

BR7903052



**ESTUDO SOBRE OS PROCESSOS DE DANIFICAÇÃO  
E A ESTABILIDADE DE DUAS PREPARAÇÕES  
DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
HUMANO MARCADO COM <sup>125</sup>I**

**(HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO DO NATIONAL  
INSTITUTE OF HEALTH E DO INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA)**

**Maria Lucia Cavalcante Quartim Fonseca**

**DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 092  
IEA - DT - 092**

**OUTUBRO/1978**

**CONSELHO DELIBERATIVO**

**MEMBROS**

Klaus Reinach – Presidente  
Roberto D'Utra Vaz  
Helcio Modesto da Costa  
Ivano Humbert Marchesi  
Admar Cervellini

**PARTICIPANTES**

Regina Elisabete Azevedo Beretta  
Flávio Gori

**SUPERINTENDENTE**

Rômulo Ribeiro Pieroni

**ESTUDO SOBRE OS PROCESSOS DE DANIFICAÇÃO  
E A ESTABILIDADE DE DUAS PREPARAÇÕES  
DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
HUMANO MARCADO COM <sup>125</sup>I  
(HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO DO NATIONAL  
INSTITUTE OF HEALTH E DO INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA)**

**Maria Lucia Cavalcante Quartim Fonseca**

**Dissertação para obtenção do Título de "Mestre em  
Fisiologia" – Orientador Prof. Dr. Lício Marques  
de Assis. Apresentada e defendida em 02 de Agosto de 1978  
no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.**

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA  
SÃO PAULO – BRASIL**

**Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA**

**INIS Categories and Descriptors**

**C45**

**STH**

**Labelling**

**Iodine 125**

**Electrophoresis**

**Chromatography**

---

**Nota: A redação, ortografia e conceitos são de responsabilidade dos autores.**

## SUMÁRIO

	Página
I – INTRODUÇÃO .....	2
II – MATERIAL E MÉTODOS .....	6
1 – Padrões .....	6
2 – Material Biológico .....	7
3 – Reagentes e Soluções .....	7
3.1 – Soluções de Estoque para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....	7
3.2 – Soluções para Extração e Purificação do HCH .....	8
3.3 – Soluções para Iodação, Purificação do HCH <sup>o</sup> e Incubação .....	9
4 – Procedimento Experimental .....	11
4.1 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....	11
4.1.1 – Polimerização do Gel .....	11
4.1.2 – Eletroforese .....	11
4.1.3 – Fracionamento do Gel e Análise .....	13
4.2 – Extração e Purificação do HCH .....	13
4.2.1 – Extração .....	13
4.2.2 – Purificação por Cromatografia Ascendente em Sephadex G-100 .....	17
4.3 – Marcação do HCH com <sup>125</sup> I .....	17
4.3.1 – Técnica de Iodação .....	17
4.3.2 – Purificação por Cromatografia Descendente em Sephadex G-75 .....	17
4.3.3 – Cálculos .....	19
4.3.3.1 – Recuperação .....	19
4.3.3.2 – Rendimento da Marcação de Proteína .....	20
4.3.4 – Teste da Imunorreatividade do HCH <sup>o</sup> e Seleção das Condições Ótimas para o Ensaio .....	20
4.3.4.1 – Protocolo de Ensaio .....	20
4.3.4.2 – Separação das Frações Livre (F) e Ligada (B) .....	22
4.3.4.3 – Cálculos .....	22
4.4 – Técnica de Radioimunoensaio .....	28
4.4.1 – Curva Padrão .....	28
4.4.2 – Protocolo de Radioimunoensaio .....	28
4.4.3 – Cálculos .....	28
5 – Aparelhos .....	28

	Página
III – RESULTADOS .....	31
1 – Hormônio de Crescimento Humano do National Institute of Health Marcado com $^{125}\text{I}$ – $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) .....	31
1.1 – Purificação em Gel de Sephadex G-75 .....	31
1.2 – Estudo Eletroforético dos Picos Obtidos na Purificação .....	31
1.3 – Repurificação .....	37
1.4 – Estudo Sobre a Imunoreatividade do $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) e do HCH(WHO) não Mar- cado .....	37
2 – Hormônio de Crescimento Humano do Instituto de Energia Atômica Marcado com $^{125}\text{I}$ $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) .....	47
2.1 – Purificação em Gel de Sephadex G-75 .....	47
2.2 – Eletroforese dos Picos Obtidos na Purificação .....	47
2.3 – Imunoreatividade do $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) .....	47
2.4 – Comparação entre o $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) e o $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) .....	47
3 – Estudo dos Fatores que Interferem na Estabilidade do $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) .....	52
3.1 – Danificação da Marcação .....	52
3.2 – Danificação de Estocagem .....	61
3.2.1 – Estudo Comparativo entre as Diferentes Condições de Estocagem .....	61
3.2.2 – Estudo sobre o Danificado D3 .....	69
IV – DISCUSSÃO .....	69
1 – Hormônio de Crescimento Humano do national Institute of Health Marcado com $^{125}\text{I}$ – $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) .....	78
2 – Hormônio de Crescimento Humano do Instituto de Energia Atômica Marcado com $^{125}\text{I}$ – $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) .....	80
3 – Danificação da Marcação .....	81
4 – Danificação de Estocagem .....	83
V – CONCLUSÕES .....	86
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88

**ESTUDO SOBRE OS PROCESSOS DE DANIFICAÇÃO  
E A ESTABILIDADE DE DUAS PREPARAÇÕES  
DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
HUMANO MARCADO COM  $^{125}\text{I}$   
(HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO DO NATIONAL  
INSTITUTE OF HEALTH E DO INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA)**

Maria Lucia Cavalcante Quartim Fonseca

**RESUMO**

Estudaram-se duas preparações de hormônio de crescimento humano (HCH) marcado com  $^{125}\text{I}$ , visando a obtenção de produtos estáveis de alta atividade específica e adequada imunorreatividade. Com relação a esse critério consideraram-se não apenas as alterações do produto marcado, mas também as modificações que afetam o hormônio proteico não marcado, nas mesmas condições de estocagem.

Para esses estudos utilizaram-se principalmente duas técnicas: eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e cromatografia em gel de Sephadex. A técnica de EGPA foi adequadamente modificada para permitir a polimerização da amostra e a detecção qualitativa e quantitativa de compostos radioativos.

Inicialmente utilizou-se o HCH altamente purificado de acordo com o método de WILHELM, fornecido pelo National Institute of Health (NIH). Realizou-se uma investigação inicial sobre o comportamento deste hormônio na reação de marcação, purificação e em diferentes condições de estocagem, bem como sobre o tipo e a natureza dos vários componentes danificados originados durante estes processos.

A pequena quantidade e a limitação do número de remessas do HCH (NIH) motivaram a segunda parte do presente estudo, na qual utilizou-se o HCH que vinha sendo extraído e purificado pelo método de ROOS e caracterizado química e biologicamente no Instituto de Energia Atômica (IEA).

A grande quantidade disponível de HCH(IEA) sempre recentemente preparado, possibilitou a realização de um maior número de experimentos, permitindo, assim, um aprofundamento na análise dos problemas que se apresentaram nos estudos iniciais com o HCH(NIH) e conseqüentemente seu uso como matriz na manufatura de conjuntos diagnósticos de RIE.

A detecção, estudo da natureza e do comportamento dos danificados, ou seja dos compostos radioativos indesejáveis, e a eliminação de sua interferência constituíram o principal objetivo deste trabalho. Isto foi feito não somente testando a presença e o comportamento dos danificados sob condições diferentes de cromatografia e EGPA em diferentes tempos durante as etapas de marcação, purificação e estocagem como também comparando estes resultados aos obtidos em marcações falsas, nas quais todas as condições foram mantidas exceto a adição de hormônio. Assim foram conseguidas valiosas informações e resultados de alto significado prático. HCH(NIH) e HCH(IEA) foram ambos marcados com alta atividade específica fornecendo produtos que mantiveram a sua imunorreatividade por dois a três meses. A marcação radioativa não pode ser totalmente responsabilizada pela perda da capacidade de ligação que ocorre algumas vezes durante a estocagem visto que esse fenômeno é também observado na proteína não marcada.

Aprovada para publicação em Junho/1978.

O soro albumina bovina (SAB), usada como carregador proteico, mostra, na purificação e estocagem grande influência no aparecimento dos componentes danificados. A ausência de SAB leva a uma preponderante formação de hormônio agregado (pico Ia) ao passo que quando presente, ela carrega uma grande quantidade de radioatividade constituindo a maior parte do chamado pico do danificado que é eluído antes do hormônio marcado no Sephadex. A natureza e o controle desses dois picos são muito importantes, não apenas porque eles interferem negativamente no RIE, mas porque sua origem diferente pode afetar os cálculos de atividade específica, rendimento e massa absoluta do marcado. A melhor condição de estocagem é a  $-20^{\circ}\text{C}$  no estado liofilizado ou em solução congelada; nestas situações tende somente a ocorrer o processo de desiodação, não havendo formação de componentes indesejáveis. A estocagem em solução a  $4^{\circ}\text{C}$ , produz uma alteração rápida, provavelmente devida à clivagem proteolítica do hormônio marcado, que inativa este produto em poucos dias. Embora não estritamente relacionado com o objetivo deste trabalho, foram interessantes os achados sobre a mobilidade em EGPA das preparações estudadas. No que se refere às preparações frias o HCH(IEA) apresentou duas bandas mais rápidas que a banda principal do HCH(NIH), provavelmente, devida à desamidação ocorrida durante a extração. Ambos os produtos marcados, entretanto, mostraram uma mobilidade aumentada em relação aos não marcados, que pode ser atribuída a uma diminuição do ponto isoelétrico causada pela iodação da tirosina ou por alterações na estrutura molecular determinadas pelos reagentes utilizados na marcação. Apesar destas diferenças a imunoreatividade aparentemente manteve-se inalterada.

## I – INTRODUÇÃO

A importância da marcação de proteínas com radioisótopos deve-se ao fato da sua larga aplicação, tanto para estudos "in vivo", quanto "in vitro". Em medicina nuclear seu uso torna-se cada vez mais difundido graças à especificidade de localização de uma proteína marcada num órgão ou tecido.

Atualmente esses compostos marcados são largamente usados para dosagem de substâncias presentes em concentrações muito baixas, em misturas não fracionadas. A base fundamental desta metodologia está na combinação na especificidade característica de reagentes biológicos tais como anticorpos, proteínas ligadoras naturais, receptores de membrana celular<sup>(33,52)</sup> com a técnica de marcação molecular, ambas permitindo a monitoração precisa do comportamento de um número muito pequeno de moléculas<sup>(13)</sup>. Pode-se referir a esse grupo de técnicas analíticas como métodos que utilizam reagentes "marcados", dos quais o RIE é o exemplo mais conhecido e nesta aplicação é baseado o presente estudo. Graças à sua enorme sensibilidade, o RIE permite dosagem a nível de picogramas de modo simples, rápido e preciso, desde que se disponha do antígeno marcado puro tal que possa competir pelos sítios de ligação do anticorpo, com o antígeno a ser dosado. Muitos estudos clínicos e fisiológicos têm sido realizados com o uso desta técnica, de grande valia, principalmente no campo da pesquisa endocrinológica, que até então não contava com métodos de dosagem adequados para a detecção dos vários hormônios proteicos e suas alterações em resposta a vários estímulos.

Mais recentemente foram mencionados métodos de marcação não isotópicos baseados em marcadores com propriedades magnéticas (spin labeling) ou usando enzimas acopladas ao hormônio que, em um sistema adequado, agem como amplificadoras de um efeito, caso do método ELISA, ou através de marcadores fluorescentes, bacteriófagos e outros<sup>(13)</sup>. Essas técnicas podem ser adequadas em casos particulares mas, de modo geral, pode-se dizer que nenhuma delas oferece ainda, junto com uma boa sensibilidade, fácil preparação e análise, como os radioisótopos. A principal vantagem destas técnicas não isotópicas é a maior durabilidade nas condições usuais de estocagem, porém, é preciso considerar os efeitos não específicos provenientes da interferência do meio de incubação, o que não ocorre com os radioisótopos, cuja medida não é afetada pela composição química do meio que, geralmente, não contém radiação de fundo.

A preparação do substrato radioativo para os sistemas de RIE envolve a seleção do radionuclídeo, a sua incorporação no composto, a purificação e avaliação de sua utilidade no sistema de ensaio<sup>(17)</sup>.



Para justificar o uso de radioiodo na marcação de proteínas e não  $^{14}\text{C}$  ou trício com meia vida muito maior, basta lembrar que seriam necessários 263 átomos de  $^{14}\text{C}$  ou 600 de trício para se ter a mesma radioatividade oferecida por um único átomo de iodo<sup>(28)</sup>. É importante lembrar que para o RIE é necessária uma alta atividade específica, o que não ocorre em estudos cinéticos usando traçadores biológicos, onde o uso do  $^{14}\text{C}$  ou trício pode ser mais adequado.

A introdução de iodo radioativo em uma molécula proteica pode ser feita de várias maneiras e embora em algumas condições, o iodo possa reagir com grupos sulfidrilícos, histidina ou triptófano, a química da radioiodação é a química da substituição do iodo nos grupos tirosílicos<sup>(29)</sup>. O método escolhido para a iodação do hormônio de crescimento humano, que contém 8 tirosinas (Figura 1), foi o desenvolvido por GREENWOOD e cols.<sup>(19,29)</sup> com bases químicas, usando a cloramina T como agente oxidante para a introdução do iodo na proteína. Existem outros métodos, como o monocloreto de iodo<sup>(26)</sup> disponível através de uma técnica introduzida por SAMOLS e WILLIAMS<sup>(46)</sup>, o método eletrolítico de ROSA e cols.<sup>(4,3)</sup>, a iodação enzimática com lactoperoxidase<sup>(51,20)</sup> e, desenvolvidos mais recentemente, a difusão gasosa do oxidante<sup>(27)</sup> e a marcação por conjugação com éster iodado<sup>(7)</sup>. De modo geral, pode-se dizer que esses métodos oferecem, sobre o método original da cloramina T, a vantagem de serem mais suaves, causando menos danificação à proteína. Este último, porém, apresenta vantagens indiscutíveis pela sua alta eficiência de iodação, o que permite a obtenção de um produto de alta atividade específica. Esta vantagem é suficiente para torná-lo favorito não somente nos laboratórios comerciais, mas também pela maioria dos pesquisadores<sup>(51)</sup>.

A cloramina T, quando adicionada em solução aquosa, em pH levemente alcalino (7,4), contendo proteína e iodeto radioativo, promove a incorporação do iodo na proteína, por um mecanismo ainda não bem estabelecido, mas que, provavelmente, envolve a formação de iodo catiônico. O metabissulfito de sódio é usado para deter a reação, reduzindo o excesso de cloramina T, transformando  $\text{I}_2$  em  $\text{I}^-$  e limitando a danificação química<sup>(17)</sup>. Isto ocorre somente em concentração baixa dos reagentes, o que é conveniente para minimizar um possível dano à proteína em questão<sup>(28)</sup>. Porém, a utilidade desses compostos marcados está na dependência de vários fatores, tais como alto grau de pureza, boa imunorreatividade e estabilidade<sup>(18)</sup>.

O método da cloramina T pode ser usado, indiferentemente, para introduzir  $^{131}\text{I}$  (Energia 364 Kev) ou  $^{125}\text{I}$  (Energia 35 Kev). O  $^{131}\text{I}$  tem apenas 8 dias de meia-vida, o que torna seu uso limitado no tempo, comparado com os 60 dias de meia vida do  $^{125}\text{I}$ . Além disso, o  $^{131}\text{I}$  raramente é obtido com abundância isotópica superior a 30%, enquanto o  $^{125}\text{I}$  pode ser considerado praticamente livre de carregador, com abundância isotópica acima de 90%. A eficiência de contagem, em contador gama (NaI) tipo poço, é proporcional à abundância de fótons e é função inversa da energia da radiação emitida, sendo, portanto, maior para o  $^{125}\text{I}$  que para o  $^{131}\text{I}$ . Estes fatos tornam o  $^{125}\text{I}$  o isótopo de escolha na maioria dos laboratórios, fornecendo produtos, teoricamente utilizáveis por 3 a 4 meses sem desvantagens na sensibilidade, comparados aos produtos marcados com  $^{131}\text{I}$ .

A iodação de hormônios proteicos deveria ser restrita a um átomo de iodo por molécula, pois, muitos estudos mostraram os efeitos deletérios da iodação a altos níveis. A atividade específica calculada para o HCH<sup>2</sup>, considerando a substituição de um átomo por molécula é de aproximadamente 100  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  para o  $^{125}\text{I}$  e 150  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  para o  $^{131}\text{I}$  (com 20% de abundância isotópica)<sup>(14)</sup>. A menor, porém, adequada atividade específica apresentada pela marcação com  $^{125}\text{I}$  se constitui em uma vantagem adicional, tendo em vista a redução dos riscos de danificação actínica. Mas o produto marcado, raramente, pode ser usado por mais de um mês, mesmo que a radioatividade ainda presente esteja adequada para sua detecção pois parece que sua imunorreatividade diminui com o tempo<sup>(30)</sup> e é este aspecto que constitui um dos propósitos principais do presente trabalho. De fato, é sabido que o produto marcado estocado, seja qual for a condição, inicia um processo de danificação que impede seu uso em RIE. A literatura é bem vasta, com referência aos vários "danificados" e talvez essa definição nem sempre seja adequada e justificada, especialmente porque ela engloba vários fenômenos diferentes, que, provavelmente, tem um único ponto em comum: a produção de compostos radioativos indesejáveis.

YALOW e cols.<sup>(64,66,67,68,69,80,81)</sup>, BERSON e cols.<sup>(6)</sup>, GLICK e cols.<sup>(16)</sup> e ROTH e cols.<sup>(44)</sup>, um dos grupos pioneiros do RIE, se referam extensivamente a dois tipos de danificação: e de

ESTRUTURA DO HCH SEGUNDO LI E COLS.<sup>(34)</sup>

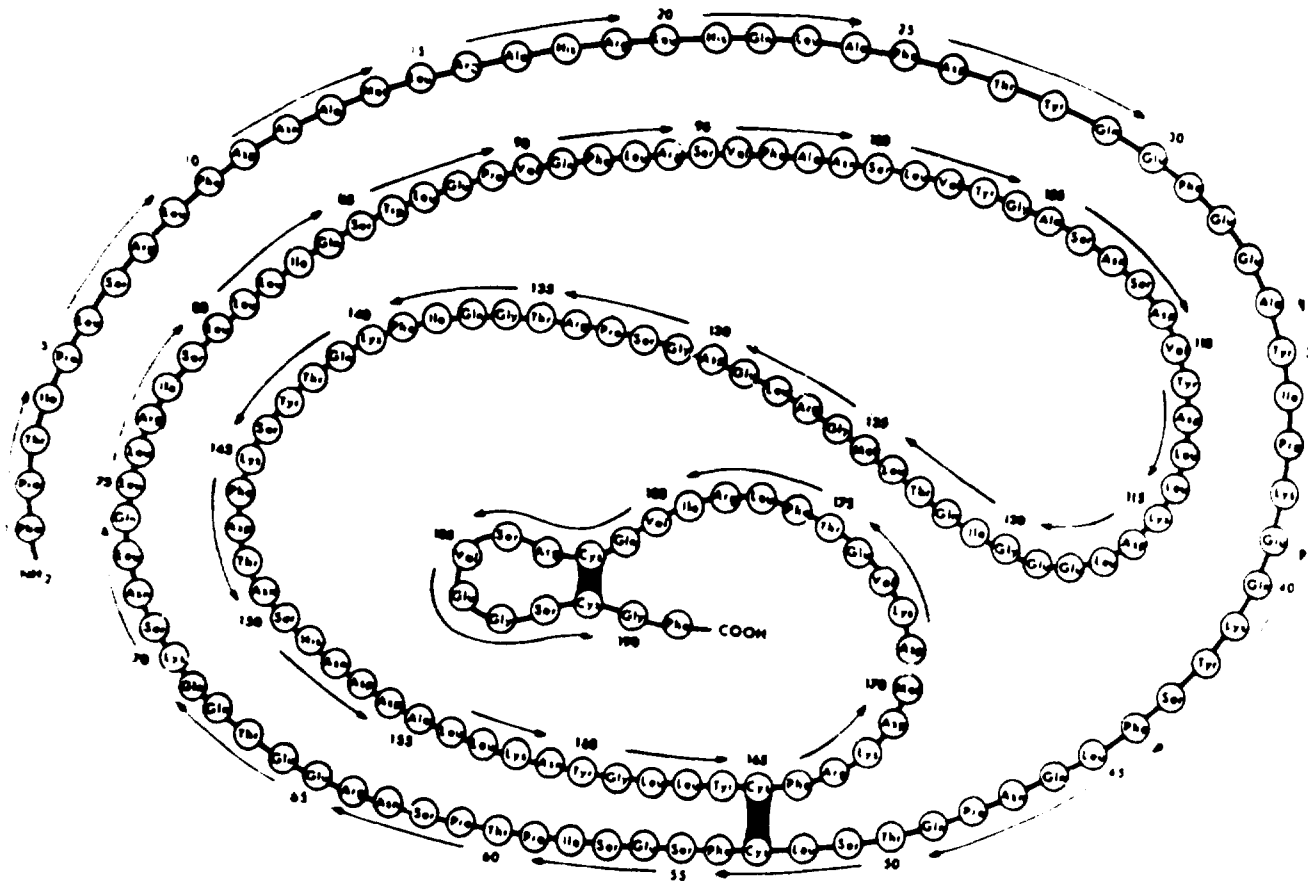


Figura 1 - O HCH contém Tirosinas cujas posições estão assinaladas pelas setas

iodação e a de incubação. Eles consideram o primeiro tipo como sendo consequência de três fatores possíveis: danos de irradiação, super iodação e oxidação da proteína pela cloramina T. O segundo tipo parece estar mais relacionado com uma ação proteolítica. Em ambos os casos, o resultado seria a produção de fragmentos danificados, que poderiam ser carregados por proteínas séricas, podendo também ocorrer uma alteração latente que possa talvez manter a estrutura primária da proteína, mas diminuir ou eliminar completamente a sua imunoreatividade.

O grupo de HUNTER<sup>(27,25,28,26)</sup> concentrou mais sua atenção na danificação de iodação e suas prováveis causas, que ele relacionou com a manipulação de proteínas em soluções extremamente diluídas sem uso de carregador, com a substituição de um átomo de iodo que tem o mesmo tamanho que o anel da tirosina na molécula, com a danificação química causada pelos reagentes concentrados em soluções de alta radioatividade e com a ação de substâncias nocivas presentes nos reagentes como contaminantes indesejáveis. A limitada durabilidade de certas preparações pode depender de uma forma latente de danificado, originada durante a reação de iodação. Ele também menciona a existência de danificação de incubação devido a enzimas presentes no soro e um outro tipo de danificado por associação (provavelmente agregado) que tem maior tendência de se adsorver ao vidro e ao gel de Sephadex durante a purificação<sup>(24)</sup>. A presença de agregados como produto ou derivado de algum processo de danificação é mencionada por muitos outros autores. NORMAN e TURTER<sup>(38)</sup> também se referem à liberação de aminoácidos marcados e iodeto indicando uma rápida fragmentação do produto estocado (danificação de incubação); HAMPSHIRE e cols.<sup>(20)</sup> identificaram esses componentes de maior peso molecular no hormônio de crescimento canino marcado; BIELER e cols.<sup>(6)</sup> referem-se à formação de agregado "in vitro" e sugerem que esta possa ocorrer também "in vivo"; SCHWARTZ e BATT<sup>(47)</sup> separaram por filtração em gel um agregado, produto de congelamentos e descongelamentos repetidos. Praticamente todos estes autores evidenciam agregado em produtos estocados na presença ou na ausência de pequenas concentrações de soro albumina. Isso levou a investigar melhor a influência deste carregador proteico nas várias etapas que envolvem o material marcado.

Entretanto, para outros autores<sup>(32,60,51)</sup>, o principal responsável pela agregação neste tipo de marcação é a cloramina T, que pode alterar a identidade química do resíduo do aminoácido terminal, podendo mesmo quebrar pontes internas da molécula antes de ser inativada. O fato de o metabissulfito de sódio não ter efeito no grau de agregação, mesmo quando usado em grande excesso, sugere que a cloramina T é responsável pela alteração do peso molecular da proteína<sup>(31)</sup>. CERASI e cols.<sup>(9)</sup> consideraram o danificado como sendo principalmente o <sup>131</sup>I-HCH ligado à albumina e KERET e cols.<sup>(30)</sup> explicaram a imunoreatividade diminuída do hormônio, pela sua decomposição em fragmentos e pela liberação de iodo.

Com base nestes aspectos, o presente trabalho foi desenvolvido, inicialmente estudando a reação de iodação e as condições ideais para melhorar a sua tão famosa "pobre reprodutibilidade", usando padrão altamente purificado de HCH fornecido pelo NIH.

Quanto ao método de purificação a escolha recaiu sobre a cromatografia em gel de Sephadex G-75<sup>(60,30,21,9)</sup> que pareceu a melhor maneira de separação. Os picos assim obtidos foram analisados por discoeletroforese em gel de poliácridamida, técnica que permite a separação de moléculas de acordo com suas dimensões, forma e carga<sup>(37)</sup>. Embora a eletroforese seja um dos métodos mais eficientes de separação dos componentes iônicos de uma mistura, o poder de resolução dos vários métodos eletroforéticos é bem variável. A discoeletroforese tem a vantagem de se poder ajustar o tamanho dos poros de um gel sintético, usando várias concentrações de acrilamida (efeito de peneira molecular) e de produzir bandas da ordem de 10 micrômetros de espessura a partir de bandas iniciais com a espessura de ordem de centímetros. Pode-se alcançar dessa forma uma maior resolução em corridas bem rápidas permitindo o uso de amostras bem diluídas<sup>(41,60)</sup>. Em contraste ao gel de amido, o gel de poliácridamida é termoestável e transparente, relativamente inerte do ponto de vista químico e com poros de dimensão variável.

A eletroforese em gel de poliácridamida, definida como um sistema físico ideal para a separação de proteínas, foi mencionada por HUNTER<sup>(28)</sup> em estudos sobre o hormônio folículo-estimulante,

usando gel a 5%, embora não aplicada diretamente à técnica do RIE. CHALKLEY e TANNER<sup>(10)</sup> aplicaram um sistema similar para a determinação de anticorpos no plasma, sem incubação prévia, promovendo a reação antígeno-anticorpo entre duas camadas de gel separadas. Recentemente este procedimento foi utilizado para a separação das frações livre e ligada no RIE de HCH<sup>(3)</sup> em substituição a outras técnicas tais como: eletroforese em papel ou celulose, cromatoeletroforese<sup>(28,57)</sup>, precipitação por adsorção em carvão<sup>(40,53)</sup>, separação por filtração em gel de Sephadex G-50 ou G-75<sup>(28,15)</sup>, precipitação por acetato de amônio<sup>(45)</sup> ou polietilenoglicol (PEG)<sup>(47)</sup> que não deram resultados tão satisfatórios, provavelmente devido a uma separação incompleta das frações livre e ligada e a fenômenos de adsorção ou interferência do danificado seja na fração livre ou na ligada.

Na eletroforese em gel de poliacrilamida a fração ligada sendo pouco maior que a gama globulina migra menos devido ao seu grande peso molecular. Muitas proteínas movem-se mais rapidamente no gel que a gama globulina e desta forma, podem ser facilmente separadas. O iodo, sendo mais leve e mais negativo, migra mais rapidamente, bem como alguns componentes degradados de menor peso molecular.

Numa segunda etapa, programou-se este estudo com o hormônio de crescimento humano extraído e purificado nos laboratórios do IEA (SOMATORMON), a fim de ser avaliada a viabilidade de seu uso como padrão para marcação e respectiva imunorreatividade, o que em caso positivo seria altamente proveitoso, dada a grande disponibilidade deste material recém-preparado.

Nesta programação procurou-se estudar o comportamento do hormônio de crescimento humano preparado no IEA sob várias condições durante a purificação com ou sem carregador, incluindo até as chamadas "marcações falsas", isto é, simulacro de marcação na ausência de hormônio. Desta forma estudaram-se as melhores condições de estocagem do produto purificado, para torná-lo utilizável o maior tempo possível. O material presente no tubo central do pico do hormônio mercado foi fracionado, sendo parte liofilizada, parte congelada e mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  e parte mantida a  $4^{\circ}\text{C}$ . Também se estudou o efeito de congelamentos e descongelamentos múltiplos e o comportamento do liofilizado após ser dissolvido e mantido a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## II – MATERIAL E MÉTODOS

### 1) Padrões

#### HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO

a) NIH-GH-HS 2002 F

NIH-GH-HS 2160 E

Gentilmente fornecidos pelo Dr. A. E. Wilhelm, da Emory University (Atlanta – Georgia).

b) HGH 1<sup>st</sup> IRP 66/217

da World Health Organization (WHO).

c) HGH-KABI – (CRESCORMON)

Ampolas com 4 U.I.

KABI Laboratories – Stockolm – Fornecido pela Astra Química do Brasil

Os padrões foram estocados a  $20^{\circ}\text{C}$ .

## 2 – Material Biológico

- a) Hipófises humanas obtidas do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade de São Paulo e do Instituto Médico Legal.
- b) Soro de cobaia
- c) Anti-soro de cobaia anti-hormônio de crescimento humano distribuído pelo NIH. Diluído 1:2 000.

Todo material biológico foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 3 – Reagentes e Soluções

### 3.1 – Soluções de estoque para eletroforeses em gel de poliacrilamida.

#### Solução A

TRIS-Hidroxi-metil-amino-metano ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) Merck .....	36,60 g
N,N,N',N'-Tetrametil-etileno-diamina TEMED ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2$ ) Merck .....	0,23 ml
HCl – 1N .....	48,00 ml
água destilada .....	q.s.p. 100 ml
pH 6,9	

#### Solução B

TRIS-Hidroxi-metil-amino-metano .....	5,98 g
TEMED .....	0,46 ml
HCl – 1N .....	48,00 ml
água destilada .....	q.s.p. 100 ml
pH 6,7	

#### Solução C

Acrilamida $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ (Bio-Rad Laboratories) .....	28,00 g
N,N'-metileno-bisacrilamida BIS ( $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ ) Bio-Rad .....	0,735 g
água destilada .....	q.s.p. 100 ml

#### Solução E

Riboflavina (Roche) .....	4,00 mg
água destilada .....	q.s.p. 100 ml

#### Solução F

Secarose (J.T. Baker) .....	40,00 g
água destilada .....	q.s.p. 100 ml

8

**Solução G**

Riboflavina . . . . .	0,20 mg
Sacarose . . . . .	8,00 g
Solução B . . . . .	5,00 ml
água destilada . . . . . q.s.p.	10 ml

**Solução H**

Acrilamida . . . . .	500,00 mg
BIS . . . . .	125,00 mg
água destilada . . . . . q.s.p.	1,0 ml

**Corante**

Azul de Bromofenol (Merck) – 0,1% . . . . .	10,00 mg
água destilada . . . . . q.s.p.	10 ml

**Solução Tampão estoque – TRIS-GLICINA**

TRIS-Hidroxi-metil-amino-metano . . . . .	6,00 g
Glicina – (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> ) Merck . . . . .	28,80 g
água destilada . . . . . q.s.p.	1000 ml
pH 8,3	

**Solução estoque para fixação**

Ácido tricloroacético TCA (Berzog) . . . . .	50,00 g
água destilada . . . . . q.s.p.	100 ml

**Solução para coloração**

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) . . . . .	0,50 g
água destilada . . . . . q.s.p.	25 ml

**Solução para decoloração**

Ácido acético glacial (Baker) . . . . .	70,00 ml
água destilada . . . . . q.s.p.	100 ml

**3.2 – Soluções para Extração e Purificação do HCM**

**Tampão fosfato de Sódio 0,03M – pH 6,2**

**Solução A**

Fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) . . . . .	13,80 g
água destilada . . . . . q.s.p.	500 ml

**Solução B**

Fosfato de sódio bibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) . . . . .	7,16 g
água destilada . . . . . q.s.p.	100 ml

**Tampão**

Solução A . . . . .	244,50 ml
Solução B . . . . .	55,50 ml
água destilada . . . . . q.s.p.	2000 ml

**Tampão fosfato de potássio 0,1M – pH 6,6 – NaCl 0,5M****Solução A**

Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) . . . . .	95,26 g
água destilada . . . . . q.s.p.	3500 ml

**Solução B**

Fosfato de potássio bibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) . . . . .	69,67 g
água destilada . . . . . q.s.p.	2000 ml

**Tampão**

Solução A . . . . .	2812,5 ml
Solução B . . . . .	1687,5 ml
NaCl . . . . .	262,98 g
$\text{NaN}_3$ (Merck) . . . . .	1,80 g
água destilada . . . . . q.s.p.	9000 ml

**Solução saturada de sulfato de amônio**

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . . . . .	796,50 g
água destilada a 4°C . . . . . q.s.p.	1500 ml

**3.3 – Soluções para Iodação, Purificação do HCH<sup>®</sup> e Incubação****Tampão fosfato de sódio – 0,5M – pH 7,4**

Fosfato de sódio monobásico . . . . .	0,4486 g
Fosfato de sódio bibásico . . . . .	7,8983 g
água destilada . . . . . q.s.p.	50 ml

**Tampão fosfato de sódio – 0,05M – pH 7,4**

Diluição do tampão anterior 1:10

**Tampão veronal – 0,1M – pH 8,6 – estoque**

Ácido dietil barbitúrico ( $C_8H_{12}N_2O_3$ ) . . . . .	3,768 g
Barbital sódico ( $C_6H_{11}N_2NaO_3$ ) . . . . .	16,400 g
água destilada . . . . .	q.s.p. 1000 ml

**Tampão veronal – 0,025M – pH 8,6 – 0,25% SAB – 1% soro de cobaie**

Tampão veronal – 0,1M – estoque . . . . .	250,00 ml
Soro albumina bovina Fração V – SAB (Sigma) . . . . .	2,50 g

Soro de Cobaia . . . . .	10,00 ml
água destilada . . . . .	q.s.p. 1000 ml

**Tampão veronal – 0,025M – pH 8,6 – 1% SAB**

Tampão veronal – 0,1M – estoque . . . . .	250,00 ml
SAB . . . . .	10,00 g
água destilada . . . . .	q.s.p. 1000 ml

**Cloramina T**

Cloramina T ( $C_7H_7ClNNaO_2S.3H_2O$ ) – Merck . . . . .	5,0 mg
Tampão fosfato de sódio – 0,05M – pH 7,4 . . . . .	1,0 ml

**Metabissulfito de sódio**

Metabissulfito de sódio ( $Na_2S_2O_5$ ) – Carlo Erba . . . . .	10,0 mg
Tampão fosfato de sódio – 0,05M – pH 7,4 . . . . .	1,0 ml

**Iodeto de potássio**

KI – (Carlo Erba) . . . . .	10,0 mg
Tampão fosfato de sódio – 0,05M – pH 7,4 . . . . .	1,0 ml

**HCH para iodação – Solução 1 mg/ml**

Hormônio liofilizado, dissolvido em tampão de fosfato de sódio – 0,05M – pH 7,4 no dia da iodação.	
Azul dextran (Pharmacia) . . . . .	1,0 mg
Tampão veronal – 0,025M – pH 8,6 – 1% SAB . . . . .	1,0 ml



#### 4 – Procedimento Experimental

##### 4.1 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Usou-se o método de DAVIS<sup>(12)</sup> e CRNSTEIN<sup>(39)</sup> modificado segundo BARTOLINI e cols.<sup>(3)</sup>.

##### 4.1.1 – Polimerização do Gel

Cilindros de vidro (11 cm x 0,72 cm) abertos nas duas extremidades com 0,5 cm de diâmetro interno são vedados em uma das extremidades com "parafilm".

O gel de separação é preparado em tubo de ensaio, seguindo as seguintes proporções das soluções de estoque, resultando em uma concentração final de 7% em acrilamida com tamanho de poro de aproximadamente 50 Å<sup>(39)</sup>:



Agita-se o coloca-se a solução nos cilindros com pipeta Pasteur, delicadamente, para evitar a formação de bolhas de ar. É conveniente colocar, previamente, a solução em sistema de vácuo, para eliminar as bolhas. Ajusta-se a solução a uma altura de 9,3 cm e com o auxílio de uma pipeta Pasteur, de ponta curva e muito fina; colocam-se sobre a solução cerca de 100 µl de água destilada, sem formar turbilhão, para evitar a formação de menisco no gel, o que acarretaria bandas de separação irregulares.

A estante contendo tubos é colocada a 7 cm da fonte de luz fria, por 30 minutos, para a polimerização do primeiro gel (Figura 2). Retira-se a água, secando com papel absorvente.

Para a polimerização do gel da amostra, os reagentes são introduzidos com micropipetas de vidro, na seguinte ordem:

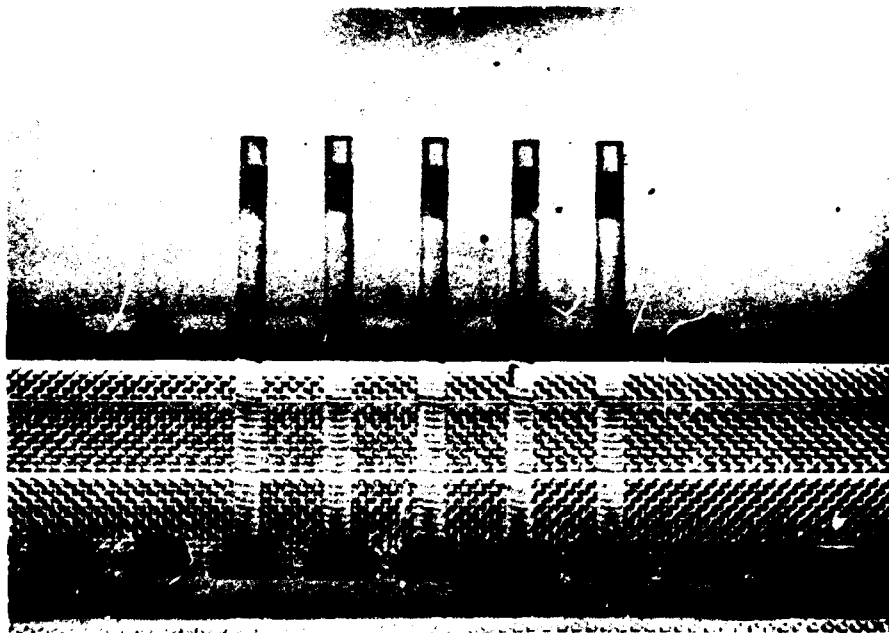
– Solução G .....	75 µl
– Soro de coelhos .....	5 µl
– Azul de bromofenol .....	5 µl
– Amostra .....	200 µl
– Solução H .....	15 µl
Total .....	300 µl

Quando o volume da amostra é menor que 200 µl, completa-se com tampão veronal – 0,025 M – pH 8,6 – 0,25% SAB – 1% soro de coelhos.

Colocam-se novamente, 100 µl de água destilada e, são necessários 30 minutos, nas mesmas condições descritas, para a polimerização do segundo gel que tem uma concentração final de 2% em acrilamida. Retira-se a água, coloca-se "parafilm" na extremidade superior e faz-se a contagem prévia da quantidade de <sup>125</sup>I de cada amostra colocada no gel, antes da eletroforese, analisando no Contador Gama, com o gel colocado invertido no tubo de contagem.

Em alguns casos não há necessidade da polimerização da amostra, que é aplicada diretamente sobre o primeiro gel, é qual adicionam-se 5 µl de bromofenol 0,1% e 20 µl de solução F.

##### 4.1.2 – Eletroforese

**SISTEMA DE POLIMERIZAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA**

**Figura 2 – Estante com os Tubos Contendo o Gel de Separação já Polimerizado e as Soluções, do Gel de Amostra (parte superior), e Serem Submetidas à Polimerização pela Ação da Luz Fluorescente Colocada Atrás da Estante a uma distância de 7 cm.**

Retiram-se os "parafilms" e a eletroforese é feita usando-se "Gel Electrophoresis Cell" (Figura 3) com tampão tris-glicina diluído 1:10 a 2 mA por gel.

A voltagem nunca deve exceder 200 V, pois há indicações que diferenças de potência altas podem interferir com a estabilidade da amostra.

A eletroforese é interrompida quando a banda do azul de bromofenol usado como traçador se encontra a cerca de 2 cm de extremidade inferior.

#### 4.1.3 – Fracionamento do Gel e Análise

O gel é retirado do cilindro de vidro com auxílio de injeção contínua de água destilada usando seringa plástica e agulha longa e fina. Corta-se com bisturi o gel da amostra (primeiro segmento) e o gel de separação é fracionado em segmentos de 0,7 cm com o "Electrophoresis Gel Slicer" (Figura 4). Ao cortar o gel, deve-se ter o cuidado de seccionar no meio a banda do traçador. Assim, a banda de albumina fica toda em um segmento, ou parte em cada segmento, padronizando-se então uma maneira de cortar o gel, para que os resultados possam ser comparados. Estas posições são assinaladas nos gráficos e são parâmetros importantes para análise dos resultados.

Para evitar problemas de contaminação, os segmentos são envolvidos em pedaços descartáveis de papel alumínio, e são analisados no contador gama por 10 minutos. A eletroforese deve ser feita no mesmo dia em que o gel é polimerizado.

Em alguns casos, o gel não é fracionado, sendo colocado em um tubo de ensaio (15 cm x 1,5 cm), marcando-se com bisturi a posição do traçador. Adicionam-se 15 ml de TCA a 12,5% (a partir da solução estoque diluída 1:4) para a fixação e, após 30 minutos, cora-se com 0,4 ml de Coomassie brilliant blue a 2%. No dia seguinte, decora-se com ácido acético a 7%, trocando duas vezes ao dia, durante três dias.

Calcula-se a taxa de migração (R<sub>m</sub>) para cada banda, dividindo-se a sua distância em milímetros, a partir da origem, pela distância de migração do traçador, marcada com o corte feito no gel antes da fixação.

#### 4.2 – Extração e Purificação do HCH

O método de ROOS e cols.<sup>(42)</sup> usado para extração e purificação do hormônio de crescimento humano a partir de hipófises congeladas, foi escolhido por ser mais simples, possibilitar maior rendimento e melhor purificação e também devido ao baixo nível de antigenicidade produzido por esse extrato no tratamento do nanismo hipofisário<sup>(23)</sup>.

##### 4.2.1 – Extração

Duzentas e quarenta hipófises humanas, coletadas por necrópsia no Instituto Médico Legal de São Paulo, foram limpas e mantidas congeladas totalizando 100 gramas.

O material é descongelado, homogeneizado no "Virtis Homogenizer" por dois minutos com água destilada a 4°C, na proporção de 3 ml de água por grama de glândula. Agita-se continuamente por duas horas (agitador mecânico) e centrifuga-se a 16 000 g por 10 minutos.

Decanta-se o sobrenadante (1A).

Faz-se nova extração do resíduo usando tampão fosfato de sódio - 0,03M - pH 6,2 na proporção de 5 ml por grama de glândula. Agita-se e centrifuga-se nas mesmas condições. Junta-se o

CUBA PARA ELETROFORESE



Figure 3

SISTEMA MANUAL DE SEGMENTAÇÃO DO GEL

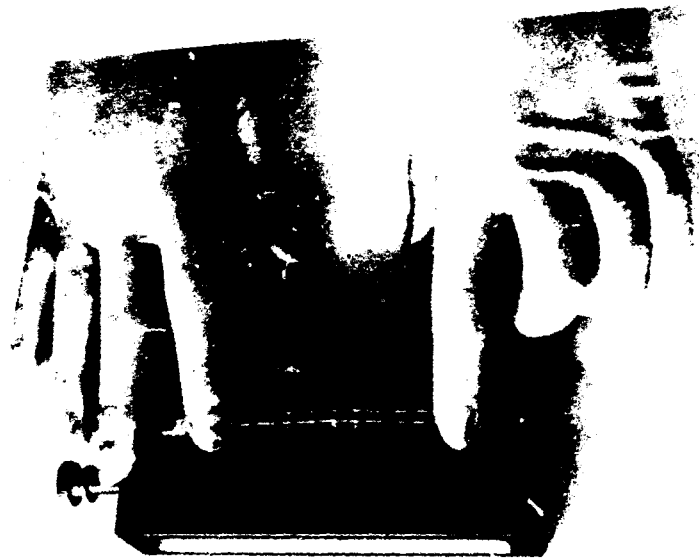


Figura 4

sobrenadante obtido (2A) ao anterior. Lava-se o resíduo com 1/4 do volume anterior do mesmo tampão; agita-se e centrifuga-se, guardando o sobrenadante junto com os demais (3A). Repete-se a mesma operação usando a metade do volume anterior, agitando-se e centrifugando, resultando o sobrenadante 4A.

Todas as etapas são realizadas a 4°C.

O sobrenadante total A é filtrado em lã de vidro para remoção de gorduras e adiciona-se NaOH - 0,1 N até se obter pH 7,0. Mede-se o volume total obtido e adiciona-se lentamente, através de duas bombas peristálticas LKB, com agitação contínua, igual volume de solução saturada de sulfato de amônio, preparada também a 4°C. Após a adição do sulfato de amônio continua-se a agitação por mais uma hora, com a formação de um precipitado denso.

Centrifuga-se a 10 000 rpm, por 10 minutos. Dissolve-se o precipitado em 200 ml de tampão fosfato de sódio 0,03M - pH 6,2 e dialisa-se contra água destilada a 4°C, por 48 horas, num recipiente de vidro de 38 litros com agitação magnética contínua, usando-se saco de diálise "Visking". O material resultante, que é então liofilizado, contém as proteínas hormonais e não hormonais extraídas das glândulas.

O hormônio de crescimento existente no liofilizado foi extraído com tampão fosfato de potássio 0,1M - pH 6,6 contendo NaCl - 0,5M diluído 1:5. Foram feitas quatro extrações, respectivamente com 50, 30, 20 e 15 ml do referido tampão, cada qual mantida duas horas em agitação e centrifugada a 10 000 rpm por 10 minutos, resultando os sobrenadantes 1B, 2B, 3B e 4B.

O sobrenadante total B foi concentrado por ultrafiltração em membrana "Diaflo PM-10" (Amicon) até se obter um volume final de 36 ml.

A dosagem das proteínas dos sobrenadantes, realizada pelo método de LOWRY e cols.<sup>(35)</sup>, pode ser vista na Tabela I.

Tabela I

Dosagem de Proteínas nos Sobrenadantes Obtidos Durante as Extrações de HCM

Sobrenadante	Volume (ml)	Proteína (g)
1A	310	10,538
2A	505	2,247
3A	120	0,302
4A	70	0,214
1B	34	2,830
2B	20	0,450
3B	12	0,377
4B	17	0,538

#### 4.2.2 – Purificação por Cromatografia Ascendente em Sephadex G-100

O concentrado obtido na etapa anterior, contendo 2,621 g de proteína é aplicado a uma coluna de 5 cm x 90 cm (Pharmacia), com paredes duplas que permitem refrigeração pela circulação de água a 4°C. O gel de Sephadex G-100 foi previamente entumescido com tampão fosfato de potássio 0,1M – pH 6,6, durante 24 horas. Foram feitas quatro trocas, com aspiração das partículas finas dos sobrenadantes, usando-se uma bomba de vácuo. O gel foi então mantido a 70°C, em banho-maria, sob agitação, em kitassato acoplado à bomba de vácuo para eliminar as bolhas, por duas horas. A seguir, realizou-se o empacotamento da coluna. A eluição é feita com o mesmo tampão num fluxo de 43 ml/hora e são colhidas frações de 15 ml<sup>(1,22)</sup>. O eluído passa por um sistema ultravioleta, LKB "Uvicord" 8 300 II acoplado ao coletor automático LKB, no comprimento de onda de 280 mμ, para detecção dos compostos proteicos. As frações colhidas são analisadas paralelamente no espectrofotômetro Zeiss, no mesmo comprimento de onda. Separam-se, essencialmente, quatro picos (Figura 5). As atividades radioimunológica e biológica do hormônio de crescimento são encontradas principalmente no Pico 3.

Para uso clínico faz-se um "pool" desse pico que, após diálise é liofilizado em condições estéreis. A fração central do Pico 3, liofilizada à parte e equivalente a, aproximadamente, 50 mg de po ativo, deve corresponder à forma monomérica mais pura do HCH, podendo servir para marcação com isótopos e como possível padrão para radioimunoensaio.

#### 4.3 – Marcação do HCH com <sup>125</sup>I

##### 4.3.1 – Técnica de Iodação

A iodação foi efetuada em tubo de ensaio de fundo cônico, de 70 mm x 10 mm, baseado no método de GREENWOOD e cols.<sup>(19,29)</sup>. Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem e quantidade, utilizando micropipetas descartáveis "Clay Adams", sob agitação moderada e contínua, com o uso de microimã:

– Tampão fosfato de sódio – 0,5M – pH 7,4. . . . .	40 μl
– Na <sup>125</sup> I (aproximadamente 1 mCi) . . . . .	1 a 3 μl
– HCH (5 μg) . . . . .	5 μl
– Cloramina T (50 μg) . . . . .	10 μl
– Metabissulfito de sódio (200 μg). . . . .	20 μl
– KI (2 000 μg) . . . . .	200 μl

A quantidade de iodo radioativo variou de acordo com a atividade específica de cada partida. O intervalo entre a adição dos reagentes foi de poucos segundos, tempo suficiente para as pipetagens. A mistura foi agitada no "Vortex" e imediatamente aplicada a uma coluna de Sephadex G-75, com uso de pipeta "Oxford" para a purificação. O tubo de marcação foi lavado com a solução de azul dextran. Antes, porém, foram retirados com micropipeta "Clay Adams" (micropipeta 1) 10 μl da mistura e adicionados a 990 μl de tampão veronal 0,025M – pH 8,6 – 1% SAB (solução 1). A solução 1 foi agitada no "Vortex", sendo retirados 10 μl com uma micropipeta de vidro (micropipeta 2) e adicionados a 200 μl do tampão veronal 0,025M – pH 8,6 – 1% SAB (solução 2).

##### 4.3.2 – Purificação por Cromatografia Descendente em Sephadex G-75

Baseando-se no trabalho de CERASI e cols.<sup>(9)</sup>, a purificação foi efetuada em coluna de vidro com dimensões de 48 cm x 2 cm, feita nas oficinas do I.E.A. A fim de melhorar a eficiência de separação, aumentou-se 13 cm no comprimento da coluna descrito no trabalho citado (35 cm).

CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100 DO  
EXTRATO DE HIPÓFISES HUMANAS

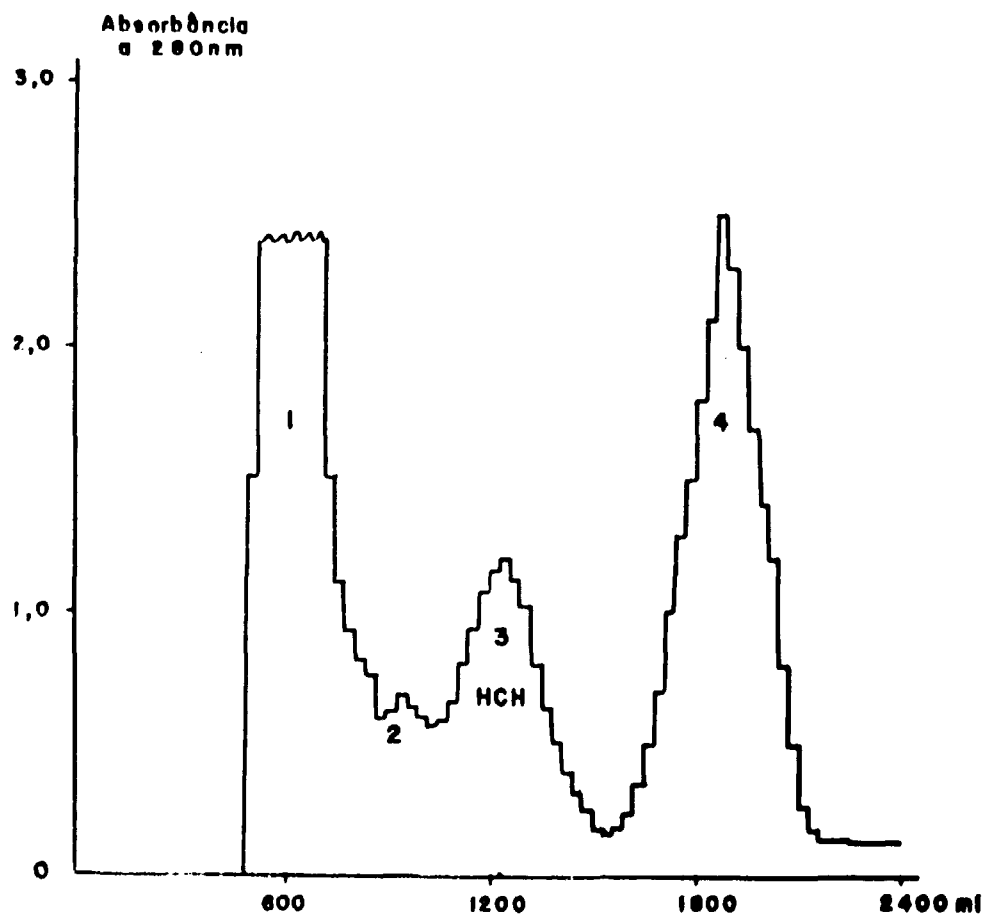


Figura 5 — A Fração Central do Pico 3 Referente à Forma Monomérica do HCH Contém a Maior Atividade Biológica do Produto.

Tampão Fosfato de Potássio 0,1M — pH 6,8 — NaCl 0,5M  
fluxo: 43 ml/hora  
frações: 15 ml



O gel de Sephadex G-75 foi equilibrado com tampão veronal 0,025M – pH 8,6 – 1% SAB, da mesma maneira descrita no item 4.2.2. A eluição foi feita com o mesmo tampão, num fluxo de 12 ml/hora, mantido por bomba peristáltica LKB e foram colhidas frações de 2,0 ml, usando coletor automático refrigerado LKB. De cada fração foram retirados 25  $\mu$ l com micropipeta de vidro, para análise no contador gama, observando-se a posição do azul dextran nos eluatos.

### 4.3.3 – Cálculos

#### 4.3.3.1 – Recuperação

Calcula-se a atividade aplicada na coluna (A) usando-se a seguinte fórmula:

$$A = \left[ (S + M_2) \times 100 + M_1 \right] \times \frac{(V - 10)}{10} - (R + P)$$

Onde:

S representa as cpm da solução 2,

$M_1$  as cpm da micropipeta 1,

$M_2$  as cpm da micropipeta 2,

V o volume da marcação,

R as cpm do recipiente da marcação com o microimã e

P as cpm da ponteira Oxford.

A atividade total recuperada (T) é obtida pela fórmula:

$$T = \sum_{i=1}^n 80 Y_i$$

Onde:

Y representa o valor das cpm em 25  $\mu$ l de cada fração, descontando-se o BG,

80 é o fator de diluição (25  $\mu$ l em 2 000  $\mu$ l) e

n é o número de frações.

A porcentagem de recuperação (R) é dada por:

$$R = \frac{T}{A} \times 100$$

#### 4.3.3.2 – Rendimento da Marcação de Proteína

São obtidos três picos principais bem distintos na seguinte ordem: hormônio danificado, hormônio íntegro e iodo livre. Calcula-se a porcentagem de cada um, em relação ao total recuperado. O rendimento da marcação de proteína é dado por:

$$\frac{PI + PII}{T} \times 100$$

Onde:

PI é a soma das cpm das frações do pico de hormônio danificado, descontando-se o BG,

PII é a soma das cpm das frações de hormônio íntegro, descontando-se o BG.

#### 4.3.3.3 – Porcentagem de Hormônio Danificado

É dada por:

$$\frac{PI}{PI + PII} \times 100$$

Os cálculos nos dois últimos itens são feitos da maneira clássica, considerando o PI como derivado somente do hormônio danificado.

#### 4.3.4 – Teste de Imunorreatividade do HCH<sup>o</sup> e Seleção das Condições Ótimas para o Ensaio

Após cada iodação é necessário testar a imunorreatividade do produto obtido. O HCH<sup>o</sup> é incubado sem anticorpo (controle 1) com excesso de anticorpo (controle 2) e com diluições crescentes do mesmo, para que se possa determinar qual a diluição do anticorpo que corresponde a uma relação de hormônio ligado (B) para o hormônio livre (F), em torno de 1.

##### 4.3.4.1 – Protocolo do Ensaio

Na Tabela II está esquematizado o procedimento para a determinação da diluição ótima do anticorpo.

O tubo de número um (controle 1), contém apenas o HCH<sup>o</sup>. O tubo de número dois (controle 2) contém excesso de anticorpo. Os demais tubos contêm anticorpo em diferentes diluições.

As diluições do anticorpo foram feitas usando tampão diluente (veronal 0,025M – pH 8,6 – 0,25% SAB – 1% soro de coelho). O HCH<sup>o</sup> é diluído no mesmo tampão, para obtenção de aproximadamente  $2 \times 10^5$  cpm contidas em 100  $\mu$ l. A incubação é mantida a 4°C, por um período de 3 a 5 dias, em um volume total de 1 000  $\mu$ l. Somente 200  $\mu$ l de incubação são usados em cada determinação na EGPA, o que possibilita cinco testes eletroforéticos, a diferentes tempos de incubação.

Tabela II

Protocolo do Ensaio para Determinação da Diluição Ótima do Anticorpo

Tubos nº	Diluição do AC	AC nas Diluições Indicadas ( $\mu$ l)	Tampão Diluente ( $\mu$ l)	HCH* ( $\mu$ l) Diluído 1:100 $\cong 2 \times 10^6$ cpm
1	—	—	900	100
2	$1:10^3$	800	100	100
3	$1.5 \times 10^3$	800	100	100
4	$1:10^6$	800	100	100
5	$1.5 \times 10^6$	800	100	100
6	$1:10^7$	800	100	100

Volume total de incubação: 1 000  $\mu$ l por tubo

#### 4.3.4.2 – Separação das Frações Livre (F) e Ligada (B)

É feita usando a eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito anteriormente. Nessas condições de separação, o complexo HCH<sup>35</sup>AC permanece quase todo no gel da amostra, enquanto o HCH<sup>35</sup> livre migra na frente, um pouco antes do traçador.

O hormônio marcado pode, às vezes, apresentar picos indesejáveis referentes ao material danificado, que foram denominados D1, D2 e D3 (Figuras 6 e 7). O D1 interfere com o complexo HCH<sup>35</sup>AC e por isso sua contribuição precisa ser descontada nos cálculos. O D2 nem sempre está presente e pode ser detectado por sua característica de não possuir imunorreatividade, coincidindo com a posição do HCH<sup>35</sup> livre e da SAB. O D3, que sai acima do traçador, pode ser eliminado graficamente e não interfere no valor das frações livre e ligada, quando se usa gel de 11 cm de comprimento (Figura 8). Inicialmente, usando gel de 8 cm, o D3 não se separava completamente (Figura 9).

#### 4.3.4.3 – Cálculos

Os eletroforetogramas são realizados com as cpm dos segmentos. Somam-se estes valores descontando-se a radiação de fundo, obtendo-se, assim, a radioatividade total (T).

Calcula-se o D1<sub>i</sub> através da fórmula:

$$D1_i = T_i \times \frac{D1_c}{T_c}$$

onde o índice c indica o valor correspondente ao gel controle 1 (na ausência de AC).

Separam-se os picos e somam-se as contagens de cada um, obtendo-se:

B'<sub>i</sub> – antígeno ligado incluindo D1

F<sub>i</sub> – antígeno livre

O valor real da fração ligada (B<sub>i</sub>) para cada gel é dado por:

$$B_i = B'_i - D1_i$$

Para o gráfico da diluição ótima, usa-se a porcentagem de ligação (% B<sub>i</sub>), dada por:

$$\% B_i = \frac{B_i}{B_i + F_i} \times 100$$

Com estes valores, tem-se uma curva cujo aspecto geral pode ser visto na Figura 10.

POSIÇÃO DOS VÁRIOS COMPONENTES NO GEL DE POLIACRILAMIDA

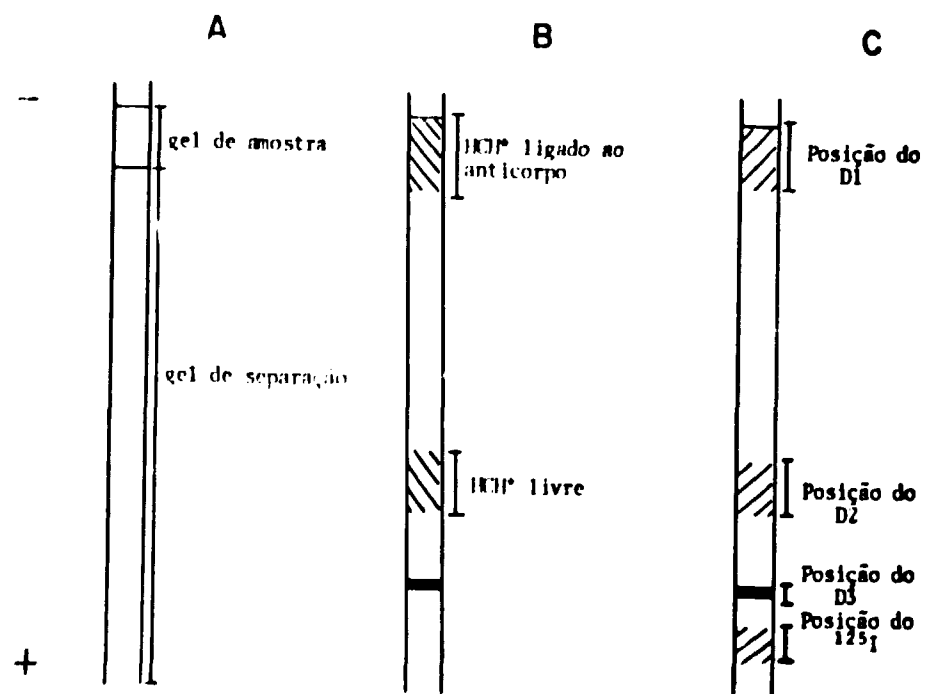


Figura 6 - A - Gel Antes da Eletroforese  
 B - Gel Após a Eletroforese da Amostra com Anticorpo  
 C - Gel Após a Eletroforese da Amostra sem Anticorpo Mostrando os Possíveis Denificados (D1, D2 e D3)

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VÁRIOS COMPONENTES OBTIDOS NO  
GEL DE POLIACRILAMIDA

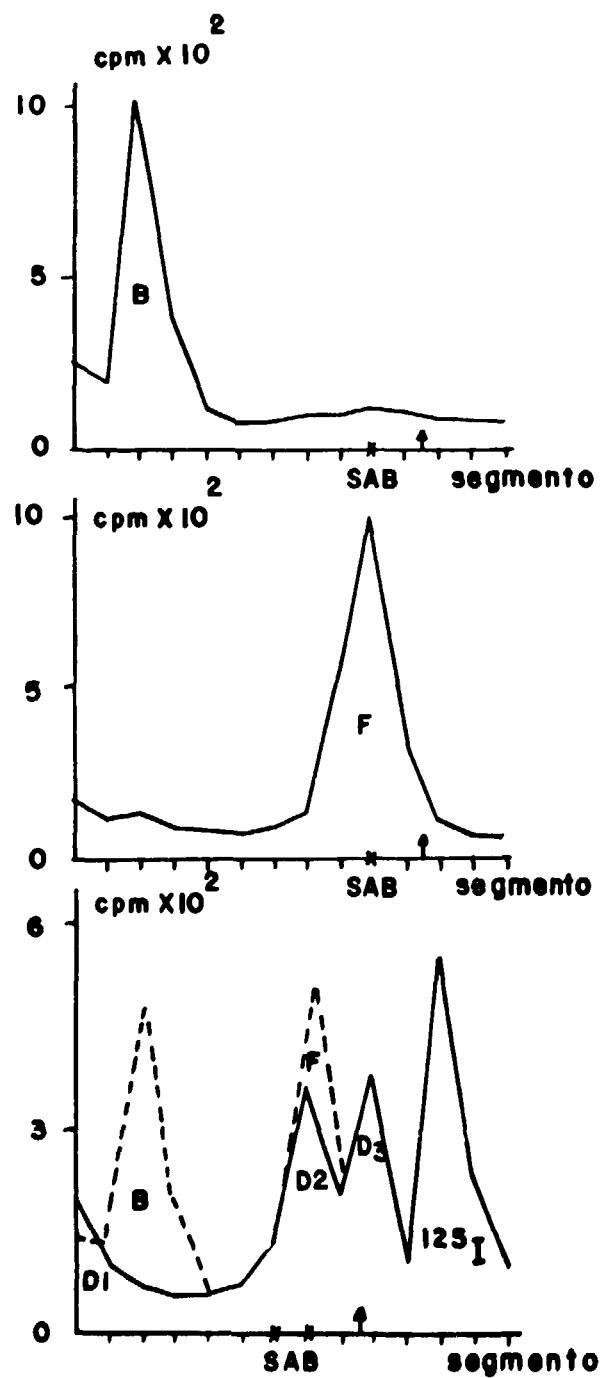


Figura 7 - Eletroforetograma Mostrando as Posições Correspondentes ao HCH<sup>35</sup> Livre (F), ao HCH<sup>35</sup> Ligado ao Anticorpo (B) e ao D1, D2, D3 e <sup>125</sup>I

ELETOFORETOGRAMAS DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) INCUBADO À DILUIÇÕES  
CRESCENTES DE ANTICORPO EM GEL DE 11 cm

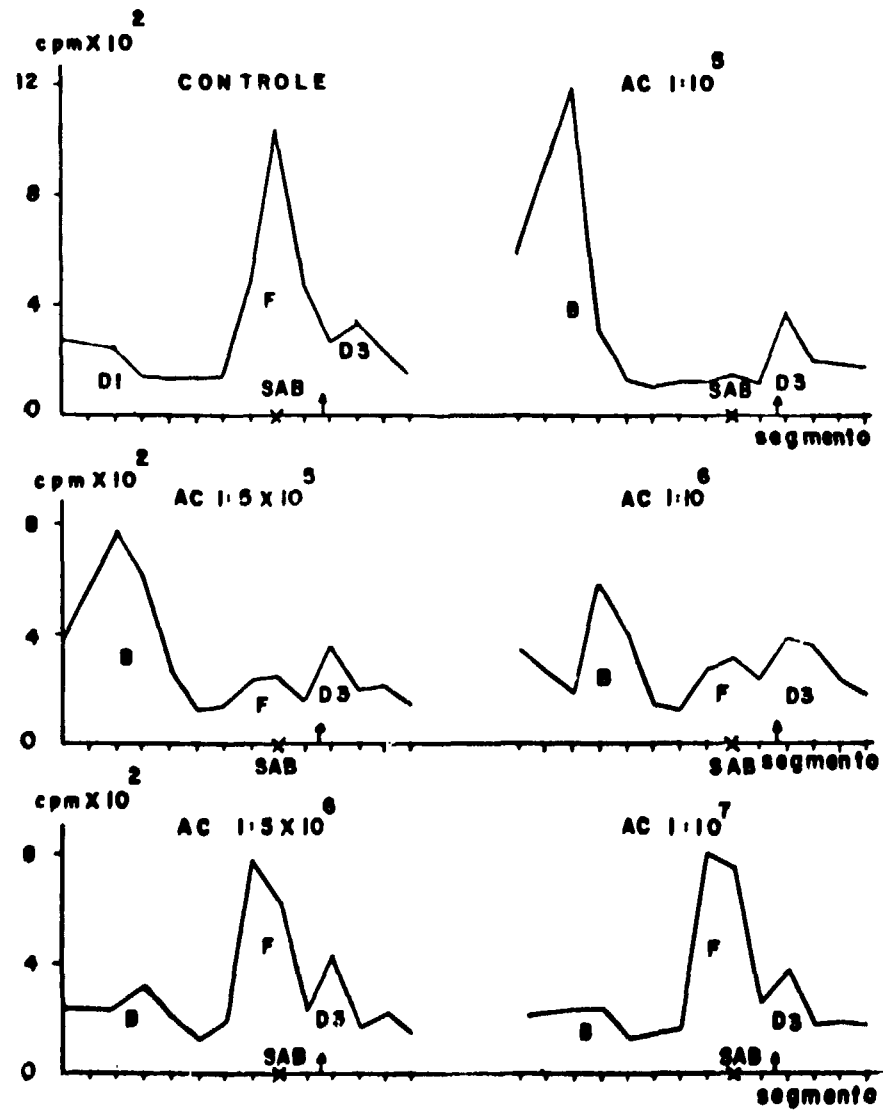


Figura 8 - A Separação das Frações Livre (F) e Ligada (B) foi Feita em EGPA

ELETOFORETOGRAMAS DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) INCUBADO A DILUIÇÕES  
CRESCENTES DE ANTICORPO EM GEL DE 8 cm.

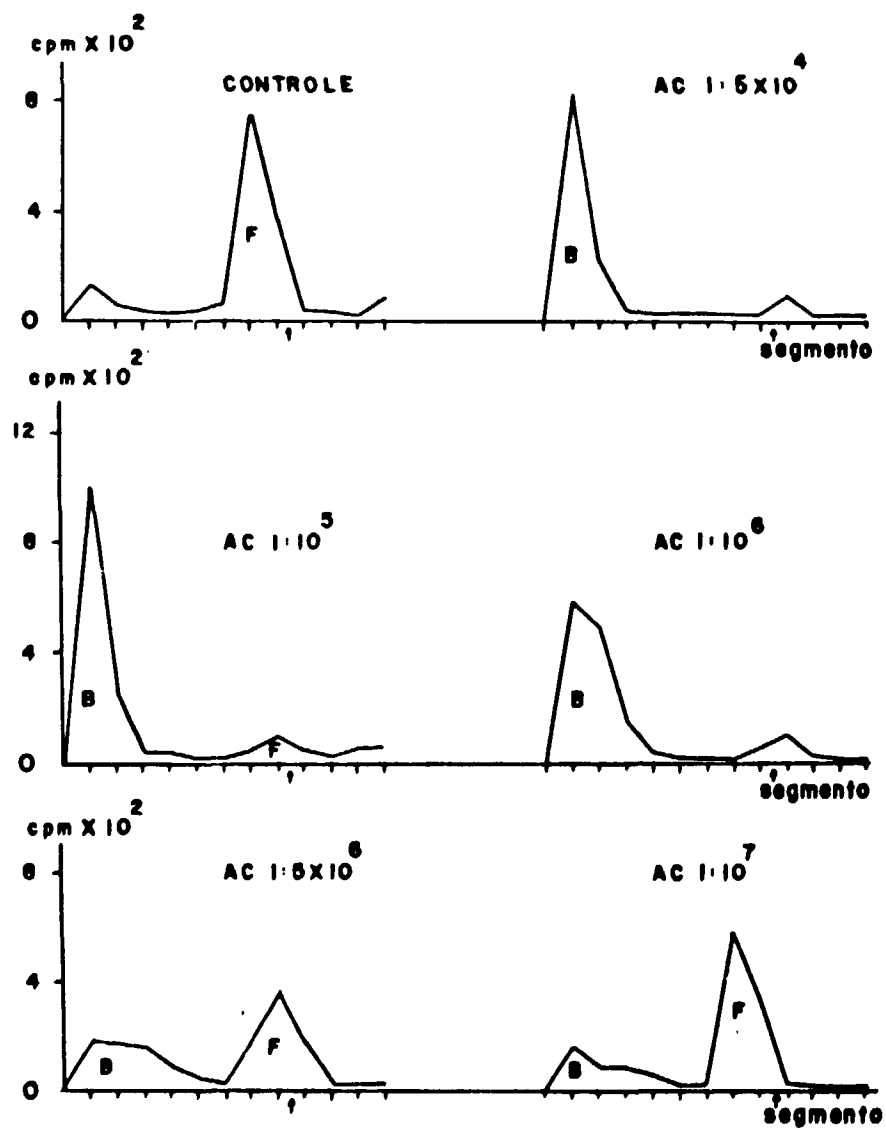
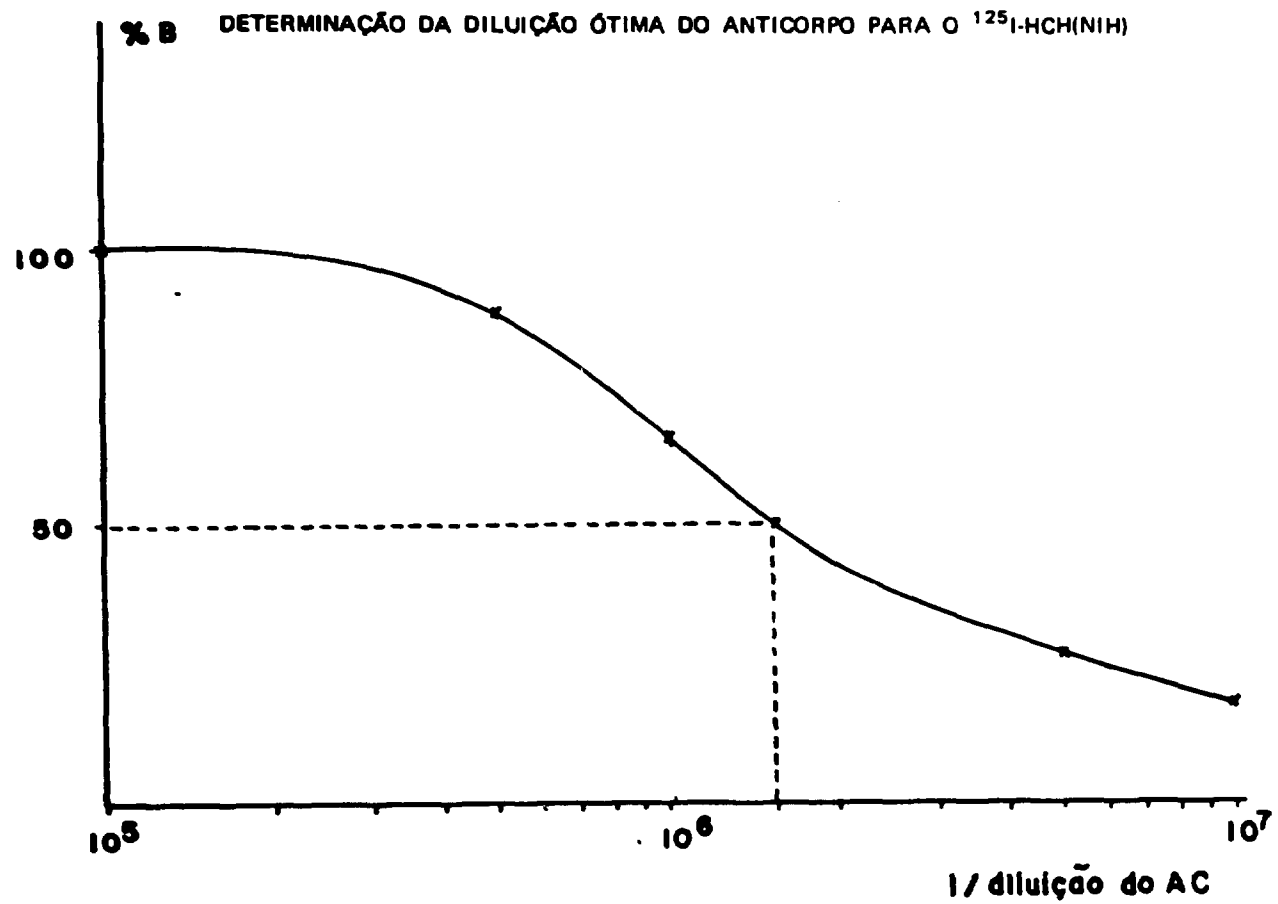


Figura 9 - A Separação das Frações Livre e Ligada foi feita em EGPA





**Figura 10** – A Separação das Frações Livre (F) e Ligada (B) foi Feita em EGPA (Figura 8). A Partir Desta Curva Fixou-se como Sendo  $1:1,66 \times 10^6$  a Diluição Ótima do Anticorpo para este Hormônio Marcado (porcentagem de ligação de 50%)

#### 4.4 – Técnica de Radioimunoensaio

A técnica foi baseada no trabalho de BARTOLINI e cols.<sup>(3)</sup>, modificando-se o comprimento do gel de 8 cm para 11 cm.

##### 4.4.1 – Curva Padrão

A curva padrão é obtida usando o HCH(WHO), padrão de referência para radioimunoensaio, numa faixa que varia de 0 a 20 ng/ml (Figura 11). Foi feito um estudo comparativo usando-se o padrão de HCH(KABI).

##### 4.4.2 – Protocolo do Radioimunoensaio

O protocolo do radioimunoensaio pode ser visto na Tabela III. O tubo de número um (controle 1) contém apenas o HCH. O tubo de número dois (controle 2) contém excesso de anticorpo. O tubo de número três (controle 3) contém excesso de HCH padrão. Os demais tubos contém HCH padrão nas concentrações de zero a 20 ng/ml.

A separação das frações livre e ligada é feita conforme descrito no item 4.3.4.2.

##### 4.4.3 – Cálculos

Analisando-se a ligação inespecífica e a presença ou não do D2 e D3, pode-se decidir se o ensaio é válido ou não. Os cálculos são feitos como descrito no item 4.3.4.3., preferindo-se, entretanto, usar a relação B/F ao invés da porcentagem de ligação (% B).

#### 5 – Aparelhos

- Coletor automático refrigerado LKB
- Bomba peristáltica LKB
- LKB Uvicord 8 300 II (LKB Producter AB – Bromma – Sweden)
- Espectrofotômetro automático de cintilografia – Tipo poço, com cristal de NaI (TI) (Nuclear Chicago Corporation).
- Balança analítica Mettler H207 (Zürich – Swiss)
- Virtis homogenizer "45"
- Liofilizador Virtis – modelo NO.10-146 MR-BA – série 1538
- Agitador magnético Amico
- Sistema de ultrafiltração Amicon, com membrana Diaflo PM-10
- Centrífuga Sorvall (automatic superspeed RC-2-B)
- Espectrofotômetro Zeiss PM-II (Carl Zeiss – U.V.)

## CURVA PADRÃO DO RADIOIMUNOENSAIO DE HCH

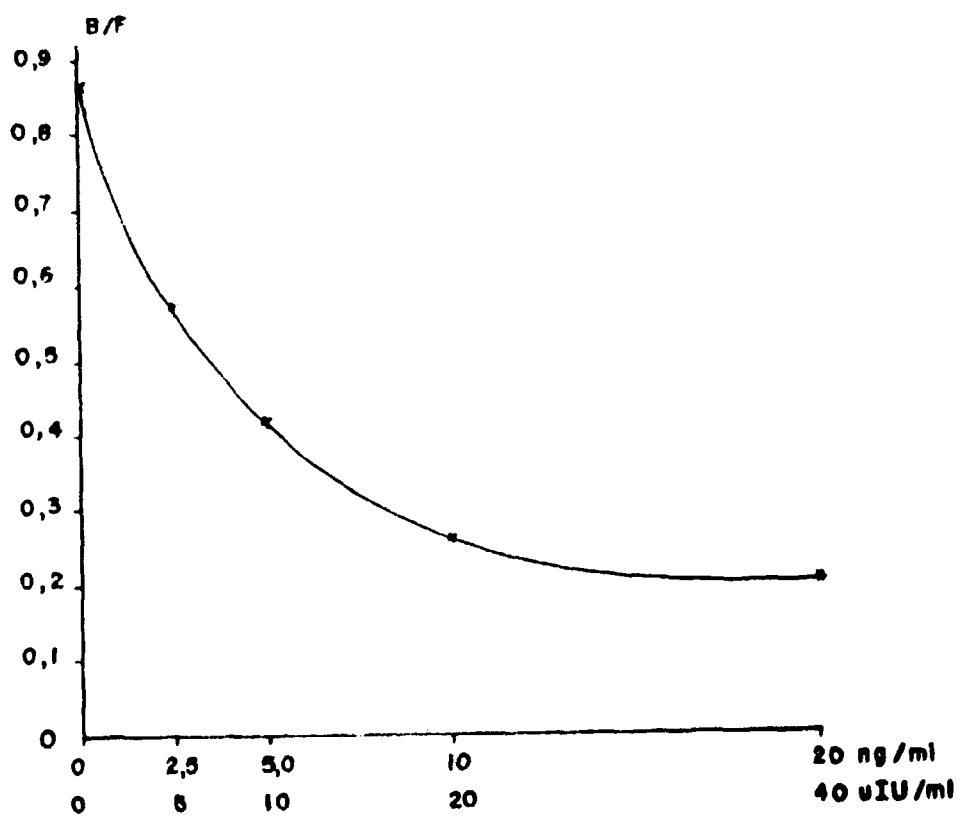


Figura 11 – Padrão de HCH da WHO (IRP 66/217). A Separação das Frações Livre e Ligada foi Feita em EGPA

Tabela III

## Protocolo de Radioimunoensaio

Tubos nº	Tempo Diluente ( $\mu$ l)	AC na Diluição Ótima ( $\mu$ l)	HCH (100 $\mu$ l)	$^{125}$ I-HCH Diluído 1:100 $2 \times 10^4$ cpm ( $\mu$ l)
1	900	—	—	100
2	100	800*	—	100
3	100	800	10 000,0 ng/ml 20 000 $\mu$ UI/ml	100
4	—	800	0 ng/ml	100
5	—	800	2,5 ng/ml 5 $\mu$ UI/ml	100
6	—	800	5,0 ng/ml 10 $\mu$ UI/ml	100
7	—	800	10,0 ng/ml 20 $\mu$ UI/ml	100
8	—	800	20,0 ng/ml 40 $\mu$ UI/ml	100

\* Diluído 1:10<sup>2</sup> (excesso de anticorpo)

- Agitador mecânico com hélice rotativa
- Agitador Vortex
- Lâmpada fluorescente para polimerização, com 15 W e 110 V
- Gel electrophoresis cell – modelo 150A (Bio-Rad Laboratories)
- Electrophoresis gel slicer – modelo 190 (Bio-Rad Laboratories)
- Bomba de vácuo

### III – RESULTADOS

#### 1 – Hormônio de Crescimento Humano do National Institute of Health marcado com $^{125}\text{I}$ – $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH)

##### 1.1 – Purificação em Gel de Sephadex G-75

A Figura 12 mostra o cromatograma da filtração em gel de Sephadex G-75 do  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) após a iodação, na qual separam-se quatro picos.

O PII corresponde ao hormônio marcado puro, o que pode ser comprovado por sua total ligação com excesso de anticorpo (diluição 1:10<sup>5</sup>) como pode ser visto na Figura 13.

O PIV, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, mostra um pico na mesma posição do Na  $^{125}\text{I}$  quando submetido à mesma análise eletroforética (Figura 14).

O PI, denominado pela maioria dos autores pico de hormônio danificado, foi estudado mais detalhadamente, a fim de se estabelecer a sua real natureza.

O PIII, algumas vezes ausente, também não tem sua natureza bem determinada.

Logo após a purificação, os picos de interesse foram estocados.

##### 1.2 – Estudo Eletroforético dos Picos Obtidos na Purificação

Uma amostra de fração central de cada pico, visto na Figura 12, foi submetida à EGPA imediatamente após a purificação e dois, três e seis meses depois. A EGPA das amostras logo após a purificação foi feita em gel de 8 cm, mas as subsequentes foram desenvolvidas em gel maior, de 11 cm.

A Figura 15 referente ao PI, mostra grande quantidade de radioatividade presente na posição de SAB, degradado 2 (D2) e pequena quantidade de degradado 1 e 3 (D1 e D3) imediatamente após a purificação. No decorrer do tempo houve aumento do pico do iodo.

O eletroforetograma do PII,  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) submetido à eletroforese logo após a purificação, mostra um pico único coincidente com a posição de SAB (Figura 16). Os eletroforetogramas seguintes, realizados respectivamente dois, três a seis meses após a purificação mostram o processo gradual de desiodação e formação de D1.

Deve-se notar que, nessas eletroforeses, realizadas nos diferentes tempos após a purificação, a posição ocupada pelo D2, oriundo do PI (Figura 15), coincide com a do hormônio puro, proveniente do

CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO  
 $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) LOGO APÓS A IODAÇÃO

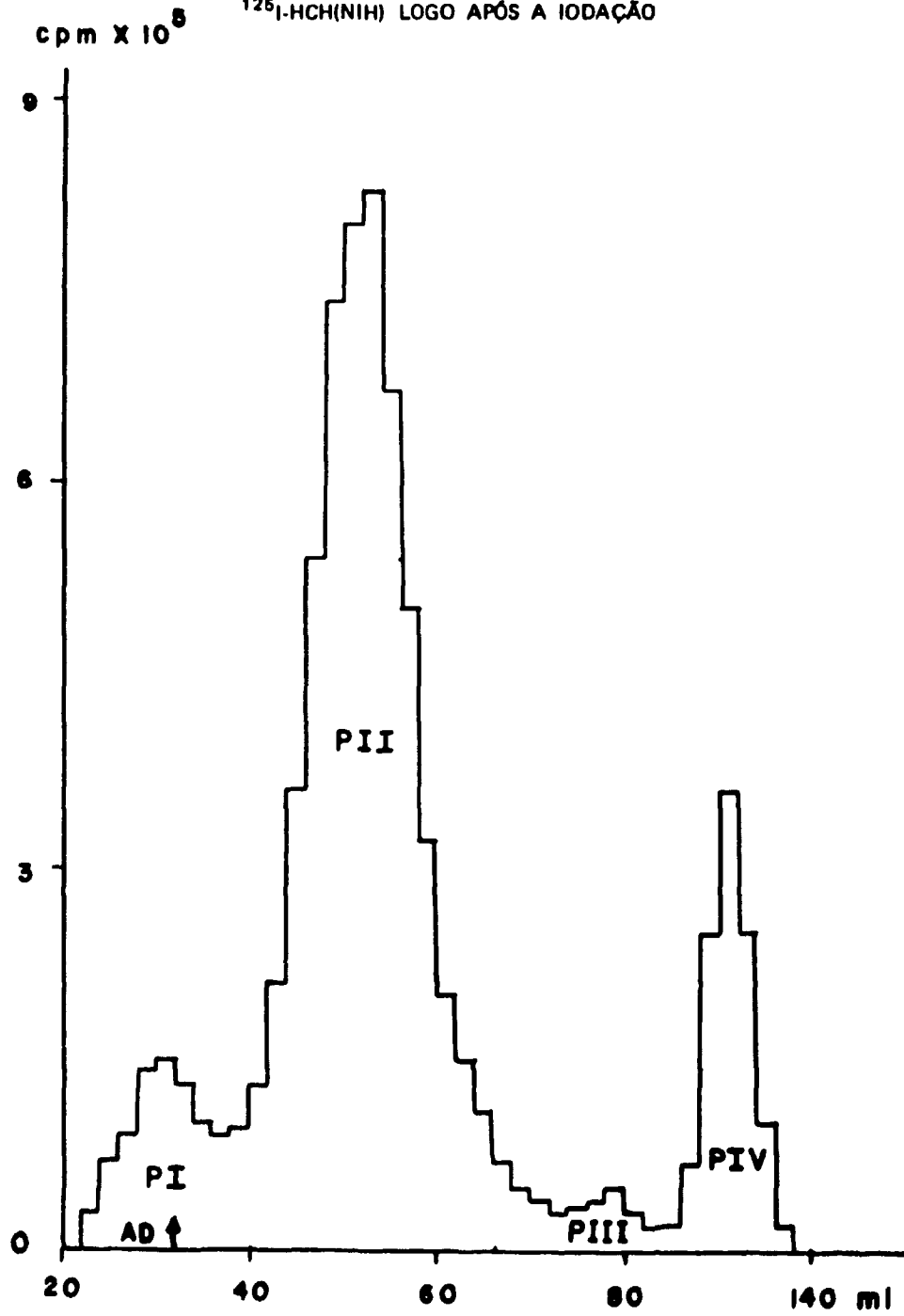


Figura 12 - Tampão Veronal 0,025M - pH 8,6 - 1% SAB  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 2 ml  
frações: 6 ml (a partir de 80 ml)

ELETROFOTOGRAMAS DOS PICOS I E II OBTIDOS NA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH). DETERMINAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE

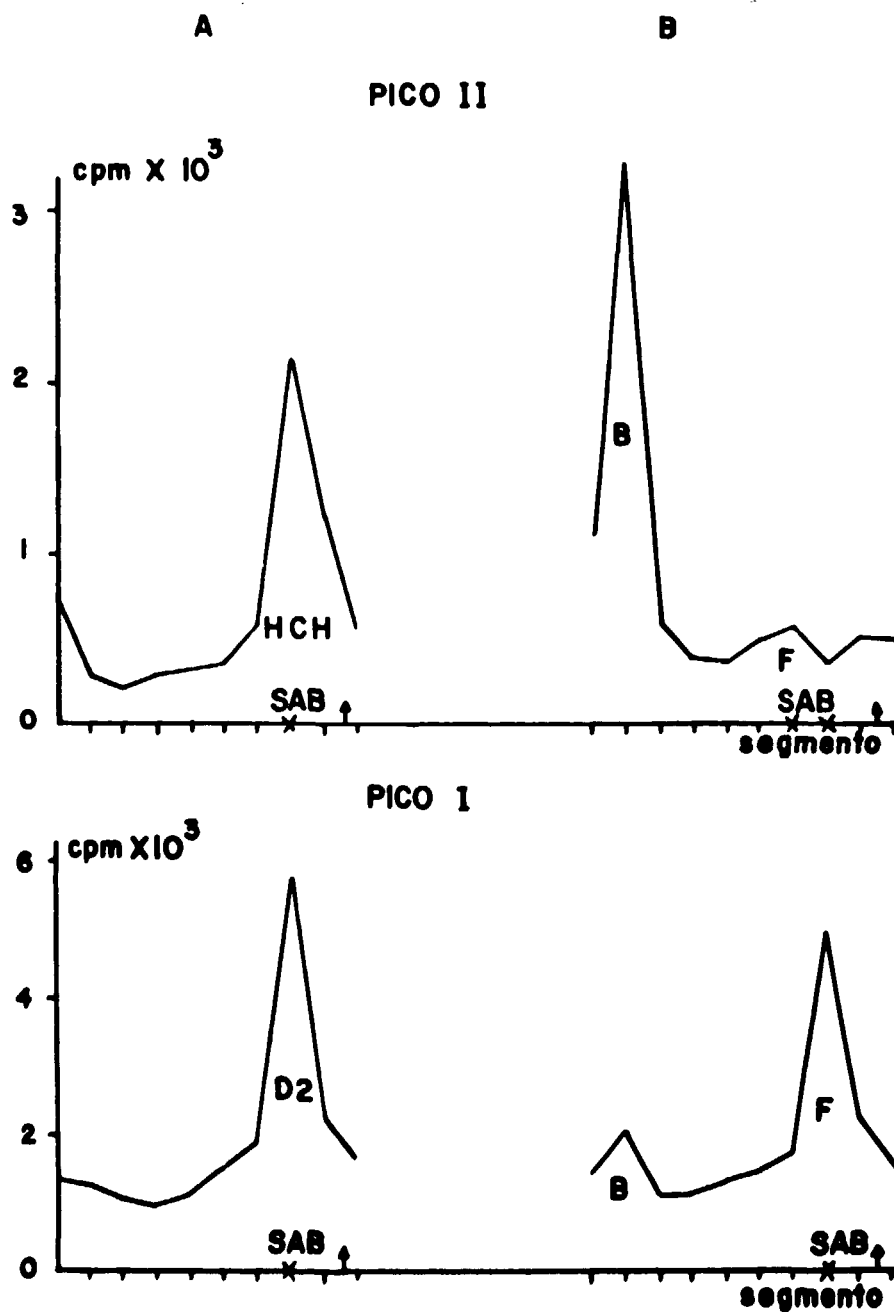


Figura 13 - A - Eletroforeses Controle Realizadas com as Amostras do PI e PII sem Anticorpo.  
B - Eletroforeses das Amostras do PI e PII Incubadas com Anticorpo Diluído 1:10<sup>5</sup>

ELETROFORETOGRAMAS COMPARATIVOS ENTRE O Na  $^{125}\text{I}$  E O PICO IV OBTIDO NA  
PURIFICAÇÃO DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) EM GEL DE SEPHADEX G-75

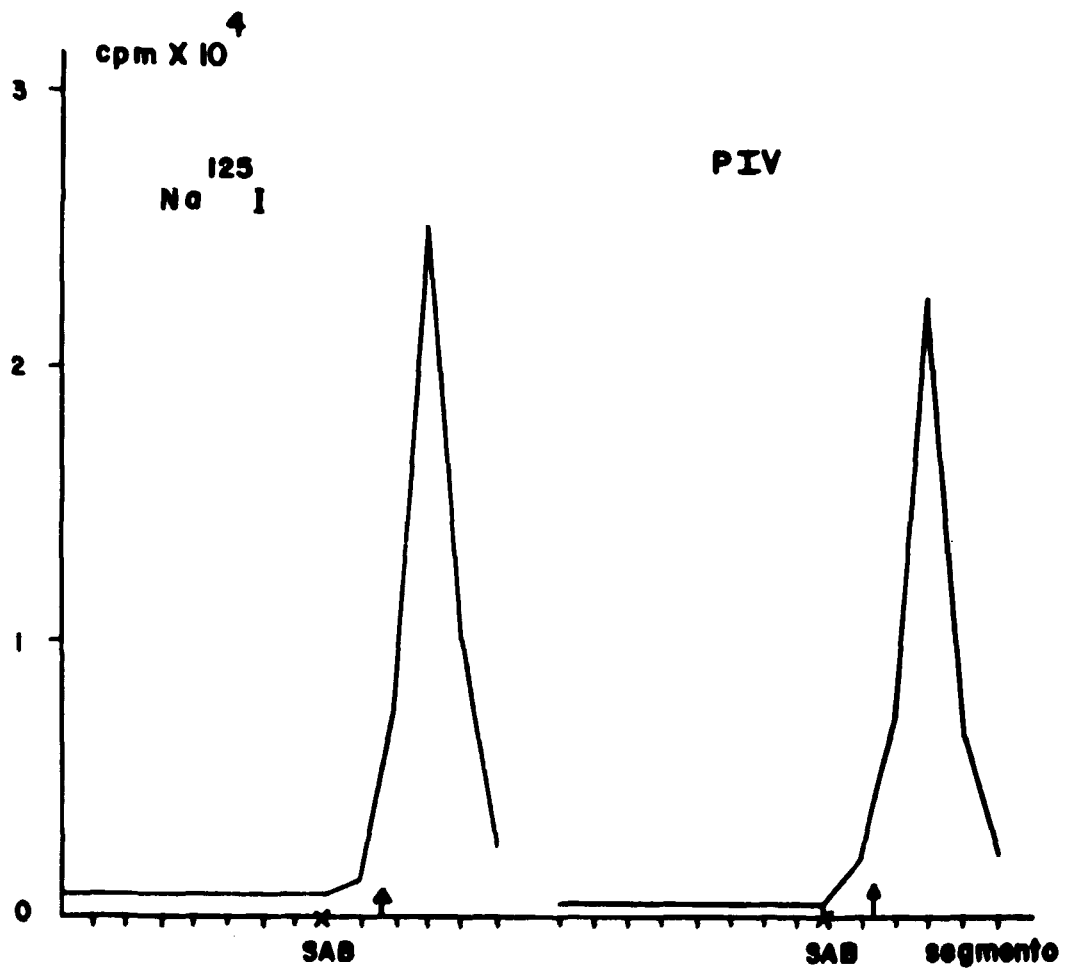


Figura 14



ELETROFORETOGRAMAS DO PICO I OBTIDO NA FILTRAÇÃO EM GEL DE  
SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH)

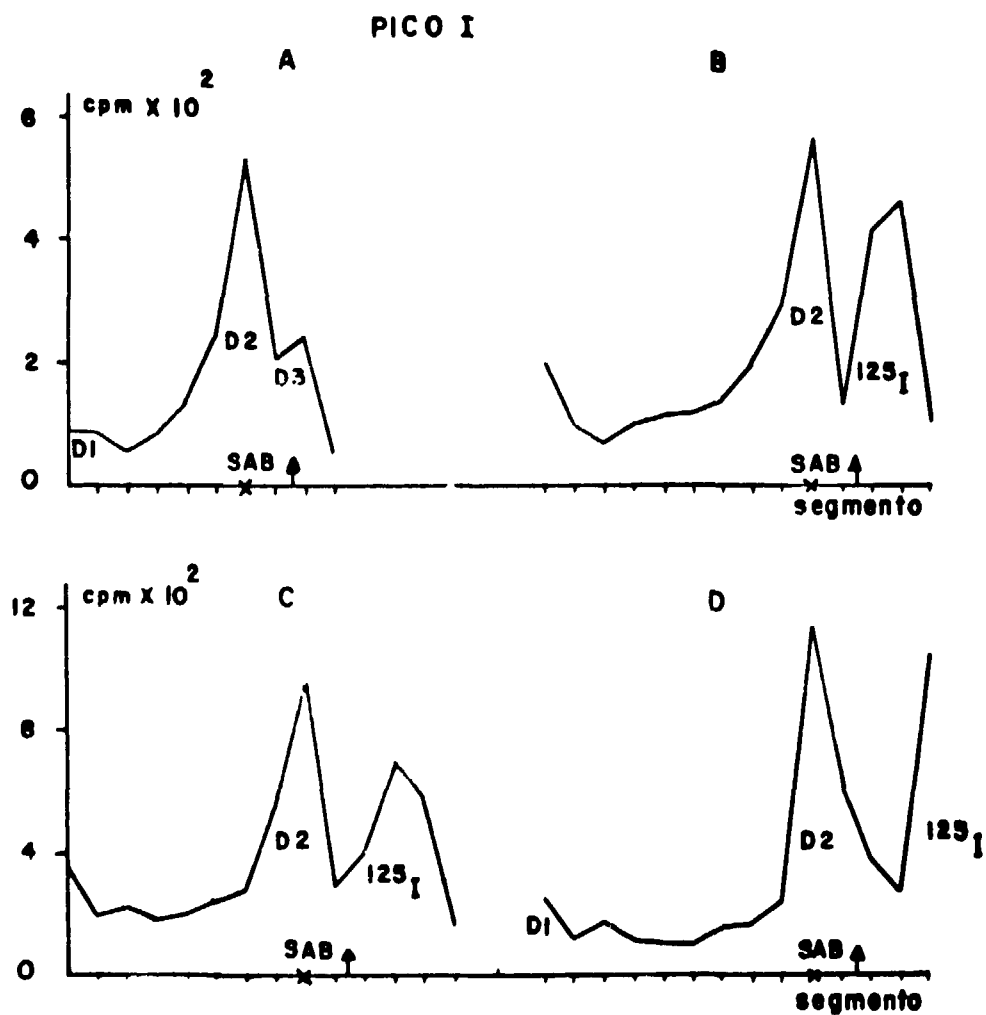


Figura 15 - Eletroforeses do PI Realizadas em Diferentes Tempos:  
 A - logo após a purificação  
 B - 2 meses após a purificação  
 C - 3 meses após a purificação  
 D - 6 meses após a purificação

ELETOFORETOGRAMAS DO PICO II OBTIDO NA FILTRACÃO EM GEL DE  
SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH)

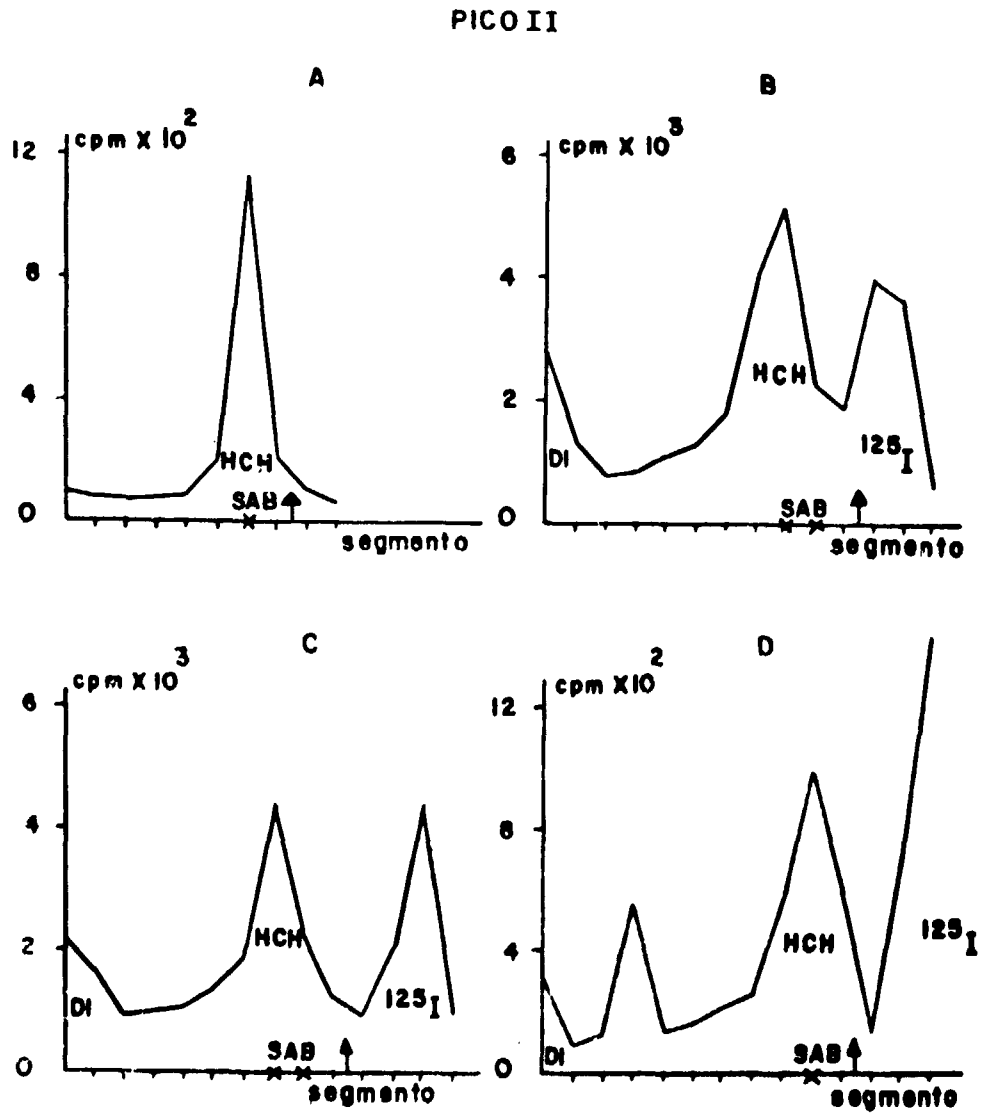


Figura 16 - Eletroforeses do PII Realizadas em Diferentes Tempos.  
 A - logo após a purificação  
 B - 2 meses após a purificação  
 C - 3 meses após a purificação  
 D - 6 meses após a purificação

PII (Figura 16). Por esse motivo uma pequena alíquota dos picos I e II foi incubada com o anticorpo, nas condições previamente descritas e então submetida à EGPA. Nota-se que, embora ambos migrem até a mesma posição no gel, posição da SAB, houve muito pouca ligação da amostra do PI (D2) com o anticorpo (Figura 13).

A Figura 17 mostra os eletroforetogramas do PIII.

À medida que se efetuaram os ensaios no segundo, terceiro e sexto mês após a purificação, observou-se um pico de radioatividade (D3) localizado após o traçador (indicado por setas), um aumento do pico do iodo e o aparecimento de um pequeno pico na posição da SAB (D2).

A Figura 18 referente ao PIV identificado como  $^{125}\text{I}$  nos eletroforetogramas da Figura 14, mostra os picos de  $^{125}\text{I}$  situados dois ou três segmentos após o traçador e o aparecimento de um pequeno D3 no sexto mês.

### 1.3 – Repurificação

Como pode ser visto na Figura 16, o hormônio marcado (PII), tempos após ser purificado, sofreu processos que resultaram no aparecimento do D1 e iodo livre.

Uma repurificação em gel de Sephadex G-75, do PII mantido um mês a  $-20^{\circ}\text{C}$  está representada graficamente na Figura 19. Nota-se a separação dos quatro picos, cujas posições aproximadamente, são coincidentes com as da primeira purificação (Figura 12).

As Figuras 20 e 21 mostram, respectivamente, a purificação do mesmo hormônio submetido a uma marcação, e a repurificação do PII após 20 dias de estocagem a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Pode-se notar na Figura 21 que após a estocagem a  $4^{\circ}\text{C}$  houve o aparecimento dos quatro picos característicos, estando o RPIII bastante aumentado quando comparado ao RPIII da Figura 19, relativa à estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A Figura 22 mostra a comparação das análises eletroforéticas em gel de poliacrilamida de PII (Figura 12) e RPII (Figura 19). Para testar a imunorreatividade do RPII, procedeu-se à incubação com diluições crescentes de anticorpo, logo após sua repurificação e um mês após a mesma, o que correspondeu respectivamente a um e dois meses após a marcação. A Figura 23 compara estas curvas de diluição ótima, com a obtida após a purificação (PII), mostrando que, o produto repurificado, mesmo quando estocado durante um mês, apresenta boas condições de ligação.

Entretanto, a estabilidade e imunorreatividade referidas anteriormente podem variar de um produto marcado para outro.

### 1.4 – Estudo Sobre a Imunorreatividade do $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) e do HCH(WHO) não Marcado

Quatro amostras de uma mesma partida de HCH(NIH) marcado em datas diferentes apresentaram um padrão normal de eluição na purificação em gel de Sephadex. Porém a eletroforese das frações correspondente ao hormônio marcado puro (PII), revelou picos cujas posições não coincidem com a de SAB e essas preparações marcadas não apresentavam imunorreatividade, quando incubadas com excesso de anticorpo. Este fato pode ser visto na Figura 24. Cumpre salientar que esse partida de hormônio liofilizado vinha sendo usada há seis meses, proporcionando ótimos resultados.

A Figura 25 mostra um estudo feito com o hormônio da WHO, padrão de referência para RIE, estocado em solução a  $-20^{\circ}\text{C}$ , revelando a perda gradativa de imunorreatividade em função do tempo de estocagem, após ter sido dissolvido. Nota-se também que após poucos dias de estocagem em solução, a

ELETROFORETOGRAMAS DO PICO III OBTIDO NA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH)

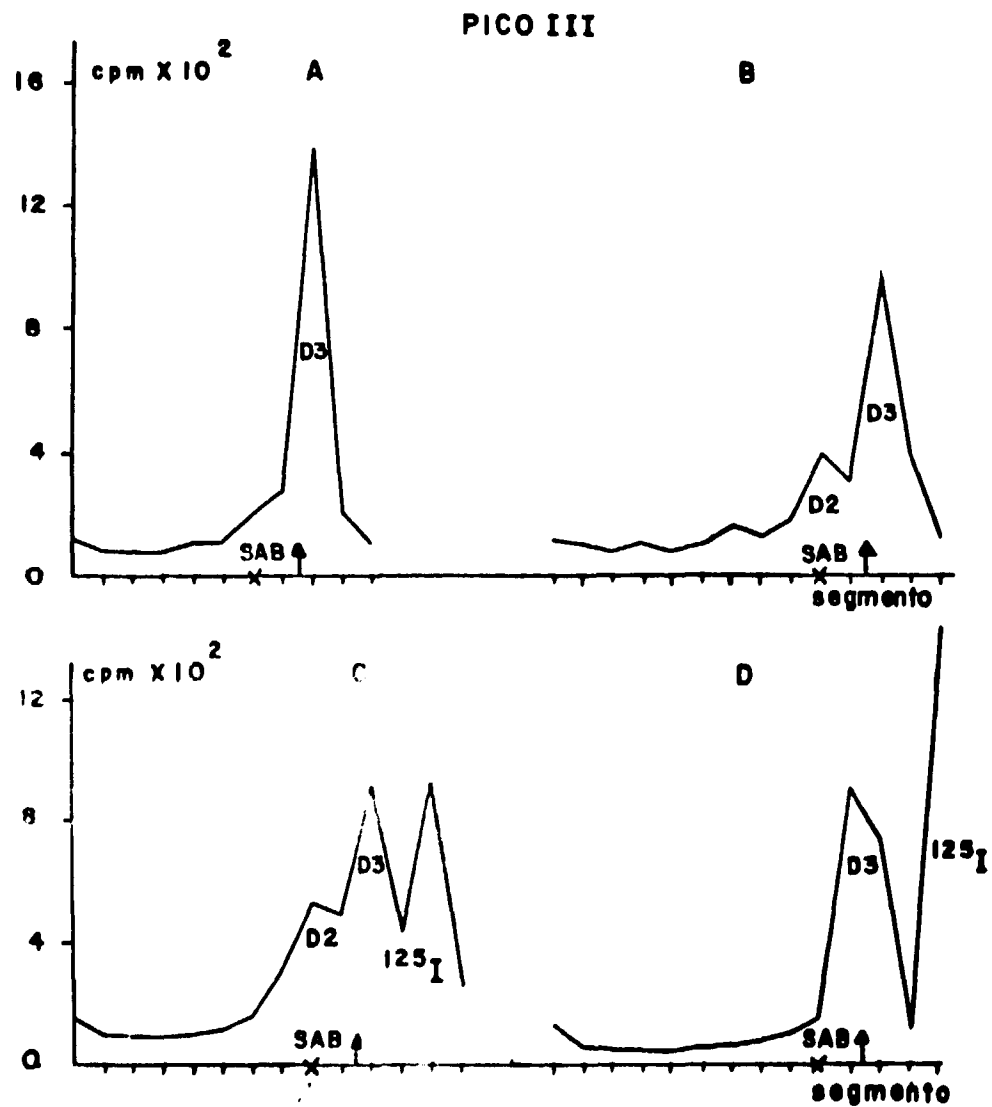


Figura 17 - Eletroforeses do Pico III Realizadas em Diferentes Tempos:  
 A - logo após a purificação  
 B - 2 meses após a purificação  
 C - 3 meses após a purificação  
 D - 6 meses após a purificação

ELETROFORETOGRAMAS DO PICO IV OBTIDO NA FILTRAÇÃO EM GEL DE  
SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH)

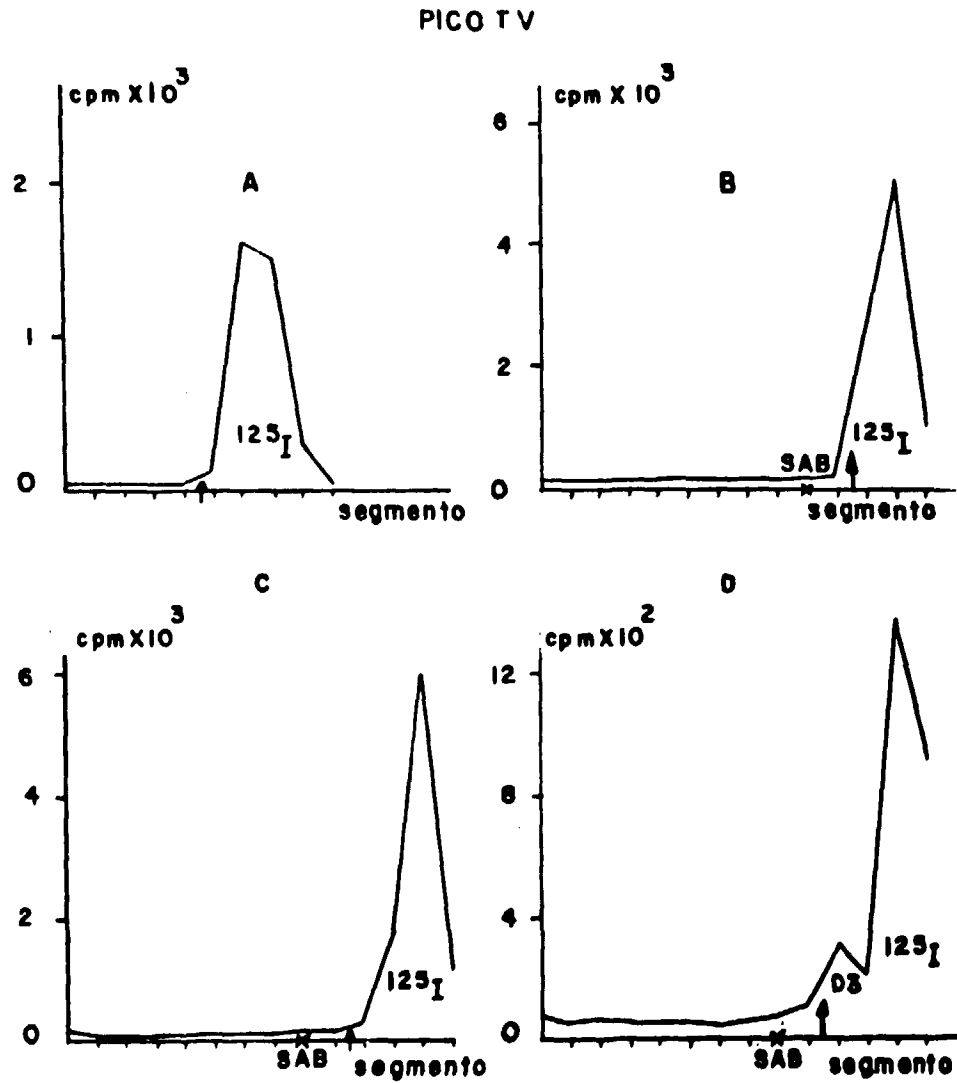


Figura 18 - Eletroforeses do Pico IV Realizadas em Diferentes Tempos:

- A - logo após a purificação
- B - 2 meses após a purificação
- C - 3 meses após a purificação
- D - 6 meses após a purificação

CROMATOGRAMA DA REFILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO PICO II DE  
 $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) ESTOCADO DURANTE 30 DIAS A  $-20^{\circ}\text{C}$

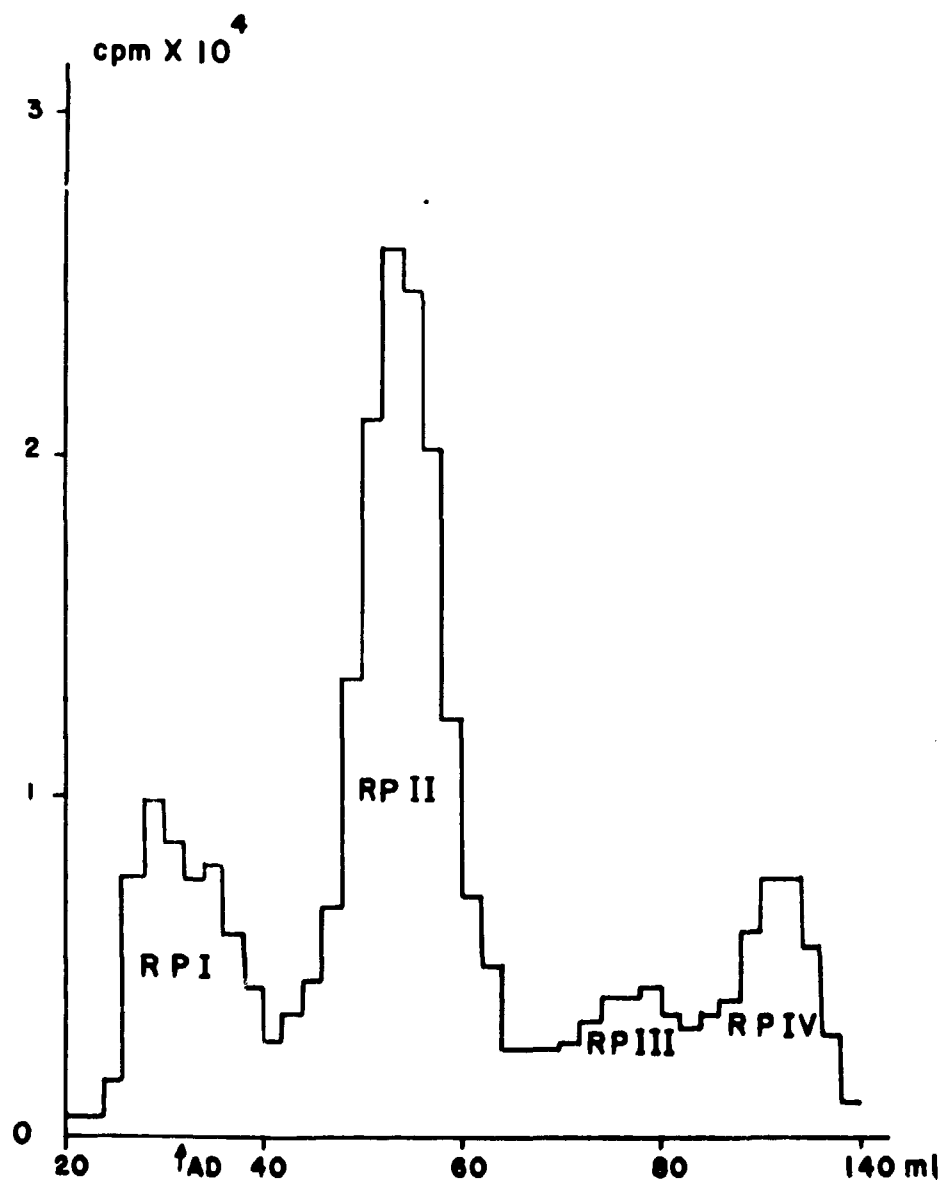


Figura 19 - Esta Refiltração Refere-se ao PII da Figura 12  
Tempo veronal 0,025M - pH 8,6 - 1% SAB  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 2 ml  
frações: 6 ml (a partir de 80 ml)

CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH)  
LOGO APÓS A IODAÇÃO

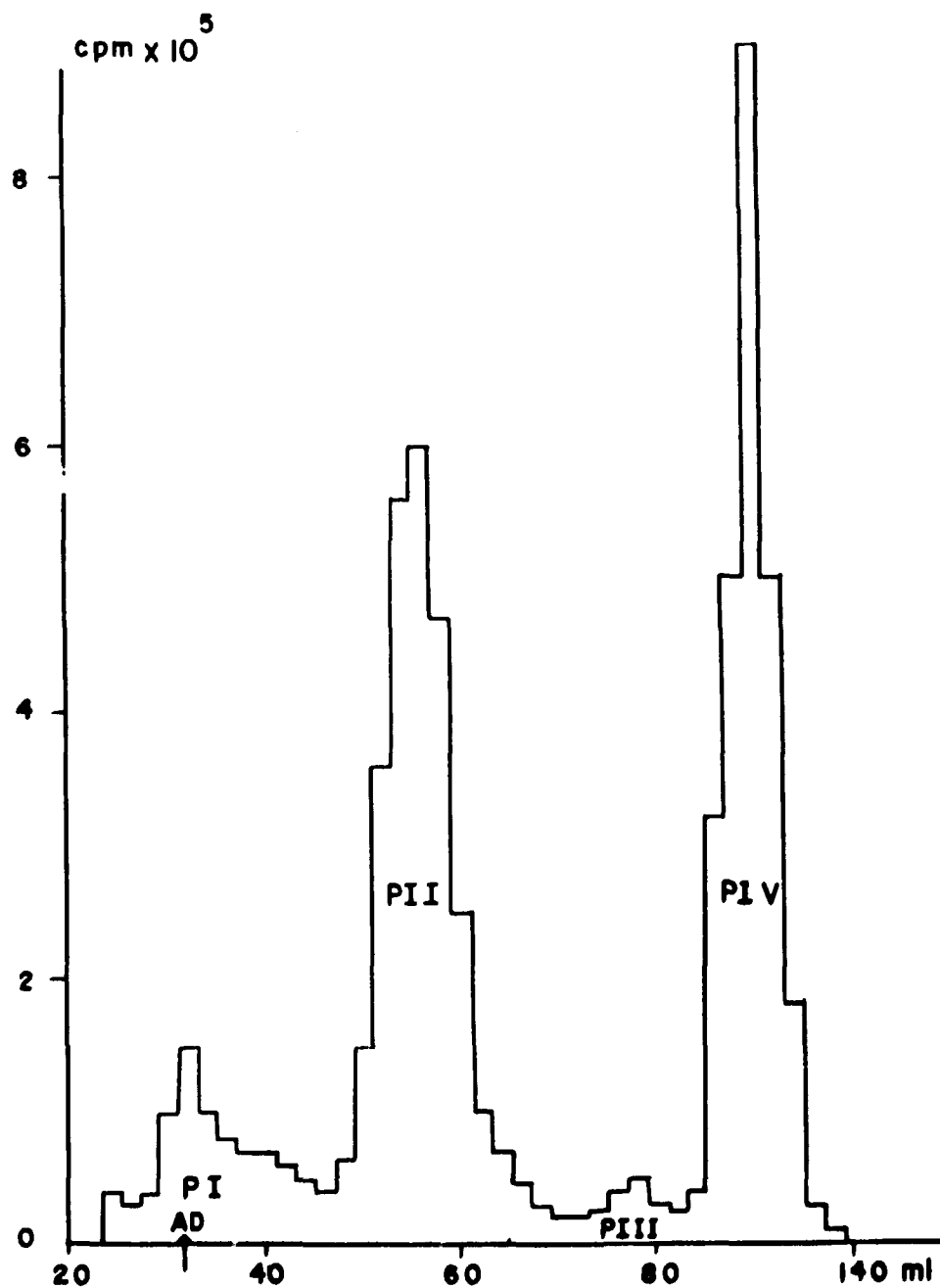


Figura 20 - Tampão Veronal 0,025M - pH 8,6 - 1% SAB  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 2 ml  
frações: 6 ml (a partir de 80 ml)

CROMATOGRAMA DA REFILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO PICO II  
DE  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) ESTOCADO DURANTE 20 DIAS A  $4^{\circ}\text{C}$

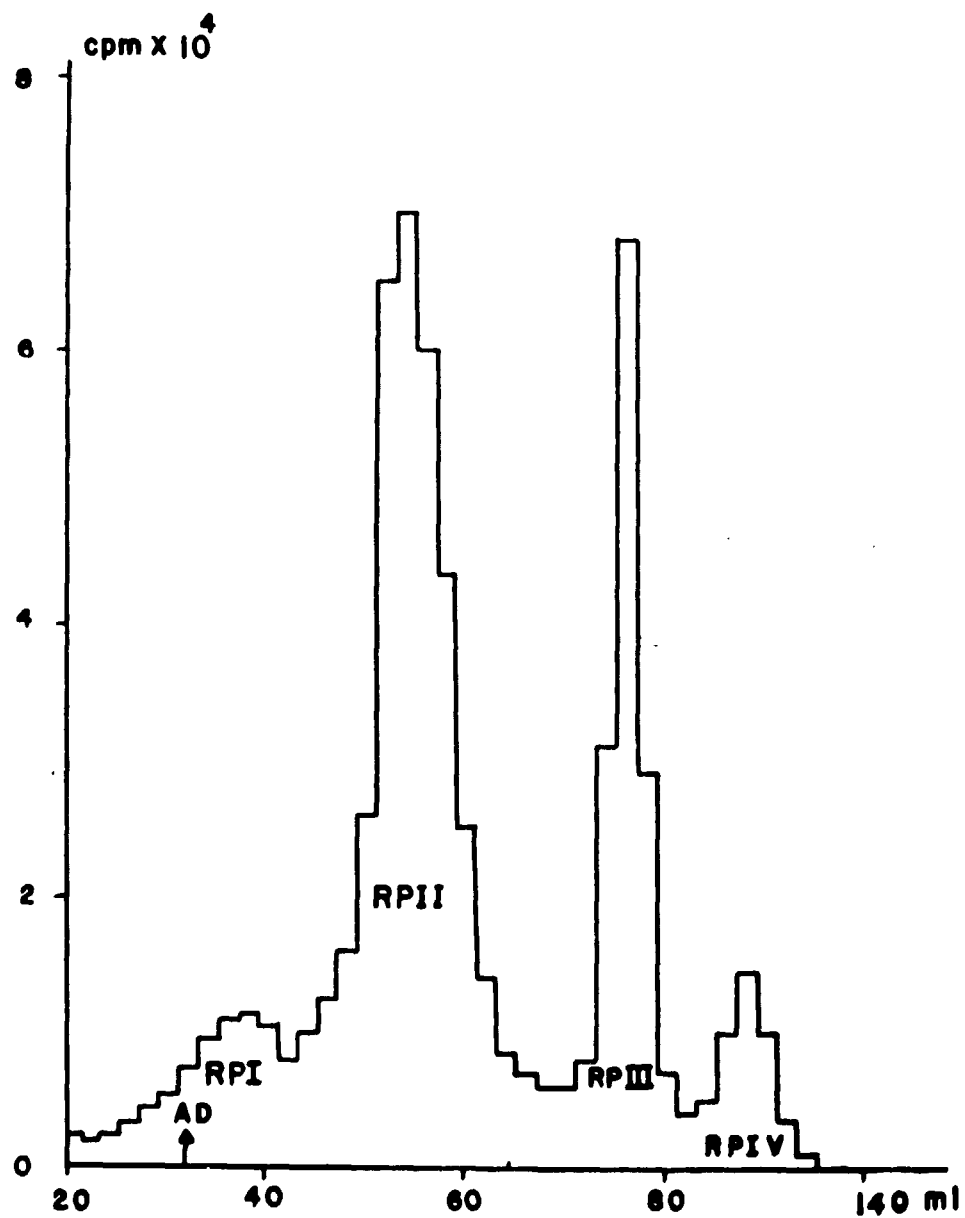


Figura 21 — Esta Filtração Refere-se ao PII da Figura 20  
Tampão veronal  $0,025\text{M}$  — pH 8,6 — 1% SAB  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 2 ml  
frações: 6 ml (a partir de 80 ml)



ELETROFORETOGRAMAS DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) PURO OBTIDO NA PURIFICAÇÃO (PII) E  
REPURIFICAÇÃO (RPII) EM GEL DE SEPHADEX G-75

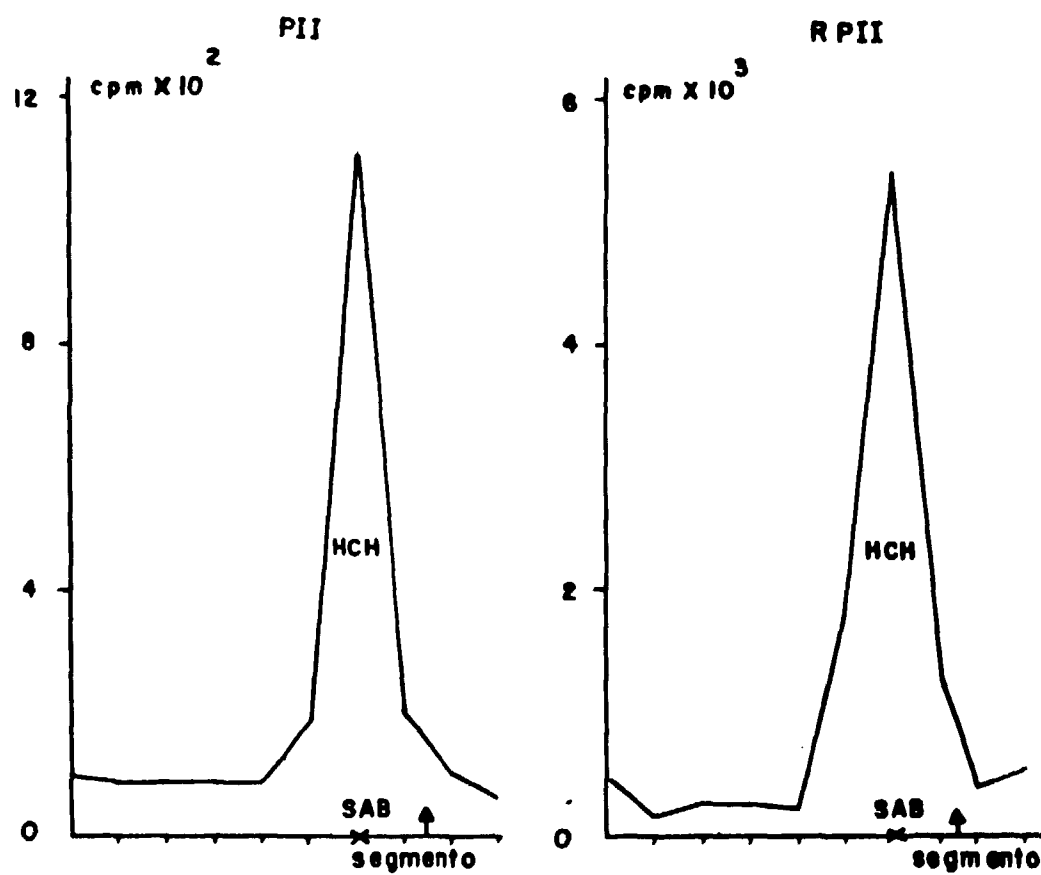


Figura 22 - O PII se Refere à Figura 12 e o RPII à Figura 19

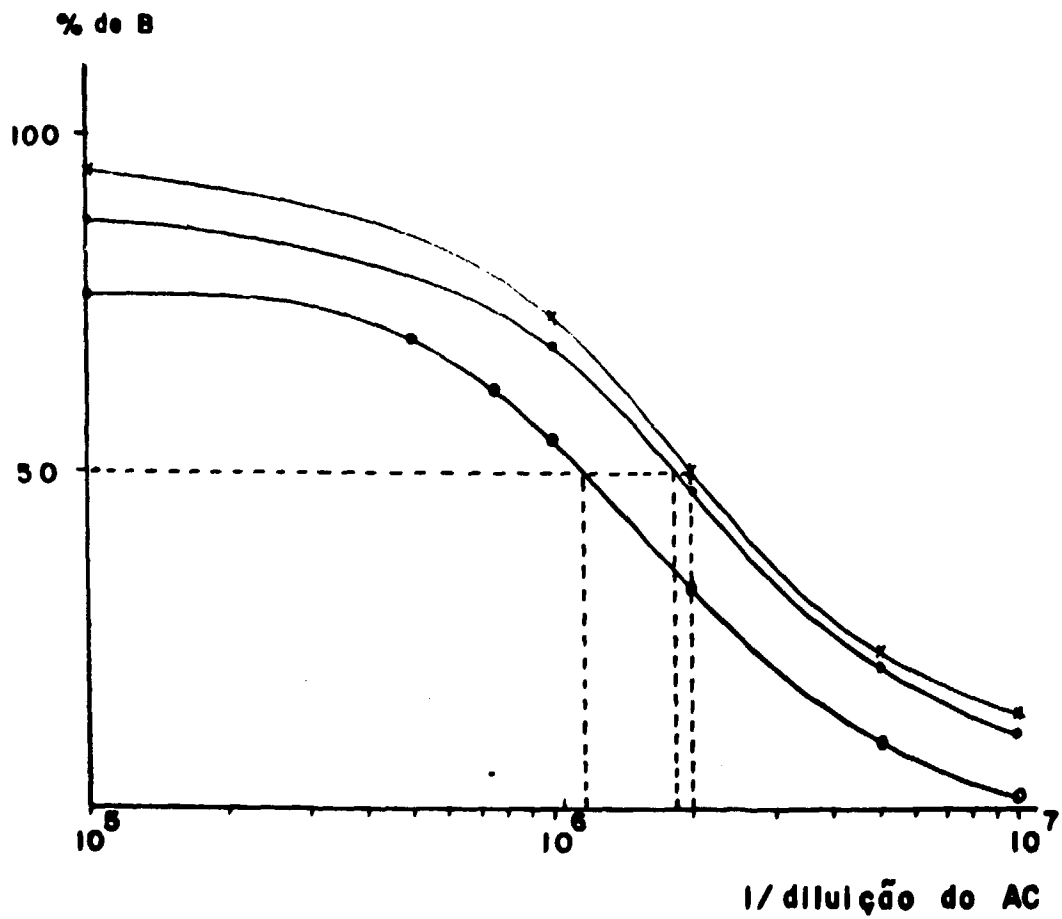
DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO ÓTIMA DO ANTICORPO PARA O  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH)

Figura 23 - A Separação das Frações Livre e Ligada foi Feita em EGPA

- x — x logo após a purificação (PII)
- — ● logo após a repurificação (RPII)
- — ○ 1 mês após a repurificação (RPII)

ELETROFORETOGRAMAS DOS PICOS II OBTIDOS APÓS A PURIFICAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 CORRESPONDENTES AO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) OBTIDOS EM QUATRO MARCAÇÕES. DETERMINAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE.

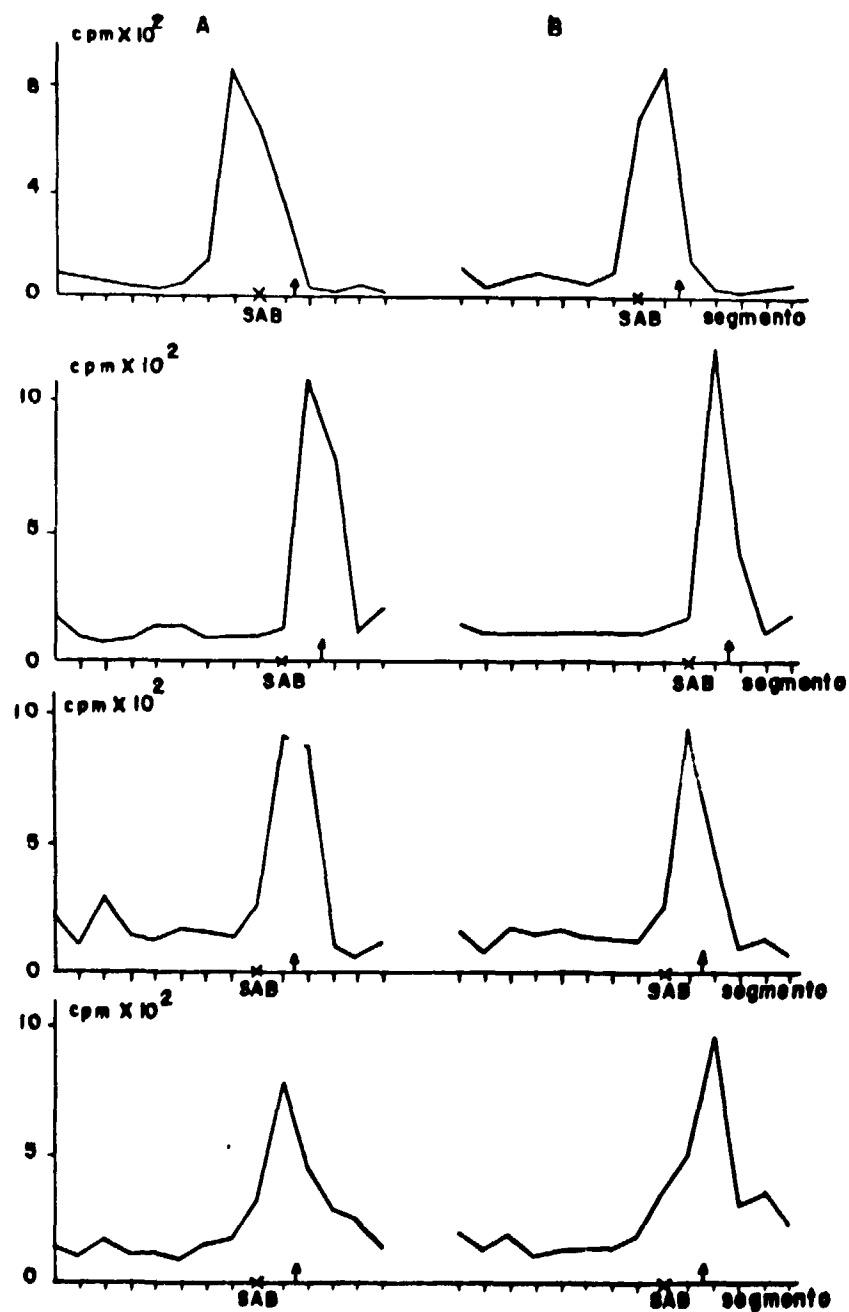


Figura 24 - A - Eletroforeses Controle Realizadas com Amostras de PII sem Anticorpo  
 B - Eletroforeses das Amostras de PII Incubadas com Anticorpo. Diluído - 1:10<sup>5</sup>

ESTUDO SOBRE O COMPORTAMENTO RADIOIMUNOLÓGICO DO HCH(WHO) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM EM SOLUÇÃO A  $-20^{\circ}\text{C}$

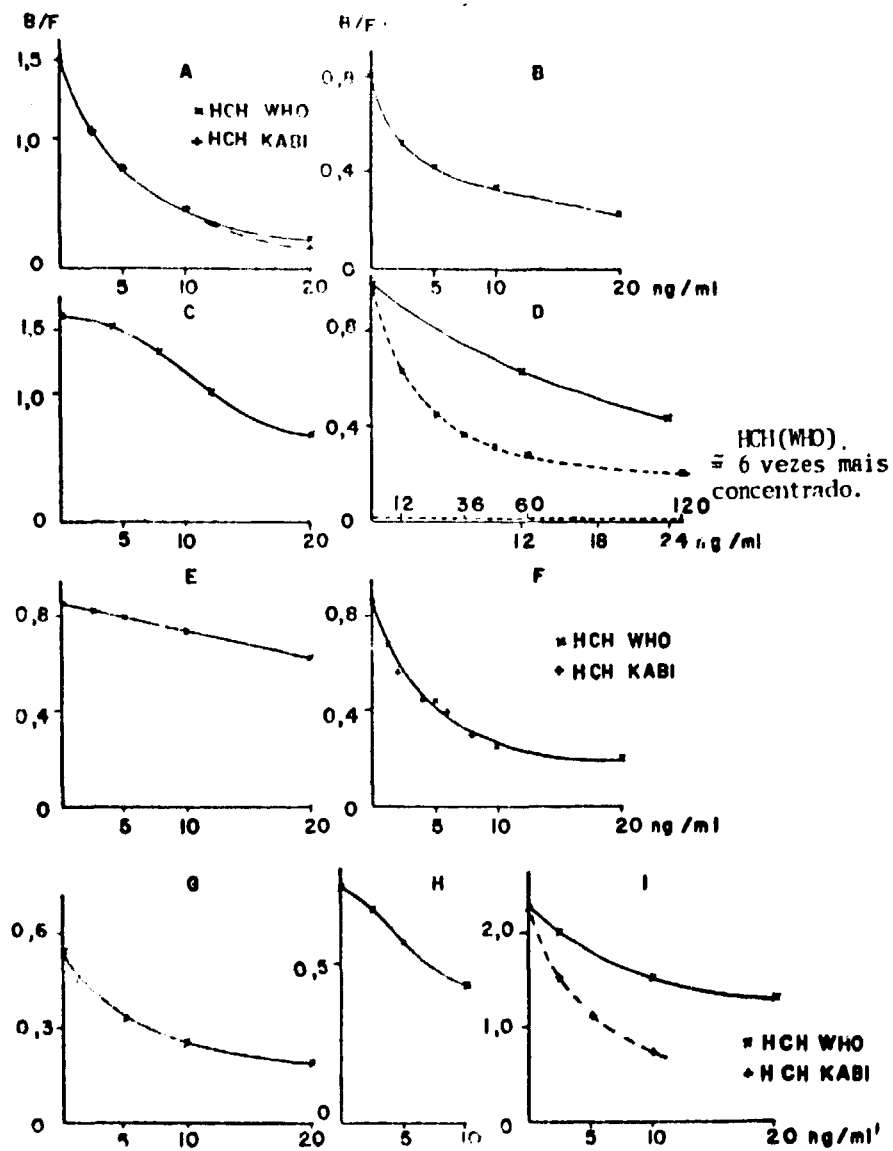


Figura 25 — A — Primeira Ampola de HCH(WHO) Liofilizada foi Dissolvida logo Após seu Recebimento e a Segunda Quatro meses depois.

- A — 1a. ampola dissolvida há 30 dias
- B — 1a. ampola dissolvida há 60 dias
- C — 1a. ampola dissolvida há 90 dias
- D — 1a. ampola dissolvida há 105 dias
- E — 1a. ampola dissolvida há 120 dias
- F — 2a. ampola dissolvida há 5 dias
- G — 2a. ampola dissolvida há 30 dias
- H — 2a. ampola dissolvida há 120 dias
- I — 2a. ampola dissolvida há 240 dias

curva desenvolvida com esse hormônio se sobrepõe à curva realizada com o HCH(KABI), o que não ocorre quando a solução de HCH(WHO) é estocada durante 240 dias (Figura 25 A, F e I).

O HCH(WHO) após permanecer 105 dias em solução tem sua imunorreatividade diminuída, apresentando uma curva satisfatória somente quando usado em concentrações aproximadamente seis vezes maior, o que é inadequado para uso em RIE (Figura 25 D).

Entretanto, o HCH(KABI) utilizado manteve-se estável em solução do início ao final do experimento.

## 2 – Hormônio de Crescimento Humano do Instituto de Energia Atômica Marcado com $^{125}\text{I}$ – $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)

### 2.1 – Purificação em Gel de Sephadex G-75

Já ficou assinalado que o HCH(NIH) tem meia vida imunológica relativamente curta quando estocado liofilizado e que o HCH(WHO) quando dissolvido e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mostra redução da sua imunorreatividade mesmo quando não iodado.

Como o HCH(IEA) vem sendo extraído e purificado periodicamente para fins terapêuticos, tentou-se usar a fração central do pico do hormônio (Figura 5) para marcações com  $^{125}\text{I}$  e eventual produção de conjuntos diagnósticos para radioimunoensaio. As marcações obtidas foram satisfatórias e o padrão geral de eluição em gel de Sephadex G-75 pode ser visto na Figura 26. Foram obtidos três picos, sendo a separação entre os picos I e II um pouco menos eficiente que no caso do  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH).

Não foi evidenciada a presença do pico III.

### 2.2 – Eletroforese dos Picos Obtidos na Purificação

Uma amostra da fração central de cada pico referente à Figura 26 foi submetida à EGPA logo após a purificação.

Os eletroforetogramas destes picos podem ser vistos na Figura 27.

O PI apresentou-se semelhante ao obtido após a purificação do  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH), exibindo os danificados D1, D2 e D3.

O PII sofreu migração um pouco mais rápida que o  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH), não coincidindo com a posição da SAB e, aproximando-se mais do traçador.

O PIV, correspondente ao iodo livre, mostrou o padrão eletroforético habitual.

### 2.3 – Imunorreatividade do $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)

A curva de diluição ótima do anticorpo está representada graficamente na Figura 28, revelando imunorreatividade similar à obtida com o  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) (Figura 10).

### 2.4 – Comparação entre o $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) e o $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH)

Na Figura 29 comparam-se os eletroforetogramas dos picos II do  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) e do  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA). Ambos os hormônios foram submetidos a EGPA antes de iodação, sendo

CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)  
LOGO APÓS A IODACÃO

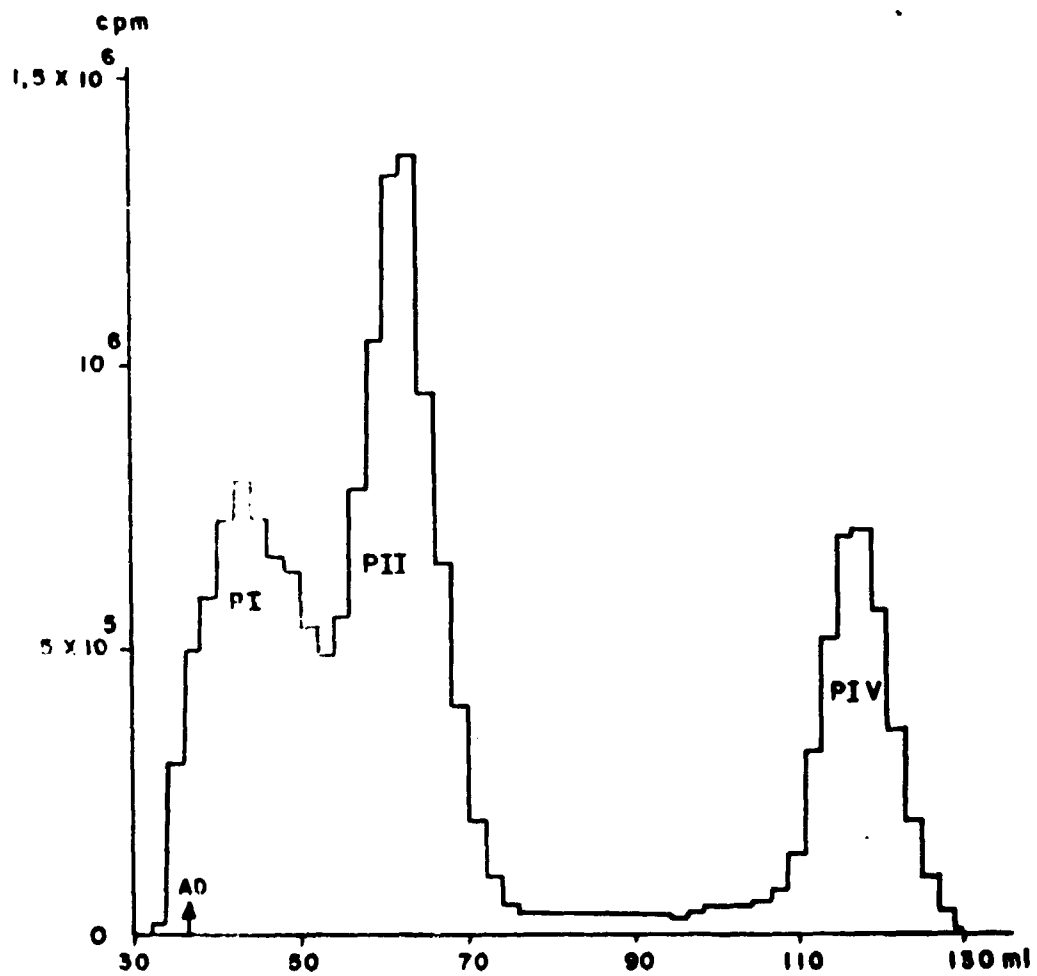


Figura 26 - Tampão Veronal 0,025M - pH 8,6 - 1% SAB  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 2 ml

ELETROFORETOGRAMAS DOS PICOS OBTIDOS NA FILTRAÇÃO EM GEL DE  
SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)

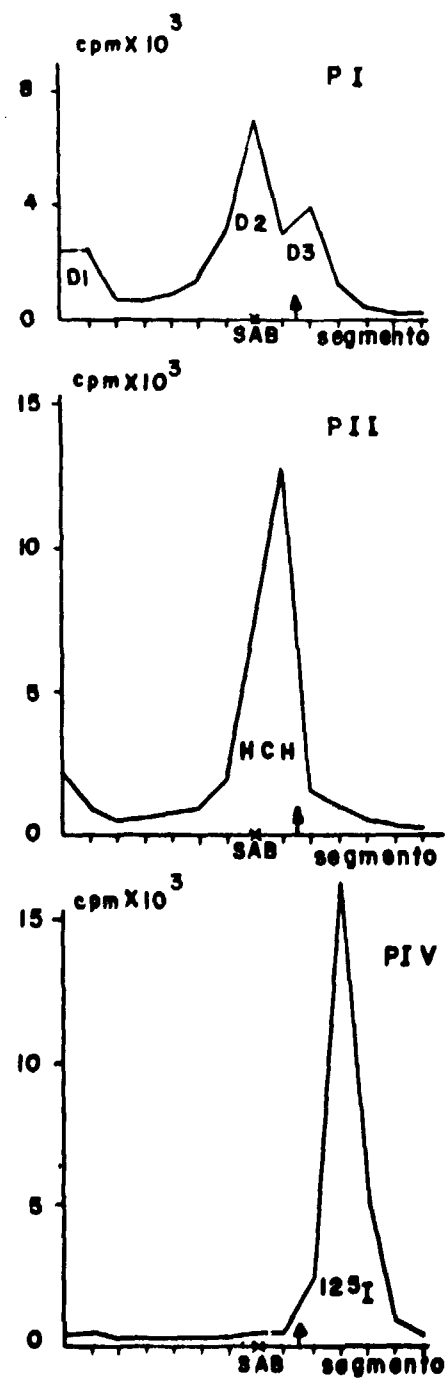


Figura 27 - Estes Electroforetoogramas Referem-se aos Picos da Figura 26

DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO ÓTIMA DO ANTICORPO PARA O  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)

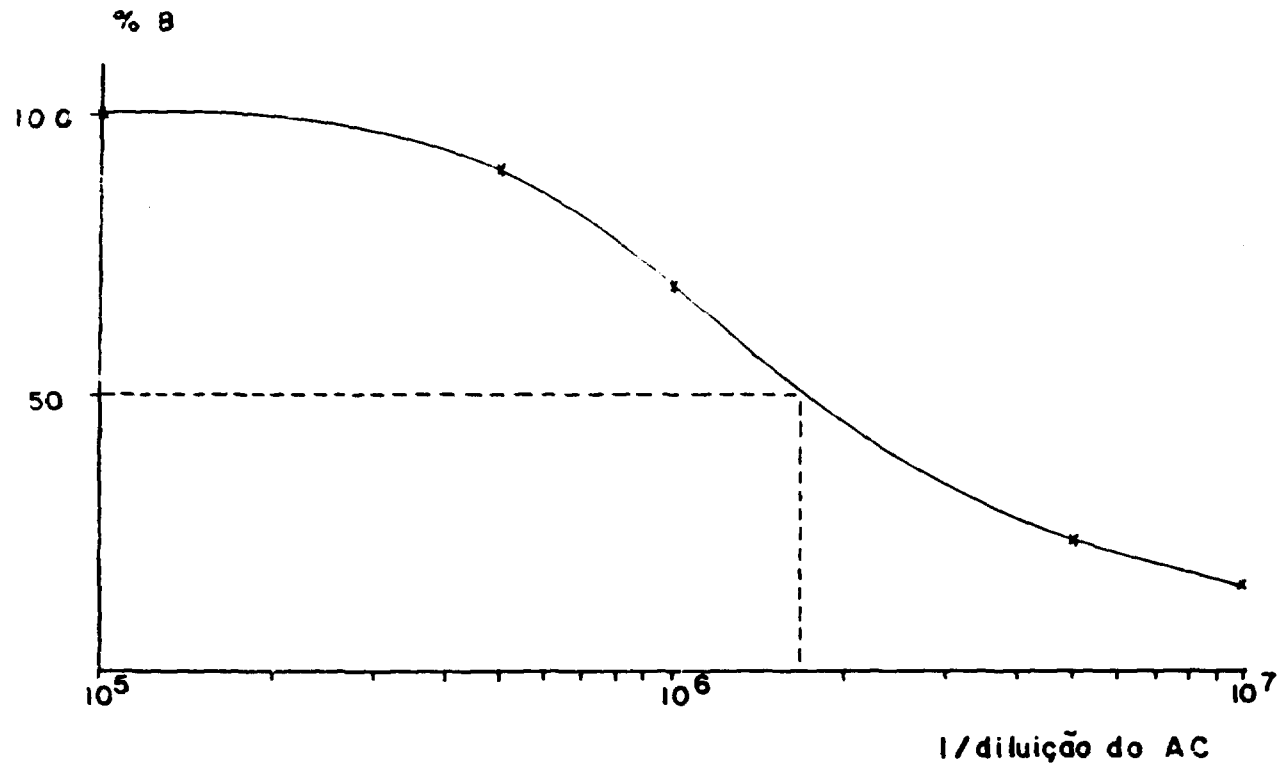


Figura 28 - A Separação das Frações Livre e Ligada foi Feita em EGPA



ELETROFORETOGRAMAS DOS PICOS II OBTIDOS POR FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) E DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES QUANDO NÃO IODADOS

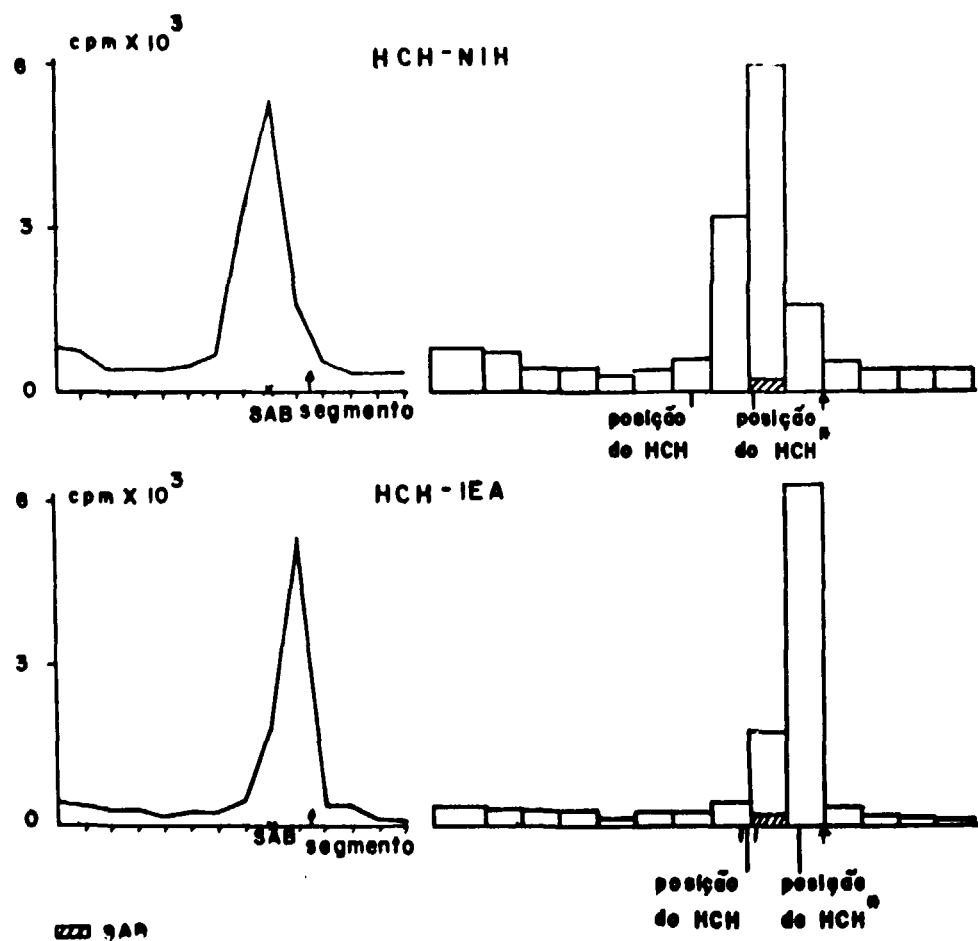


Figura 29 - Nota-se um Aumento da Mobilidade nas Preparações Marcadas em Relação às Preparações Frias

subsequentemente corados. Na Figura 30 observa-se que o HCH(NIH) apresentou uma banda principal e o HCH(IEA) duas. A partir dos valores das taxas de migração ( $R_m$ ) referentes às duas preparações frias, calcularam-se as suas posições no gel, representados na Figura 29, contendo os respectivos produtos iodados, possibilitando uma comparação entre estes valores.

### 3 – Estudo dos Fatores que Interferem na Estabilidade do $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)

#### 3.1 – Danificação de Marcação

##### 3.1.1 – EGPA do Produto Marcado Antes da Purificação

Logo após a reação de iodação foram retirados  $10\ \mu\text{l}$  para controle da radioatividade real presente na reação e colocados em  $990\ \mu\text{l}$  de tampão veronal  $0,025\text{M}$  – pH 8,6 1% SAB (solução 1) conforme já descrito. Este procedimento foi repetido usando-se o mesmo tampão sem SAB. A Figura 31 mostra os eletroforetogramas da solução 1 com e sem SAB. Pode-se notar que na ausência de albumina há formação de D1 e uma pequena quantidade de hormônio está presente. Na presença de albumina nota-se o pico do hormônio em sua posição normal e quantidade insignificante de D1. Em ambos os casos o pico do iodo livre está presente.

##### 3.1.2 – Purificação em Gel de Sephadex G-75 na Ausência de SAB

Fez-se uma reação de iodação nas condições habituais sendo a purificação realizada no mesmo tampão sem adicionar a SAB.

O cromatograma pode ser visto na Figura 32. Separaram-se dois picos: o primeiro (PI) coincidente com o volume vazio da coluna determinado pelo azul dextran (peso molecular 2 000 000), e o segundo (PIV), na posição do iodo livre. Na ausência de azul de dextran manteve-se o mesmo perfil cromatográfico.

Os eletroforetogramas desses picos e da solução 1 (antes da purificação e sem SAB) são mostrados na Figura 33.

O PI apresentou-se bastante diferente do PI obtido em uma purificação normal com SAB, mostrando um pico alto de D1.

##### 3.1.3 – Marcações Falsas

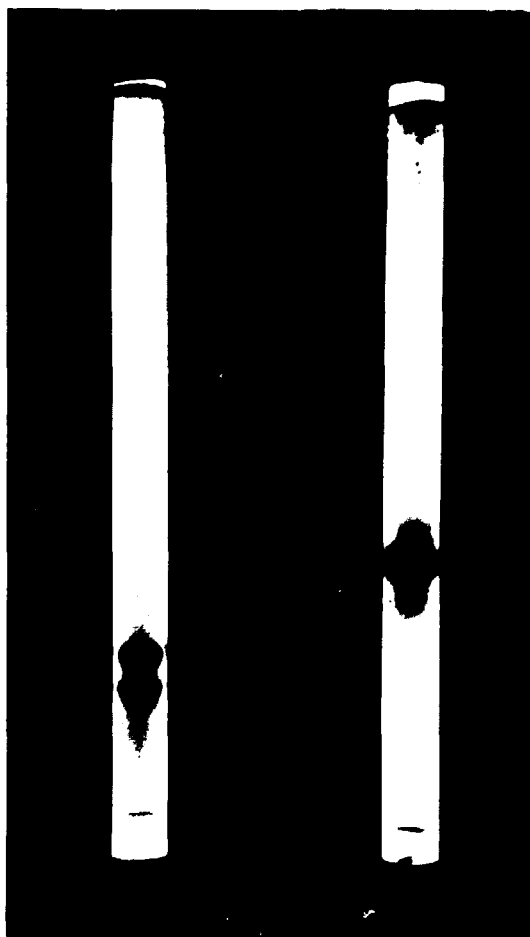
Foram feitas duas marcações falsas simultâneas sendo adicionados todos os reagentes, com exceção do HCH.

Os eletroforetogramas das soluções 1 (produto antes da "purificação" com e sem SAB) podem ser vistos na Figura 34 onde a área hachurada indica radioatividade carregada pela SAB. O iodo livre apresentou-se em ambos os casos na posição normal.

A "purificação" da marcação falsa em gel de Sephadex G-75 na presença de SAB revelou dois picos (Figura 35). O pico I não coincide com o volume vazio e está na posição de albumina determinada com azul de bromofenol. O PIV está na posição do iodo livre.

A Figura 36 mostra a "purificação" da marcação falsa na ausência de SAB, revelando apenas o pico do iodo livre.

A Figura 37 mostra a passagem no  $\text{Na}^{125}\text{I}$  puro através da coluna na presença da proteína carregadora (SAB), mostrando o mesmo padrão de eluição.

**GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO AS BANDAS DO HCH(NIH) E DO HCH(IEA)**

**Figura 30 – O Gel foi Corado com Comessie Brilliant Blue e Descorado com Ácido Acético a 7%**

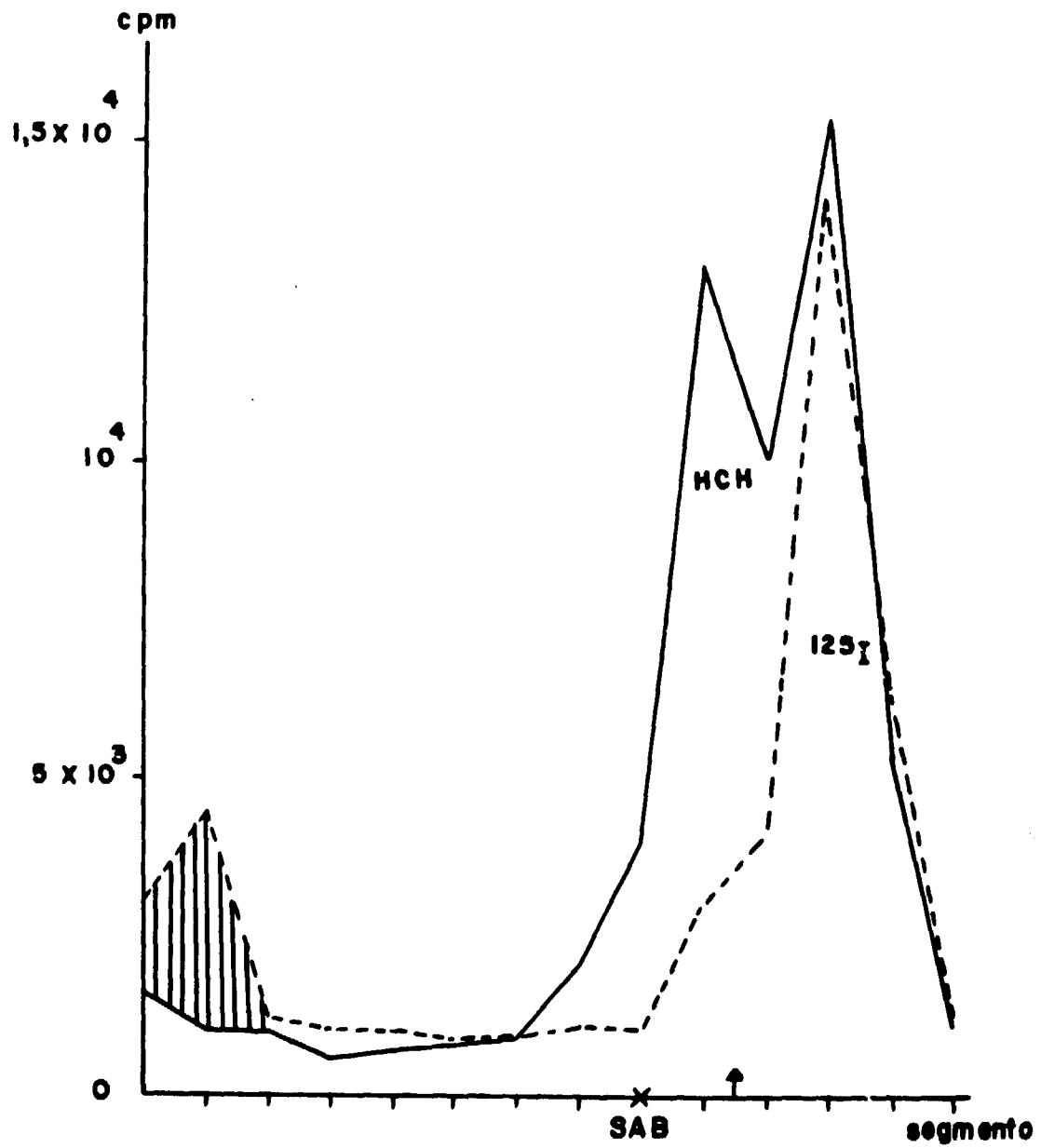
ELETROFORETOGRAMAS DA MISTURA DE MARCAÇÃO DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) NA PRESENÇA  
OU NÃO DE SAB

Figura 31 - — com SAB; - - - sem SAB

CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO  
 $^{125}\text{I}$  HCH(IEA) NA AUSÊNCIA DE SAB

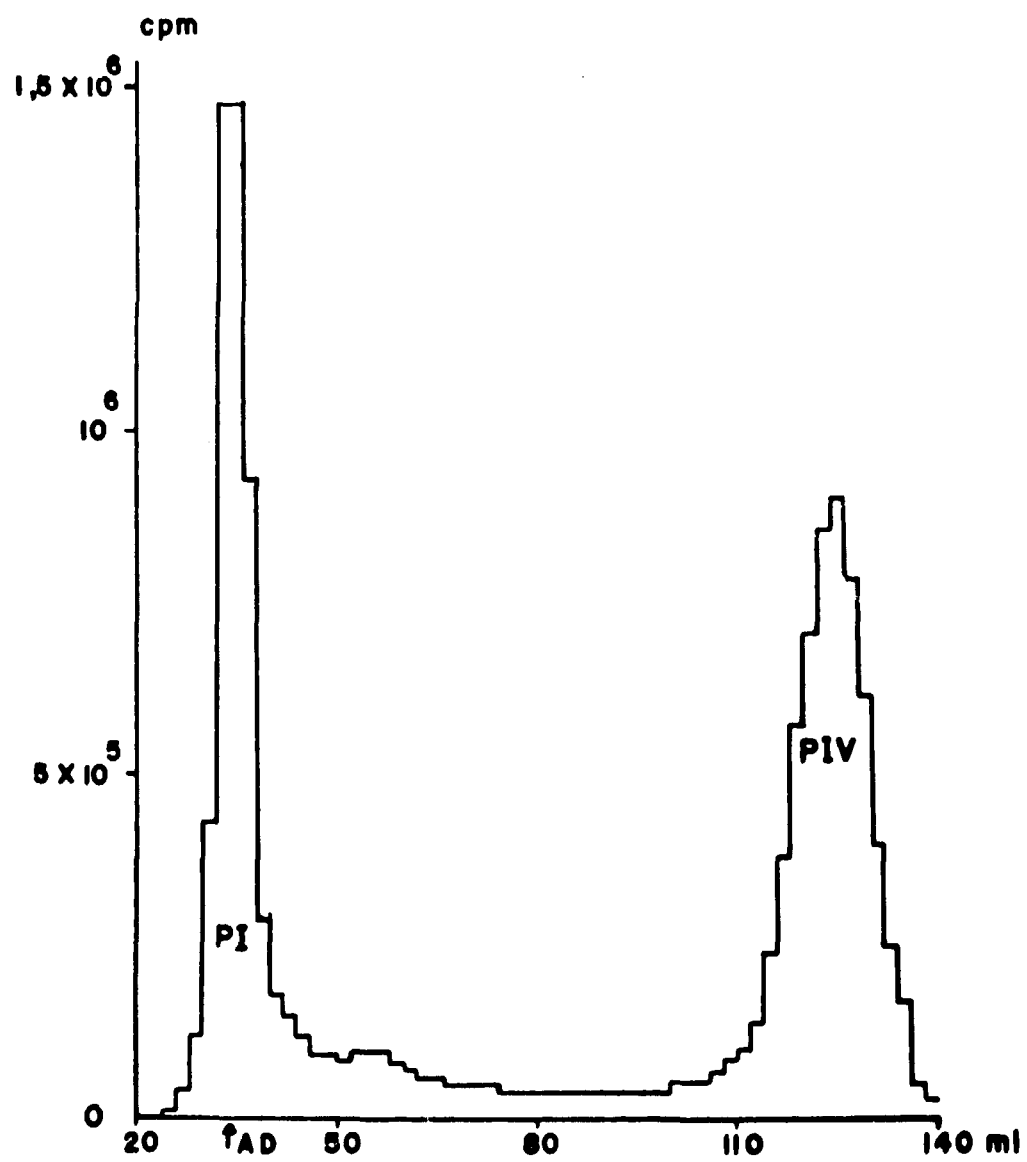


Figura 32 - Tampão Veronal 0,025M pH 8,6  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 2 ml

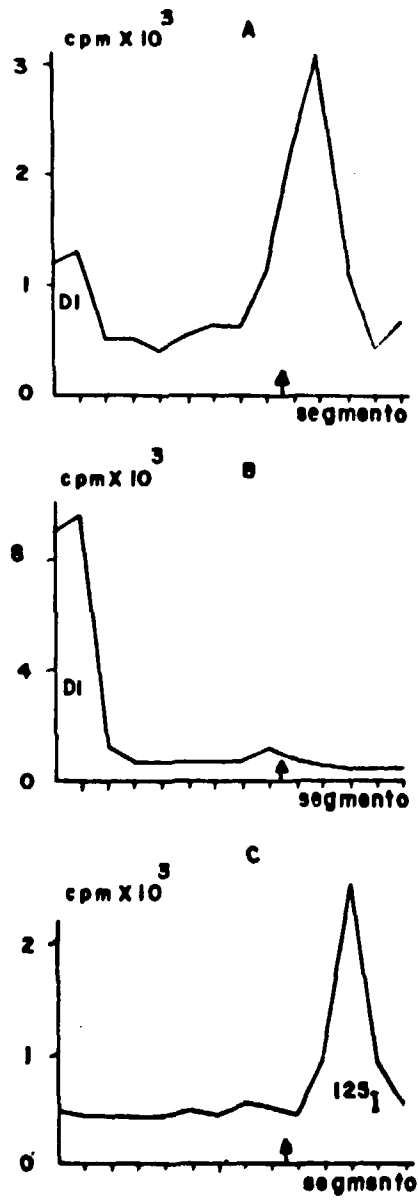
ELETROFORETOGRAMAS DO  $^{125}\text{I}$ -HCH-IEA PURIFICADO NA AUSÊNCIA DE SAB

Figura 33 - Os Picos I e IV Referem-se à Figura 32  
 A - Antes da purificação (solução 1 sem SAB)  
 B - Pico I  
 C - Pico IV

ELETROFORETOGRAMAS DA MARCAÇÃO FALSA ANTES DA "PURIFICAÇÃO"  
NA PRESENÇA OU NÃO DE SAB

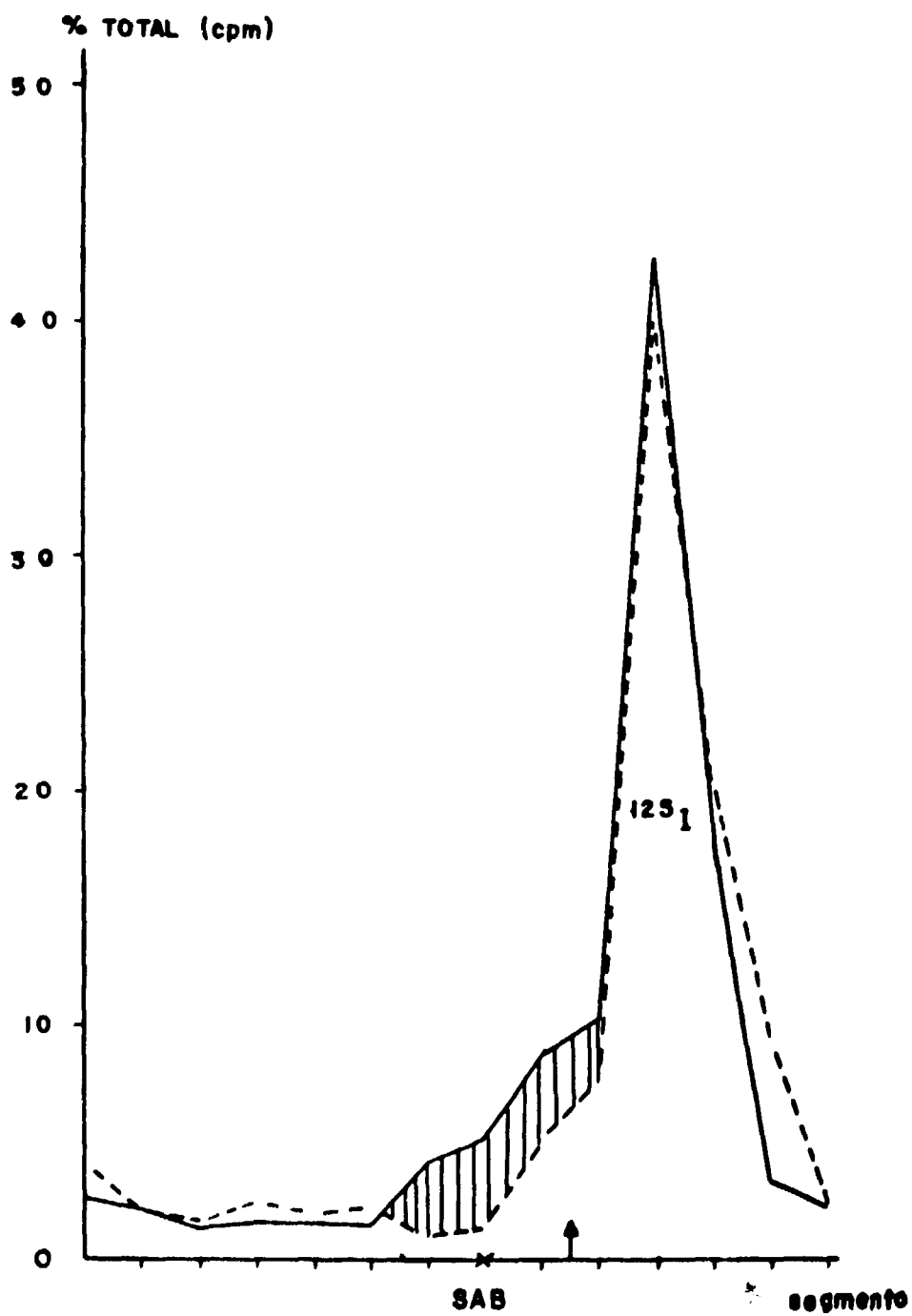


Figura 34 - — com SAB; - - - sem SAB

CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DA MARCAÇÃO  
FALSA NA PRESENÇA DE SAB

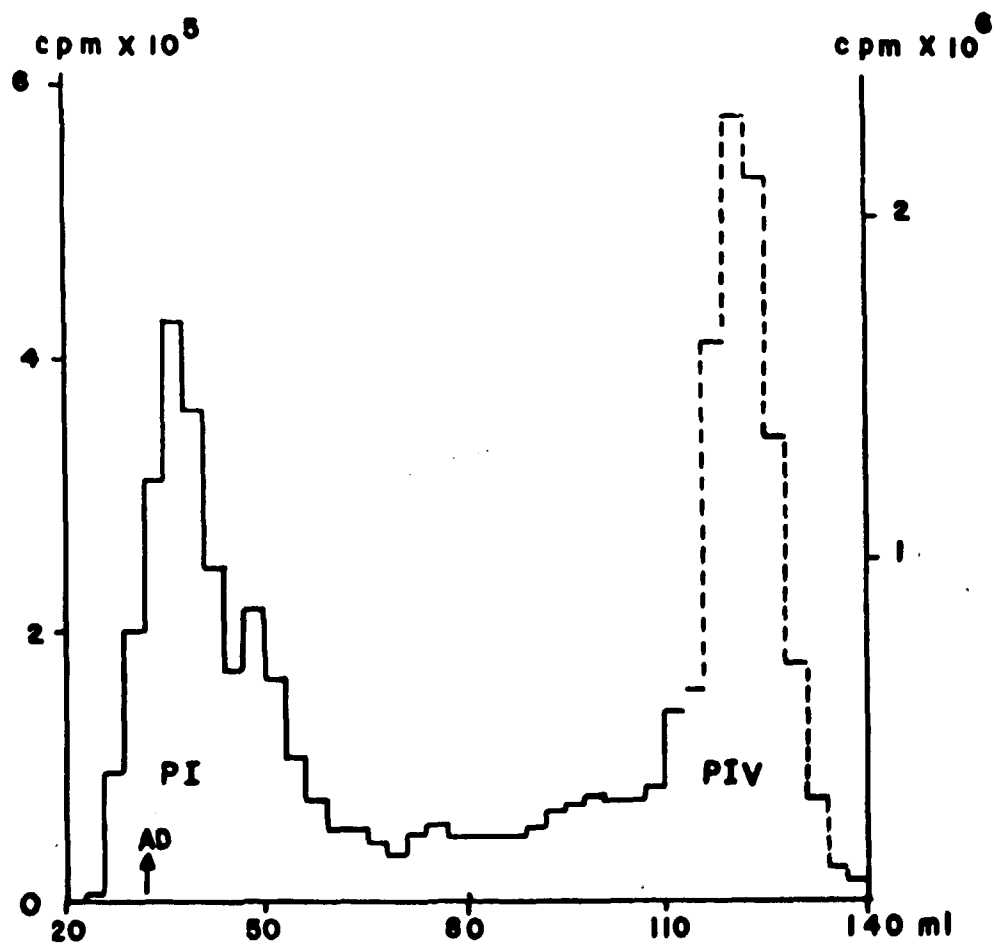


Figura 35 - O Traçado Pontilhado Refere-se à Escala da Direita  
Tempo Veronal 0,025M - pH 8,6 - 1% SAB  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 3 ml



CRÔMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DA MARCAÇÃO  
FALSA NA AUSÊNCIA DE SAB

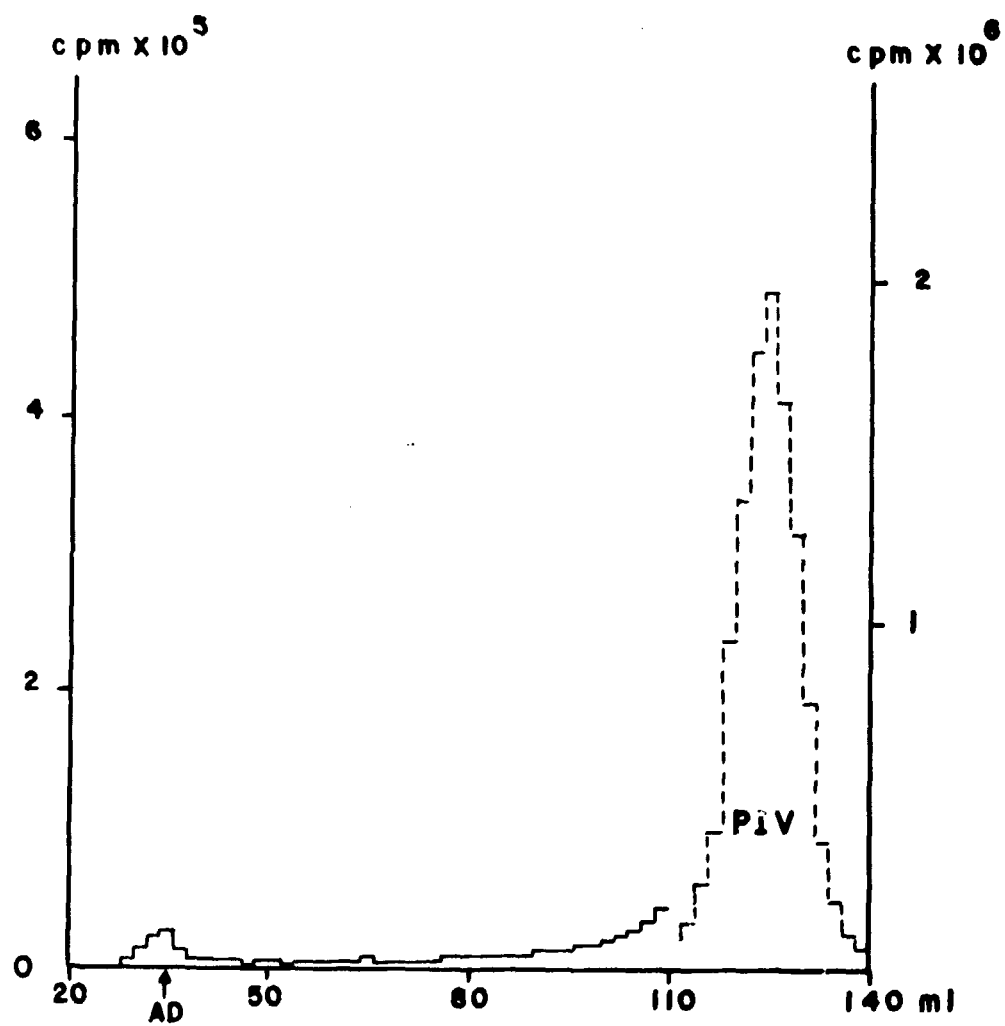


Figura 36 - O Traçado Pontilhado Refere-se a Escala da Direita  
Tempo Veronal 0,025M - pH 8,6  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 2 ml

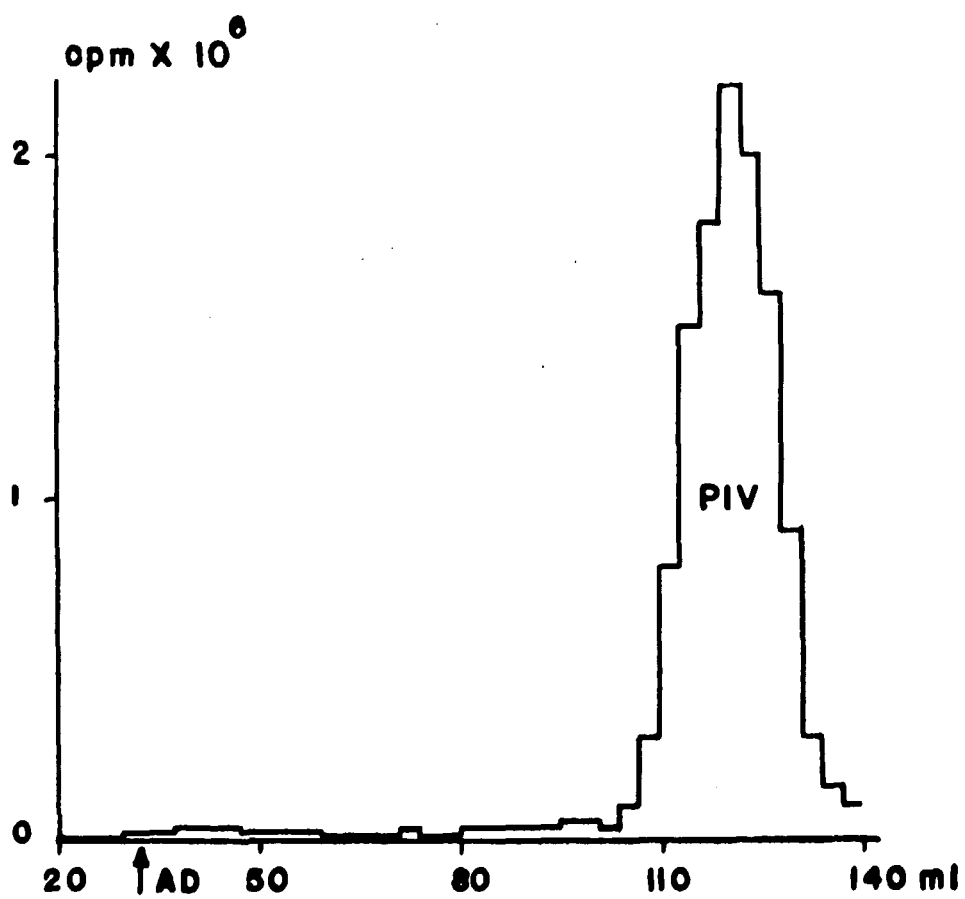
CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO Na <sup>125</sup>I

Figura 37 - Tampão Veronal 0,025M - pH 8,6 - 1% SAB  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 3 ml

Os eletroforetogramas dos picos das marcações falsas podem ser vistos na Figura 38. O PI da "purificação" com SAB apresenta D2 e D3 e um pico no 3º e 4º segmentos. Não há atividade significativa em correspondência do D1. O PIV de ambas as purificações saiu na posição do iodo livre.

A fim de verificar a possível interferência dos artefatos da técnica de EGPA, foi realizado o seguinte teste:

O PI da marcação falsa obtido após "purificação" com SAB (Figura 35) e estocado a 4°C por uma semana, foi submetido à nova eletroforese em três condições diferentes na mistura de polimerização do gel da amostra.

- nas condições normais
- na ausência de traçador (azul de bromofenol)
- na ausência de soro de cobaia

Os respectivos eletroforetogramas podem ser vistos na Figura 39.

Para verificar qual forma de iodo poderia ser carregada pela SAB, procedeu-se ao seguinte experimento:

Preparou-se uma solução de Na <sup>125</sup>I na presença de carregador isotópico (NaI) usando tampão veronal 0,025M - pH 8,6 - 0,25% SAB e 1% soro de cobaia.

Em duas alíquotas de 200 µl desta solução adicionou-se respectivamente 1 mg de persulfato de amônio como oxidante, para obtenção de I<sub>2</sub> e 1 mg de tiossulfato de sódio para assegurar a manutenção do iodo na forma reduzida (I<sup>-</sup>).

As eletroforeses foram feitas na presença ou não de traçador, para determinar sua provável interferência. Os eletroforetogramas vistos na Figura 40 mostram que a albumina carrega apenas a forma oxidada do iodo, não havendo nenhuma interferência do traçador.

Objetivando-se comprovar a heterogeneidade do PI obtido na purificação do produto marcado - <sup>125</sup>I-HCH(IEA), colheram-se duas amostras deste pico para estudo em EGPA, assinaladas com setas na Figura 41. A primeira fração (a) corresponde ao volume vazio da coluna e a segunda (b) à posição de albumina. Os respectivos eletroforetogramas podem ser vistos na Figura 42. A fração a (PIa) mostra uma grande quantidade de D1 o que não ocorre na fração b (PIb) onde são notados os componentes D2 e D3 não bem individualizados. No PIa nota-se também a presença de D2.

### 3.2 - Denificação de Estocagem

#### 3.2.1 - Estudo Comparativo entre as Diferentes Condições de Estocagem

O <sup>125</sup>I-HCH(IEA) puro (PII da Figura 28), foi fracionado e estocado, parte liofilizado (10 alíquotas), parte em solução mantida a -20°C (10 alíquotas) e uma fração em solução estocada a 4°C. A partir da segunda semana de iodação e durante seis semanas consecutivas essas amostras foram submetidas à EGPA. A coluna A da Figura 43 mostra os eletroforetogramas do hormônio mantido liofilizado a -20°C e submetido à dissolução imediatamente antes de cada eletroforese. Na coluna B pode-se ver o comportamento do hormônio mantido a -20°C e descongelado antes de cada eletroforese. A coluna C mostra a primeira amostra descongelada inicialmente na segunda semana, que sofreu novos congelamentos e descongelamentos semanais por ocasião de cada análise. A coluna D mostra a primeira amostra de hormônio liofilizado que sendo dissolvido na segunda semana foi mantida a 4°C e analisada semanalmente. As respectivas proporções de denificados e iodo livre destes eletroforetogramas podem ser vistas na Tabela IV.

ELETROFORETOGRAMAS DOS PICOS OBTIDOS APÓS FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX  
G-75 DAS MARCAÇÕES FALSAS NA PRESENÇA OU NÃO DE SAB

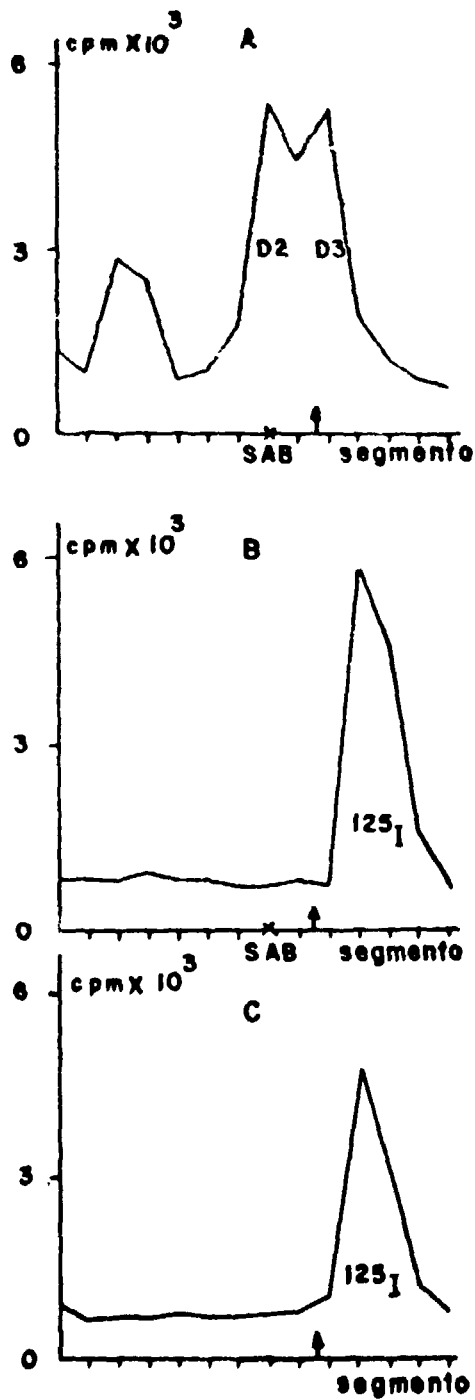


Figura 38 - A - Pico I de Figura 35 (com SAB)  
B - Pico IV de Figura 35 (com SAB)  
C - Pico IV de Figura 36 (sem SAB)

ELETOFORETOGRAMAS DO PICO I DA MARCAÇÃO FALSA "PURIFICADA" COM SAB  
SOB CONDIÇÕES DIFERENTES NA EGPA

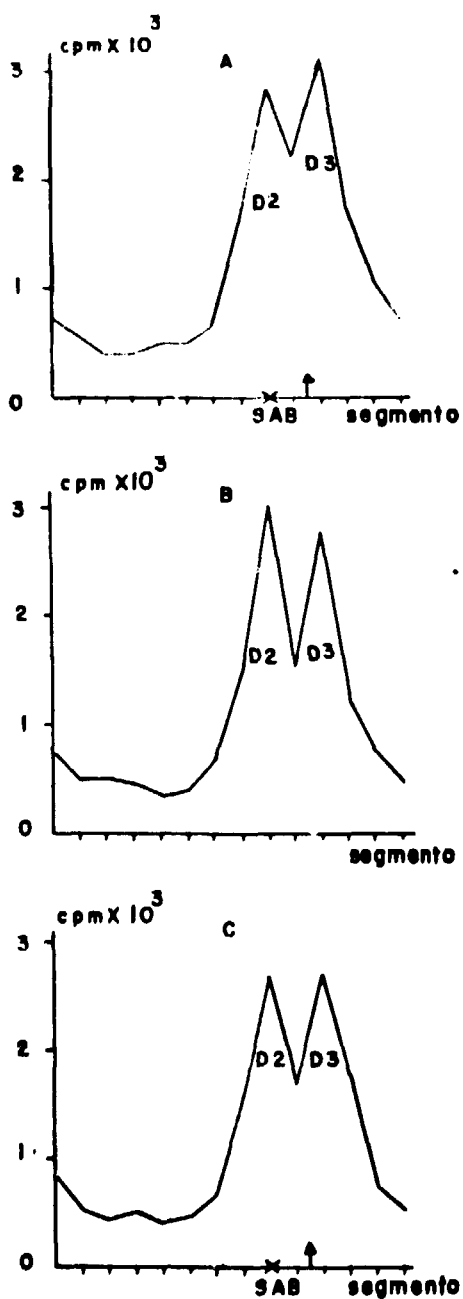


Figura 39 - A - Tampão Veronal 0,025M - pH 8,6 - 0,25% SAB - 1% Soro de Cobala, com Traçador  
B - Tampão Veronal 0,025M - pH 8,6 - 0,25% SAB - 1% Soro de Cobala, sem Traçador  
C - Tampão Veronal 0,025M - pH 8,6 - 0,25% SAB - sem Soro de Cobala e com Traçador

ELETROFORETOGRAMAS DAS FORMAS OXIDADA E REDUZIDA DE  $^{125}\text{I}$  NA PRESENÇA DE SAB COM OU SEM TRAÇADOR

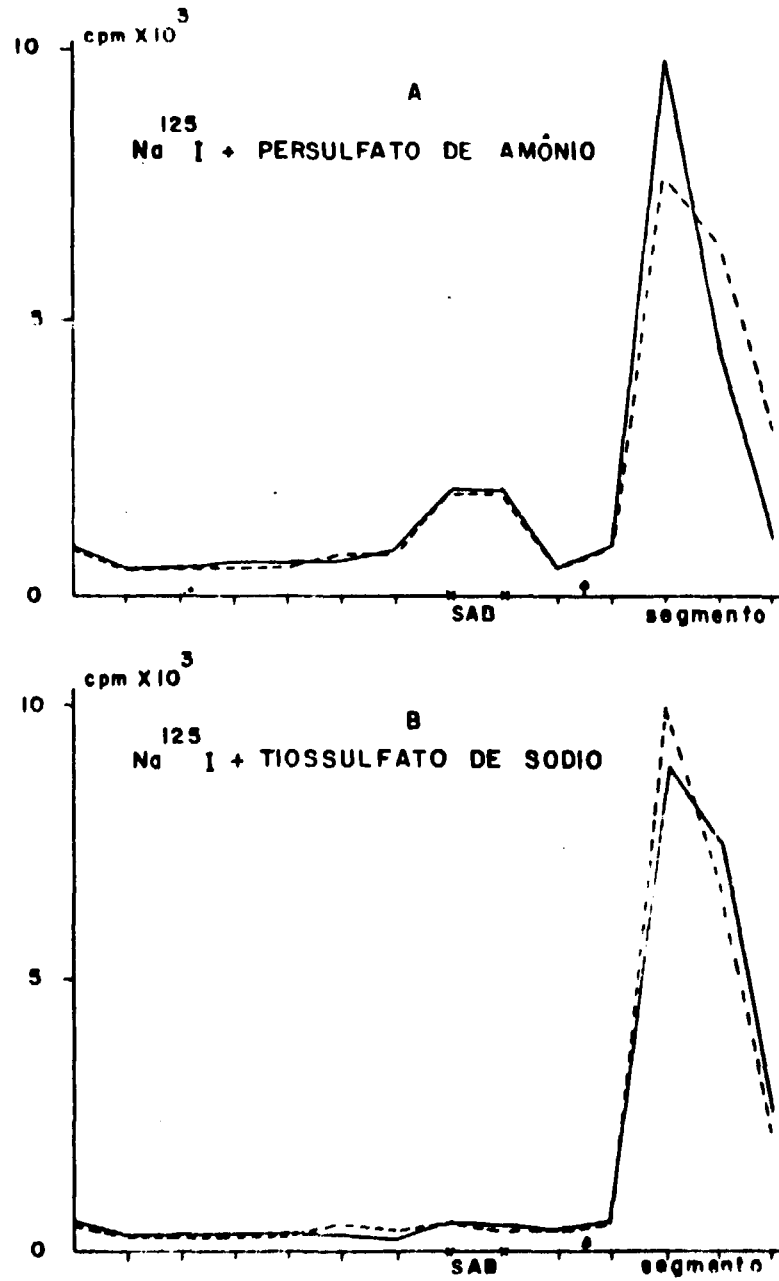


Figura 40 - Nota-se que Somente a Forma Oxidada Liga-se à Albumina e que não há Interferência do Traçador em Ambos os Casos.

- A -  $\text{I}_2$  (forma oxidada)
- B -  $\text{I}^-$  (forma reduzida)
- com traçador
- - - sem traçador

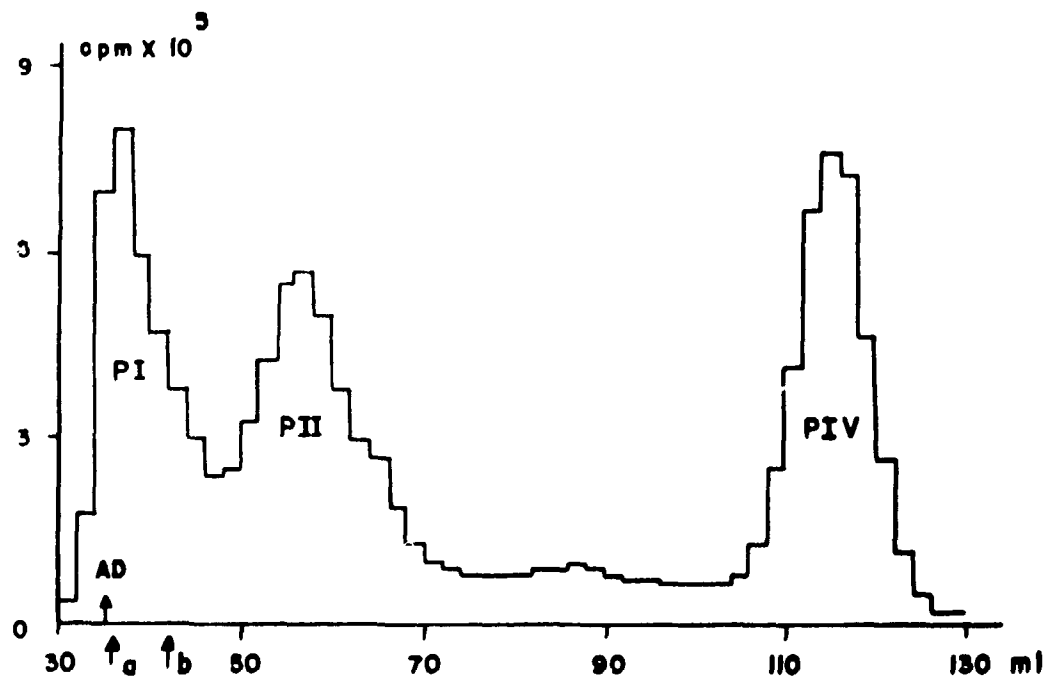
CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)

Figura 41 - As Setas Indicam as Amostras que Foram Submetidas à EGPA.  
Tampão Veronal 0,025M - pH 8,6 - 1% SAB  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 2 ml

## ELETROFORETOGRAMAS DAS FRAÇÕES a e b DO PICO I

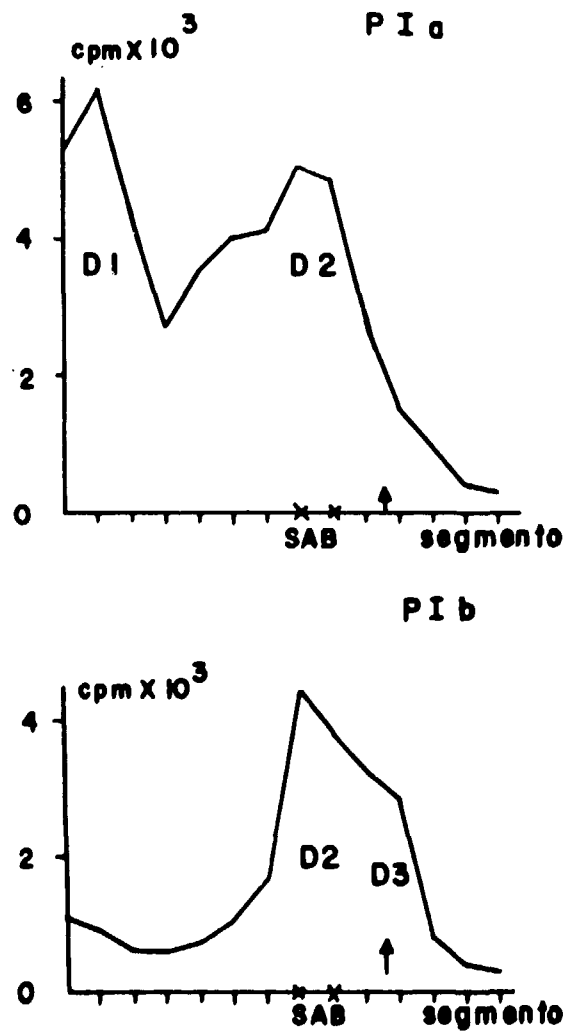


Figura 42 -- As Frações a e b Referem-se à Figura 41 e Correspondem Respectivamente ao Volume Vazio e ao Volume de Eluição de SAB



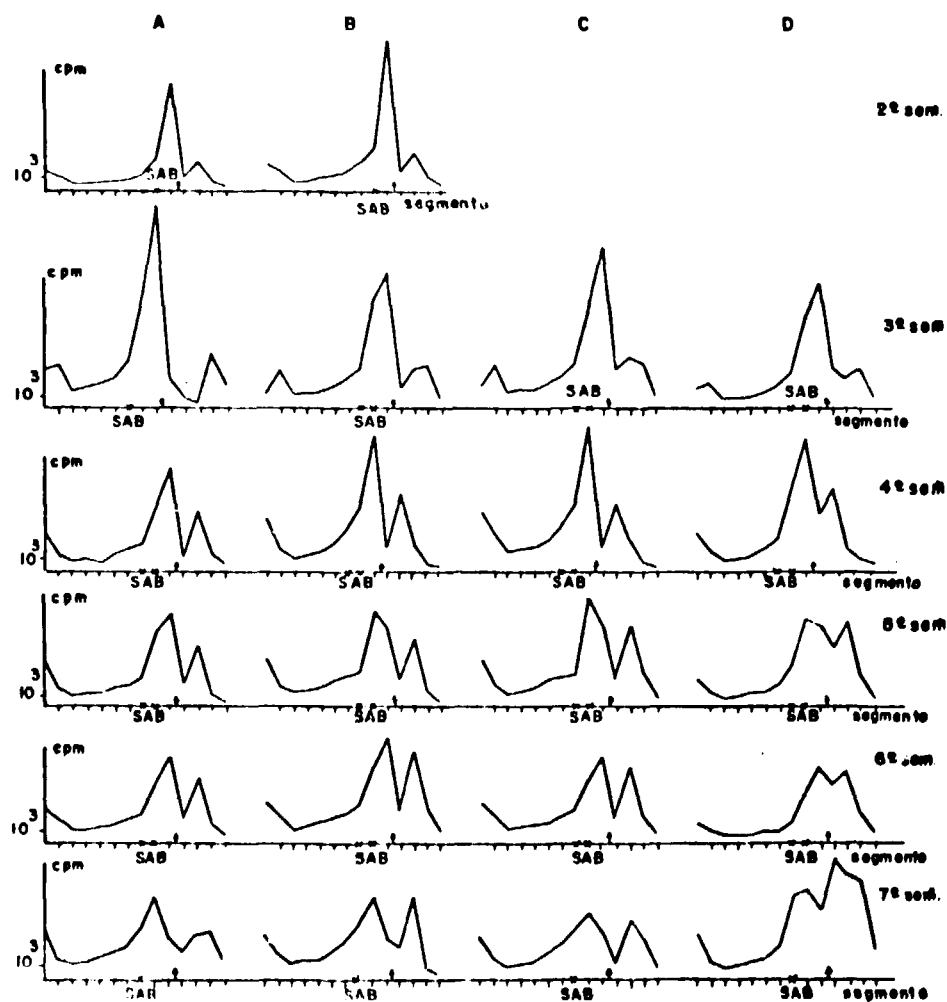
ESTUDO EM EGPA DAS CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) PURIFICADO

Figura 43 -- A -- Hormônio Liofilizado ( $-20^{\circ}\text{C}$ )  
 B -- Hormônio Congelado ( $-20^{\circ}\text{C}$ )  
 C -- Hormônio Submetido a Congelamentos e Descongelaamentos Múltiplos.  
 D -- Hormônio Liofilizado Dissolvido e Mantido a  $4^{\circ}\text{C}$ .  
 Os Valores Porcentuais Relativos aos Picos dos Danificados e  $^{125}\text{I}$  Encontram-se na Tabela IV

Tabela IV

Valores Percentuais dos Danificados e  $^{125}\text{I}$  Formados a Partir do  $^{125}\text{I}$ -HCH (IEA) em Função do Tempo e das Condições de Estocagem

Tempo de Estocagem (Semanas)	Liofilizado Mantido a $-20^{\circ}\text{C}$		Solução Mantida a $-20^{\circ}\text{C}$		Solução Mantida a $-20^{\circ}\text{C}$ e Descongelada Várias Vezes		Liofilizado que Após Dissolvido foi Mantido a $4^{\circ}\text{C}$	
	D1	$^{125}\text{I}$	D1	$^{125}\text{I}$	D1	$^{125}\text{I}$	D1	D3 + $^{125}\text{I}$
2 <sup>o</sup>	10,4	15,0	9,9	15,6	---	---	---	---
3 <sup>o</sup>	12,1	11,8	7,7	15,4	8,0	17,1	8,0	8,3
4 <sup>o</sup>	12,8	22,4	13,5	24,5	15,8	21,9	9,2	32,6
5 <sup>o</sup>	14,0	22,2	13,6	22,9	12,1	26,7	8,0	38,3
6 <sup>o</sup>	13,5	26,7	11,6	29,9	14,2	28,6	5,5	49,4
7 <sup>o</sup>	12,6	28,2	13,3	24,7	15,0	28,5	6,8	51,2

Como se pode observar nas colunas A, B e C, o  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) sofreu um aumento progressivo de desalogenação refletido nas proporções crescentes de iodo. É importante notar que nessas condições o componente D1 manteve-se praticamente inalterado. Na coluna D pode-se ver, a partir da quinta semana, o aparecimento do componente D3, que se torna progressivamente maior com o correr do tempo.

Após um mês de estocagem do  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) em solução respectivamente a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$  procedeu-se à repurificação em Sephadex G-75 (Figura 44). O cromatograma do hormônio estocado a  $4^{\circ}\text{C}$  (A) mostra RPI, RPIV e um pico intermediário deslocado para a direita (de peso molecular menor) em relação à posição do hormônio íntegro. Na estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$  (B) verifica-se RPI, RPII e RPIV nas posições habituais. Os eletroforetogramas destes picos podem ser vistos na Figura 45. Uma nítida diferença pode ser notada antes da repurificação (Figura 45 A) podendo se salientar o aparecimento do D3 na estocagem a  $4^{\circ}\text{C}$ . O RPI (Figura 45 B) mostra a presença de D1, e D2 mais espalhado no caso da estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Mas a diferença mais interessante refere-se ao RPII (Figura 45 C), revelando que a pequena alteração da posição desse pico no Sephadex fica bem visível na EGPA.

### 3.2.2 – Estudo sobre o Danificado D3

Já foi analisado o comportamento do  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) quando estocado liofilizado ou em solução, ambos a  $-20^{\circ}\text{C}$  e a  $4^{\circ}\text{C}$ . Desenvolveu-se um estudo cinético submetendo o  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) estocado a  $4^{\circ}\text{C}$  à EGPA quase diariamente (Figura 46). A formação de D3 pode ser vista na Figura 46. Este componente foi analisado sob várias condições em EGPA, como pode ser visto na Figura 47. Somente quando pré-incubado com 1 mg de tiosulfato de sódio (agente redutor) dissolvido em 200  $\mu\text{l}$  de tampão veronal 0,025M – pH 8,6 – 0,25% SAB e 1% de soro de cobaia, resultou no aparecimento de D2 (Figura 47 E), o que não ocorreu quando se repetiu o mesmo procedimento na ausência de SAB (Figura 47 F). Em ambos os casos, após a adição de tiosulfato de sódio verificou-se o aparecimento de iodo (Figura 47 E e F).

A eletroforese do  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) após um mês de estocagem a  $4^{\circ}\text{C}$  revelou pequena formação de D2, além do D3 presente desde o 15º dia (Figura 48 A).

O PI, obtido após a "Purificação" da marcação falsa na presença de SAB, após um mês de estocagem a  $4^{\circ}\text{C}$ , mostrou ainda na EGPA a presença de D2 e D3 (Figura 48 B).

Essas duas amostras, contendo D2 e D3, uma em presença de HCH e outra não, foram submetidas a refiltração em gel de Sephadex G-75 (Figura 49).

Verificou-se na Figura 49A a existência do RPI, ausência do RPII e radioatividade distribuída em pequenos picos entre a posição do RPII e RPIV. Cada fração assinalada com uma seta foi submetida à EGPA e depois incubada com excesso de anticorpo (1:10<sup>5</sup>) por três dias a  $4^{\circ}\text{C}$  (Figura 50). A amostra 1 (referente ao RPI) resultou no aparecimento de D2 e D3. As amostras 2 e 3 apresentaram um pequeno D2, D3 e a presença de iodo livre. A amostra 4 mostrou apenas o D3. Nenhuma das quatro amostras revelou capacidade de ligação quando incubada com excesso de anticorpo. No caso da marcação falsa (Figura 49B) obteve-se apenas o RPI e RPIV, indicando que os picos intermediários (Figura 49A) formam-se na presença do hormônio.

A fim de determinar uma possível formação de D3 a partir de Na  $^{125}\text{I}$  na presença de albumina, este radioisótopo foi estocado em tampão veronal 0,025M – 1% SAB – pH 8,6 a  $4^{\circ}\text{C}$  durante, respectivamente, 1, 2 e 4 semanas. Como pode ser observado na Figura 51, essas amostras ao serem submetidas à EGPA não revelaram a presença deste danificado (D3).

## IV – DISCUSSÃO

A reação de iodação pode ser considerada de certa forma imprevisível, pois seu rendimento e e

CROMATOGRAMAS DA REFILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DO  $^{125}\text{I}$ -HCHIEA)  
ESTOCADO DURANTE 30 DIAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES

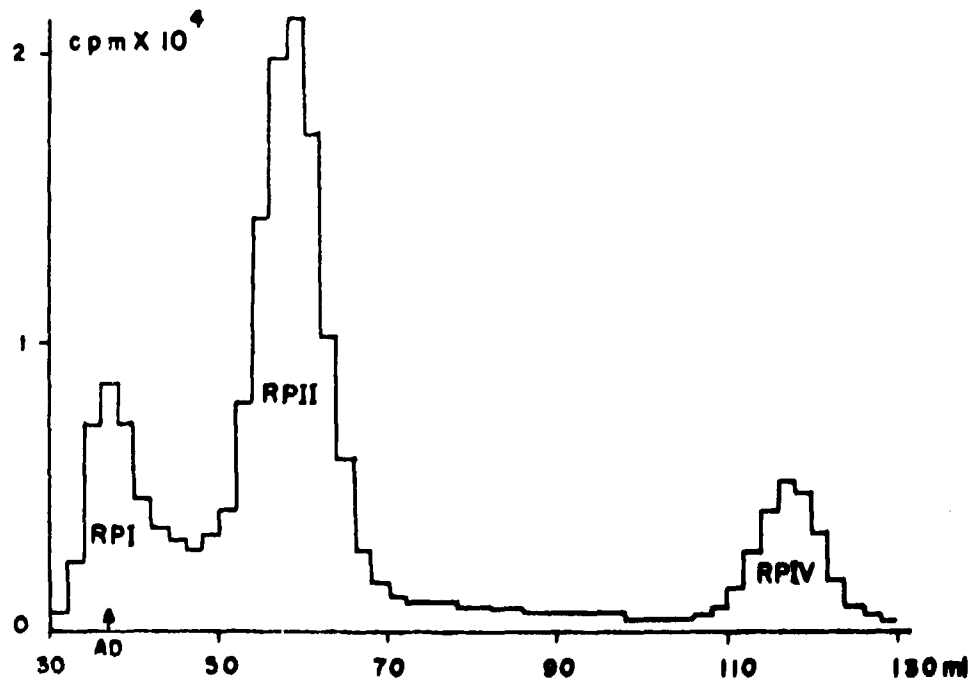
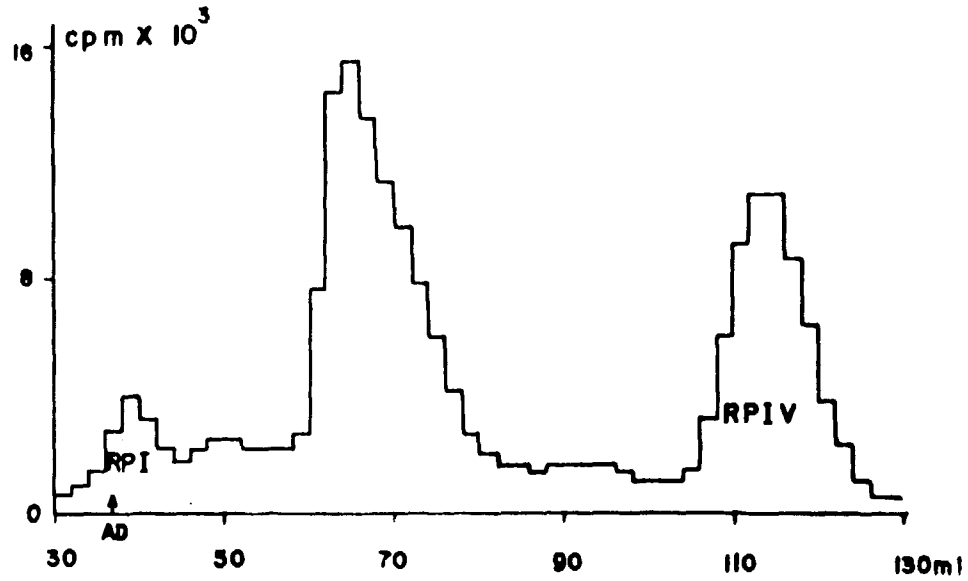


Figura 44 - A - estocado a  $4^{\circ}\text{C}$   
B - estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$   
Tampão Veronal  $0,025\text{M}$  - pH 8,6 - 1% SAB  
fluxo: 12 ml/hora  
frações: 2 ml

ELETOFORETOGRAMAS DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(IFA) ESTOCADO DURANTE 30 DIAS A  $4^{\circ}\text{C}$   
E A  $-20^{\circ}\text{C}$  E REPURIFICAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75

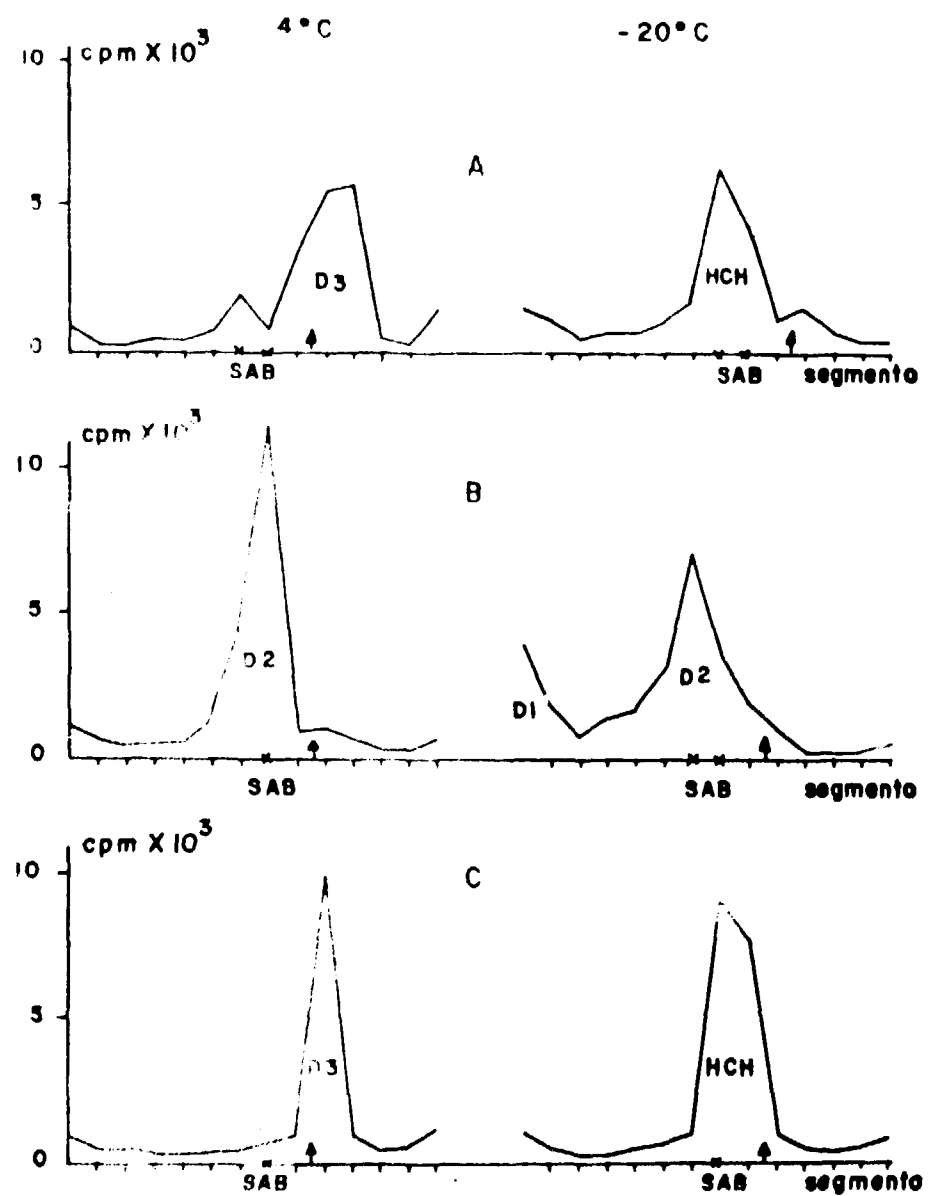


Figura 45 - O HPI e o RPII Referem-se à Figura 44

A - antes da repurificação

B - RPI

C - RPII

ESTUDO CINÉTICO DA FORMAÇÃO DE D3 A PARTIR DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)  
PURIFICADO E ESTOCADO A  $4^{\circ}\text{C}$

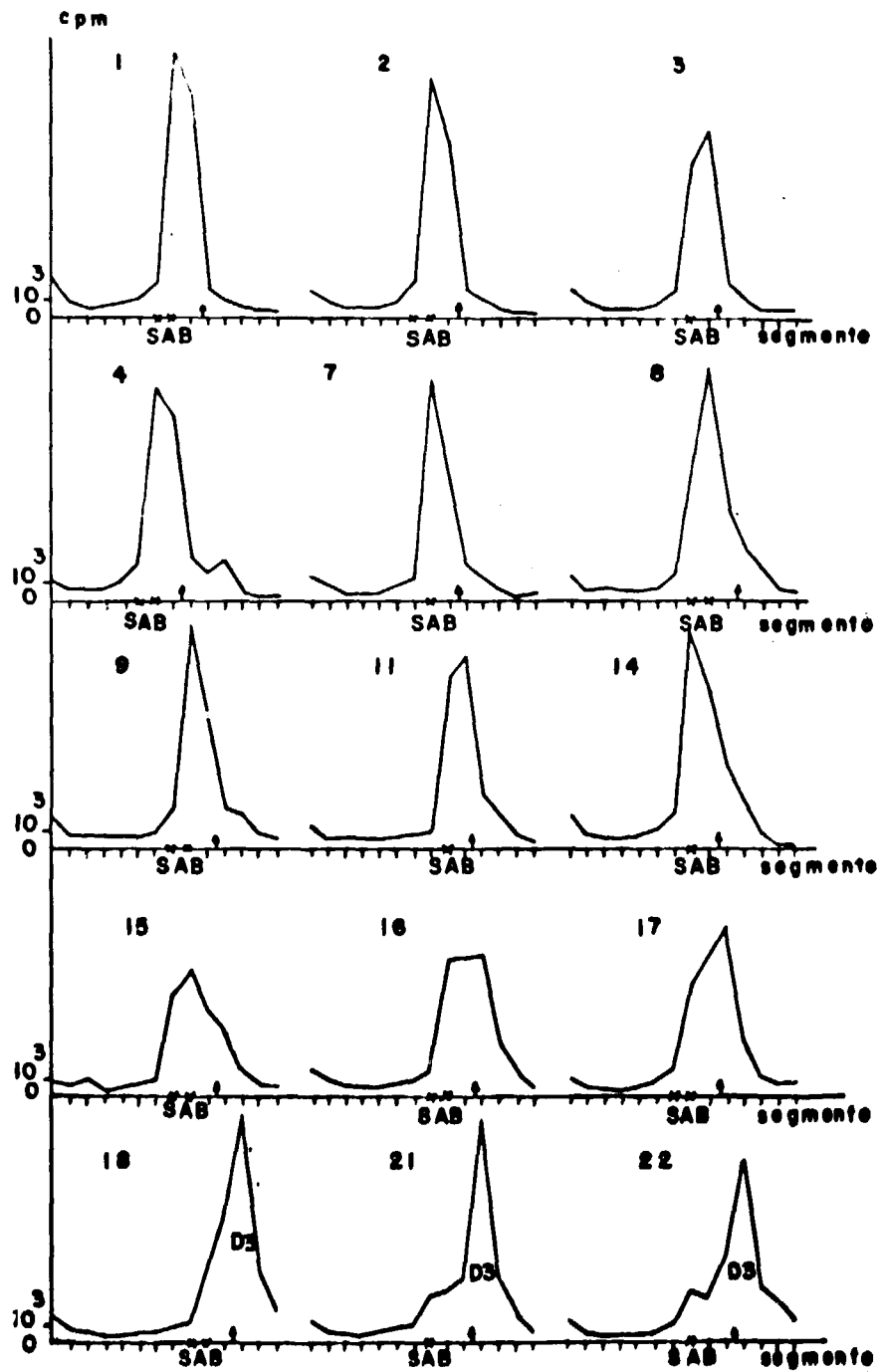


Figura 46 - Os Números Indicam Quantos Dias Após a Purificação foi Realizada a EGPA

ELÉTROFORETOGRAMAS DO D3 RESULTANTE DA ESTOCAGEM A 4°C DO  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)  
SOB VÁRIAS CONDIÇÕES EM EGPA

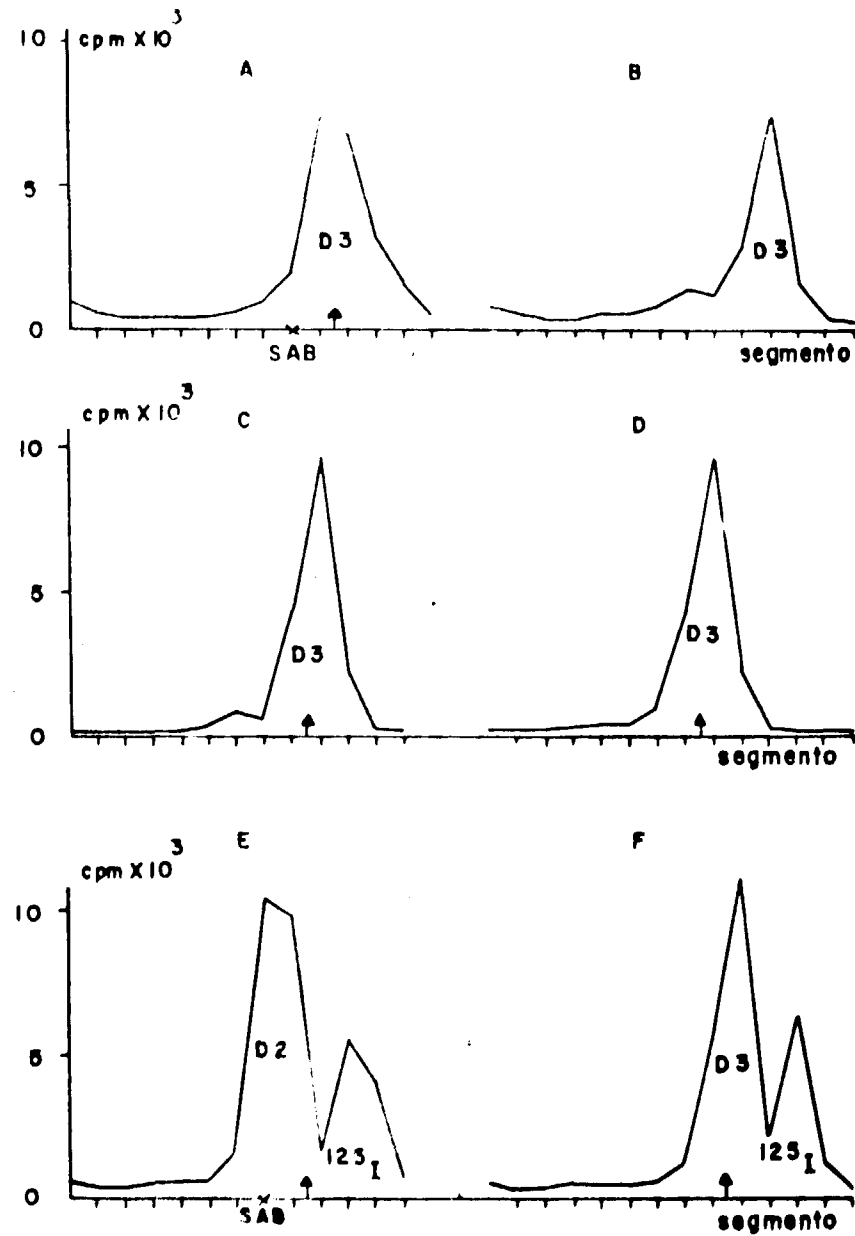


Figura 47 - A - Polimerizado  
 B - Polimerizado sem Traçador  
 C - Não Polimerizado  
 D - Não Polimerizado sem Sacarose (solução F)  
 E - Incubado com Tiosulfato na Presença de SAB  
 F - Incubado com Tiosulfato na Ausência de SAB

̄ELETROFORETOGRAMAS DO PICO II DE  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) E DO PICO I DA MARCAÇÃO FALSA  
"PURIFICADA" NA PRESENÇA DE SAB, AMBOS MOSTRANDO D2 E D3

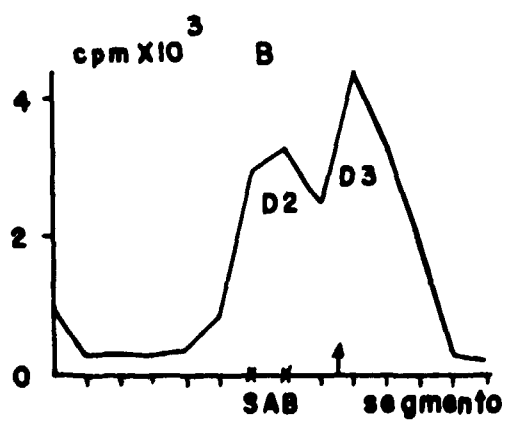
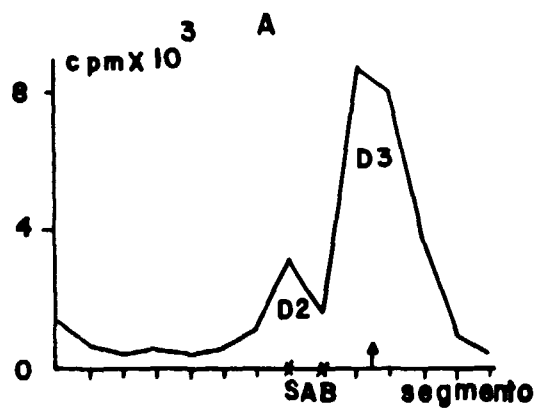


Figura 48 -- A -- Pico II Referente à Figura 26 Estocado por 30 dias a  $4^\circ\text{C}$   
B -- Pico I da Marcação Falsa com SAB Referente à Figura 35 Estocado por 30 dias a  $4^\circ\text{C}$



CROMATOGRAMAS INDICANDO A PRESENÇA DE COMPONENTES DE PESO MOLECULAR INTERMEDIÁRIO ENTRE PI E PIV NÃO PRESENTES NO PRODUTO DA MARCAÇÃO FALSA

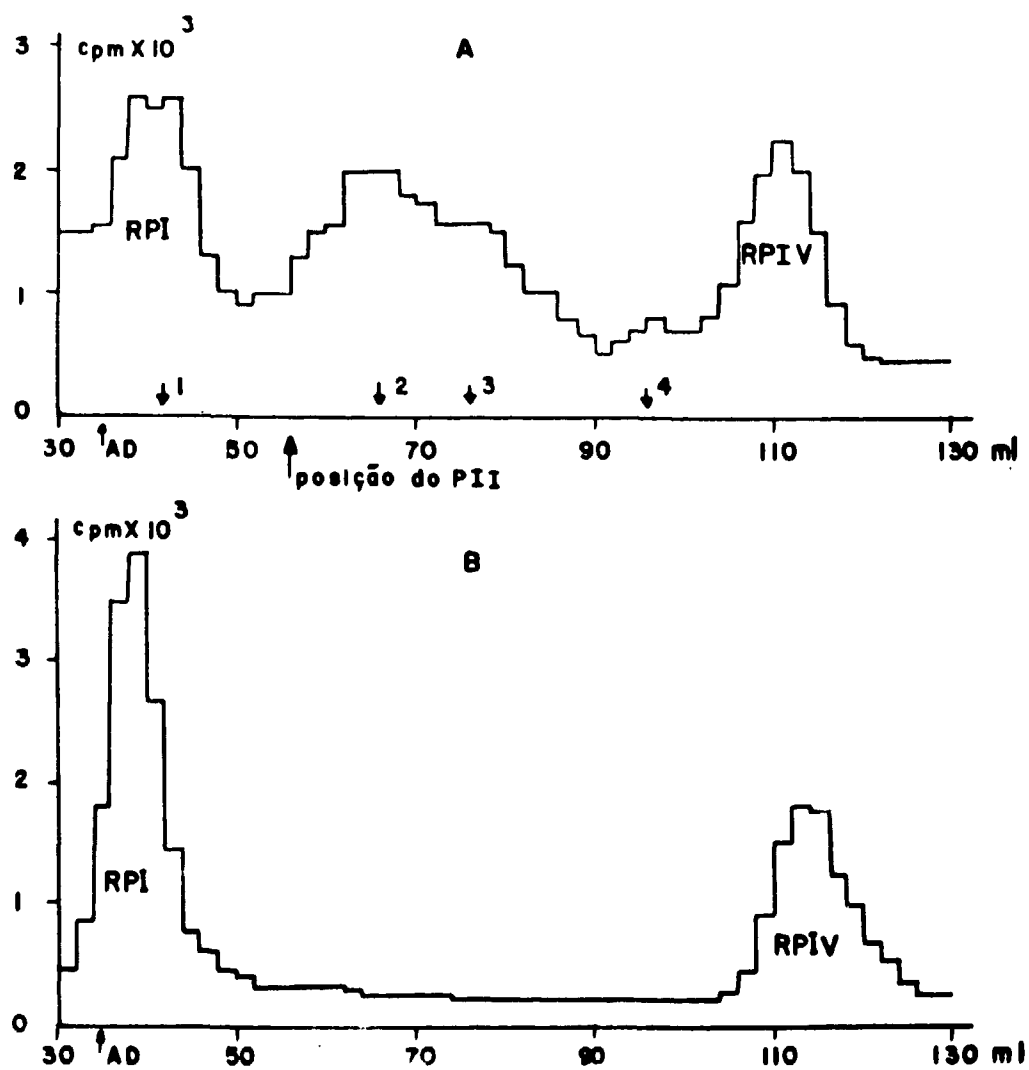


Figura 49 - Os Picos II e I Referem-se Respectivamente às Figuras 26 e 35.

A - Pico II Estocado a 4°C Após um Mês de Iodação, Resultando em D2 e D3 (Figura 48 A).

B - Pico I da Marcação Após um Mês de Reação, Estocado a 4°C Contendo D2 e D3 (Figura 48 B)

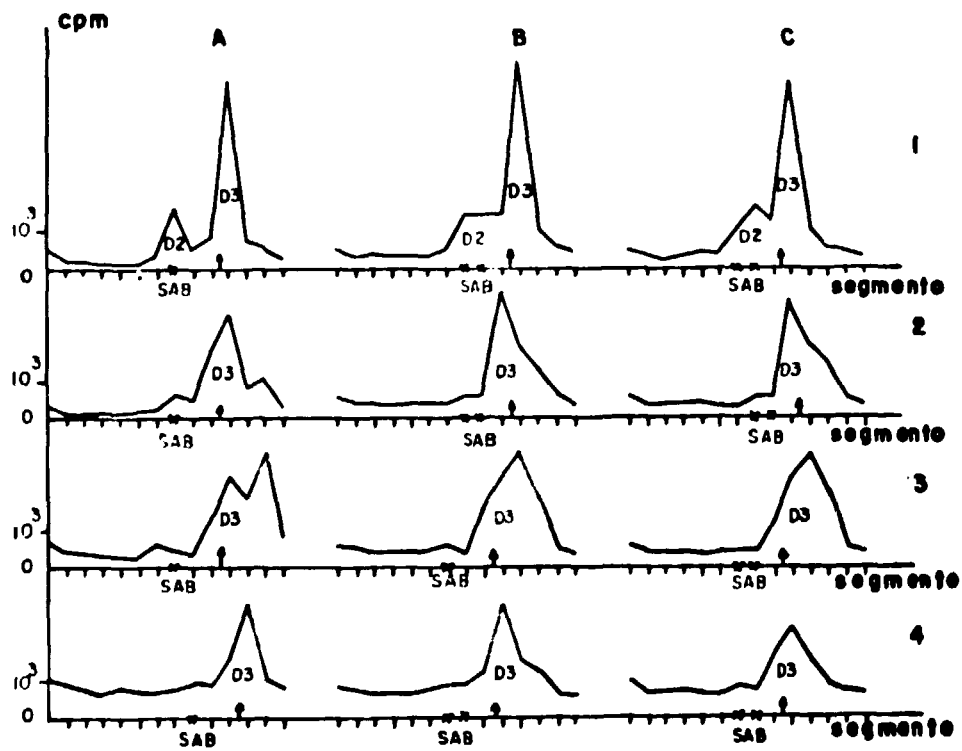
DETERMINAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DOS PROVÁVEIS FRAGMENTOS DE  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA)

Figura 50 - As Amostras 1, 2, 3 e 4 estão Indicadas por Setas na Figura 49 A.  
 A - Eletroforeses Realizadas com as Amostras Logo Após a Purificação.  
 B - Eletroforeses Controle Realizadas com as Amostras sem Anticorpo.  
 C - Eletroforeses das Amostras Incubadas com Anticorpo Diluído  $1:10^4$

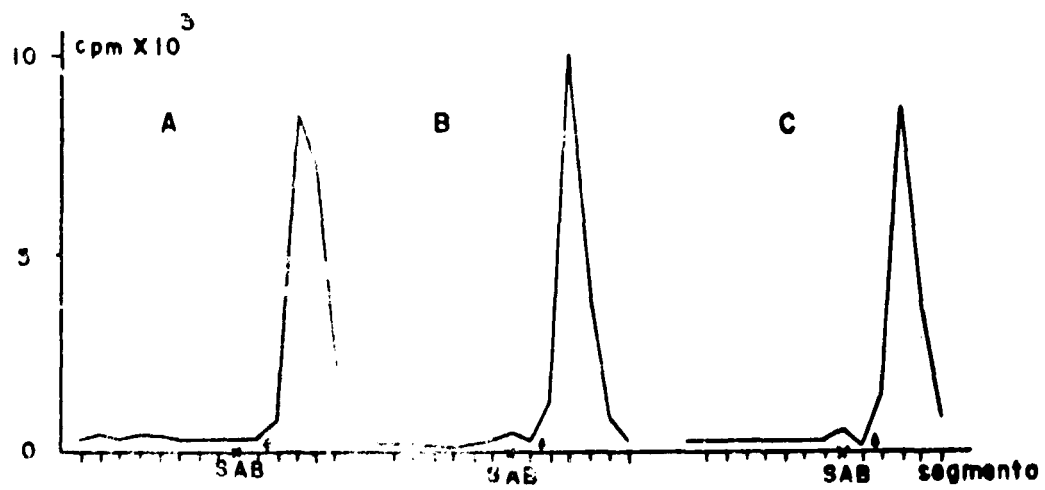
ELETROFEROGRAMAS DO Na  $^{125}$ I ESTOCADO A 4°C NA PRESENÇA DE 1% DE SAB

Figura 51 -- Tempo de Estocagem  
A - 1 semana  
B - 2 semanas  
C - 4 semanas

porcentagem dos vários picos obtidos na purificação, oscilam consideravelmente<sup>(27)</sup>. Algumas normas foram preestabelecidas como tentativa de minimizar estas variações, tais como:

- 1) Todas as soluções usadas para a iodação foram dissolvidas no momento do uso.
- 2) O HCH era estocado liofilizado em dessecador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 3) O tampão para purificação contendo SAB era preparado sempre no dia do experimento.
- 4) A purificação era iniciada imediatamente após a iodação e realizada a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Procurou-se sempre utilizar o  $^{125}\text{I}$  logo após a sua chegada, pois, comprovou-se melhores resultados e, para minimizar os problemas de perdas e contaminações, passou-se a usar seringa Hamilton de  $1\ \mu\text{l}$  para a retirada do  $\text{Na}^{125}\text{I}$  sem abertura do frasco.

Na discussão dos resultados procurou-se mostrar como foi realizada a identificação dos vários componentes obtidos na eletroforese em gel de poli-acrilamida, tendo em vista não ter sido encontrado na literatura nenhum estudo similar para ser confrontado com o presente trabalho.

#### 1) Hormônio de Crescimento Humano do National Institute of Health marcado com $^{125}\text{I}$ — $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH).

Usando um preparação do HCH(NIH) verificou-se, com relação à marcação e subsequente purificação, que a coluna de Sephadex G-75 (48 x 2 cm) propicia uma separação bastante eficiente do hormônio marcado íntegro (Pico II) dos demais componentes indesejáveis, representados pelos picos I e IV e, eventualmente Pico III (Figura 12). A discriminação em quatro componentes, a partir da marcação, é raramente mencionada na literatura. A partir desta mesma separação, comparada com outra curva de calibração, obtida anteriormente, pode-se dizer que o PII é a molécula íntegra, uma vez que seu volume de eluição é o mesmo que o correspondente da preparação fria. Mas além da obtenção de um hormônio puro, livre dos componentes danificados, é condição essencial que ele mantenha adequada imunorreatividade, o que constitui aliás, um pré-requisito básico no RIE.

A Figura 13 mostra na EGPA que pelo menos 80% do PII é constituído por HCH imunorreativo. Na mesma Figura pode-se observar que somente mínima parte do PI liga-se ao anticorpo, embora tenha a mesma mobilidade eletroforética que o  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH). Este resultado eletroforético do PI dá a primeira indicação de que se trata de um componente nitidamente indesejável e que sua posição está relacionada com a posição da SAB, tanto na filtração em gel quanto na EGPA.

A técnica da EGPA não deixa dúvida alguma sobre a natureza do PIV, que tem sido sempre corretamente considerado iodo livre, o qual permaneceu na forma inorgânica após a reação de marcação. Uma clara confirmação disto pode ser vista na Figura 14, onde o pico de radioatividade na EGPA do próprio isótopo usado para marcação ( $\text{Na}^{125}\text{I}$ ), corresponde exatamente à posição do PIV. Infelizmente a natureza e o comportamento do PIII não são tão claros, visto que na eletroforese ele aparece como um pico estreito e nítido (D3) na posição do traçador (Figura 17 A). Será discutido mais adiante este tipo de componente indesejável que poderia estar mais relacionado com as condições de estocagem, mas que às vezes aparece logo após a reação de marcação.

Mais para o estudo da natureza desses componentes do que para um conhecimento real sobre a sua estabilidade, um primeiro estudo foi realizado com o  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH), para ver as transformações que poderiam ocorrer com o tempo.

Assim, na Figura 15 pode-se notar que o PI sofre uma nítida desiodação, enquanto que o componente D2 permanece constante na posição da SAB, não havendo formação adicional de D1. Entretanto, com relação ao PII pode-se ver aproximadamente o mesmo efeito de desiodação, mas com

grande aumento de D1 que talvez possa alcançar uma quantidade fixa após cerca de dois meses (Figura 16). O PIII, apresentando desiodação tardia e uma certa fração de radioatividade ligada à SAB quase sempre presente, não mostra evolução com o tempo e nem possibilita uma indicação melhor da sua natureza (Figura 17). Como era de se esperar, o único pico que não causou surpresa, mesmo com o decorrer do tempo, foi o PIV que somente após seis meses de estocagem começou a originar um pequeno D3 (Figura 18). Isto poderia indicar a natureza inorgânica deste último componente (D3).

Neste ponto surgiu o interesse prático de repurificar o PII pois, a sua grande porcentagem de iodo livre e de D1 não permitia o seu emprego nos radioimunoensaios por mais de um mês (Figura 16 B). A Figura 19 mostra o cromatograma referente a essa repurificação, que é quase exatamente o mesmo obtido na Figura 12.

Como uma primeira conclusão geral, pode-se sugerir que o  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) tem por si próprio a potencialidade de produzir os mesmos componentes indesejáveis já presentes após a marcação e evidenciados na primeira purificação. SONKSEN, P. H. ao discutir o trabalho de HUNTER<sup>(26)</sup> verificou que após duas semanas de estocagem do HCH a 4°C houve um aumento no pico de iodo e transferência da radioatividade do pico de HCH para o danificado de alto peso molecular.

Há, portanto, uma correlação entre a danificação de "preparação" e de "estocagem". Uma diferença foi encontrada quando a estocagem do HCH\* não foi realizada a -20°C, mas a 4°C. A Figura 20 mostra uma purificação do  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH), notando-se o mesmo padrão usual, cujo PII foi estocado a 4°C, de acordo com a recomendação de alguns autores<sup>(47,38)</sup>. O resultado foi o aparecimento do PIII bastante aumentado, como pode ser visto na Figura 21, o que poderia sugerir desta feita a natureza predominantemente orgânica deste componente, talvez derivado da clivagem proteolítica das moléculas do hormônio, produzindo um tipo de danificado similar ao da danificação de incubação muitas vezes mencionada<sup>(56,59,54)</sup>. Apesar de não haver presença de soro na solução de estocagem, como ocorre durante a incubação, sabe-se que a SAB presente nesta solução em uma concentração de 1% é frequentemente contaminada por proteases<sup>(8)</sup>.

Além dessas considerações, a repurificação do  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) mostrou-se muito eficaz, revelando na EGPA um pico praticamente indistinguível daquele obtido logo após a purificação (Figura 22). A diluição ótima do anticorpo encontrada para PII e RPII foi similar (Figura 23) e também muito próxima ao valor de  $1:2 \times 10^6$  declarado pelo NIH para este anti-HCH produzido por YALOW em cobaia.

Embora o hormônio marcado venha sofrer uma diluição durante o processo de repurificação, não há interferência nos ensaios em virtude de sua alta atividade, o que exigiria de qualquer forma uma diluição prévia. A diminuição da diluição ótima, evidenciada um mês após a repurificação, não está relacionada, provavelmente, com a imunorreatividade diminuída do  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH), mas com o efeito do decaimento que força o uso de diluições menores do hormônio marcado e fornece como consequência uma ligação correspondentemente menor (Figura 23).

Resultados similares, mostrando a eficiência da repurificação sem perda da imunorreatividade, tem sido mencionados por outros autores tais como YALLOW e BERSON<sup>(55)</sup> e HAMPSHIRE e cols.<sup>(20)</sup>.

Entretanto, a imunorreatividade esteve mais relacionada às transformações que ocorrerem com o HCH não marcado, liofilizado ou em solução, estocado a -20°C.

A Figura 24, por exemplo, apresenta vários eletroforetogramas dos picos II, referentes a quatro marcações do HCH(NIH), que não mostraram nenhuma ligação com o anticorpo imediatamente após a marcação. Eliminou-se a possibilidade de uma inativação do anticorpo, testando-o com outra preparação de HCH\*. Também a incubação dos referidos picos com outra partida de anticorpo não revelou resultados satisfatórios. Que esta transformação esteve mais relacionada com a preparação fria, que com a própria marcação, foi demonstrado pelo fato de que uma nova partida de HCH(NIH) começou a

produzir novamente produtos marcados imuno-reativos. Este hormônio tinha sido estocado liofilizado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por pelo menos dois anos.

Um fenômeno paralelo de perda de imunoreatividade, apresentado desta vez pelo HCH(WHO), estocado em solução congelada a  $20^{\circ}\text{C}$ , é mostrado na Figura 25. É difícil dizer se esses dois tipos de inativação têm uma origem comum, mas estes dois últimos experimentos pelo menos indicam que o mesmo tipo de inativação pode ocorrer também no mercado e não como consequência da marcação ou das radiações.

Segundo BANGHAM<sup>(2)</sup> a inativação ou perda da potência de um hormônio padrão frio pode ser devida a uma série de fatores, tais como:

- formação de dímeros, polímeros ou agregados, principalmente quando em alta concentração,
- ação de enzimas contaminantes, que podem ser enzimas proteolíticas do tecido extraído ou de bactérias, ou presentes na própria proteína carregadora adicionada ou mesmo em outros reagentes usados nos ensaios,
- desamidação que é frequentemente influenciada pelo pH,
- pH,
- adsorção a superfícies, tais como vidro,
- temperatura,
- luz

Estas conclusões levaram a usar para esses estudos uma preparação hormonal facilmente obtida e sempre recentemente preparada, dissolvida cada vez antes da marcação, evitando as variáveis relacionadas somente com a proteína não marcada e oferecendo assim, condições de relacionar melhor cada transformação com a própria proteína marcada. Serviu para esse propósito o HCH(IEA), que é rotineiramente extraído e purificado neste laboratório.

Os aspectos gerais desta primeira parte sobre o  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) podem ser assim resumidos:

- a) realizou-se um primeiro estudo para a identificação dos componentes indesejáveis.
- b) obteve-se um bom resultado após a repurificação em Sephadex, sem perda de imunoreatividade, assim permitindo o seu uso por dois ou três meses.
- c) detectou-se uma diminuição gradativa da imunoreatividade na própria preparação de HCH fria.

## 2 - Hormônio de Crescimento Humano do Instituto de Energia Atômica Marcado com $^{125}\text{I}$ - $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA).

A marcação do hormônio de crescimento humano extraído e purificado no IEA produziu um padrão cromatográfico (Figura 26) similar àquele obtido com o  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) (Figura 12), embora, nesse caso específico, o PIII esteja completamente ausente. A curva de diluição ótima do anticorpo (Figura 28) foi perfeitamente comparável à do NIH (Figura 10), mostrando capacidade de ligação similar. O eletroforetograma dos vários picos (Figura 27) também seguiu o modelo já discutido. O pico I

apresentou D1 na posição de alto peso molecular, D2 em correspondência com a SAB e D3 conforme já mencionado, embora não muito enfatizado, na Figura 15 A que mostra uma corrida homóloga para o  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH). O PIV é sempre constante.

A posição do PII na EGPA é talvez a diferença mais interessante entre o  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) e o  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) (Figura 29). O pico do  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) não se identifica com a posição da SAB mas, geralmente, coloca-se numa posição mais avançada. Ao invés de parecer ilógico e sem explicação, este fato parece decorrer de que as duas preparações não marcadas têm taxas de migração (Rm) diferentes na EGPA (Figura 30) como resultado do processo de preparação, o qual, mantendo intactas as atividades imuno e biológica, teria provocado uma diminuição do ponto isoelétrico da proteína IEA, tornando-a mais rápida na corrida. Essa heterogeneidade nas preparações de HCH, porém, mantendo sua imunorreatividade, tem sido mencionada por vários autores<sup>(4,60,11,26)</sup>, sendo atribuída em parte ao processo de desamidação que pode ocorrer durante o tracionamento das hipófises ou estocagem do hormônio como já mencionado<sup>(2)</sup>.

Essa diferença entre o HCH(NIH) e HCH(IEA) torna-se particularmente interessante no presente trabalho, não somente por abrir uma nova e interessante direção de pesquisa, mas também porque esclarece dois fatos muito importantes no estudo:

- O  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH) se coloca, geralmente, na EGPA na posição da SAB, mas como ocorrência, provavelmente acidental, não devendo acontecer com toda preparação de HCH. De fato, no Sephadex as duas posições do HCH e da SAB apresentam-se bem separadas, eliminando qualquer dúvida sobre transporte da molécula de HCH pela SAB.
- Se o HCH é independente da SAB, como mostraram as duas preparações, o PI, ao contrário, é muito dependente deste carregador, pois não somente está na mesma posição eletroforética em ambas as preparações, posição da SAB, mas também está relacionado com ela no gel de Sephadex.

A partir destas observações o estudo da influência da SAB nas reações de marcação e purificação tornou-se fundamental.

Os aspectos principais desta segunda fase, relativa à marcação do HCH(IEA), podem ser assim resumidos:

- a) Não há diferença no que se refere à marcação, atividade específica, capacidade de ligação do  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) comparado ao  $^{125}\text{I}$ -HCH(NIH).
- b) As diferentes posições no gel decorrem, provavelmente, do processo de desamidação ocorrido durante a preparação do HCH(IEA), não influenciando as características mencionadas no item a.

### 3 – Denificação de Marcação

Como se pode ver na Figura 29 os produtos marcados tanto de HCH(NIH) quanto de HCH(IEA) migram mais rapidamente na eletroforese quando comparados às respectivas preparações frias, mantendo porém a imunorreatividade. Isso pode ser devido a um aumento da carga negativa pela incorporação do iodo ou devido a alterações provocadas na molécula do hormônio pela ação de cloramina T, produzindo migração mais rápida na EGPA como mencionado por SKYLER e cols.<sup>(48)</sup>.

A EGPA da mistura de marcação não purificada, diluída com ou sem SAB (Figura 31) apresentou duas diferenças interessantes: na presença de SAB apareceu um pico único, que precedeu o pico do iodo e do qual não se achou bem separado, provavelmente composto de  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) e de

D2. Este pico, praticamente, desapareceu ou se reduziu acentuadamente na ausência de SAB, aumentando marcadamente o pico na posição de componentes de alto peso molecular (D1), ocorrência esta incomum. Porém YALOW e BERSON<sup>(60)</sup> mencionam que uma fração significativa de HCH<sup>125</sup> pode ser perdida por absorção na ausência de carregador, explicando a diminuição do pico de HCH<sup>125</sup>. Foi a observação deste fenômeno que levou ao estudo do comportamento do <sup>125</sup>I-HCH(IEA) submetido à purificação na ausência de SAB (Figura 32). Nestas condições, não se observou a presença de <sup>125</sup>I-HCH monomérico (PII), apareceu o pico do iodo livre (PIV) e um pico alto coincidindo com o volume vazio (PI), o qual, na ausência de qualquer outra proteína além do HCH, pode ser considerado como um tipo de <sup>125</sup>I-HCH monomérico (agregado).

A conclusão é que o <sup>125</sup>I-HCH(IEA) pudesse ser carregado pelo azul dextran, na ausência de SAB, foi eliminada repetindo-se o experimento sem adicionar este marcador. O volume vazio foi determinado separadamente.

A Figura 33, que mostra o eletroforetograma da mistura de marcação não purificada e dos picos I e IV, purificados na ausência de SAB, confirma aquela sugestão de que o pico I representa realmente a forma polimérica do hormônio, pois a radioatividade esteve presente quase que exclusivamente sob a forma de D1. A acentuada diminuição do pico do hormônio na solução 1 sem SAB (antes da purificação) pode ser atribuída a uma agregação. O fato de que nem toda radioatividade perdida se encontra em D1 seria devido a maior tendência de adsorção do agregado como mencionado por HUNTER<sup>(24)</sup>.

O experimento não somente confirma a presença de componentes de alto peso molecular, mas também oferece duas indicações interessantes: a primeira, que a agregação a qual antes da purificação em Sephadex significava menos do que 20%, passou a representar 40% após a gel filtração; a segunda, que o D1, tantas vezes encontrado nos eletroforetogramas, pode agora ser definido como agregado, quando não oriundo do complexo AG-AC. Deve-se notar, entretanto, que na EGPA a 7% o complexo AG-AC tende a penetrar algo no gel de separação, o que não ocorre com o agregado. Mas, se nesta experiência a SAB parece evitar agregação, como caracterizar o pico I, que às vezes assume proporções consideráveis e que sempre aparece após purificação do <sup>125</sup>I-HCH(IEA) na presença de excesso daquele carregador?

Uma nova marcação, desta vez falsa (sem a preparação de HCH) fez-se necessária para provar que o PI é, em grande parte, independente da presença do hormônio marcado. As Figuras 34 e 35 esclarecem essa dúvida. Antes da "purificação" (Figura 34) o produto da marcação falsa foi submetido à EGPA, após ter sido diluído em tampão contendo ou não 1% de SAB, já mostrando uma certa ação carregadora relacionada com a presença dessa proteína. Mas o resultado final surgiu após a "purificação" dessa marcação falsa no Sephadex G-75 (Figura 35). Apareceu cerca de 20% de "danificado" na posição da SAB numa situação onde realmente nada existe que poderia ser "danificado".

Em muitas reações de marcação verdadeira a porcentagem de PI sobre a radioatividade total recuperada foi bem inferior a 20%. Para confirmar, foi feita uma nova marcação falsa e a sua "purificação" então, foi realizada na ausência de SAB durante todo o processo (Figura 36). Praticamente não apareceu PI, a não ser uma pequena quantidade de radioatividade, provavelmente carregada pelo azul dextran. Demonstra-se desta forma a ação fundamental da SAB na produção do PI. A esse respeito GOLDSMITH<sup>(17)</sup> menciona que a adição de plasma após a reação de marcação pode resultar na iodação da albumina ou outros componentes plasmáticos. GREENWOOD e cols.<sup>(18)</sup> se referem a adsorção do iodo à albumina e sua iodação mesmo com a adição de metabissulfito de sódio. A Figura 38 confirma que na EGPA o PI da marcação falsa "purificada" com SAB é simples radioatividade carregada por essa proteína (D2) e, provavelmente, parte da radioatividade é liberada, talvez durante a eletroforese, como D3. Nota-se também um pico não bem identificado no terceiro e quarto segmentos, talvez derivado de um agregado de albumina. A Figura 39 eliminou qualquer dúvida no que se refere ao padrão de dependência de algum artefato de técnica; eliminando azul de bromofenol ou soro de cobaia, o eletroforetograma permaneceu inalterado.

Fica em aberto a especulação sobre que forma de radioatividade realmente é carregada pela SAB, pois já ficou assinalado que o Na <sup>125</sup>I passado em Sephadex com 1% de SAB, somente forneceu



PIV e nada mais (Figura 37). Assim, o que é carregado pela SAB deve ser algo que sobrou, ou que derivou, do processo de marcação, talvez uma forma oxidada de iodo.

Um resultado interessante, embora não conclusivo, é mostrado na Figura 40. Iodo ( $I_2$ ), obtido através da oxidação de  $Na^{125}I$  com persulfato de amônio, ao qual se adicionou carregador  $NaI$ , liga-se à SAB com ou sem a presença de traçador, enquanto que o iodeto ( $I^-$ ), mantido no seu estado reduzido com tiosulfato de sódio, não mostrou ligação alguma à SAB.

Foi destes resultados que surgiu a idéia de que o PI pudesse ser formado por dois componentes. Uma comparação entre os vários picos de PI, resultantes de mais de 20 marcações, obtidas neste laboratório no último ano, sugere essa possível sobreposição de dois picos.

A Figura 41, derivada de uma das últimas marcações do HCH(IEA) dá a resposta que se procurava. As duas frações (a e b) colhidas respectivamente em correspondência do volume vazio (posição do agregado) e do volume de eluição da SAB (radioatividade carregada pela SAB) forneceram os eletroforetogramas da Figura 42. Um alto pico de agregado foi verificado para a fração "a", embora com uma parte da radioatividade na posição da SAB (D2), mas principalmente D2 e um baixo pico de agregado e D3 para fração "b".

#### 4 – Danificação de Estocagem

Com base nos resultados anteriores, pode-se agora desenvolver um estudo mais sistemático das melhores condições de estocagem, numa tentativa de interpretação dos vários tipos de danificados que ocorrem. Na Figura 43, a coluna A referente à estocagem na condição liofilizada (em dessecador a  $-20^\circ C$ ), mostra formação do que agora se pode chamar "agregado" (posição do D1) até uma porcentagem limite, e a liberação contínua de iodo livre. Esse tipo de liberação parece muito interessante para uma investigação futura, pois deve ser lembrado que se trata do material no estado liofilizado e, portanto, não devem ocorrer nem a desalogenação enzimática nem a desalogenação química clássica, podendo-se excluir também, nessa situação, efeitos indiretos das radiações, como por exemplo a radiólise. Restaria somente o efeito radioquímico direto ou o próprio decaimento. Também na preparação estocada a  $-20^\circ C$  a situação é praticamente idêntica, e não há razão para pensar, portanto, num mecanismo diferente. YALOW e BERSON<sup>(55)</sup> referem-se ao fenômeno da "catástrofe do decaimento". Segundo esses autores, mesmo considerando uma média de um átomo de iodo por molécula, muitas moléculas podem conter dois ou mais átomos, principalmente no caso do  $^{125}I$  devido a sua maior abundância isotópica do que o  $^{131}I$ . Quando um átomo de radioiodo decai, a molécula do hormônio ao qual está ligado sofre um choque. Se ela contém radioiodo pode fracionar-se permanecendo fragmentos marcados ou havendo liberação de radioiodo. Nesse trabalho, MYERS discute a hipótese do decaimento do radioiodo de uma molécula afetar outra molécula vizinha, sendo ambas monoiodadas.

Tanto no caso da estocagem na condição liofilizada (A) ou em solução congelada (B) a quantidade de agregado que se formou, possivelmente durante a liofilização ou congelamento e descongelamento, não parece ter aumentado, pelo menos significativamente, em função do tempo (Tabela IV). Na coluna C os eventos repetidos de congelamento e descongelamento acompanham-se de incremento também não significativo de agregado (D1). Nesta mesma coluna nota-se o aumento do pico correspondente ao iodo livre. A coluna D, que mostra o comportamento de uma amostra que tendo sido liofilizada foi dissolvida e mantida a  $4^\circ C$ , confirma novamente a indicação já mostrada na Figura 21 de que um processo diferente de danificação ocorre quando a condição de estocagem é mudada de  $-20^\circ C$  para  $4^\circ C$ . Isso não é estranho pois a ação atribuída a enzimas proteolíticas em tais condições tem sido mencionada muitas vezes. SKYLER e cols.<sup>(49)</sup> referem-se à digestão do HCH com plasmina mostrando produtos que migram perto do traçador na EGPA, além do hormônio na posição normal. Esta última observação não tem importância apenas teórica. De fato, na utilização dos "conjuntos diagnósticos" de RIE torna-se extremamente importante a avaliação do tempo em que o produto marcado liofilizado pode ser usado após a dissolução. Os resultados apresentados na coluna C sugerem que a estocagem do produto marcado a  $4^\circ C$ , modo mais frequente de consideração dos materiais em laboratórios de análises clínicas, não deve ultrapassar o período de uma semana.

A comparação entre a repurificação do mesmo hormônio marcado após um mês de estocagem a 4°C (A) e a 20°C (B) pode ser vista na Figura 44. Prováveis fragmentos de  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) podem ser notados num pico localizado numa posição de menor peso molecular que o RPII, quando a estocagem é feita a 4°C, evidenciando-se neste caso maior liberação de iodo. A eletroforese desses picos confirma a diferença entre o RPII e esse pico mais à direita, a qual mostra a presença de D3. Quanto ao RPI, no caso da estocagem a 20°C há maior formação de D1 (Figura 45). A eletroforese do marcado antes da repurificação já mostra a transformação do material estocado a 4°C em D3 (Figura 45).

O comportamento do  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) estocado a 4°C em função do tempo foi seguido com a realização da EGPA quase diária. Pode-se notar na Figura 46 que o pico correspondente ao  $^{125}\text{I}$ -HCH imuno-reativo, que está situado um ou dois segmentos à esquerda do traçador (Figura 4E-1), transformou-se lenta e progressivamente, a partir do 11º dia, em D3, pico este que se localiza preferentemente à direita do traçador. O D3, como foi demonstrado, não apresenta nenhuma ligação com o anticorpo. Pelos resultados dos eletroforetogramas apresentados na Figura 47 ficou excluído que a formação de D3 na EGPA fosse decorrente de um artefato de técnica relacionado, por exemplo, à polimerização do gel da amostra, presença de traçador ou de sacarose. Foi verificado então (Figura 47 E) que um agente redutor forte deve promover pelo menos 30% de liberação de iodo livre. Isso novamente faz pensar na possibilidade de que para o pico D3 deve contribuir a forma inorgânica oxidada de iodo ( $\text{I}_2$  ou Iodato), embora cerca de 70% do D3 tenha resistido à redução e ocupado a posição da SAB. É possível que este componente seja derivado de uma forma orgânica que pode ser carregada pela albumina, como será discutido mais adiante. Na ausência de SAB (Figura 47 F) observa-se o mesmo grau de conversão em iodeto, porém, o pico do D3 mantém sua posição inalterada.

A comparação entre PII de uma marcação normal e PI de uma marcação falsa, ambos estocados durante um mês a 4°C, foi feita na EGPA (Figura 48) e em Sephadex (Figura 49) indicando uma nítida diferença entre as duas preparações, não tão evidente na eletroforese quanto na filtração em gel. Os dois cromatogramas similares no que se refere ao RPI e ao RPIV presentes nas duas preparações, são bem diferentes na zona intermediária (peso molecular menor que 20 000). Portanto, fica claro que se está na presença de fragmentos de HCH\* que podem muito bem ocupar as posições 2, 3 e 4 indicadas na Figura 49 A e que logicamente não podem ser encontrados na Figura 49 B referente à marcação falsa. Resultados comparáveis foram apresentados por HAMPSHIRE e cols.<sup>(20)</sup> que afirmam que a danificação radioquímica pode ser detectada em gel de Sephadex com radioatividade aparecendo em frações de menor peso molecular quando comparadas ao verdadeiro HCH\*. Como esse fenômeno pode provocar quebras aleatórias na molécula, os fragmentos marcados resultantes podem apresentar peso molecular diferente, o que pode ser comprovado pela análise das Figuras 20, 43 e 48, onde esses picos resultantes da estocagem do HCH\* a 4°C, podem aparecer na zona intermediária entre PII e PIV, em várias posições.

A possibilidade de um componente orgânico (fragmentos de HCH\*) para a interpretação da natureza do D3, adiciona-se à possibilidade inorgânica (formas oxidadas de  $^{125}\text{I}$ ) já discutida. É de se notar que os componentes orgânicos perdem suas qualidades imuno-reativas (Figura 50). O que aparece demonstrado é que o D3 origina-se somente em três circunstâncias: a partir do  $^{125}\text{I}$ -HCH (pico II) mantido a 4°C, a partir do pico I b, correspondendo a radioatividade corrigida pela SAB e a partir do pico III, quando presente, picos estes obtidos após a purificação da mistura de marcação. A estocagem de uma amostra de Na  $^{125}\text{I}$  na presença de SAB a 4°C não mostra o aparecimento do D3 (Figura 51).

Para fins práticos, porém, a ação indesejável do D3 tem sido eliminada de várias maneiras:

- não estocando o  $^{125}\text{I}$ -HCH(IEA) a 4°C
- quando o D3 aparece durante a incubação, ele pode ser separado graficamente usando gel longo de 15 cm ou mesmo através de diálise.
- no gel curto de 8 cm ele pode ser subtraído através de cálculos determinando a sua porcentagem no gel controle 1 incubado com excesso de anticorpo.

Como conclusões destes itens sobre os processos de danificação pode-se afirmar:

- a) Há uma grande influência da SAB no processo de purificação. Sua ausência leva a uma agregação quase total do hormônio marcado e a perdas. Sua presença leva ao aparecimento do PIb.
- b) Há uma possível sobreposição em PI de dois componentes: PIa e PIb, de origem inteiramente distinta. O primeiro está relacionado com a presença da proteína marcada, o segundo não. Os cálculos do rendimento da marcação, atividade específica e massa absoluta do marcado, devem levar em consideração esse fato.
- c) A estocagem em condição liofilizada ou congelada pode permitir o uso da preparação marcada por até cerca de um mês. A primeira maneira, embora não apresentando evidências de maior estabilidade, é preferida por razões práticas óbvias.
- d) A estocagem a 4°C deve ser evitada, não somente após a lodação, mas também após a dissolução da ampola liofilizada.

O estudo do mecanismo de desalogenação do produto liofilizado e congelado e de artifícios que possam levar a um provável controle deste processo, representam dois aspectos interessantes que se constituem em temas já em desenvolvimento neste laboratório.

## V – CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que este trabalho foi realizado e com a metodologia empregada, os principais fatos observados foram:

- 1) O hormônio de crescimento humano preparado no IEA, mostrou grau de purificação satisfatório para ser submetido à marcação com  $^{125}\text{I}$ . Seu padrão de eluição no Sephadex G-75 foi similar e sua imunorreatividade foi praticamente idêntica à do hormônio de crescimento humano padrão do NIH.
- 2) A purificação do hormônio de crescimento humano marcado mostrou-se eficiente quando se usou uma coluna de Sephadex G-75 de 48 cm de altura por 2 cm de diâmetro.
- 3) O pico I resultante da eluição no Sephadex G-75 no processo de purificação do HGH $^{\circ}$  é integrado por dois componentes distintos:

PIa – representado por radioatividade possivelmente ligada à presença de moléculas agregadas (poliméricas) do hormônio.

PIb – representado por radioatividade “carregada” pela albumina (SAB).

- 4) O PIII que é de ocorrência aleatória, aumenta nitidamente com a estocagem do purificado a 4°C, sendo evidenciado no processo de repurificação.
- 5) A coluna de gel de poliacrilamida com 11 cm de altura por 0,75 cm de diâmetro constitui-se em uma forma eficaz para separar os componentes “danificados” das frações livre e ligada.
- 6) Na ausência de soro albumina bovina, tende a ocorrer o fenômeno de agregação das moléculas monoméricas de HCH especialmente durante o processo de filtração em gel de Sephadex G-75.

- 7) Embora não se possa excluir a possibilidade do transporte pela albumina de fragmentos de moléculas de hormônio, foi comprovado que esta desempenha papel essencial como carregadora de uma forma oxidada de iodo.
- 8) A melhor maneira de estocagem do hormônio marcado ( $^{125}\text{I}$ -HCH) é sob a forma liofilizada a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou em solução congelada a essa mesma temperatura. Não foi estudada a estabilidade de moléculas marcadas liofilizadas mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## ABREVIATURAS E SINAIS

HCH	Hormônio de crescimento humano
HCH*	Hormônio de Crescimento Humano marcado com <sup>125</sup> I
IEA	Instituto de Energia Atômica
NIH	National Institute of Health
WHO	World Health Organization
RIE	Radioimunoensaio
AG	Antígeno
AC	Anti-soro de cobaia, anti-HCH
F	Hormônio marcado livre
B	Hormônio marcado ligado ao anticorpo
EGPA	Eletroforese em gel de Poliacrilamida
SAB	Soro albumina bovina
D1 a D3	Danificados detectados na eletroforese em gel de poliacrilamida
Rm	Taxa de migração
PI a PIV	Picos obtidos na purificação em gel de Sephadex G-75
RPI a RPIV	Picos obtidos na repurificação em gel de Sephadex G-75
AD	Azul dextran
BG	Radiação de fundo
cpm	contagens por minuto
†	Traçador (azul de bromofenol)

## ABSTRACT

Two HGH preparations were studied to obtain stable  $^{125}\text{I}$  labelled products, with high specific activity, good binding capacity and long shelf life. Not only the damage occurring during storage of the labelled compound was considered, but also the subtle alterations affecting the simply unlabelled protein hormone. Two techniques were used: polyacrilamide gel electrophoresis conveniently modified and chromatography by gel filtration on Sephadex. The first preparation studied was HGH(NIH) while the second, less precious was always freshly prepared at IEA (method of ROOS). The detection, study on nature and elimination of the interference of these "damaged" radioactive components, was done by checking their presence and behaviour at different moments and conditions during the process of labelling, purification or storage, and performing a comparison with some "false labelling" (without HGH). HGH(NIH) and HGH(IEA) are both labelled with a high specific activity, with immunoactivity up to three months. The radioactive label is probably not much responsible for the loss in binding occurring sometimes during storage since this happens also for the unlabelled protein. Bovine Serum Albumin used as a protein carrier and protector in the purification process and storage, showed great influence on the origin of "undesired" components. Its absence produces a peak of aggregate while when present it carries a large quantity of radioactivity forming most of the so called peak of damaged eluting from Sephadex. The nature and control of these two peaks are very important, not only because they interfere negatively in the RIA but also because they can affect calculations on specific activity, yield and absolute amount in term of mass of the labelled. The best conditions for storage are at  $-20^{\circ}\text{C}$  in dry lyophilized powder or frozen solution, in such situation only the deiodination process occurs and no other "undesired" formations. Storage at  $4^{\circ}\text{C}$  in solution produces a fast alteration (proteolytic cleavage?) that inactivates the product within few days. Both labelled products showed an increased mobility in comparison with the unlabelled: fact that needs further investigations. This can be attributed to a decreased isoelectric point due to the iodination of tyrosine or to alterations in the structure caused by reagents used in the labelling.

## VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSIS, L. M. de; NICOLAU, W.; HIRATA, I. A. D.; MURAMOTO, E.; PIERONI, R. R.; SHIBATA, H. Estudo do método de preparação do hormônio de crescimento humano pelo fracionamento em sulfato de amônio e gel-filtração em Sephadex G-100. *Revta. Ass. Med. bras.*, 18(8):299-304, ago. 1972.
2. BANGHAM, D. R. (Comunicação pessoal).
3. BARTOLINI, P.; ASSIS, L. M. de; SCHWARZ, I.; PIERONI, R. R. An accurate determination of human growth hormone content in different pituitary extracts, using a radioimmunoassay with polycrylamide gel electrophoresis as a bound-free separation system. *Clinica chim. Acta*, 79:223-36, 1977.
4. BERSON, S. A. & YALOW, R. S. State of human growth hormone in plasma and changes in stored solutions of pituitary growth hormone. *J. biol. Chem.*, 241(24):5745-9, Dec. 1966.
5. BERSON, S. A.; YALOW, R. S. GLICK, S. M.; ROTH, J. Immunoassay of protein and peptide hormones. *Metabolism*, 13(10):1135-53, Oct. 1964.
6. BIELER, E. V.; PITOUT, M. J.; STROUD, S. W.; ROOYEN, R. J. van. Conversion of monomeric human growth hormone and big growth hormone into different molecular weight forms in vitro and after injection into humans. *Hormone Res.*, 8:29-38, 1977.
7. BOLTON, A. E. & HUNTER, W. M. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a  $^{125}\text{I}$  containing acylating agent. *Biochem. J.*, 133:529-38, 1973.
8. CAYGILL, C. P. J. Detection of peptidase activity in albumin preparations. *Clinica chim. Acta*, 78:507-509, 1977.

9. CERASI, E.; DELLACASA, L.; LUFT, R.; ROOVETE, A. Determination of human growth hormone (HGH) in plasma by a double antibody radioimmunoassay. *Acta endocr. (Copenhagen)*, 53(1):101-20, Sep. 1966.
10. CHALKLEY, S. R. & TANNER, G. M. Incidence and effects on growth of antibodies to human growth hormone. *Archs Dis. Childh.*, 46:106-6, 1971.
11. CHRAMBACH, A.; YADLEY, R. A.; BEN-DAVID, M.; RODBARD, D. Isohormones of human growth hormone. I. Characterization by electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Endocrinology*, 93(4):848-57, Oct. 1973.
12. DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:404-27, 1964.
13. EKINS, R. P. The future development of immunoassay. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Vienna. *International symposium on radioimmunoassay and related procedures in medicine*. Vienna, [s.d.]. (IAEA-SM-220/204).
14. FREEDLENDER, A. E. Practical and theoretical advantages for the use of  $^{125}\text{I}$  in radioimmunoassay. In: MARGOULIES, M., ed. *Protein and polypeptide hormones: proceedings of the international symposium Liège, May 19-25, 1968*. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, 1969. p.351-3.
15. GENUTH, S.; FROHMAN, L. A.; LEBOVITZ, H. E. A radioimmunological assay method for insulin using insulin- $^{125}\text{I}$  and gel filtration. *J. clin. Endocr.*, 25:1043-9, 1965.
16. GLICK, S. M.; ROTH, J.; YALOW, R.; BERSON, S. A. Immunoassay of human growth hormone in plasma. *Nature (London)*, 199(4895):784-7, Aug. 1963.
17. GOLDSMITH, S. J. Radioimmunoassay: review of basic principles. *Sem. nucl. Med.*, 5(2):125-52, Apr. 1975.
18. GREENWOOD, F. C. Radioiodination of peptide hormones: procedures and problems. In: ODELL, W. D. & DAUGHADAY, W. H., eds. *Principles of competitive protein - binding assays*. Philadelphia, Lippincott, 1971. p.288-96.
19. GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M.; GLOVER, J. S. The preparation of  $^{131}\text{I}$  labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89:114-23, 1963.
20. HAMPSHIRE, J.; ALTSZULER, N.; STEELE, R.; GREENE, L. J. Radioimmunoassay of canine growth hormone: enzymatic radioiodination. *Endocrinology*, 96(3):822-8, Mar. 1975.
21. HIGA, O. *Aplicação do método de radioimunoensalo na dosagem do hormônio de crescimento humano no plasma*. São Paulo, 1972. (Dissertação de mestrado).
22. HIRATA, I. A. D. *Fracionamento de extrato hipofisário humano, em Sephadex G-100 para separação do hormônio de crescimento*. São Paulo, 1970. (Dissertação de mestrado).
23. HOLMSTRÖM, B. & KHÖLENHAC, K. Characterization of human growth hormone preparations used for the treatment of pituitary dwarfism: a comparison of concurrently used batches. *J. clin. Endocrinol. Metab.*, 40(5):858-62, May, 1975.

24. HUNTER, W. M. Homogeneity studies on human growth hormone. *Biochem. J.*, 97:199-208, 1965.
25. HUNTER, W. M. Iodination of protein compounds. In: ANDREWS, G. A.; KNISELEY, R. M.; WAGNER JR., H. N. *Radioactive pharmaceuticals: proceedings of a symposium held at the Oak Ridge Institute of Nuclear Studies, November 1-4, 1965*. Oak Ridge, Tenn., U. S. Atomic Energy Commission, Apr. 1966. p.245-64. (A.E.C. Symposium series, 6; CONF-651111).
26. HUNTER, W. M. The preparation and assessment of iodinated antigens. In: KIRKHAM, K. E. & HUNTER, W. M. eds. *Radioimmunoassay methods: European workshop, September 15-17, 1970, Edinburgh*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971. p.3-23.
27. HUNTER, W. M. Preparation and assessment of radioactive tracers. *Br. med. Bull.*, 30(1):18-24, 1974.
28. HUNTER, W. M. Radioimmunoassay. In: WEIR, D. M. ed. *Handbook of experimental immunology, v.1: Immunochemistry*. 2.ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1973. p.17,1 – 17-38.
29. HUNTER, W. M. & GREENWOOD, F. C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (London)*, 194(4827):495-6, May 1962.
30. KERET, R.; MATHIASH, S.; ESHET, R.; BROWN, M.; LEVY, J.; ARON, Z. Repeated purifications of [<sup>125</sup>I] GHG for radioimmunoassay. *Clinica chim. Acta.*, 47:21-6, 1973.
31. KROHN, K.; SHERMAN, L.; WELCH, M. Studies on radioiodinated fibrinogen. I. Physicochemical properties of the IC1, chloramine-T, and electrolytic reaction products. *Biochim. biophys. Acta*, 285:404-13, 1972.
32. LEE, J.; COLEMAN, R. E.; SHERMAN, L. A. Comparison of iodine monochloride and modified chloramine-T radioiodination for in vivo protein studies. *J. Lab. clin. Med.*, 89(4) 838-44, 1977.
33. LESNIAK, M. A.; GORDEN, P.; ROTH, J.; GAVIN, J. R. Binding of <sup>125</sup>I human growth hormone to specific receptors in human cultured lymphocytes. *J. biol. Chem.*, 249(6):1661-7, Mar. 1974.
34. LI, C. H.; HAYASHIDA, T.; DONEEN, B. A. RAO, A. J. Human somatotropin: biological characterization of the recombinant molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73(10):3483-5, 1976.
35. LOWRY, O. H.; ROSGBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
36. McFARLANE, A. S. Efficient trace labelling of proteins with iodine. *Nature (London)*, 182(4627) 53, Jul. 1958.
37. MAURER, H. R. Basic principles of polyacrilamide gel electrophoresis and some recent advances of the technique. *Annls. Biol. clin. (paris)*, 29 205-10, 1971.
38. NORMAN, N. & TURTER, A. R. Radioimmunoassay studies with human growth hormone and a pituitary lipid mobilizing factor. *Acta endocr. (Copenhagen)*, 58(3) 318-38, Jun. 1968.
39. ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121 321-49, 1964.
40. PALMIERI, G. M.; YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Adsorbent techniques for the separation of antibody-bound from free peptide hormones in radioimmunoassay. *Hormone Metab. Res.*, 3:301-5, 1971.



41. RICHARDS, E. G. & GRATZER, W. B. Disc electrophoresis of RNA in polyacrylamide gels. In: SMITH, I., ed. *Chromatographic and electrophoretic techniques: v.2: zone electrophoresis*. 2.ed. London, William Heinemann Medical Books, 1968. p.419-37.
42. ROOS, P.; FEVOLD, H. R.; GEMZELL, C. A. Preparation of human growth hormone by gel filtration. *Biochim. biophys. Acta*, 74:525-31, 1963.
43. ROSA, V.; SCASSELLATI, G. A.; PENNSIS, F.; RICCIONI, N.; GIANONI, P.; GIORDANI, R. Labelling of human fibrinogen with <sup>131</sup>I by electrolytic iodination. *Biochim. biophys. Acta*, 86:519-26, 1964.
44. ROTH, J. GLICK, S.; YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Antibodies to human growth hormone (HGH) in human subjects treated with HGH. *J. clin. Invest.*, 43(6):1056-65, Jun. 1964.
45. SAITO, T. & SAXENA, B. B. A sensitive, rapid, and economic radioimmunoassay of human growth hormone using ethanol-ammonium acetate. *J. Lab. clin. Med.*, 85(3):497-504, Mar. 1975.
46. SAMOLS, E. & WILLIAMS, H. S. Trace-labelling of insulin with iodine. *Nature (London)*, 190(4782):1211-2, Jun. 1961.
47. SCHWARTZ, P. L. & BATT, M. The aggregation of [<sup>125</sup>I] human growth hormone in response to freezing and thawing. *Endocrinology*, 92(6):1795-8, Jun. 1973.
48. SKYLER, J. S.; BAUMANN, G.; CHRAMBACH, A. A catalogue of isohormones of human growth hormone based on quantitative polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta endocr. (suppl) (Kbh)*, 85(211):5-41, 1977.
49. SKYLER, J. S.; CHRAMBACH, A.; LI, C. H. Quantitative polyacrylamide gel electrophoresis and specific activities of human somatotropin and its derivatives. *Biochim. biophys. Acta*, 491:566-72, 1977.
50. SMITH, I. Acrylamide gel disc electrophoresis. In: SMITH, I., ed. *Chromatographic and electrophoretic techniques, v.2: zone electrophoresis*. 2. ed. London, William Heinemann Medical Books, 1968. p. 365-99.
51. THORELL, J. I. & JOHANSSON, B. G. Enzymatic iodination of polypeptides with <sup>125</sup>I to high specific activity. *Biochim. biophys. Acta*, 251:363-9, 1971.
52. TSUSHIMA, T. & FRIESEN, H. G. Radioreceptor assay for growth hormone. *J. clin. Endocrinol. Metab.*, 37:334-7, 1973.
53. WOOL, M. S. & SELENKOW, H. A. Charcoal-dextran radioimmunoassay of human growth hormone. *Acta endocr. (Copenhagen)*, 57(1):109-14, Jan. 1968.
54. YALOW, R. S. Radioimmunoassay: practices and pitfalls. *Circulation Res. Suppl.*, 32-33:1116-1-125, May 1973.
55. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. General aspects of radioimmunoassay procedures. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Vienna. *In vitro procedures with radioisotopes in medicine: proceedings of the symposium on . . . held in Vienna, 8-12 September 1969*. Vienna, 1970. p.455-81. (Proceedings series).
56. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. General principles of radioimmunoassay. In: HAYES, R. L.; GOSWITZ, F. A.; MURPHY, B. E. P. eds. *Radioisotopes in Medicine: In vitro studies*. Oak Ridge, Tenn., U. S. Atomic Energy Commission, 1968. p. 7-41.

57. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. clin. Invest.*, 39(7):1157-75, Jul. 1960.
58. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Immunoassay of plasma insulin. *Meth. biochem. Analysis*, 12:69-96, 1964.
59. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Preparation of high-specific-activity iodine-131- labelled hormones: use in radioimmunoassay of hormones in plasma. In: ANDREWS, G. A.; KNISELEY, R. M.; WAGNER, JR. H. N. *Radioactive pharmaceuticals: proceedings of a symposium held at the Oak Ridge Institute of Nuclear Studies, November 1-4, 1965*. Oak Ridge, Tenn., U. S. Atomic Energy Commission, Apr. 1966. p.265-80, (A.E.C. Symposium series, 6; CONF-651111).
60. YALOW, R. S. & S. A. Radioimmunoassay of human growth hormone in plasma. In: PECILE, A. & MÜLLER, E. E., eds. *Growth hormone: proceedings of the first international symposium Milan, Italy, September 11-13, 1967*. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, 1968. p.60-9. (International congress series, 158).
61. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Topics on radioimmunoassay of peptides hormones. In: MARGOULIES, M. ed. *Protein and polypeptide hormones: proceedings of the international symposium, Liège, May. 19-25, 1968*. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, 1969. p.36-44.



INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA  
Caixa Postal, 11049 - Pinheiros  
CEP 05508  
01000 - São Paulo - SP

Telefone: 211-6011  
Endereço Telegráfico - IEATOMICA  
Telex - 011-23592 IENA BR