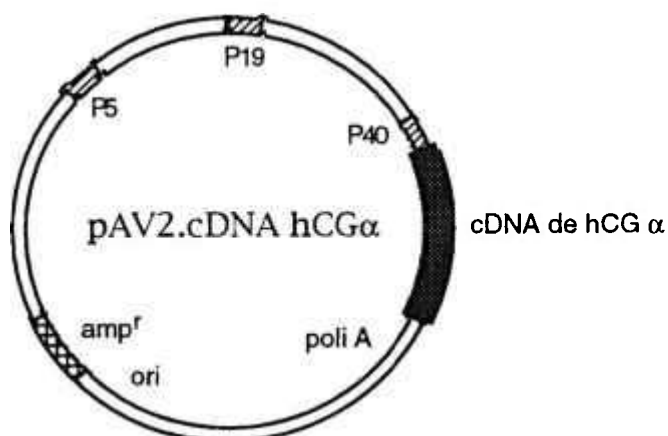


Figura 6 Mapa circular do vetor de expressão pAV2.cDNAhCG $\alpha$ , utilizado nas transfeções transientes. O vetor contém o cDNA da subunidade alfa de hCG, os promotores P5, P19 e P40 e o sítio de poliadenilação, que são elementos derivados do vírus adeno-associado <sup>102</sup>.

As células de interesse foram cultivadas em placas de 100 mm de diâmetro numa quantidade de 7 a 8 x 10<sup>5</sup> células, com 10 ml de meio de cultura D-MEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) com 10% de soro fetal bovino, por 24 horas. Foram co-precipitados 30  $\mu$ g de pAV2.cDNA $\alpha$ hCG, 10  $\mu$ g de pVARNA e 10  $\mu$ g de pLBCM.V.TSH $\beta$  ou 10  $\mu$ g de pLBCM.V.TSH $\beta$ -CTEP com 240  $\mu$ l da solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub> 0,5 M, HEPES 0,1 M) e 480  $\mu$ l de solução de fosfato de sódio (NaCl 0,28 M, HEPES 0,05 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,75 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,75 mM). A mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, sendo então adicionada à placa com as células aderidas. Procedeu-se uma incubação de 16 horas à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro, e novamente as células foram incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura sem soro, de diferentes placas, foi coletado a cada 48 horas por três vezes, durante uma semana, centrifugado a 2.500 x g, por 25 minutos para a remoção de células e concentrados por ultrafiltração com membranas de seleção molecular para 10 kDa (*Filtron Technology Corporation*, Northborough, MA, EUA).

## 2.9 Transfecção de células 293, para a obtenção de uma linhagem estável, secretora de TSH nativo ou quimérico

As células 293 foram co-transfectadas com os plasmídeos pLBCM.V.TSH $\beta$  ou pLBCM.V.TSH $\beta$ -CTEP e pM<sup>2</sup>.hCG $\alpha$ , pelo método de lipossomas <sup>38</sup>. Células 293, transfectadas com o plasmídeo pLB.CMV sem o gene de hTSH, foram utilizadas como controle negativo (*mock*).

O plasmídeo pM<sup>2</sup>.hCG $\alpha$ , com um minigene da subunidade  $\alpha$  de hCG sob a regência do promotor do *long terminal repeat* (LTR) do retrovírus de sarcoma murínico de Harvey (HaMuSV), que também tem o gene de resistência a neomicina (*neo<sup>r</sup>*), foi utilizado na seleção dos clones transfectados estavelmente, com G418 <sup>55</sup>. Este plasmídeo foi cedido por Dr. I. Boime, *Washington University School of Medicine*, St. Louis, MO, EUA. (Figura 7)

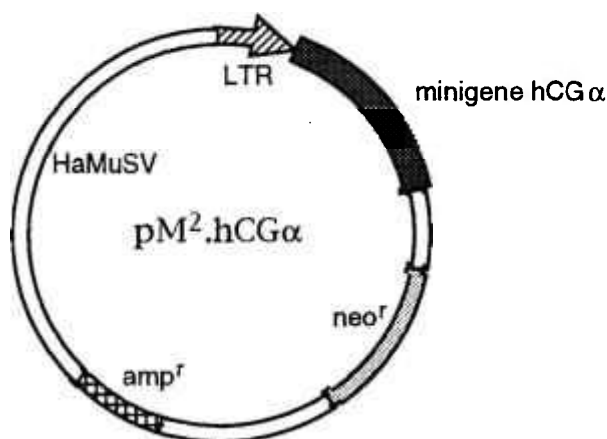


Figura 7 Mapa circular do vetor pM<sup>2</sup>.hCG $\alpha$  contendo o minigene da subunidade  $\alpha$ , o promotor do *long terminal repeat* (LTR) do retrovírus de sarcoma murínico de Harvey (HaMuSV) e o gene de resistência a neomicina (*neo<sup>r</sup>*), utilizado nas transfecções estáveis de células em cultura <sup>55</sup>.

O lipossoma utilizado foi o reagente comercial da *GIBCO-BRL*, *Lipofectamine®*. Misturou-se 20 µl de solução de lipossoma com 3 µl de pM2.hCGα (12 µg) e 2 µl de pLBCM.V.hTSHβ (4 µg) ou pLBCM.V.hTSHβ-CTEP (4 µg), completando-se o volume para 100 µl com meio de cultura *Opti-Mem®* (*GIBCO-BRL*). Esta mistura foi incubada por 30 minutos. Logo após o volume foi completado para 1 ml com o meio de cultura *Opti-MEM®*, em seguida a mistura foi adicionada às células aderidas ( $3 \times 10^5$  células), previamente lavadas com meio de cultura sem soro, de maneira a cobri-las completamente. Após 6 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi substituído pelo meio de crescimento D-MEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco). Após 48 horas, as células foram repicadas e incubadas com o meio de cultura contendo 500 µg/ml de G418 (*Geneticin®* *Gibco-BRL*), para seleção. Após 14-21 dias, as células transfectadas estavelmente foram selecionadas e multiplicadas para a coleta de TSH nativo ou quimérico, secretado.

## 2.10 Imunoensaios

A imunoreatividade do TSH nativo e quimérico secretado pelas células transfectadas foi determinada por dois ensaios imunométricos tipo sanduíche. O ensaio imunométrico (*IRMA*, *ICN Biomedicals Inc.*, Costa Mesa, CA, EUA), emprega dois anticorpos monoclonais que reconhecem diferentes epitopos, um ligado ao tubo de ensaio e outro marcado com <sup>125</sup>I. Outro ensaio, imunométrico quimio-luminescente (*Nichols Institute Diagnostics*, San Juan Capistrano, CA, EUA), utiliza um anticorpo monoclonal imobilizado e um anticorpo policlonal conjugado a um éster acridínico. Os resultados obtidos nos diferentes ensaios são comparáveis, ambos utilizando um padrão calibrado contra a 2ª preparação internacional de referência, WHO 80/558.

As concentrações das amostras são determinadas em µUI/ml, no entanto, nas figuras estas são apresentadas em ng/ml para facilitar as comparações entre os ensaios 1 µUI foi considerada imunologicamente equivalente a 0,09 ng de padrão de hTSH hipofisário, purificado, NIH I-6 102.

## 2.11 Avaliação da atividade biológica *in vitro*

Para a avaliação da atividade biológica do rec-hTSH *in vitro* foram utilizadas células de tireóide de rato Fisher, FRTL-5. Esta linhagem celular é derivada de células FRTL e mantem a propriedade de captar iodeto, sintetizar tireoglobulina e metabolizar nucleotídeos, durante longo período, em cultura <sup>1</sup>. A linhagem FRTL-5 distingue-se das células originárias FRTL pela sua capacidade de crescimento rápido, pela capacidade de sobreviver em ausência de tireotrofina por períodos prolongados e pela sensibilidade aos estimuladores ou inibidores das funções tiroideanas após ausência de TSH por longos períodos. Como resposta a tireotrofina, a adenilato ciclase é ativada, e o crescimento destas células é diretamente dependente de TSH. Estas características conferem a esta linhagem celular propriedades ideais para a determinação e quantificação dos fatores estimuladores e inibidores da tireóide. Estes fatores podem ser avaliados medindo-se a incorporação de timidina marcada, elevação de AMP cíclico e incorporação de iodeto <sup>95</sup>.

### 2.11.1 Ensaio de produção de AMP cíclico (AMPC)

A linhagem celular FRTL-5 (ATCC CRL# 8305), cedida por Dr. L.D. Kohn (NIDDK, NIH, Bethesda, MD, EUA), foi semeada em placas de 96 poços e mantida por 5 a 7 dias em meio de cultura de Ham F12, modificado por Coon. Este meio era suplementado com 5% de soro de novilho e uma mistura de 6 fatores essenciais para o crescimento (insulina, hidrocortisona, transferrina humana, somatostatina, acetado de glicil-L-histidil-L lisina, e TSH bovino). Após o crescimento das células na presença dos 6 fatores, o meio de cultura foi substituído pelo meio sem bTSH e mantido por 8 a 10 dias. Após este tempo, as células foram incubadas com diferentes concentrações de amostras de rec-hTSH, diluídas em um meio hipotônico contendo HEPES 40 mM, isobutil-metil xantina (IBX) 4 mM, inibidor da atividade fosfo-diesterase do AMPC, e soro albumina bovina 4 mg/ml, por 30 minutos a 37°C. A quantidade de AMPC produzido foi determinada por radioimunoensaio <sup>94</sup>. Para eliminar a interferência dos produtos de secreção das células produtoras de TSH, foi preparada uma curva padrão com rec-hTSH-G, (hTSH recombinante produzido em células CHO, pela Genzyme Corp., Framingham, MA, EUA), dissolvido em meio de cultura

concentrado, obtido de células transfectadas com o vetor sem o gene de hTSH.

O  $^{125}\text{I}$  AMPc foi adquirido da *Hazelton Biologicals* (Vienna, VA, EUA) e o anticorpo foi doado pelo Dr. J.L. Vaitukaitis, (*National Center for Research Resources, NIH, Bethesda, MD, EUA*).

### **2.11.2 Ensaio de crescimento das células FRTL-5**

Valente e colaboradores <sup>95</sup> sugeriram que a adenilato ciclase e o crescimento das células FRTL-5 eram ativadas pelo mesmo receptor, porém através de domínios distintos. Embora esta última observação não tenha sido corroborada por Szkudlinski e colaboradores <sup>82</sup>, com o intuito de verificarmos possíveis diferenças de atividade biológica entre os rec-hTSH obtidos, realizamos o ensaio de crescimento das células FRTL-5 nas condições abaixo.

As culturas de FRTL-5, em placas com 24 poços, com 30% de confluência ( $1 \times 10^5$  células/ poço), foram incubadas na ausência de TSH, como no ensaio de produção de AMP cíclico. Estas células foram expostas às amostras de TSH nativo e quimérico, e a capacidade de estimular o crescimento foi medida pela incorporação de  $^3\text{H}$ -metil-timidina ao DNA, pelo método de difenilamina, segundo Valente <sup>95</sup>. A  $^3\text{H}$ -metil-timidina foi adquirida da *Dupont-NEN* (Boston, MA, EUA).

### **2.11.3 Ensaio de ligação ao receptor de TSH**

Foram utilizados receptores solubilizados de membrana obtidos de tiróide porcina e  $^{125}\text{I}$ -TSH bovino para determinar a capacidade de ligação ao receptor das amostras de hTSH (kit comercial da *Kronus*, San Clemente, CA, EUA). As amostras de TSH nativo e quimérico foram incubadas por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  na presença de  $^{125}\text{I}$ -bTSH e receptores de membrana. A ligação total foi determinada com  $^{125}\text{I}$ -TSH bovino mais receptores de membrana na ausência de amostra de rec-hTSH.



## 2.12 Avaliação da atividade biológica *in vivo*

A atividade biológica *in vivo* do rec-hTSH secretado pelas células Cos-7, foi determinada pelo método de McKenzie, modificado por East-Palmer <sup>17</sup>. As amostras foram injetadas intraperitonealmente em camundongos machos (swiss albinos) de 22 a 30 gramas, que tiveram o TSH endógeno suprimido pela administração oral de triiodotironina (3,0 µg/ml) *ad libitum* por 4 a 5 dias. Os hormônios recombinantes foram injetados nas doses de 0,2 e 0,5 µg num volume de 250 µl. Amostras de sangue foram coletadas 6 horas após a administração de TSH exógeno, e os níveis de tiroxina (T4) determinados por radioimunoensaio realizando 6-8 replicatas por animal, utilizando de 3 a 4 camundongos para cada dose, em dois experimentos independentes. (*TT4 Radioimmunoassay Kit, Incstar Corp., Stillwater, MN, EUA*).

## 2.13 Índices farmacocinéticos do rec-hTSH

Os índices farmacocinéticos do rec-hTSH secretado pelas células Cos-7 e 293 foram determinados a partir da curva de concentração plasmática das amostras, obtidas após administração de dose única, em ratos Sprague-Dawley machos, jovens. Administrou-se pela veia cava inferior, 0,2 µg de rec-hTSH/rato, utilizando-se quatro animais por amostra. Em seguida, foram coletadas amostras de sangue pela mesma via, nos tempos de 1, 3, 5, 8, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos determinando-se as concentrações de TSH plasmático pelo método imunométrico quimioluminescente descrito anteriormente. A curva de concentração de rec-hTSH plasmática obtida foi decomposta em duas equações exponenciais, uma correspondente à rápida queda inicial, denominada fase alfa ou de distribuição, seguida da fase beta ou de eliminação lenta, representada pela Equação 1. 2, 69, 76, 82

Os coeficientes de eliminação plasmática ( $K_e$ ) dos rec-hTSH foram determinados pela Equação 2 e as meias-vidas ( $T_{1/2}$ ) da fase alfa e beta foram calculadas a partir dos valores das inclinações das retas  $\alpha$  e  $\beta$ . (Equações 3 e 4)

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (1)$$

onde,

C = concentração de rec-hTSH no plasma, (% hTSH injetado/ml)

t = tempo, (min),

A e B = concentração plasmática extrapolados no tempo =0, das fases alfa ou beta, respectivamente, (% hTSH injetado/ml)

$\alpha$  e  $\beta$  = inclinação das retas das fases alfa e beta respectivamente.

$$K_e = A+B/(A/\alpha + B/\beta), \quad (\% \text{ hTSH injetado/min}) \quad (2)$$

$$T_{1/2 \alpha} = 0,693/\alpha, \quad (\text{min}) \quad (3)$$

$$T_{1/2 \beta} = 0,693/\beta, \quad (\text{min}) \quad (4)$$

## 2.14 Marcação metabólica

As linhagens estáveis de células 293 obtidas como descritas no item 2.9, e uma linhagem estável de células CHO produtoras de TSH (cedidas pela *Genzyme Co.*) utilizada como controle positivo, além de um controle negativo (linhagem de células 293 não transfectadas) foram semeadas em placas de 6 poços, ( $3.5 \times 10^5$  células/ poço de 35 mm de diâmetro) em meio de cultura D-MEM contendo 10% de soro fetal bovino. No dia seguinte, as células foram lavadas com solução tamponada de fosfato sem cálcio e magnésio e pré-incubadas por uma hora com meio D-MEM sem metionina (*Gibco-BRL*). Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{Ci}$  de  $^{35}\text{S}$ -metionina por placa, com 2 ml do mesmo meio de cultura, as células sendo expostas ao marcador por 8 horas. Após o tempo de incubação, estas foram lisadas, os meios de cultura coletados e imunoprecipitados com anticorpo anti-hTSH $\beta$ -IC-2 e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida como indicados no item 2.16.

No experimento de *pulse-chase* foram utilizadas células 293, produtoras de hTSH nativo ou quimérico e células CHO produtoras de hTSH. A  $10^6$  células por placa foram adicionados 100  $\mu\text{Ci}$  de  $^{35}\text{S}$ -metionina, sendo o tempo de pulso de 30 minutos em meio de cultura D-MEM. Após o pulso, o meio foi trocado por D-MEM com excesso de metionina não

marcada (1 mM). O meio de cultura de diferentes placas foi coletado após a marcação nos tempos de 0, 30 min, 1, 2, 4, 8 e 12 horas. As amostras foram analisadas como indicado no item 2.16.

A  $^{35}\text{S}$ -metionina (atividade específica= 1018 mCi/mmol) e os padrões de peso molecular marcados com  $^{14}\text{C}$  foram adquiridos da *Amersham* (Arlington Heights, IL, EUA).

### 2.15 Marcação com $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$

As linhagens celulares utilizadas são as mesmas citadas no item anterior. As células foram pré-incubadas com meio D-MEM sem sulfato, com 5% de soro fetal bovino dialisado, por 1h e 30 min, adicionando-se em seqüência, 100  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  de  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  dissolvido no mesmo meio de cultura. Após 3 dias de incubação, adicionou-se meio de cultura e células não marcadas e prosseguiu-se a marcação por mais 3 ou 4 dias. O  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  (atividade específica= 64-100 mCi/mmol, foi adquirido da *ICN Biomedicals*, Costa Mesa, CA, EUA) e os meios de cultura D-MEM, sem sulfato, foram preparados na unidade de meios de cultura do *NIH* (Bethesda, MD, EUA).

Durante o período de incubação as células foram mantidas em recipiente especial tipo *Hot box*®, (*Billups-Rothenberg*, Del Mar, CA) para evitar contaminação da estufa pelos vapores radioativos de  $^{35}\text{S}$ , numa atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C.

### 2.16 Imunoprecipitação e análise em gel de poliacrilamida

Ao término do período de incubação, tanto na marcação com  $^{35}\text{S}$ -metionina como naquela com  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ , os meios de cultura foram coletados e mantidos no gelo com solução de *Pefabloc*® 1 mM [cloridrato de 4- (fluoreto de 2- aminoetil-benzenosulfonil)] da *Boehringer Mannheim*, para evitar degradação proteolítica; em seguida foram concentrados e dializados em *Centricon 10*® (*Amicon Inc.*, Beverly, MA, EUA). As células foram lavadas com solução tamponada de fosfato e lisadas pela adição do tampão Tris HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 66 mM; deoxicolato 0,4%; Nonidet P-

40 1% e Pefabloc 0,5 mM e ultracentrifugadas a 100.000 x g por 2 horas, antes da imunoprecipitação.

Os TSH nativo e quimérico foram imunoprecipitados com anticorpo anti-hTSH $\beta$ -IC-2, CYTO (Lot#AFP557417891), fornecido pelo *National Hormone and Pituitary Program* (Rockville, MD, EUA)/*National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases* (Bethesda, MD, EUA), que reconhece a subunidade beta isolada ou o heterodímero de TSH intacto. As amostras foram diluídas em tampão NET (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Nonidet P-40 1%; EDTA 1 mM pH 8,0; gelatina 0,25%; e azida sódica 0,02%), clarificadas com 5 a 10  $\mu$ l de soro normal de coelho a 37°C por 1 hora, incubadas a 4°C por 18 horas, e adicionadas de 100  $\mu$ l de uma suspensão de *Staphylococcus aureus* (*Imunoprecipitin*® GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) incubando em banho de gelo por 1 hora. O *S. aureus*, fixado em formol, em sua superfície tem a proteína A que possui afinidade pela porção Fc das imunoglobulinas G. As partículas de *S. aureus* foram retiradas por centrifugação e o sobrenadante foi imunoprecipitado com 10  $\mu$ l de anticorpo anti-hTSH $\beta$ -IC-2 a 4°C por 18 horas, sendo novamente adicionados 100  $\mu$ l de *Imunoprecipitin*®, incubando em banho de gelo por 1 hora. As partículas de *Imunoprecipitin*® foram lavadas duas vezes em tampão NET, e uma vez com solução Tris-HCl 10 mM pH 7,5 com Nonidet P-40 0,1%. Em seguida estas foram ressuspensas em tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, ditiotreitol 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%), fervidas por 3 minutos e centrifugadas, antes dos sobrenadantes serem aplicados no gel de poliacrilamida 14% ou com gradiente de 8-16%, com SDS, conforme o caso.

Após a corrida eletroforética, os geis foram tratados com *EN<sup>3</sup>HANCE*®, *NEF-981* (Dupont-NEN, Boston, MA, EUA) para aumentar os sinais da radiação beta, secos e expostos ao filme radiográfico *Kodak X-OMAT* (Kodak, St. Louis, MO, EUA) deixando em chassis com placas intensificadoras a -70°C. Para obter a autorradiografia de marcação com <sup>35</sup>S-metionina o filme foi exposto 2-3 dias, enquanto, para as autorradiografias derivadas da marcação com Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> o filme foi deixado 4-5 semanas antes de ser revelado.

Todos os outros reagentes químicos foram da *Sigma* (St. Louis, MO, EUA).

### 3 Resultados

#### 3.1 Construção dos genes hTSH $\beta$ e quimera hTSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$

O fragmento de 2 kb de hTSH $\beta$ , construído originalmente por Wondisford <sup>102</sup>, foi modificado com intuito de se obter maiores níveis de expressão transiente. Na construção do minigene de hTSH $\beta$  por reação de *PCR* conforme descrito sob materiais e métodos, retirou-se o fragmento do intron I de 277pb e incluiu-se o exon I não traduzido com o sítio autêntico de iniciação da transcrição, para assegurar a correta transcrição do mRNA. O produto da *PCR* de 921 pb contendo exon I, exon II, intron II, exon III e os sítios *Xba*I e *Bam*HI, nas porções 5' e 3', respectivamente, foi digerido com enzimas *Xba*I e *Bam*HI e, o minigene de 909 pb purificado, foi clonado nos respectivos sítios do vetor pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -7Z, onde sua seqüência foi confirmada. (Figuras 8 e 9).

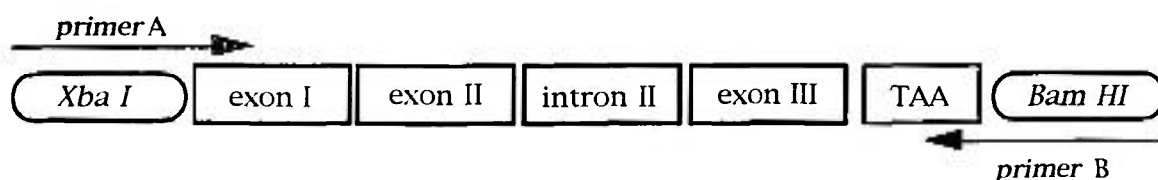


Figura 8 Esquema do minigene de hTSH $\beta$  ( 921 pb) obtido por *PCR*.

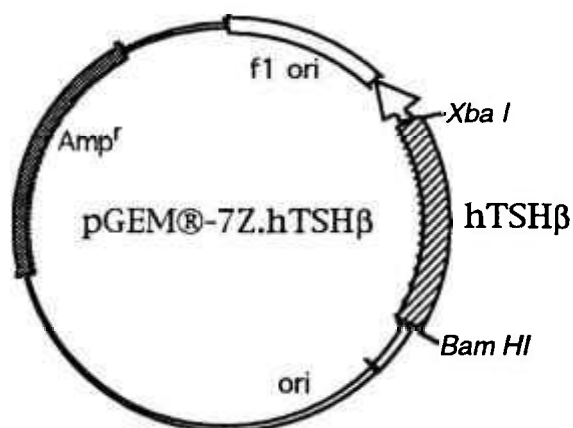


Figura 9 Mapa circular do vetor pGEM-7Z contendo o minigene de hTSH $\beta$  de 909 pb.

Para a construção da quimera da subunidade beta de hTSH com o peptídeo carboxi-terminal (CTEP) da subunidade beta de hCG, obteve-se primeiramente o minigene de hTSH com o sítio de XbaI na porção 5', como na etapa anterior, sem porém, o codon terminal e com a introdução do sítio de restrição HindIII na porção 3'. O produto da PCR de 918 pb foi digerido com enzimas XbaI e HindIII. O minigene de 906 pb purificado foi clonado no vetor pGEM7Z, originando pGEM7Z. TSH $\beta$ q. (Figura 10 e 12).

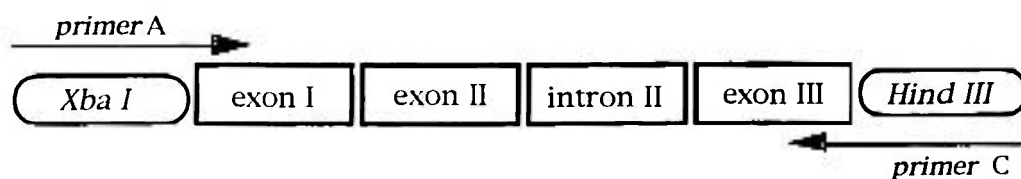


Figura 10 Esquema do fragmento de hTSH $\beta$ q (918 pb) obtido por PCR.

O fragmento de CTEP de 102 pb, foi obtido também por técnica de *PCR*, utilizando-se o gene de hCG como DNA *template*, e *primers* contendo os sítios *Hind*III, na porção 5' e *Bam*HI, na porção 3' (Figura 11). Este foi digerido com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI e purificado. O CTEP de 90 pb foi clonado seqüencialmente no vetor pGEM7Z.TSH $\beta$ q, obtendo-se o gene de fusão TSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$  de 996 pb (Figura 12). Como resultado da introdução do sítio de restrição *Hind*III após o codon 118 (valina) da subunidade TSH $\beta$ , introduziu-se uma lisina (substituindo o codon terminal) e uma leucina, seguida de 27 aminoácidos do peptídeo carboxi-terminal da hCG. Estes codons não foram mais modificados neste estudo (Figura 13).

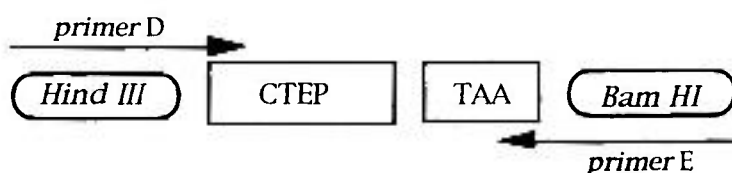


Figura 11 Fragmento do peptídeo carboxi-terminal de hCG $\beta$  (102 pb), amplificado por *PCR*.

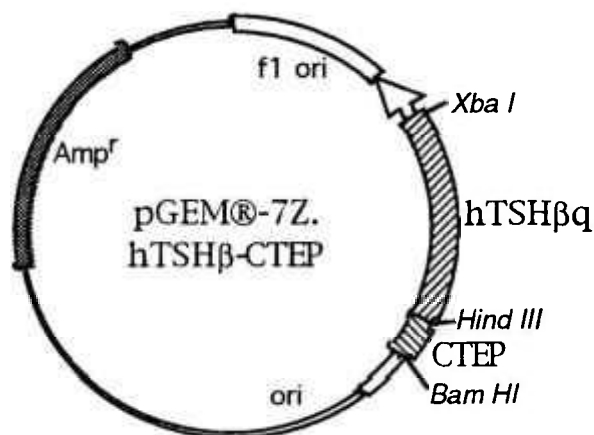


Figura 12 Mapa circular do vetor pGEM®-7Z com a inserção do gene hTSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$  (996 pb).

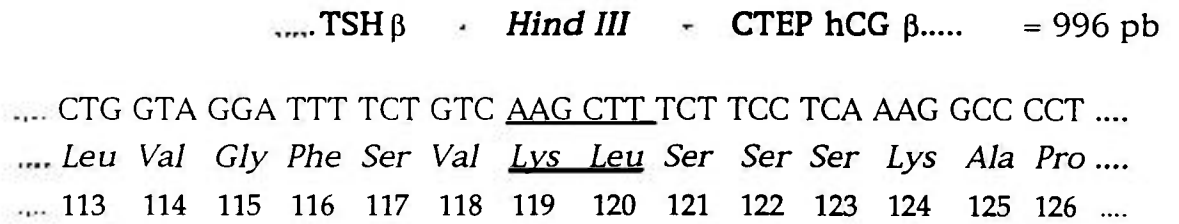


Figura 13 Detalhe da junção entre hTSH $\beta$ q e CTEP, derivada da criação do sítio de restrição *Hind III*.

A integridade dos minigenes de TSH nativo e quimérico foi confirmada mediante análise de restrição enzimática e por seqüenciamento, como nos métodos citados anteriormente. Em seguida os genes foram subclonados no vetor de expressão p $\beta\Delta^{127}$ , de onde foi retirado o gene Oct-1. Os vetores obtidos, chamados de pLB.CMV.hTSH $\beta$  e pLB.CMV.hTSH $\beta$ -CTEP, são apresentados na Figura 14.

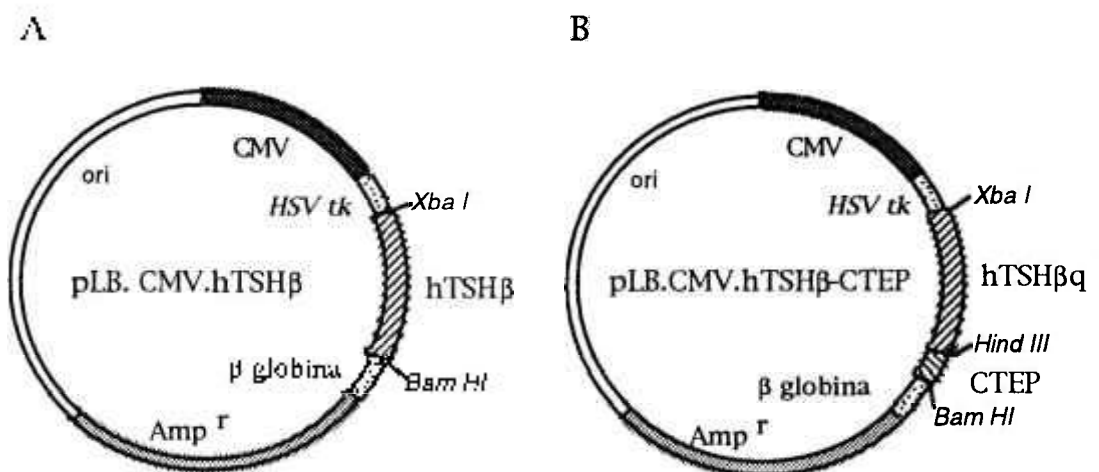


Figura 14 (A) Mapa circular do vetor de expressão transiente, contendo o minigene de hTSH $\beta$  (909 pb), chamado de pLB.CMV.hTSH $\beta$ .  
(B) Mapa do vetor que contém o gene da quimera hTSH $\beta$ -CTEP hCG (996 pb), chamado de pLB.CMV.hTSH $\beta$ -CTEP.



### 3.2 Transfecção transiente de células em cultura

Em células 293 transfectadas com pAV2.hCG $\alpha$ / pAV2.hTSH $\beta$  (2 kpb)/ pVARNA, Wondisford e colaboradores <sup>102</sup> obtiveram uma expressão de 27,20 $\pm$ 6,48 ng/10<sup>6</sup> células/48 horas de rec-hTSH, e em células Cos-7 transfectadas com os plasmídeos pAV2.hCG $\alpha$ / pSV2.G-hTSH $\beta$  (2 kpb)/ pVARNA, uma expressão de 1,62 $\pm$ 0,11 ng/10<sup>6</sup> células/48 horas de rec-hTSH, determinados por IRMA. Lash e colaboradores <sup>49</sup> obtiveram uma expressão de aproximadamente 60,30 $\pm$ 2,07 ng/10<sup>6</sup> células/96 horas, em células 293, com os mesmos vetores. O minigene hTSH $\beta$  de 909 pb, inserido no vetor de expressão pLB.CMV.hTSH $\beta$ , co-transfectado com pAV2.hCG $\alpha$  e pVARNA, expressou cerca de 60 vezes mais rec-hTSH que na transfecção do gene de 2 kpb, em células Cos-7 e 2-4 vezes mais nas células 293. (Tabela 1)

Tabela 1 Concentração de rec-hTSH determinados por IRMA, nos meios de cultura, após transfecção das células com pLB.CMV.hTSH $\beta$ , pAV2.hCG $\alpha$  e pVARNA.

linhagem celular	ng rec-hTSH/ 10 <sup>6</sup> células		
	24 horas	48 horas	72 horas
Cos-7	64,40 $\pm$ 0,93	106,27 $\pm$ 2,67	82,27 $\pm$ 5,87
293	79,73 $\pm$ 4,27	109,20 $\pm$ 5,87	88,53 $\pm$ 4,93
Cos-7/ quimera		115,00 $\pm$ 15,00	
293/ quimera		115,00 $\pm$ 15,00	

O hTSH nativo e hTSH-quimera, nas linhagens 293 e na linhagem COS-7, tiveram o mesmo nível de expressão transiente (100-130 ng/10<sup>6</sup> células/48 horas), determinado pelo método imunométrico, sugerindo que, similarmente à quimera FSH.CTEP obtida por Fares e colaboradores <sup>19</sup>, o peptídeo adicionado não afetou a associação das subunidades  $\alpha/\beta$ , nem a secreção do heterodímero de hTSH.

### 3.3 Bioatividade *in vitro* do hTSH nativo e hTSH quimérico

O AMPc produzido pelas células FRTL-5 como resposta ao TSH nativo e quimérico, secretado pelas células Cos-7, foi determinado para avaliar a bioatividade *in vitro* destes dois produtos. As atividades foram comparadas com o rec-hTSH-G, produzido em células CHO pela empresa Genzyme. Os resultados relativos às amostras de TSH nativo e quimérico obtidos são comparáveis entre si, e também com o TSH produzido em células CHO, nas doses inferiores a 10 ng/ml. Os dois produtos preparados em Cos-7 mostram-se, porém, mais potentes nas doses acima de 20 ng/ml. (Figura 15)

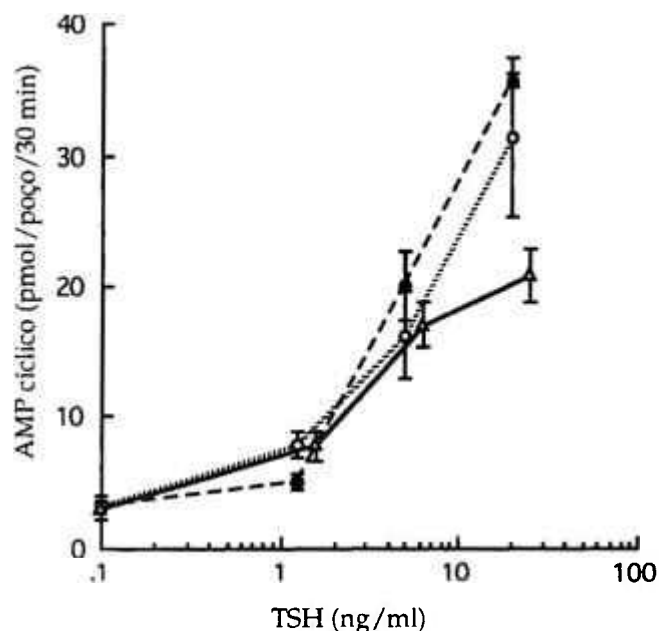


Figura 15 Estimulação da produção dose-dependente de AMP cíclico pelas células de tiróide de rato (FRTL-5) incubadas com:

- (—▲—) rec-hTSH-G, obtido em células CHO,
- (.....○.....) rec-hTSH nativo obtido em células Cos-7,
- (--●--)

Na figura, cada ponto é representado pela média de três determinações, com seu respectivo desvio padrão.

O material secretado pelas células 293 mostrou interferência não específica no ensaio de AMPc, devido possivelmente a algum produto de secreção das próprias células, de modo que não foi possível construir uma curva dose-resposta completa. Mesmo assim, neste ensaio biológico ambos, TSH nativo e quimérico produzidos por 293, apresentaram atividade biológica quando comparados ao controle negativo (*mock*). (dados não apresentados)

A bioatividade *in vitro* foi também determinada pelo crescimento das células FRTL-5. Como podemos observar na Figura 16 aparentemente há um maior estímulo de incorporação de timidina nas células incubadas com a amostra quimérica secretada pelas células Cos-7. Nas amostras secretadas pelas células 293 há uma tendência à diminuição do estímulo, possivelmente devido às diferenças nas estruturas oligossacarídicas ou aos mesmos fatores que interferiram na produção de AMP cíclico. O hTSH nativo, secretado pelas células Cos-7 ou 293, não mostrou diferença significativa, comparado ao rec-hTSH-G.

Como a carboxila terminal do TSH $\beta$  está envolvida na interação receptor-ligante <sup>40, 92</sup>, supôs-se que a adição de 27 aminoácidos do CTEP mais 2 aminoácidos derivados do sítio HindIII na porção terminal, poderiam interferir na ligação do TSH quimérico ao receptor. Esta hipótese foi verificada pelo ensaio de ligação aos receptores solubilizados de membranas de tiróide porcina, utilizando <sup>125</sup>I-bTSH. Ambas preparações, de TSH nativo e quimérico secretadas pelas células Cos-7, demonstraram afinidade pelo receptor aparentemente superior àquela de rec-hTSH-G. A amostra quimérica apresenta, claramente, maior afinidade, como se pode observar na Figura 17. O material secretado pelas células 293 mostrou interferência não específica, de modo que não foi possível construir uma curva dose-resposta.

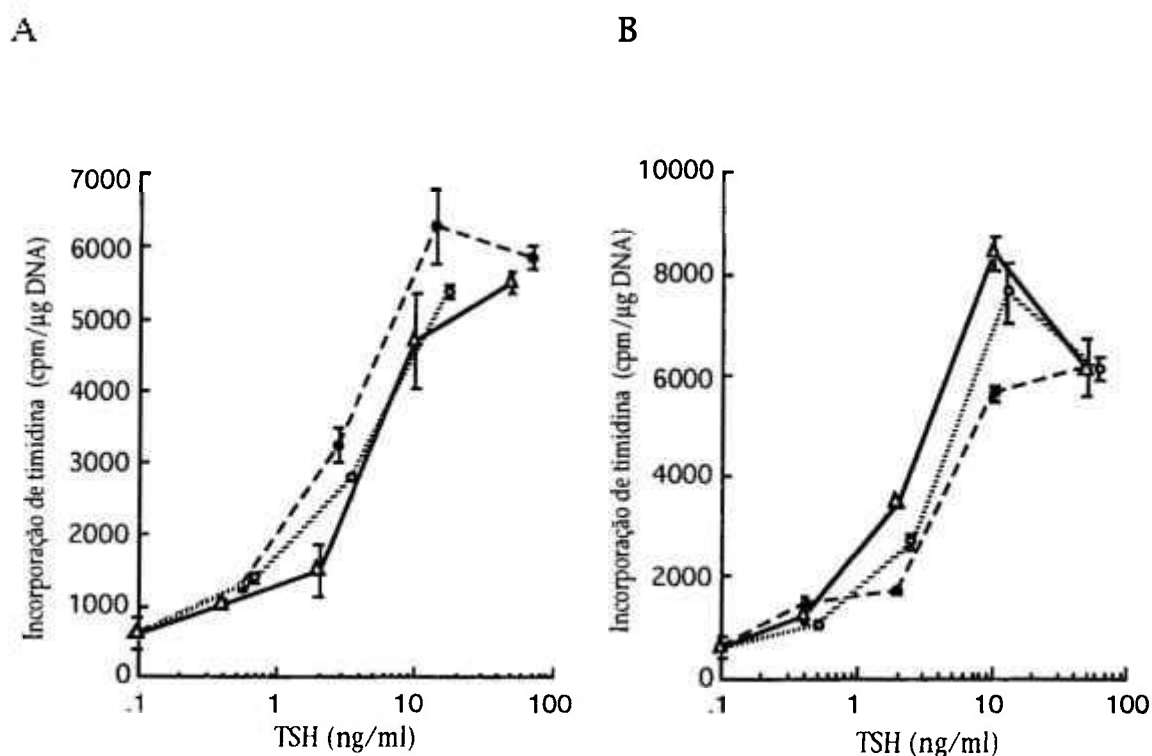


Figura 16 Incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina pelas células de tiróide de rato (FTRL-5). A incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina é a resposta obtida pelo estímulo da multiplicação celular destas células na presença de TSH.

(A):

- (.....○.....) rec-hTSH nativo obtido em células Cos-7,
- (--●--)
- (—▲—) rec-hTSH-G, obtido em células CHO.

(B):

- (.....○.....) rec-hTSH nativo obtido em células 293,
- (--●--)
- (—▲—) rec-hTSH-G, obtido em células CHO.

Na figura, cada ponto é representado pela média de três determinações, com seu respectivo desvio padrão.

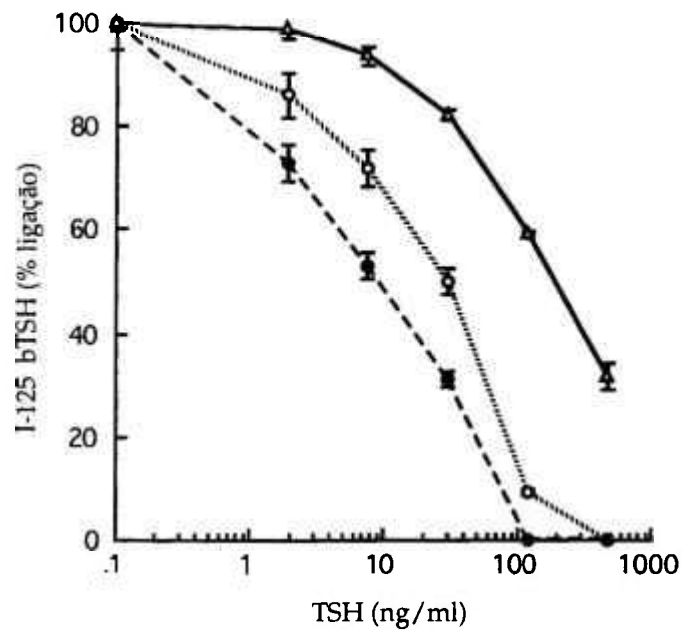


Figura 17 Afinidade de ligação do rec-hTSH ao receptor de membrana de tireóide porcina solúvel. As amostras foram incubadas com  $^{125}\text{I}$ -TSH bovino e com a preparação de receptor solubilizado.

- (—▲—) rec-hTSH-G, obtido em células CHO,
- (.....○.....) rec-hTSH obtido em células Cos-7,
- (-●-) rec-hTSH quimérico obtido em células Cos-7.

Cada ponto é representado pela média de duplicatas, com seu respectivo desvio padrão, de dois experimentos independentes.

Estes resultados indicam que a adição dos 29 aminoácidos (CTEP hCG $\beta$ ) no TSH não afeta negativamente o mecanismo de ligação ao receptor.

### 3.4 Atividade biológica *in vivo*

A atividade *in vivo* das amostras recombinantes foi analisada em camundongos com TSH endógeno suprimido. Na Figura 18 estão indicados os aumentos em porcentagem dos níveis de T4,  $\mu\text{g/dL}$ , determinados em resposta ao rec-hTSH-G, produzido em células CHO e as mesmas respostas após a injeção do TSH nativo e quimérico secretados pelas células Cos-7 transfectadas. Os níveis de T4 obtidos pelo controle negativo (*mock*) foram considerados como 0% de resposta.

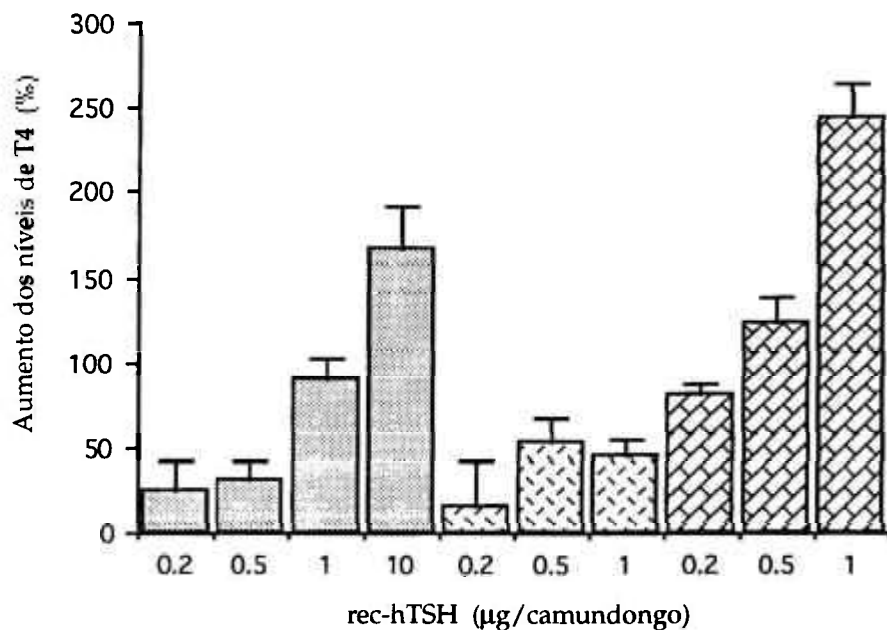





Figura 18 Atividade biológica *in vivo*. A bioatividade foi determinada em camundongos, com TSH endógeno suprimido por triiodotironina, pela injeção intraperitoneal das diferentes preparações de rec-hTSH. Os níveis de tiroxina (T4) foram determinados por radioimunoensaio, 6 horas após a injeção.

-  rec-hTSH-G,
-  rec-hTSH nativo obtido em células Cos-7, e
-  rec-hTSH quimérico obtido em células Cos-7.

Na figura, os pontos são representados pela média de 6-10 replicatas por animal, utilizando de 3-5 camundongos para cada dose, com seus respectivos desvios padrões. Foram realizados dois experimentos para confirmação dos resultados. Devido à escassez de material foi possível realizar 4 doses diferentes somente no caso de rec-hTSH-G.

O TSH quimérico apresentou um incremento significativo (cerca de 3 vezes) em sua potência *in vivo* comparada ao nativo ( $p < 0,05$ ). Este resultado foi reproduzível em dois experimentos independentes em amostras de transfecções também independentes.

### 3.5 índices farmacocinéticos dos rec-hTSH nativo e quimérico.

As curvas de concentração plasmática dos rec-hTSH quimérico e nativo secretados pelas duas linhagens de células renais, Cos-7 e 293, foram comparadas àquela do rec-hTSH-G. Surpreendentemente, o comportamento das curvas obtidas pelos hormônios secretados pelas duas linhagens de células renais diferem significativamente. (Figura 19 e Tabela 2).

A amostra de rec-hTSH quimérico, secretado em Cos-7, apresentou o menor coeficiente de eliminação plasmático ( $K_{e\alpha\beta}$ ), seguida das amostras de rec-hTSH nativo, secretado pelas células CHO e células Cos-7 que, embora tenham apresentado diferenças nos  $T_{1/2\alpha}$ , têm  $T_{1/2\beta}$  e  $K_{e\alpha\beta}$  similares. O rec-hTSH quimérico e nativo, secretados em células 293 apresentaram  $K_{e\alpha\beta}$  elevados, cerca de 3,8 vezes maiores que as amostras nativas produzidas em células Cos-7 ou CHO, influenciados principalmente pela meia-vida na fase alfa. (Figura 19 e Tabelas 2 e 3).

O  $K_{e\alpha\beta}$  da amostra quimérica produzida pelas células Cos-7 é cerca de 3,5 vezes menor que o  $K_{e\alpha\beta}$  da amostra nativa produzida pela mesma linhagem celular, influenciado pelo  $T_{1/2\beta}$  que é 2,2 vezes mais lento. O  $T_{1/2\beta}$ , por sua vez, deve ter sido influenciado pela presença adicional das cadeias oligossacarídicas *O-linked*. O mesmo não acontece entre as amostras, quimérica e nativa secretadas pelas células 293, apesar da presença do CTEP e das cadeias oligossacarídicas adicionais, sugerindo que o  $K_{e\alpha\beta}$  é mais influenciado pelo tipo de célula produtora que pela existência ou não do CTEP. Possivelmente a linhagem celular 293 estaria adicionando terminais sulfato nas cadeias oligossacarídicas, que aceleram a eliminação do hormônio glicoprotéico <sup>2, 24</sup>. Para verificarmos esta hipótese foi produzida uma linhagem estável de células 293 secretora de TSH nativo e quimérico.

A similaridade na velocidade de depuração metabólica das amostras de TSH nativo produzidas em células Cos-7 e amostras rec-hTSH-G, produzidas em células CHO, indica possivelmente uma semelhança nas terminações em ácido siálico das cadeias de oligossacarídeos. Como a análise estrutural relativa aos carboidratos do hTSH, secretado pelas células CHO já foi descrita por Thotakura e colaboradores **87, 90, 91** e Szkudlinski e colaboradores **82**, a marcação metabólica foi realizada na linhagem 293, utilizando a linhagem CHO como referência.



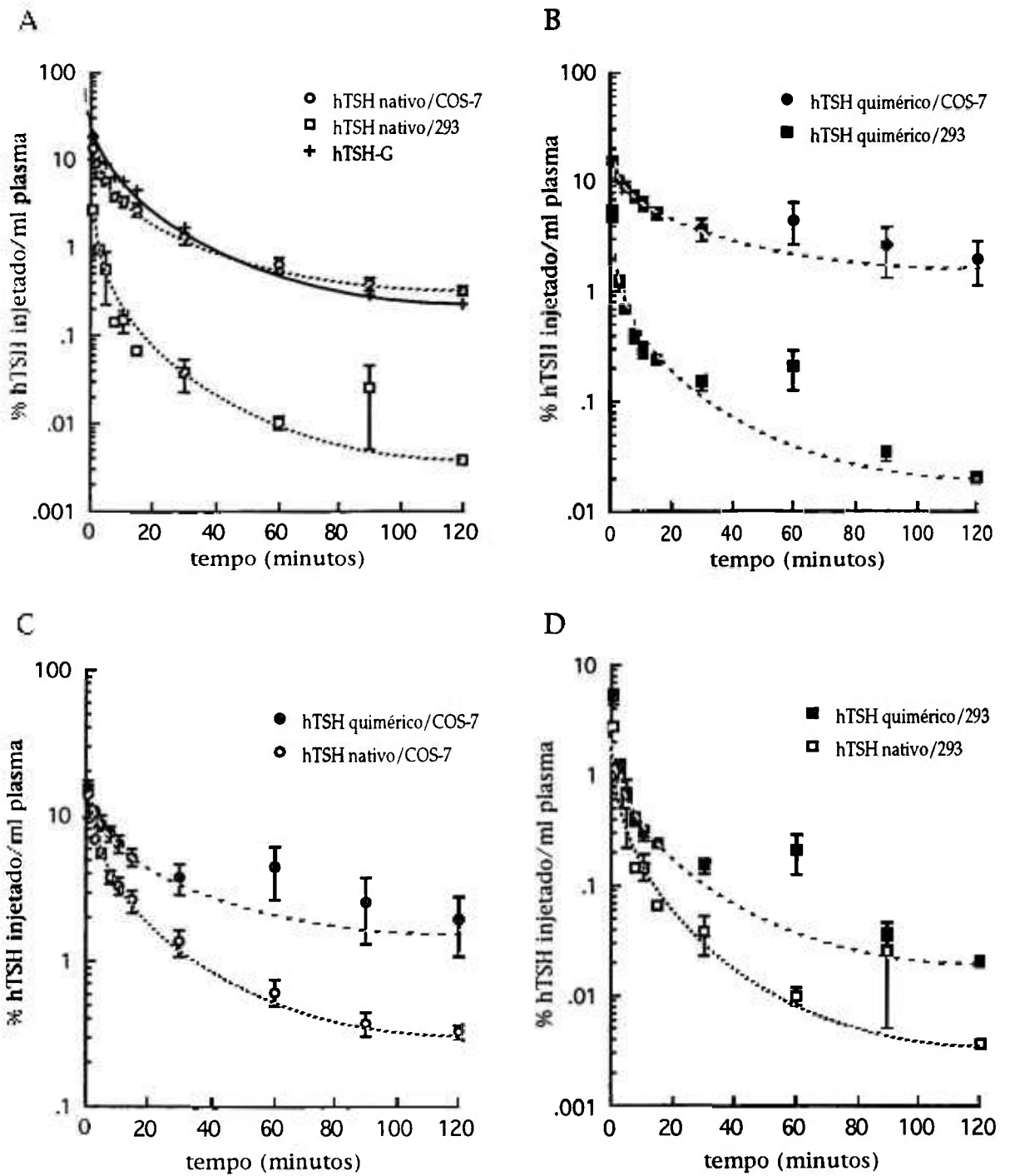


Figura 19 Cinética plasmática de hTSH recombinante. As amostras foram injetadas e coletadas pela veia cava inferior de ratos nos tempos de 1 a 120 minutos. Os valores de hTSH no eixo y representam a % do hormônio total, injetado, por ml de plasma. Cada ponto foi determinado em três animais, em dois experimentos independentes.

Tabela 2 Meias-vidas nas fases alfa ( $T_{1/2\alpha}$ ) e beta ( $T_{1/2\beta}$ ) e coeficientes de eliminação plasmática ( $K_{e\alpha\beta}$ ) dos rec-hTSH expressos em diferentes linhagens celulares.

rec-hTSH/linhagem celular	$T_{1/2\alpha}$ (min)	$T_{1/2\beta}$ (min)	$K_{e\alpha\beta}$ (% min <sup>-1</sup> )
quimera/Cos-7	3,3	83,8	2,4
nativo/Cos-7	3,0	37,6	8,5
quimera/293	1,0	27,4	32,4
nativo/293	1,7	28,1	32,5
nativo/CHO	5,2	36,6	8,4

Tabela 3 Comparação dos  $T_{1/2}$  nas fases alfa e beta dos rec-hTSH estudadas de acordo com sua estrutura primária e com o tipo de célula hospedeira.

Razão entre $T_{1/2}$	fase alfa	fase beta
(quimera/nativo) Cos-7	1,1	2,2
(quimera/nativo) 293	0,6	1,0
(Cos-7/293) quimera	3,3	3,1
(Cos-7/293) nativo	1,8	1,3
(CHO/293) nativo	3,0	1,3
(Cos-7/CHO) nativo	0,6	1,0

### 3.6 Marcação metabólica das células 293 e CHO com <sup>35</sup>S-metionina

Para verificar se a adição do CTEP hCG $\beta$  ao TSH $\beta$  tem efeitos na secreção e associação do TSH heterodimérico, foi realizada a marcação metabólica com <sup>35</sup>S-metionina. A secreção de TSH, nativo e quimérico, secretado por linhagens estáveis de células 293 foi comparada com TSH nativo secretado por células CHO também transfectadas estavelmente.

O TSH nativo secretado pelas linhagens celulares (293 e CHO) apresentou em eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, duas bandas principais: de 23 kDa (subunidade alfa) e 19 kDa (subunidade beta). Como era esperado, a cadeia beta quimérica apresentou uma mobilidade bem menor correspondente a um peso molecular de 29 kDa, devido à adição dos 29 aminoácidos e provavelmente também, das quatro cadeias de oligossacarídeos de ligação-O. (Figura 20)

No experimento de *pulse -chase*, verificou-se que o rec-hTSH foi secretado no meio de cultura e pôde ser visualizado a partir dos 30 minutos, aumentando gradativamente até o tempo de quatro horas. Após este tempo, a secreção parece ter sido constante até as 12 horas, quando encerramos o experimento (Figura 21). Resultados similares foram obtidos com o TSH quimérico em células 293 e TSH nativo em células CHO (Figura 22). Embora os meios de cultura tenham sido clarificados por sonicação, ultracentrifugação e com soro normal de coelho, a retirada de bandas inespecíficas não foi possível em algumas amostras.

A cinética de secreção demonstrou ser a mesma nas duas linhagens celulares, e também similares quando transfectadas com hTSH nativo ou quimérico, demonstrando que a adição da sequência CTEP no gene de TSH $\beta$  não interfere na heterodimerização ou com o mecanismo de secreção.

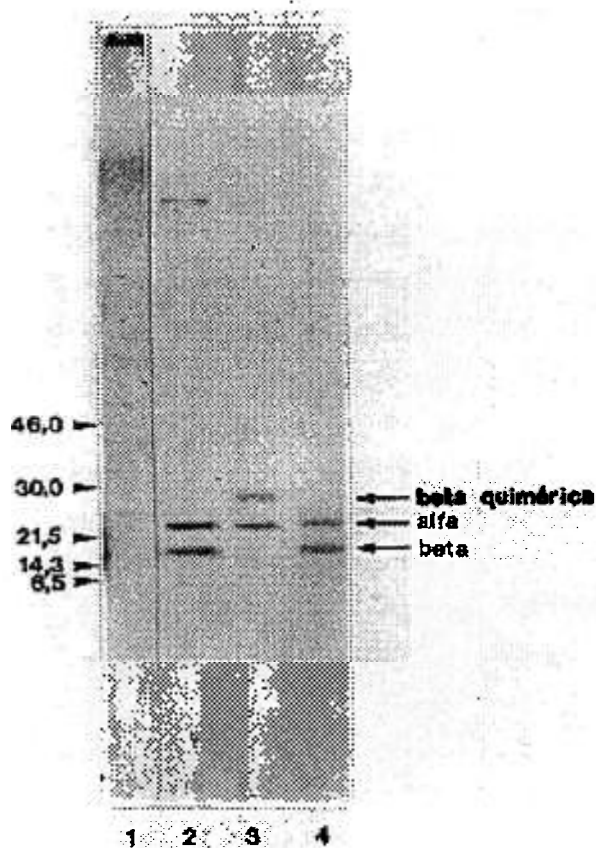


Figura 20 Autorradiograma dos produtos de secreção previamente marcados por 8 horas com  $^{35}\text{S}$ -metionina, separados em gel de poliacrilamida-SDS (14%), com adição de redutores e derivados de:

- 1- células 293 não transfectada,
- 2- rec-hTSH nativo secretado pelas 293,
- 3- rec-hTSH quimérico secretado pelas 293,
- 4- rec-hTSH nativo secretado por células CHO (Genzyme).

Os pesos moleculares obtidos com proteínas marcadas com  $^{14}\text{C}$  estão indicados à esquerda.

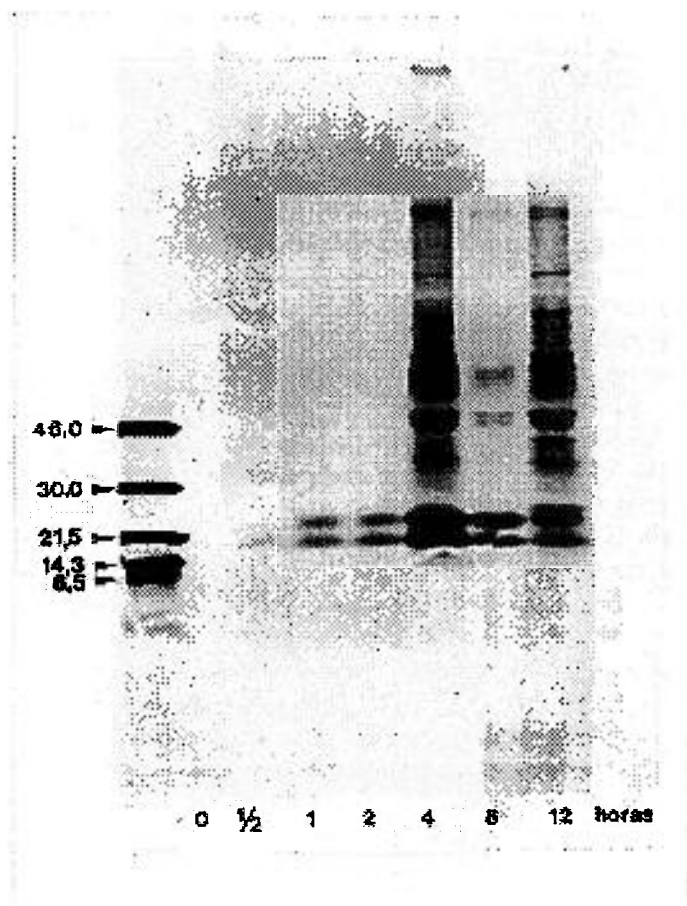


Figura 21 Marcação *pulse-chase* das células 293 secretoras de rec-hTSH nativo. As amostras foram coletadas nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 8 e 12 horas após o pulso. Foi utilizado gel de poliacrilamida com gradiente de 8 a 16% .

Os pesos moleculares obtidos com proteínas marcadas com  $^{14}\text{C}$  estão indicados à esquerda.

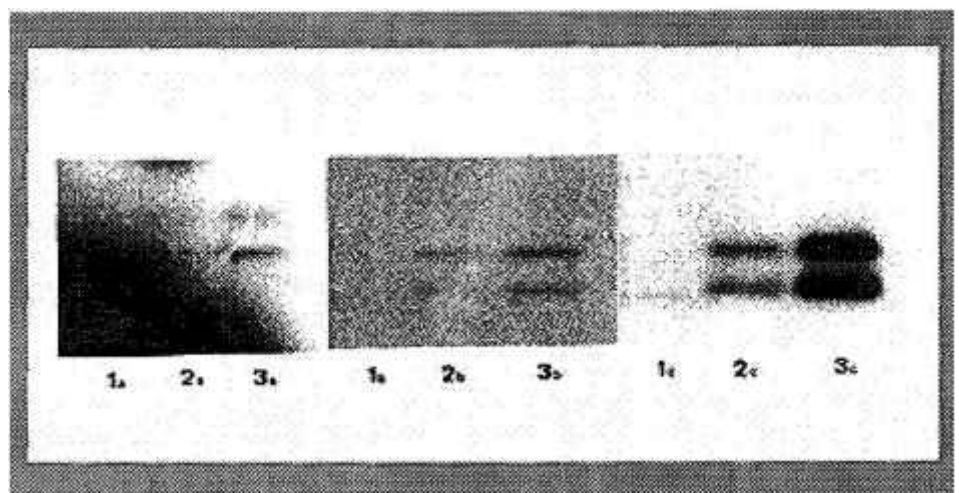


Figura 22 Marcação *pulse-chase* de células secretoras de rec-hTSH,  
a células 293, rec-hTSH quimérico  
b células 293, rec-hTSH nativo,  
c células CHO, rec-hTSH-G nativo.  
nos tempos:  
1 tempo 0  
2 30 minutos  
3 1 hora

### 3.7 Marcação metabólica das células 293 com $^{35}\text{S}$ -sulfato

A sulfatação poderia ser responsável pelo aumento na velocidade de depuração metabólica do TSH nativo secretado pelas células 293, esta hipótese foi examinada pela marcação com  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  em comparação com os produtos secretados por células CHO. As células foram marcadas por 6 a 7 dias e o meio de cultura assim como o lisado das células foram imunoprecipitados e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Como podemos verificar na Figura 23, a incorporação de sulfato foi predominante na subunidade  $\beta$  quimérica, e em menor intensidade na subunidade  $\beta$  nativa e nas subunidades  $\alpha$ , secretadas pelas células 293, apesar destas células secretarem hTSH em níveis inferiores às células CHO. Apesar da adição de inibidores proteolíticos ao tampão de lise, não se detectam formas intracelulares, possivelmente devido aos baixos níveis de incorporação e ao processamento imediato do  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  pelas sulfotransferases. A presença do sulfato na subunidade  $\beta$  de hTSH nativo ou quimérico secretadas no meio de cultura confirmam que a adição do sulfato nos terminais das cadeias oligossacarídicas ocorre imediatamente antes da secreção <sup>30, 32, 100</sup>. A marcação das células 293 com sulfato mostrou ser muito difícil e um sinal só pode ser observado após um longo período de exposição (de 4 a 5 semanas) a  $-80^\circ\text{C}$ , com intensificadores.

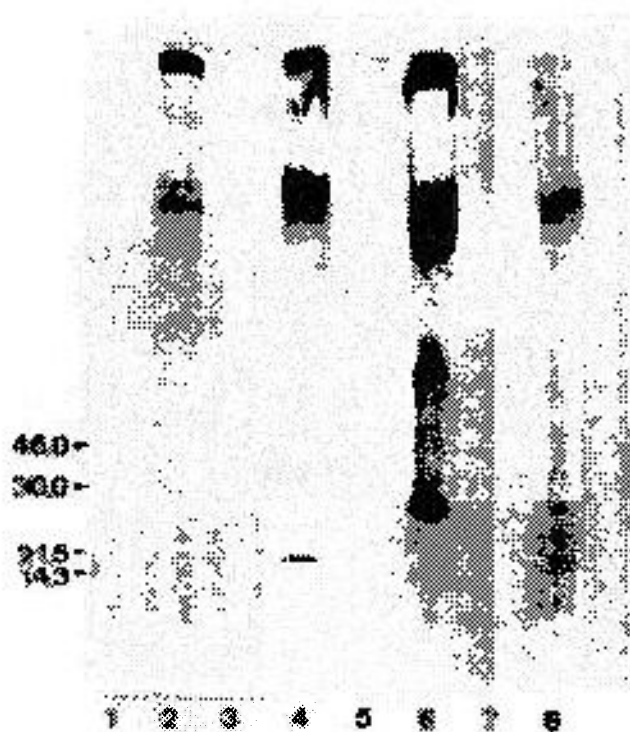


Figura 23 Marcação de rec-hTSH com  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ .

Os números ímpares representam amostras obtidas no lisado celular, e os números pares, amostras secretadas no meio de cultura.

- 1-2 células 293 não transfectadas,
- 3-4 células 293 secretoras de rec-hTSH nativo,
- 5-6 células 293 secretoras de rec-hTSH quimérico,
- 7-8 células CHO secretoras de rec-hTSH nativo.

A análise foi realizada em gel de poliacrilamida com gradiente de 8 a 16%. Os pesos moleculares obtidos com proteínas marcadas com  $^{14}\text{C}$  estão indicados à esquerda.



## 4 Discussão

Para a obtenção de um superagonista de hTSH, a primeira etapa estudada foi a construção do minigene de 909 pb da subunidade  $\beta$  de hTSH, aumentando assim os níveis de secreção no meio de cultura. Esta construção favoreceu a expressão de rec-hTSH em células Cos-7 e 293, apesar de ter sido em níveis inferiores nas células 293. Os resultados indicam que a retirada do fragmento do intron I de 277 pb, e a introdução do exon I possibilitaram a correta transcrição e tradução do gene nas células, o que não ocorria nas células Cos-7 com o gene de 2 kpb utilizado por Wondisford e colaboradores <sup>102</sup>. Tendo as condições de expressão do hTSH nativo padronizadas para as linhagens de células renais, verificamos os efeitos da adição dos 29 aminoácidos do terminal carboxílico de hCG $\beta$ , CTEP, no terminal carboxílico de hTSH $\beta$ .

A adição do CTEP, de caráter hidrofílico, no terminal carboxílico de hTSH $\beta$  não impediu a expressão do rec-hTSH quimérico pelas células em cultura. A presença dos 29 aminoácidos e, possivelmente, as adicionais 4 cadeias oligossacarídicas não alteraram o *folding* da subunidade  $\beta$  ou a heterodimerização com a subunidade  $\alpha$  e possivelmente não interferiram na glicosilação da asparagina, que é importante para o *folding* desta subunidade <sup>49</sup>. A identificação das quimeras secretadas foi realizada pelo reconhecimento das mesmas pelos anticorpos gerados a partir de hTSH nativo nos ensaios imunológicos, pelos níveis de secreção e também da cinética de secreção que se apresentaram similares ao rec-hTSH nativo, demonstrados pelos experimentos de marcação com <sup>35</sup>S-metionina, e ainda, pelas determinações das atividades *in vitro* e *in vivo*. Os últimos resultados são concordantes com o incremento da bioatividade em 3 até 10 vezes observadas na quimera de hFSH construídas pela adição do CTEP na porção carboxi-terminal do gene da subunidade  $\beta$  da foliculotrofina <sup>19, 48</sup> e com o incremento de aproximadamente 2 vezes na bioatividade da quimera de hCG, quando o CTEP foi adicionado na porção amino-terminal do hCG $\alpha$  <sup>25</sup>.

Estudos anteriores <sup>9</sup>, afirmam que a presença dos resíduos de aminoácidos Ile<sup>142</sup>, Leu<sup>143</sup>, Pro<sup>144</sup> e Gln<sup>145</sup>, do terminal carboxílico da hCG $\beta$ , diminuem a atividade tireotrófica do hCG, outros autores <sup>65</sup> relatam que a região entre Cys<sup>105</sup>-Tyr<sup>112</sup> é a mais relevante na interação do hTSH

com os receptores. Considerando estas afirmações, a adição do terminal carboxílico da hCG $\beta$  no hTSH $\beta$  poderia inibir a atividade biológica do rec-hTSH quimérico. Surpreendentemente, a quimera secretada pelas células Cos-7 apresentou mesmos níveis de estimulação de AMP cíclico que as amostras nativas em células FRTL-5, foi capaz de estimular mais eficientemente o crescimento destas células, e ainda, mostrou maior afinidade de ligação aos receptores solubilizados de membrana de tiróide porcina que o rec-hTSH nativo. Também foram observados incrementos significativos de bioatividade *in vivo* com diferentes doses de hTSH quimérico secretados por células Cos-7.

O estímulo do crescimento das células FRTL-5 pela quimera produzida em células 293, analisado no ensaio de incorporação de timidina, demonstrou que esta quimera também foi ativa, embora em níveis inferiores a quimera produzida em células Cos-7. Se esta diminuição na atividade deve ser atribuída apenas aos possíveis interferentes inespecíficos secretados por esta linhagem celular ou às diferenças nos terminais dos oligossacarídeos, ainda não está esclarecido. Sabe-se porém, que a presença das cadeias oligossacarídicas são essenciais para a ativação da adenilato ciclase e estimulação da incorporação de timidina <sup>82, 87, 88, 90</sup> e suas terminações tem participação nesta atividade <sup>82</sup>. Devemos considerar também que a quantificação das diferentes amostras foi baseada em imunoensaios e que, embora os hormônios tireotróficos nativos recombinantes produzidos em células 293, Cos-7 <sup>102</sup> e CHO <sup>44, 73</sup> conservem identidade imunológica com o hTSH hipofisário, quando analisados em imunoensaios utilizando anticorpos monoclonais anti-hTSH nativo, são encontradas diferenças que são atribuídas às diferentes cadeias de carboidratos <sup>44</sup>, as quais poderiam, conseqüentemente, levar a super-estimar ou sub-estimar a quantidade de rec-hTSH analisado.

A atividade biológica *in vivo* é a soma das atividades intrínsecas e da meia-vida plasmática da glicoproteína. Para ser uma droga mais efetiva, o análogo superativo deve ter uma maior atividade intrínseca e uma meia-vida plasmática prolongada, que dependem de vários fatores como a composição de aminoácidos e distribuição da carga, a contribuição da cadeia oligossacarídica, tamanho, composição hidrofílica e estrutura tri-dimensional da glicoproteína. Assim sendo, as diferenças significativas observadas nos coeficientes de eliminação plasmáticas dos rec-hTSH nativo e quimérico, expressos em duas linhagens celulares de origem renal, Cos-7 e

293, reforçam a hipótese de que as duas linhagens celulares secretam estruturas oligossacarídicas com diferentes padrões de glicosilação. Da mesma forma, a similaridade nas curvas de concentração plasmática das amostras de rec-TSH nativo secretadas por células Cos-7 e CHO, foram os indicativos da presença de estruturas semelhantes nas terminações glicosídicas, provavelmente de resíduo de ácido siálico nas cadeias de ligação-N, segundo estudos detalhados sobre rec-hTSH secretados pelas células CHO 62, 82, 87, 88, 90.

O rec-hTSH secretado por células 293 com rápida eliminação plasmática tem comportamento semelhante ao LH bovino, com oligossacarídeos com terminais sulfatados, estudado por Baenziger e colaboradores 2, que foi removido da circulação sanguínea mais rapidamente que LH com terminais com ácido siálico. Os autores também verificaram que a estimulação de AMP cíclico ou a produção de progesterona em células MA-10 não foram alteradas pela ausência do terminal sulfato. Há indicativos de que a rápida eliminação de glicoproteínas com terminais sulfato ocorra devido à ligação das mesmas aos receptores presentes nas células endoteliais hepáticas e células de Kupffer, que reconhecem oligossacarídeos com terminação  $\text{SO}_4\text{-4GalNAc}\beta\text{1, 4GlcNAc}\beta\text{1, 2-Man}\alpha$ , e que medeiam a remoção das mesmas da circulação sanguínea 24. A hipótese de que as amostras secretadas pelas células 293 tinham as cadeias oligossacarídicas sulfatadas foi comprovada pelo experimento de marcação metabólica com  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ .

Os resultados do experimento de marcação metabólica com  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  indicam a incorporação predominante na subunidade  $\beta$  quimérica seguida da subunidade  $\beta$  nativa e da subunidade  $\alpha$ , embora a subunidade  $\alpha$  apresente dois sítios de glicosilação de ligação-N e a subunidade  $\beta$ , um sítio. A incorporação mais eficiente de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  pelo hTSH $\beta$  quimérico pode ser explicada pela adição do mesmo na cadeia de ligação-N e também nas quatro cadeias de ligação-O, que segundo Siciliano e colaboradores 77, dependem de um mesmo sinal de reconhecimento pela  $\beta$ -N-acetilgalactosamina transferase para a adição de N-acetil galactose seguida da adição do terminal sulfato. Os baixos níveis de sulfatação observados nas subunidades  $\alpha$  são contrários ao esperado. Segundo Smith e colaboradores 78, 79, 80 esta subunidade contém o tripeptídeo Pro-X-Arg/Lis requerido pela enzima  $\beta$ -N-acetilgalactosamina transferase para a adição de N-acetilgalactosamina. Este tripeptídeo não é encontrado na subunidade  $\beta$ ,

sugerindo que para o hTSH, os sinais de reconhecimento desta enzima pode ser diferente, ou mesmo que, ao formar o heterodímero, este tripeptídeo favoreça a adição da N-acetilgalactosamina na subunidade associada, mas não nela mesma. Alternativamente é possível que as células 293 adicionem estruturas oligossacarídicas aberrantes, com cadeias de estruturas multiantenárias na hTSH $\beta$ , resultando em maior número de terminais não reduzidos disponíveis e facilmente acessíveis para a incorporação de sulfato <sup>43</sup>.

Ao analisar o rec-hTSH marcado com <sup>35</sup>SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, secretado pelas células CHO, devemos considerar um nível de secreção mais elevado que o obtido em células 293. Além disso, sabe-se que as células CHO não possuem as enzimas necessárias para sulfatação de N-acetilgalactosamina, mas apresentam altos níveis de galactosil transferase, que transferem em níveis baixos N-acetilgalactosamina aos terminais N-acetilglucosamina <sup>80</sup>. A presença da N-acetilgalactosamina nos oligossacarídeos possibilitaria a sulfatação através de enzimas inespecíficas ou ainda, o sulfato poderia estar sendo adicionado às tirosinas <sup>51</sup>, e não aos terminais oligossacarídicos. Este último mecanismo seria favorecido pelos níveis de secreção de rec-hTSH elevados em CHO em comparação às células 293. O sítio de sulfatação poderá ser demonstrado, futuramente, pela digestão das subunidades marcadas com a enzima endoglicosidase F, que separa especificamente, as cadeias de carboidratos da cadeia polipeptídica. Devemos considerar que a dificuldade técnica encontrada nesta marcação, que pode ter sido causada por vários fatores como a linhagem celular utilizada, a quantidade insuficiente de proteína secretada ou a dificuldade de acesso para a marcação das cadeias oligossacarídicas ou ainda a baixa atividade específica do marcador utilizado neste estudo, pode ter aumentado as possibilidades de ligações inespecíficas. Apesar de todas estas dificuldades e do inesperado sinal de sulfatação apresentado pelo rec-hTSH produzido em células CHO, consideramos este ensaio indicativo de uma maior sulfatação ocorrida, especialmente na subunidade  $\beta$  quimérica, em células 293.

Contrariamente ao rec-hTSH secretados pelas células 293, o rec-hTSH quimérico secretado por células Cos-7 apresentou uma diminuição do coeficiente de eliminação plasmática, paralelamente com o aumento da atividade *in vivo*, confirmando a importância do ácido siálico no aumento da meia-vida e da potência *in vivo* <sup>62, 82, 87, 88, 89</sup> e sugerindo sua utilização como análogo de atividade prolongada. O aumento da potência biológica *in*

*vivo* foi comparável àquele apresentado pelo hFSH quimérico no ensaio baseado no incremento de peso ovariano <sup>19, 48</sup>.

Adicionalmente, a análise das subunidades de rec-hTSH secretadas pelas células 293 e CHO, marcadas com <sup>35</sup>S-metionina, demonstrando a presença de proteínas de mesmo tamanho molecular, com a mesma cinética de secreção, reforçam a hipótese de que as diferenças nos oligossacarídeos terminais são responsáveis pelos diferentes coeficientes de eliminação plasmáticas e conseqüentemente pelas diferentes atividades biológicas. Os pesos moleculares das subunidades secretadas, de 23 kDa para a subunidade  $\alpha$ , 19 kDa para a subunidade  $\beta$  são maiores que os descritos na literatura em geral, mas também foram observados por Wondisford e colaboradores <sup>102</sup>, e foram atribuídos aos diferentes carboidratos que compõem as cadeias oligossacarídicas.

O rec-hTSH quimérico com uma cadeia de ligação N mais quatro cadeias de ligação-O tem atividade biológica *in vivo* aumentada cerca de 3 vezes, um incremento comparável àquele apresentado pelas quimeras de hFSH com duas cadeias de ligação-N e quatro cadeias de ligação-O ou oito cadeias de ligação-O <sup>19, 48</sup>. Este resultado sugere que o número de resíduos de ácido siálico não é o único responsável pelo prolongamento da meia-vida e o aumento da bioatividade *in vivo*. A contribuição dos 29 aminoácidos no aumento do peso molecular do hTSH quimérico não pode ser desprezada, especialmente porque o aumento no tamanho das proteínas por reações químicas com o polietileno glicol e por fusão genética (albumina-CD4) tem demonstrado aumentar a meia vida plasmática devido a diminuição da filtração glomerular renal <sup>104</sup>.

Em resumo, este estudo apresenta, pela primeira vez, evidências de que a adição do peptídeo carboxílico terminal da hCG $\beta$  na subunidade  $\beta$  de hTSH não diminui a atividade tireotrófica, ao contrário, aumenta sua potência *in vivo* paralelamente com o aumento da meia-vida plasmática, mostrando que a quimera rec-hTSH-CTEP hCG $\beta$  é um possível candidato a superagonista *in vivo*.

Embora nossos resultados tenham demonstrado que foi possível desenvolver um análogo com atividade aumentada, modificações adicionais como a remoção dos últimos aminoácidos do CTEP-hCG $\beta$  (Ile<sup>142</sup>, Leu<sup>143</sup>, Pro<sup>144</sup> e Gln<sup>145</sup>) <sup>9</sup>, assim como a remoção dos seis últimos aminoácidos do hTSH $\beta$  (Leu<sup>113</sup>, Val<sup>114</sup>, Gly<sup>115</sup>, Phe<sup>116</sup>, Ser<sup>117</sup> e Val<sup>118</sup>) <sup>49, 83</sup> e a

mutagenese sítio dirigida com alteração ou eliminação de outros aminoácidos, podem ser úteis no aperfeiçoamento da expressão *in vitro* desta quimera e principalmente na obtenção de análogos com maior atividade biológica e conseqüentemente de maior eficácia terapêutica. Além disso, uma mutante da quimera deglicosilada, com a subunidade  $\alpha$  também deglicosilada, poderia resultar num análogo antagonista, com possíveis aplicações terapêuticas <sup>43</sup>.

## 5 Conclusões

O minigene de 909 pb resulta em maiores níveis de expressão de rec-hTSH, pelas células Cos-7, em comparação ao minigene de 2 kpb, em cultura.

A quimera TSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$  foi expressa em células em cultura, nos mesmos níveis que o rec-hTSH nativo.

A atividade *in vitro* de ambos, rec-hTSH e quimérico, foram comparáveis.

O TSH quimérico produzido em células Cos-7 foi mais ativo no ensaio *in vivo*.

Os coeficientes de eliminação plasmática de ambos, rec-hTSH nativo e quimérico, secretados pelas células Cos-7 foram menores quando comparados com os mesmos produtos obtidos em células 293.

A cinética de secreção nas linhagens celulares, 293 e CHO, são similares.

As células 293 adicionam sulfato nas terminações dos oligossacarídeos das glicoproteínas.

A quimera hTSH $\beta$ -CTEP hCG $\beta$  é uma candidata a superagonista de TSH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AMBESI-IMPIOMBATO, F.S.; PARKS, L.A.M.; COON, H.G. Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 77, n. 6, p. 3455-3459, 1980.
- 2- BAENZIGER, J.U.; KUMAR, S.; BRODBECK, R.M.; SMITH, P.L.; BERANEK, M.C.; Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 334-338, 1992.
- 3- BARTOLINI, P.; DIAS, L.E.M.F.; MURATA, Y. Growth hormone production by DNA-recombinant techniques. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, v. 45, p. 241-243, 1990.
- 4- BEEBE, J.S.; HUTH, J.R.; RUDDON, R.W. Combination of the chorionic gonadotropin free  $\beta$ -subunit with  $\alpha$ . *Endocrinology*, v. 126, n. 1, p. 384-391, 1990.
- 5- BIELINSKA, M.; RZYMKIEWICZ, D.; BOIME, I. Human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin are targeted to a regulated secretory pathway in GH<sub>3</sub> cells. *Mol. Endocrinol.*, v. 8, n. 7, p. 919-928, 1994.
- 6- BIRKEN, S.; CANFIELD, R.; LAUER, R.; AGOSTO, G.; GABEL, M. Immunochemical determinants unique to human chorionic gonadotropin: importance of sialic acid for antisera generated to the human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit COOH-terminal peptide. *Endocrinology*, v. 106, n. 6, p. 1659-1664, 1980.



- 7- BOOTHBY, M.; RUDDON, R.W.; ANDERSON, C.; MCWILLIAMS, D.; BOIME, I. A single gonadotropin  $\alpha$ -subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J. Biol. Chem.*, v. 256, n. 10, p. 5121-5127, 1981.
- 8- BOORSTEIN, W.R.; VAMVAKOPOULOS, N.C.; FIDDES, J.C. Human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem and inverted pairs. *Nature*, v. 300, p. 419-422, 1982.
- 9- CARAYON, P.; AMR, S.; NISULA, B.; LISSITZKY, S. Effect of carboxypeptidase digestion of the human chorionic gonadotropin molecule on its thyrotropic activity. *Endocrinology*, v. 108, n. 5, p. 1891-1898, 1981.
- 10- CHEN, F.; PUETT, D. Delineation via site-directed mutagenesis of the carboxyl-terminal region of human choriogonadotropin  $\beta$  required for subunit assembly and biological activity. *J. Biol. Chem.*, v. 266, n. 11, p. 6904-6908, 1991.
- 11- COLE, E.S.; LEE, K.; LAUZIÈRE, K.; KELTON, C.; CHAPPEL, S.; WEINTRAUB, B.; FERRARA, D.; PETERSON, P.; BERNASCONI, R.; EDMUNDS, T.; RICHARDS, S.; DICKERELL, L.; KLEEMAN, J.M.; MCPHERSON, J.M.; PRATT, B.M. Recombinant human thyroid stimulating hormone: development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma. *Biotechnology*, v. 11, p. 1014-1024, 1993.
- 12- CORLESS, C.L.; MATZUK, M.M.; BAMABHADHAN, J.V.; DRICHEVSKY, A.; BOIME, I. Gonadotropin beta subunits determine the role of assembly and the oligosaccharide processing of hormone dimer in transfected cells. *J. Cell Biol.*, v. 104, p. 1173, 1181, 1987.
- 13- DHARMESH, S.M.; BAENZIGER, J.U. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides on lutropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p. 11127-11131, 1993.

- 14- DIRNHOFER, S.; KLIEBER, R.; LEEUW, R.; BIDART, J.M.; MERZ, W.E.; WICK, G.; BERGER, P. Functional and immunological relevance of the COOH-terminal extension of human chorionic gonadotropin  $\beta$ : implications for the WHO birth control vaccine. *FASEB J.*, v. 7, p. 1381-1385, 1993.
- 15- DRACOPOLI, N.C.; RETTIG, W.J.; WHITFIELD, G.K.; DARLINGTON, G.J.; SPENGLER, B.A.; BIEDLER, J.L.; OLD, L.J.; KOURIDES, I.A. Assignment of the gene for the  $\beta$  subunit of thyroid-stimulating hormone to the short arm of human chromosome 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 1822-1826, 1986.
- 16- DWEK, R.A.; EDGE, C.J.; HARVEY, D.J.; WORMALD, M.R. Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 62, p. 65-100, 1993.
- 17- EAST-PALMER, J.; SZKUDLINSKI, M.W.; LEE, J.; THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D. A novel, non-radioactive in- vivo bioassay of thyrotropin (TSH). *Thyroid*, v. 5, n. 1, p. 55-59, 1995.
- 18- EL-DEIRY, S.; KAETZEL, D.; KENNEDY, G.; NILSON, J.; PUETT, D. Site-directed mutagenesis of the human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit: bioactivity of a heterologous hormone, bovine  $\alpha$ -human des(122-145) $\beta$ . *Mol. Endocrinol.*, v. 3, n. 10, p. 1523-1528, 1989.
- 19- FARES, F.A.; SUGANUMA, N.; NISHIMORI, K.; LAPOLT, P.S.; HSUEH, A.J.W.; BOIME, I. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit to the follitropin  $\beta$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 4304-4308, 1992.
- 20- FERBER, S.; GROSS, D.J.; VILLA-KOMAROFF, L.; DANEHY, F. VOLLENWEIDER, F.; MEYER, K.; LOEKEN, M.R.; KAHN, C.R.; HALBAN, P. A. Heterogeneity of expression and secretion of native and mutant [Asp<sup>B10</sup>] Insulin in AtT20 cells. *Mol. Endocrinol.*, v. 5, n. 3, p. 319-326, 1991.

- 21- FIDDES J.C.; GOODMAN, H.M. Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the  $\alpha$ -subunit of human chorionic gonadotropin. **Nature**, v. 281, p. 351-356, 1979.
- 22- FIDDES, J.C.; GOODMAN, H.M. The cDNA for the  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. **Nature**, v. 286, p. 684-687, 1980.
- 23- FIDDES, J.C.; GOODMAN, H.M. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. **J. Mol. Appl. Genet.**, v. 1, n. 1, p. 3-15, 1981.
- 24- FIETE, D.; SRIVASTAVA, V.; HINDSGAUL, O.; BAENZIGER, J.U. A hepatic reticulo-endothelial cell receptor specific for SO<sub>4</sub>-4GalNAc $\beta$ 1, 4GlcNAc $\beta$ 1, 2Man $\alpha$  that mediates rapid clearance of lutropin. **Cell**, v. 67, p. 1103-1110, 1991.
- 25- FURUHASHI, M.; SHIKONE, T.; FARES, F.A.; SUGAHARA, T. HSUEH, A.J.W.; BOIME, I. Fusing the carboxy-terminal peptide of the chorionic gonadotropin (CG) b-subunit: retention of O-linked glycosylation and enhanced *in vivo* bioactivity of chimeric human CG. **Mol. Endocrinol.**, v. 9, n. 1, p. 54-63, 1995.
- 26- GALWAY, A.B.; HSUEH, A.J.W.; KEENE, J.L.; YAMOTO, M. FAUSER, B.C.J.M.; BOIME, I. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. **Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 93-100, 1990.
- 27- GALWAY, A.B.; LAPOLT, P.S.; TSAFRIRI, A.; DARGAN, C.M.; BOIME, I.; HSUEH, A.J.W. Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. **Endocrinology**, v. 127, n. 6, p. 3023-3028, 1990.

- 28- GEISOW, M.J. Glycoprotein glycans - roles and controls. *Trends in Biotechnol.* , v. 10, p. 333-335, 1992.
- 29- GESUNDHEIT, N.; ALEXANDER, J.K. Endocrine therapy with recombinant hormones and growth factors. In: Weintraub, B.D. (Ed) *Molecular endocrinology: basic concepts and clinical correlations*. New York: Raven Press, 1995. p. 491-507.
- 30- GESUNDHEIT, N. WEINTRAUB, B.D. Mechanisms and regulation of TSH glycosylation. In: DHINDSA, D.S.; BAHL, O.P. (Eds) *Molecular and cellular aspects of reproduction*. New York: Plenum , 1986. p. 87-105.
- 31- GOEDEL, D.V.; HEYNEKER, H.L.; HOZUMI, T.; ARENTZEN, R.; ITAKURA, K.; YANSURA, D.G.; ROSS, M.J.; MIOZZARI, G.; CREA, R.; SEEGURG, P.H. Direct expression in *E coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, v. 281, p. 544-548, 1979.
- 32- GOOCHEE, C.F.; GRAMER, M. J.; ANDERSON, D.C.; BAHR, J.B.; RASMUSSEN, J.R. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Bio/Technology*, v. 9, p. 1347-1355, 1991.
- 33- GREEN, E. D.; BAENZIGER, J.U. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin *J. Biol. Chem.*, v. 263, n. 1, p. 25-35, 1988.
- 34- GREEN, E.D.; GRUENEBAUM, J.; BIELINSKA, M.; BAENZIGER, J.U.; BOIME, I. Sulfation of lutropin oligosaccharides with a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, p. 5320-5324, 1984.
- 35- GUIDON JR, P.T.; WHITFIELD, G.K. PORTI, D.; KOURIDES, I.A. The human thyrotropin  $\beta$ -subunit gene differs in 5' structure from murine TSH- $\beta$  genes. *DNA*, v. 7, n. 10, p. 691-699, 1988.

- 36- GYVES, P.W.; GESUNDHEIT, N.; THOTAKURA, N.R.; STANNARD, B.S.; DeCHERNEY, G.S.; WEINTRAUB, B.D. Changes in the sialylation and sulfation of secreted thyrotropin in congenital hypothyroidism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, p. 3792-3796, 1990.
- 37- HARTREE, A.S.; RENWICK, A.G.C. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem. J.*, v. 287, p. 665-679, 1992.
- 38- HAWLEY-NELSON, P.; CICCARONE, V. GEBEYEHU, G. JESSEE, J. Lipofectamine® reagent: a new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus*, v. 15, n. 3, p. 73-79, 1993.
- 39- HAYASHIZAKI, Y.; MIYAI, K.; KATO, K.; MATSUBARA, K. Molecular cloning of the human thyrotropin- $\beta$  subunit gene. *FEBS*, v. 188, n. 2, p. 394-400, 1985.
- 40- HERSHMAN, J.M.; LEE, H-Y.; SUGAWARA, M.; MIRELL, C.J.; PANG, X-P.; YANAGISAWA, M.; PEKARY, A.E. Human chorionic gonadotropin stimulates iodide uptake, adenylate cyclase, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured rat thyroid cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 67, n. 1, p. 74-79, 1988.
- 41- HORTIN, G.; NATOWICZ, M.; PIERCE, J.; BAENZIGER, J.; PARSONS, T.; BOIME, I. Metabolic labeling of lutropin with [35S] sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 78, n. 12, p. 7468-7472, 1981.
- 42- JAMESON, J.L.; LINDELL, C.M.; HABENER, J.F. Gonadotropin and thyrotropin  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit gene expression in normal and neoplastic tissues characterized using specific messenger ribonucleic acid hybridization probes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 64, n. 2, p. 319-327, 1987.

- 43- JOSHI, L.; MURATA, Y.; WONDISFORD, F.E.; SZKUDLINSKI, M.W.; DESAI, R.; WEINTRAUB, B.D. Recombinant thyrotropin containing a  $\beta$ -subunit chimera with the human chorionic gonadotropin- $\beta$  carboxy-terminus is biologically active, with a prolonged plasma half-life: role of carbohydrate in bioactivity and metabolic clearance. *Endocrinology*, v. 136, n. 9, p. 3839-3848, 1995.
- 44- KASHIWAI, T.; ICHIHARA, K.; ENDO, Y.; TAMAKI, H.; AMINO, N.; MIYAI, K. Immunological and biological characteristics of recombinant human thyrotropin. *J. Immunol. Methods*, v. 143, p. 25-30, 1991.
- 45- KAUFMAN, R.J.; WASLEY, L.C.; SPILIOTES, A.J.; GOSSELS, S.D.; LATT, S.A.; LARSEN, G.R.; KAY, R.M. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.*, v. 5, n. 7, p. 1750-1759, 1985.
- 46- KEENE, J.L.; MATZUK, M.M.; OTANI, T.; FAUSER, B.C.J.M.; GALWAY, A.B.; HSUEH, A.J.W.; BOIME, I. Expression of biologically active human follitropin in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 9, p. 4769-4775, 1989.
- 47- KENNEDY, R.L.; DARNE, J. The role of hCG in regulation of the thyroid gland in normal and abnormal pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, v. 78, n. 2, p. 298-307, 1991.
- 48- LAPOLT, P. S.; NISHIMORI, K.; FARES, F.A.; PERLAS, E.; BOIME, I.; HSUEH, A.J.W. Enhanced stimulation of follicle maturation and ovulatory potential by long acting follicle-stimulating hormone agonists with extended carboxy-terminal peptides. *Endocrinology*, v. 131, n.6, p. 2514-2520, 1992.

- 49- LASH, R.W.; DESAI, R.K.; ZIMMERMAN, C.A.; FLACK, M.R.; YOSHIDA, T.; WONDISFORD, F.E.; WEINTRAUB, B.D. Mutations of the human thyrotropin- $\beta$  subunit glycosylation site reduce thyrotropin synthesis independent of changes in glycosylation status. *J. Endocrinol. Invest.*, v. 15, p. 255-263, 1992.
- 50- LIU, D.T-Y. Glycoprotein pharmaceuticals: scientific and regulatory considerations, and the US Orphan Drug Act. *Trends Biotechnol.* , v. 10, p.114-120, 1992.
- 51- LIU, N.; BAENZIGER, J.U. *In vivo* and *in vitro* tyrosine sulfation of a membrane glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, v. 261, n.2, p. 856-861, 1986.
- 52- LIU, L.; SOUTHERS, J.L.; BANKS, S.M.; BLITHE, D.L.; WEHMANN, R.E.; BROWN, J.H.; CHEN, H-C.; NISULA, B.C. Stimulation of testosterone production in the cynomolgus monkey *in vivo* by deglycosylated and desialylated human choriogonadotropin. *Endocrinology*, v. 124, n. 1, p. 175-180, 1989.
- 53- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989.
- 54- MATZUK, M.M.; BOIME, I. Site-specific mutagenesis defines the intracellular role of the asparagine-linked oligosaccharides of chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.*, v. 263, n. 32, p. 17106-17111, 1988.
- 55- MATZUK, M.M.; BOIME, I. The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the  $\alpha$  subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotropin. *J. Cell Biol.*, v. 106, p. 1049 - 1059, 1988.

- 56- MATZUK, M.M.; HSUEH, A.J.W.; LAPOLT, P.; TSAFRIRI, A.; KEENE, J.L.; BOIME, I. The biological role of the carboxyl-terminal extension of human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit. *Endocrinology*, v. 126, n. 1, p. 376-383, 1990.
- 57- MATZUK, M.M.; KEENE, J.L.; BOIME, I. Site specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 5, p. 2409-2414, 1989.
- 58- MATZUK, M.M.; KORNMEIER, C.M.; WHITFIELD, G.K.; KOURIDES, I.A.; BOIME, I. The glycoprotein  $\alpha$ -subunit is critical for secretion and stability of the human thyrotropin  $\beta$ -subunit. *Mol. Endocrinol.*, v. 2, n. 2, p. 95-100, 1988.
- 59- MATZUK, M.M.; KRIEGER, M.; CORLESS, C.L.; BOIME, I. Effects of preventing O-glycosylation on the secretion of human chorionic gonadotropin in chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 6354-6358, 1987.
- 60- MATZUK, M.M.; SPANGLER, M.M.; CAMEL, M.; SUGANUMA, N. BOIME, I. Mutagenesis and chimeric genes define determinants in the  $\beta$  subunits of human chorionic gonadotropin and lutropin for secretion and assembly. *J. Cell Biol.*, v. 109, p. 1429-1438, 1989.
- 61- MEIER, C.A.; BRAVERMAN, L.E.; EBNER, S.A.; VERONIKIS, I.; DANIELS, G.H.; ROSS, D.S.; DERASKA, D.J.; DAVIES, T.F.; VALENTINE, M.; DeGROOT, L.J.; CURRAN, P.; McELLIN, K.; REYNOLDS, J.; ROBBINS, J.; WEINTRAUB, B.D. Diagnostic use of recombinant human thyrotropin in patients with thyroid carcinoma (phase I/II study). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 78, n. 1, p. 188-196, 1994.
- 62- MORELL, A.G.; GREGORIADIS, G.; SCHEINBERG, I.H.; HICKMAN, J.; ASHWELL, G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.*, v. 246, n. 5, p. 1461-1467, 1971.



- 63- MORGANTI, L.; HUYER, M.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Production and characterization of biologically active Ala-Ser-(His)<sub>6</sub>-Ile-Glu-Gly-Arg-human prolactin (tag-hPRL) secreted in the periplasmic space of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* , *In press.*
- 64- MORRIS III, J.C.; JIANG, N.-S.; CHARLESWORTH, M.C.; McCORMICK, D.J.; RYAN, R.J. The effects of synthetic,  $\alpha$ -subunit peptides on thyrotropin interaction with its receptor. *Endocrinology*, v. 123, n. 1, p. 456, 462, 1988.
- 65- MORRIS, J.C.; McCORMICK, D.J.; RYAN, R.J. Inhibition of thyrotropin binding to receptor by synthetic human thyrotropin  $\beta$  peptides. *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 4, p. 1881-1884, 1990.
- 66- NISULA, B.C.; MORGAN, F.J.; CANFIELD, R.E. Evidence that chorionic gonadotropin has intrinsic thyrotropic activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 59, n. 1, p. 86-91, 1974.
- 67- PAREKH, R. B.; PATEL, T.P. Comparing the glycosylation pattern in recombinant glycoproteins. *Trends Biochem. Technol.*, v. 10, p. 276-280, 1992.
- 68- PARIS, N.; RENTIER-DELRUE, F.; DEFONTAINE, A.; GOFFIN, V.; LEBRUN, J.J.; MERCIER, L.; MARTIAL, J.A. Bacterial production and purification of recombinant human prolactin. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 12, p. 436-449, 1990
- 69- PERRIER, D.; GIBALDI, M. Clearance and biologic half-life as indices of intrinsic hepatic metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 191, n. 1, p. 17-24, 1974.
- 70- PIERCE, J.G.; PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 50, p. 466-495, 1981.

- 71- PROPST, C.L. Recent developments in the use of mammalian cell culture for the production of pharmaceuticals and other important products. *J. Indust. Microbiol.*, v. 2, p. 125-132, 1987.
- 72- REDDY, V.B.; BECK, A.K.; GARRAMONE, A.J.; VELLUCCI, V.; LUSTBADER, J.; BERNSTINE, E.G. Expression of human choriogonadotropin in monkey cells using a single simian virus 40 vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 3644-3648, 1985.
- 73- RIBELA, M.T.C.P.; BIANCO, A.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human thyrotropin produced in chinese hamster ovary cells for the preparation of immunoassay reagents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *In press*.
- 74- RYAN, R.J.; KEUTMANN, H.T.; CHARLESWORTH, M.C.; MCCORMICK, D.J.; MILIUS, R.P.; CALVO, F.O.; VUTYAVANICH, T. Structure-function relationships of gonadotropins *Rec. Progr. Horm. Res.*, v. 43, p. 383-429, 1987.
- 75- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSTON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- 76- SERTIE, J.A.A.; LARA, P. F. Biodisponibilidade e farmacocinética. In: ZANINI, A.C.; OGA, S. *Farmacologia aplicada*. São Paulo: Atheneu, 1994. p. 46-63.
- 77- SICILIANO, R.A.; MORRIS, H.R.; BENNETT, H.P.J.; DELL, A. O-glycosylation mimics N-glycosylation in the 16-kDa fragment of bovine pro-opiomelanocortin. The major O-glycan attached to Thr-45 carries SO<sub>4</sub>-4GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-, which is the archetypal non-reducing epitope in the N-Glycans of pituitary glycohormones. *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 2, p. 910-920, 1994.

- 78- SMITH, P.L.; BAENZIGER, J.U. A pituitary N-acetylgalactosamine transferase that specifically recognizes glycoprotein hormones. *Science*, v. 242, p. 930-933, 1988.
- 79- SMITH, P.L.; BAENZIGER, J.U. Molecular basis of recognition by the glycoprotein hormone-specific N-acetylgalactosamine-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 329-333, 1992.
- 80- SMITH, P.L.; SKELTON, T.P.; FIETE, D.; DHARMESH, S.M.; BERANEK, M.C.; MACPHAIL, L.; BROZE JR., J.G.; BAENZIGER, J.U. The asparagine-linked oligosaccharides on tissue factor pathway inhibitor terminate with  $SO_4-4GalNAcb1, 4GlcNAc\beta 1,2 Man\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 27, p. 19140-19146, 1992.
- 81- SNIDER, M.D.; ROBBINS, P.W. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides of glycoproteins *Methods Cell Biol.*, v. 23, p. 89-100, 1981.
- 82- SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; BUCCI, I.; JOSHI, L.R.; TSAI, A.; EAST-PALMER, J.; SHILOACH, J.; WEINTRAUB, B.D. Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by Chinese hamster ovary cells: The role of sialylation and sulfation in TSH bioactivity. *Endocrinology*, v. 133, n. 4, p. 1490-1503, 1993.
- 83- TAKATA, K.I.; WATANABE, S.; HIRONO, M.; TAMAKI, M.; TERAOKA, H.; HAYASHIZAKI, Y. The role of the carboxyl-terminal 6 amino acid extension of human TSH  $\beta$  subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 165, n. 3, p. 1035-1042, 1989.
- 84- TALMADGE, K.; BOORSTEIN, W.R.; VAMVAKOPOULOS, N.C.; GETHING, M.-J.; FIDDES, J.C. Only three of the seven human chorionic gonadotropin beta subunit genes can be expressed in the placenta. *Nucleic Acids Res.*, v. 12, n. 22, p. 8415-8436, 1984.

- 85- TALMADGE, K.; VAMVAKOPOULOS, N.C.; FIDDES, J.C. Evolution of the genes for the  $\beta$  subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature*, v. 307, p. 37-40, 1984.
- 86- TANAKA, M.; HERR, W. Preferential transcriptional Activation by Oct-1 and Oct-2: Interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell*, v. 60, p. 375-386, 1990.
- 87- THOTAKURA, N.R.; DESAI, R.K.; BATES, L.G.; COLE, E.S.; PRATT, B.M.; WEINTRAUB, B.D. Biological activity and metabolic clearance of a recombinant human thyrotropin produced in chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*, v. 128, n. 1, p. 341-348, 1991.
- 88- THOTAKURA, N.R.; DESAI, R.K.; SZKUDLINSKI, M.W.; WEINTRAUB, B.D. The role of the oligosaccharide chains of thyrotropin  $\alpha$ - and  $\beta$  subunits in hormone action. *Endocrinology*, v. 131, n. 1, p. 82-88, 1992.
- 89- THOTAKURA, N.R.; LICALZI, L.; WEINTRAUB, B.D. The role of carbohydrate in thyrotropin action assessed by a novel approach using enzymatic deglycosylation. *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 20, p. 11527-11534, 1990.
- 90- THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D. N-glycans of thyrotropin and gonadotropins: their physiological relevance. *Glyconews*, v. 2, p. 1-4, 1993.
- 91- THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D.; BAHL, O.P. The role of carbohydrate in human choriogonadotropin (hCG) action. Effects of N-linked carbohydrate chains from hCG and other glycoproteins on hormonal activity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 70, p. 263-272, 1990.
- 92- TOMER, Y.; HUBER, G.K.; DAVIES, T.F. Human chorionic gonadotropin (hCG) interacts directly with recombinant human TSH receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 74, n. 6, p. 1477-1479, 1992.

- 93- TORJESEN, P.A.; SAND, T. NORMAN, N.; TRYGSTAD, O.; FOSS, I.  
Isolation of LH, FSH and TSH from human pituitaries after the removal of hGH. *Acta Endocrinol.*, v. 77, p. 485-497, 1974.
- 94- VAITUKAITIS, J.L.; LEE, C.Y.; EBERSOLE, E.R. LERARIO, A.C. New evidence for an acute role of protein kinase in hCG action. *Endocrinology*, v. 97, n. 1, p. 215-222, 1975.
- 95- VALENTE, W.A.; VITTI, P.; KOHN, L.D.; BRANDI, M.I.; ROTELLA, C.M. TOCCAFONDI, R.; TRAMONTANO, D.; ALOJ, S.M.; AMBESI-IMPIOMBATO, F.S. The relationship of growth and adenylate cyclase activity in cultured thyroid cells: separate bioeffects of thyrotropin. *Endocrinology*, v. 112, n. 1, p. 71-79, 1983.
- 96- WALLIS, M.; HOWELL, S.L.; TAYLOR, K.W. *Biochemistry of polypeptide Hormones*. New York, NY: Wiley, 1985.
- 97- WARREN, C.E. Glycosilation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 4, p. 596-602, 1993.
- 98- WATANABE, S.; HAYASHIZAKI, Y.; ENDO, Y.; HIRONO, M.; TAKIMOTO, N.; TAMAKI, M.; TERAOKA, H.; MIYAI, K.; MATSUBARA, K. Production of human thyroid-stimulating hormone in chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 149, n. 3, p. 1149-1155, 1987.
- 99- WEINTRAUB, B.D.; GESUNDHEIT, N.; GYVES, P.W.; TAYLOR, T.; DECHERNEY, G.S. Endocrine and developmental regulation of thyrotropin (TSH) carbohydrate synthesis. In: NAGATAKI, S.; TORIZUKA, K. (Eds.). *The thyroid 1988: proceedings of the international thyroid symposium, Tokyo, 13-15 July, 1988*. Amsterdam: Elsevier Science, 1988. p. 13-18.

- 100- WONDISFORD, F.E.; MAGNER, J.A.; WEINTRAUB, B.D. Thyrotropin. In: BRAVERMAN, L.E.; UTIGER, R.D. (Eds.). ***The thyroid a fundamental and clinical text.*** 6. ed. Philadelphia, Pa.: J.B. Lippincott, 1991. p. 257-276.
- 101- WONDISFORD, F.E.; RADOVICK, S.; MOATES, J.M.; USALA, S.J.; WEINTRAUB, B.D. Isolation and characterization of the human thyrotropin  $\beta$ -subunit gene. ***J. Biol. Chem.***, v.263, n. 25, p. 12538-1254, 1988.
- 102- WONDISFORD, F.E.; USALA, S.J.; DECHERNEY, G.S.; CASTREN, M.; RADOVICK, S.; GYVES, P.W.; TREMPER, J.P.; PRICE KERFOOT, B.; NIKODEM, V.M.; CARTER, B.J.; WEINTRAUB, B.D. Cloning of the human thyrotropin  $\beta$ -subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. ***Mol. Endocrinol.***, v. 2, n. 1, p. 32-39, 1988.
- 103- WOOD, C.R.; DORNER, A.J.; MORRIS, G.E. ALDERMAN, E.M. WILSON, D.; O'HARA, R.M.; KAUFMAN, R.J. High level synthesis of immunoglobulins in chinese hamster ovary cells. ***J. Immunol.***, v. 145, n. 9, p. 3011-3016, 1990.
- 104- YEH, P.; LANDAIS, D.; LEMAITRE, M.; MAURY, I.; CREENE, J.-Y.; BECQUART, J.; MURRY-BRELIER, A.; BOUCHER, F.; MONTAY, G.; FLEER, R.; HIREL, P.-H.; MAYAUX, J.-F.; KLATZMANN, D. Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy: biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, v. 89, p. 1904-1908, 1992.