



**ESTUDO ELETROFORÉTICO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE HORMÔNIO  
DE CRESCIMENTO HUMANO: ESTIMATIVA DA MASSA MOLECULAR E  
CARACTERIZAÇÃO DOS ISOHORMÔNIOS E OUTROS  
COMPONENTES PEPTÍDICOS**

Irene Schwarz

DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 134  
IEA - DT - 134

JUNHO/1979

## **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 ELETROFORÉTICO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE HORMÔNIO  
DE CRESCIMENTO HUMANO: ESTIMATIVA DA MASSA MOLECULAR E  
CARACTERIZAÇÃO DOS ISOHORMÔNIOS E OUTROS  
COMPONENTES PEPTÍDICOS**

Irene Schwarz

**Dissertação para obtenção do Título de "Mestre em  
Fisiologia" – Orientador Prof. Dr. Lício Marques de  
Assis. Apresentada e defendida em 01 de fevereiro de 1979,  
no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

INIS Categories and Descriptors

C45

STH

Molecular weight

Electrophoresis

Acrylamide

Chromatography

---

NOTA: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade dos autores.

## SUMÁRIO

	Página
I – INTRODUÇÃO .....	1
II – MATERIAL E MÉTODOS .....	7
1 – Extração e Purificação do Hormônio de Crescimento Humano .....	7
2 – Preparações de Hormônio de Crescimento Humano .....	8
3 – Padrões Proteicos .....	11
4 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....	11
5 – Cálculos .....	17
6 – Nomenclatura dos Isohormônios e outros Componentes .....	24
7 – Método de Quantificação Proteica – Método de LOWRY .....	25
III – RESULTADOS .....	29
1 – Curva-padrão para Estimativa do $\bar{R}$ e da MM .....	29
2 – Amostras de HCH .....	37
IV – DISCUSSÃO .....	64
1 – Curva-padrão para Estimativa do $\bar{R}$ e de MM .....	64
2 – Amostras do Grupo I .....	66
3 – Amostras dos Grupos II, III e IV .....	79
V – CONCLUSÕES .....	82
VI – APÊNDICE .....	85
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	98

## ARREVIATURAS

<b>FMUSP</b>	– Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>IEA</b>	– Instituto de Energia Atômica
<b>IML</b>	– Instituto Médico Legal
<b>NIH</b>	– National Institutes of Health
<b>HC</b>	– Hormônio de crescimento
<b>HCH</b>	– Hormônio de crescimento humano
<b>IH(s)</b>	– Isohormônio(s)
<b>ACTH</b>	– Hormônio adrenocorticotrófico
<b>FSH</b>	– Hormônio folículo-estimulante
<b>LH</b>	– Hormônio luteinizante
<b>TSH</b>	– Hormônio tireotrófico
<b>SAB</b>	– Soroalbumina bovina
<b>Ve</b>	– Volume de eluição
<b>EGPA</b>	– Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>A%</b>	– Concentração de acrilamida
<b>Rm</b>	– Distância de migração relativa
<b>K<sub>R</sub></b>	– Coeficiente de retardamento
<b>Yo</b>	– Interseção da reta de FERGUSON com o eixo das ordenadas
<b>MM(s)</b>	– Massa(s) molecular(es)
<b>d</b>	– Dalton
<b><math>\bar{R}</math></b>	– Raio molecular geométrico médio
<b>d.p.</b>	– Desvio-padrão
<b>r</b>	– Coeficiente de correlação
<b>R<sup>2</sup></b>	– Coeficiente de explicação
<b>I.C.</b>	– Intervalo de confiança

# ESTUDO ELETROFORÉTICO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO: ESTIMATIVA DA MASSA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOHORMÔNIOS E OUTROS COMPONENTES PEPTÍDICOS

Irene Schwarz

## RESUMO

Doze preparações de hormônio de crescimento humano (HCH) foram analisadas num sistema analítico de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), nas concentrações de 7, 10, 12 e 14% de acrilamida, a fim de se avaliar a homogeneidade e caracterizar-se o raio molecular geométrico médio ( $\bar{R}$ ) e a massa molecular (MM) dos hormônios. Empregou-se curva-padrão relacionando a raiz quadrada do coeficiente de retardamento ( $\sqrt{K_R}$ ) ao  $\bar{R}$  de dez proteínas conhecidas.

De cinco isohormônios (IHs) identificados puderam ser caracterizados como isômeros de carga, com base nas diferenças das suas mobilidades eletroforéticas e na semelhança dos valores do  $\bar{R}$  - 1,81 e 1,97 nm - e da MM - 20 300 a 26 000 d.

A heterogeneidade do HCH de todas as amostras evidenciou-se pela presença de, em média, três isohormônios (IH). Nas preparações de RABEN, STROUD, MILLS (FG<sub>2</sub>), WILHELM (NTH) e ROOS (KABT) predominaram os IHs B, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, provavelmente resultantes de desamidação do HCH. Em preparações recentes de HCH IEA (método de ROOS) identificaram-se os IHs C<sub>2</sub>, D e E e numa preparação antiga, os IHs E e E<sub>1</sub>, provavelmente consequentes a digestão enzimática limitada do hormônio.

Dois a cinco compostos secundários foram encontrados em todas as amostras, em grupos de MM entre 7 000 e 15 000 d, perto de 30 000 d, 44 000 d (dímeros) e 66 000 d (trímeros).

Foram analisados grupos de amostras pertencentes aos picos proteicos II e III do fracionamento cromatográfico em Sephadex G 100, de três extratos de HCH IEA. Os IHs são encontrados a partir do pico II, e sua concentração relativa acompanha o perfil do pico III. Essencialmente, todos os componentes secundários ocupam o pico II e a maior parte do pico III, demonstrando a heterogeneidade das preparações do HCH devido a outras proteínas ou a formas agregadas do hormônio.

## I - INTRODUÇÃO

A existência de um hormônio pituitário responsável pelo crescimento corporal e tecidual em animais e no homem pôde ser definitivamente comprovada em 1944 por LI & EVANS, quando conseguiram obter um preparado homogêneo puro extraído de glândulas hipofisárias bovinas e demonstraram a sua ação somatotrófica em ratos hipofisectomizados. Este hormônio foi empregado numa série de experiências "in vivo" e "in vitro" que contribuíram para corroborar a sua eficiência em

promover o crescimento corporal e em exercer diversas atividades metabólicas em mamíferos como o rato, boi, gato e cão. Contudo BENNETT, em 1950, e KNOBIL, em 1954, ao administrarem o hormônio de crescimento bovino respectivamente ao homem e ao macaco, não observaram os seus efeitos biológicos esperados. Entretanto, quando LI e PANKOFF conseguiram obter hormônio somatotrófico suficientemente puro de hipófises humanas e de macaco e verificaram que suas características químicas eram diferentes das do hormônio de crescimento bovino, atribuiu-se a este fato a ineficácia do hormônio bovino nos primatas. Diversos trabalhos foram conduzidos, então, para estudar as respostas biológicas de vários animais a hormônios somatotróficos de espécies diferentes, percebendo-se o condicionamento da atividade biológica ao hormônio da própria espécie em alguns mamíferos, notadamente nos primatas e nas cobaias. WILHELM, estudando os hormônios somatotróficos de boi, carneiro, cavalo, porco e peixe, verificou que as características físico-químicas diferiam em cada hormônio, contribuindo assim para o estabelecimento da teoria de que a especificidade da atividade biológica deve estar relacionada a variações na composição molecular dos hormônios. (Todos os trabalhos clássicos mencionados, estão citados na revisão de LI no item 39 das referências bibliográficas).

Atualmente a sequência de amino-ácidos de hormônios de crescimento de algumas espécies é total ou parcialmente conhecida, citando-se como exemplo a do hormônio humano, determinada por LI<sup>(40)</sup> (Figura 1) e NIALL<sup>(46)</sup>, e dos hormônios bovino, equino, ovino e porcino. Comparando as sequências de amino-ácidos destes hormônios, LI sugeriu a presença de um "núcleo" biologicamente ativo comum a todas as espécies de mamíferos, havendo diferenças no restante da proteína de cada espécie<sup>(66)</sup>.

A revelação mais importante feita através destas experiências foi a de que para o emprego clínico e para estudar os efeitos do hormônio de crescimento no homem, as únicas preparações úteis são as provenientes de hipófises de primatas. A comprovação de que o HC de primatas é capaz de provocar efeitos metabólicos no homem<sup>(43)</sup>, reavivou as esperanças de que ele poderia ser utilizado clinicamente, notadamente na terapia substitutiva para os casos de nanismo hipossomatotrófico. RABEN, em 1958, foi o primeiro a empregar o HCH na terapia de um indivíduo hipossomatotrófico, relatando uma aceleração na velocidade de crescimento estatural do paciente<sup>(53)</sup>. Desde esta época o HCH tem encontrado grande aplicação na terapêutica específica deste tipo de nanismo<sup>(71)</sup>.

Dado o problema óbvio da obtenção de hipófises humanas ou de primatas em grande número, foram feitas tentativas de encontrar um produto que pudesse substituir o HCH. As experiências realizadas neste sentido concentraram-se principalmente, na obtenção de produtos ativos resultantes da digestão enzimática do hormônio de crescimento bovino. Apesar de se ter conseguido isolar fragmentos com atividade somatotrófica satisfatória no homem<sup>(47)</sup>, a sua aplicação não é viável por causa de sua antigenicidade<sup>(66)</sup>. Uma outra alternativa, a síntese do HCH em grande escala, ainda hoje é uma possibilidade remota, pois o hormônio é constituído de uma cadeia muito longa de 191 amino-ácidos<sup>(47)</sup>. Portanto, a única fonte para a obtenção do HCH é a glândula hipofisária humana, por ser a produtora e armazenadora deste hormônio.

Desde a introdução de métodos radioimunológicos sensíveis para a dosagem do hormônio de crescimento humano em fluídos biológicos e em extratos, em 1963, por GLICK, ROTH e YALOW<sup>(23)</sup>, o extrato purificado encontrou sua segunda aplicação prática em grande escala. Como é sabido, um hormônio extremamente puro se faz necessário para a realização de várias etapas deste tipo de ensaio: para a produção de anticorpos específicos, para sua função como padrão e para a marcação com elementos radioativos.

Tendo o interesse voltado para a obtenção do hormônio ou em grande escala para fins terapêuticos e/ou altamente puro para ensaios ou pesquisa, vários autores empenharam-se no desenvolvimento de metodologias de extração e purificação do HCH.

Na obtenção de HCH para uso clínico existem, basicamente, dois processos que evitam a deterioração das hipófises humanas até a sua extração: o congelamento e a conservação em acetona<sup>(66)</sup>.

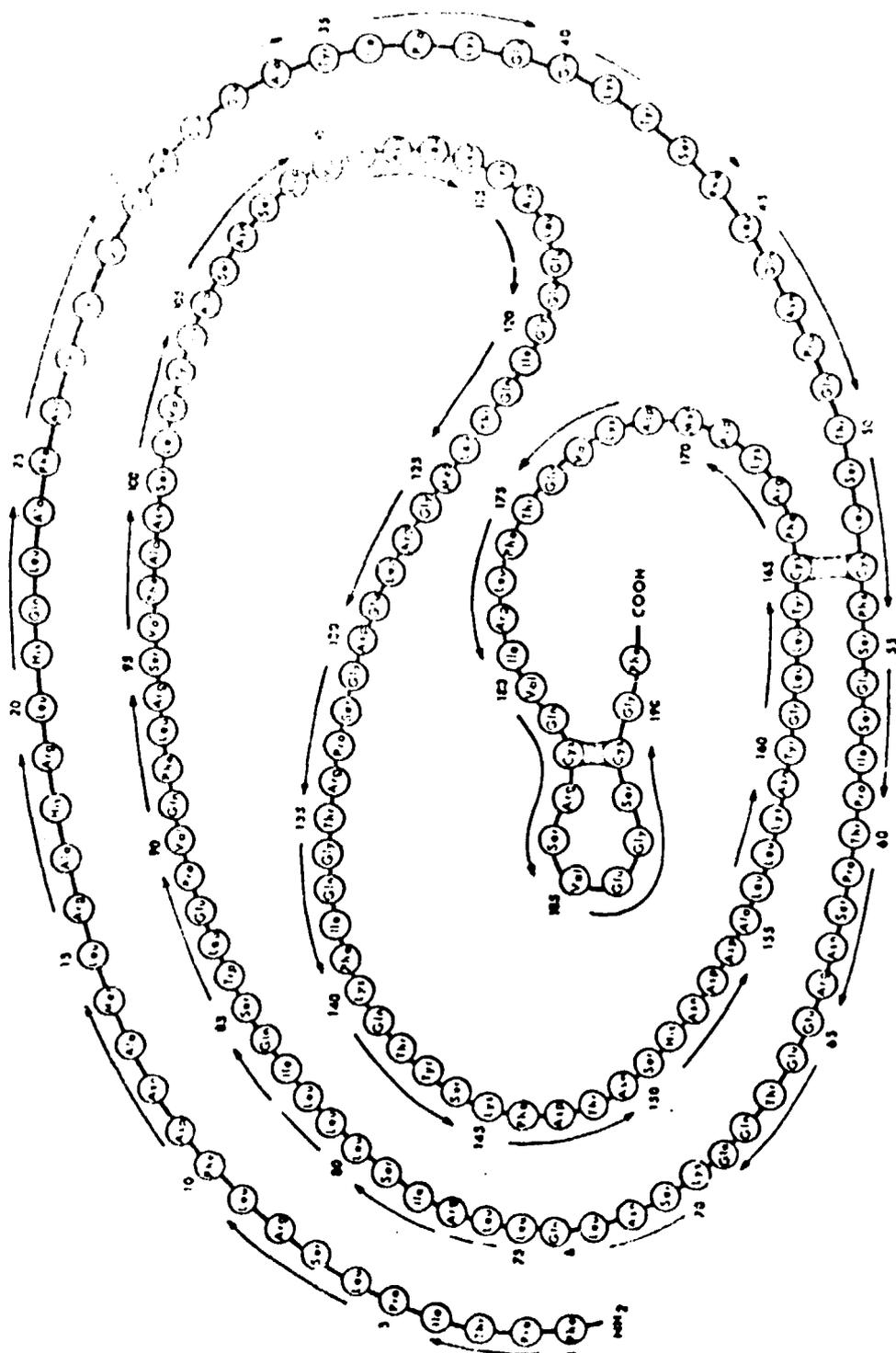


Figura 1 - Estrutura da molécula de HCH, segundo LI e cols. (40)

O segundo método tem sido o mais empregado por não necessitar de condições especiais de temperatura, permitir o armazenamento de grande número de glândulas durante vários anos a 4°C, sob a forma de pó acetonzado, reduzido a cerca de 1/6 do volume original e por ser vantajoso para o transporte do material biológico. Contudo, os processos de extração do hormônio deste material são relativamente drásticos, empregando-se ácido acético glacial aquecido – método de RABEN<sup>(53)</sup>, soluções fortemente alcalinas – métodos de WILHELMI<sup>(75)</sup>, PARLOW e cols.<sup>(50)</sup>, ELRICK e cols.<sup>(16)</sup>, MILLS e cols.<sup>(44)</sup> e STROUD<sup>(68)</sup> – ou soluções muito ácidas – método de REISFELD<sup>(55)</sup>. As hipófises congeladas, obviamente, não oferecem as mesmas facilidades para armazenamento e transporte mas por outro lado para sua extração podem ser empregadas condições mais suaves, representadas por soluções-tampão diluídas e de pH próximo ao neutro – métodos de ROOS<sup>(60)</sup>, LI<sup>(41)</sup>, TRYGSTAD<sup>(69)</sup> e LEWIS<sup>(36)</sup>. Tais procedimentos são inefetivos para as hipófises acetonzadas.

Pouco tempo após o início do emprego do HCH para fins terapêuticos, notou-se o aparecimento de anticorpos séricos contra o hormônio em alguns pacientes, bloqueando ou não a sua ação sobre o crescimento estatural<sup>(30)</sup>. Tratando-se de uma proteína homóloga, não era esperada a formação destes anticorpos. Como a maioria dos pacientes que desenvolveram resistência ao hormônio haviam sido tratados com HCH preparado por métodos de extração mais drásticos, atribuiu-se a estes processos a indução de modificações estruturais ou agregação da molécula, tornando-a antigênica. Em alguns casos a substituição do preparado hormonal por outro, extraído sob condições mais suaves (ROOS), após intervalo terapêutico em que o título sérico de anticorpos diminuía sensivelmente, não provocava mais aumento do nível sérico dos mesmos, favorecendo a hipótese acima exposta. Contudo não pode ser posta de lado a suposição de que existe um fator genético contribuindo para a formação dos anticorpos, já que houve relatos sobre casos de nanismo familiar que desenvolveram resistência contra HCH preparado em condições pouco desnaturantes (HCH ROOS)<sup>(66)</sup>.

A escolha do método para extração do HCH depende dos propósitos de cada laboratório e fundamenta-se nas seguintes considerações:

a. Obtenção de hormônio para emprego clínico com alto rendimento por grama de hipófise. Em geral são métodos que processam um grande número de hipófises ou pó acetonzado ao mesmo tempo; os métodos de ROOS e cols.<sup>(60)</sup>, WILHELMI<sup>(75)</sup>, RABEN<sup>(53)</sup>, REISFELD e cols.<sup>(55)</sup> e MILLS e cols.<sup>(44)</sup> estão entre os mais empregados. Estes preparados, de um modo geral, não são os mais homogêneos, contendo maior ou menor quantidade de outros hormônios hipofisários, especialmente a prolactina<sup>(66)</sup>.

b. Interesse na obtenção de outros hormônios da hipófise anterior, como gonadotrofinas, hormônio tireotrófico (TSH), ou fatores lipotróficos, além do hormônio de crescimento (TRYGSTAD & FOSS<sup>(69)</sup>, ELRICK e cols.<sup>(16)</sup>, STOCKELL HARTREE<sup>(66)</sup>, PARLOW e cols.<sup>(50)</sup>).

c. Outro aspecto a ser considerado na escolha do método é o grau de antigenicidade do produto para o paciente, devendo-se dar preferência às extrações menos drásticas possíveis<sup>(66)</sup>, evitando condições que favoreçam a presença de hormônio agregado<sup>(26,36,37,44)</sup>.

d. Obtenção de hormônio altamente purificado para fins de pesquisa, como por exemplo, caracterização físico-química, determinação da sequência de amino-ácidos, estudo de efeito metabólico e emprego em radioimunoensaio – método de LI<sup>(41)</sup>.

e. Condições existentes de armazenamento e transporte de glândulas hipofisárias para o local de extração. A preferência deve ser dada ao congelamento, porém, no transporte a longas distâncias, muitas vezes isto não é viável, tendo-se que optar pela acetonzação.

Como muitos hormônios peptídicos, também o HCH não é encontrado apenas sob a forma no plasma e em extratos glandulares<sup>(79)</sup>. Todos os tipos de preparados de HCH para uso clínico apresentam uma certa heterogeneidade quanto aos aspectos físico-químico<sup>(60,79)</sup> ou biológico. De um modo geral,

esta heterogeneidade deve-se principalmente à multiplicidade de formas diferentes de HCH do que a proteínas contaminantes<sup>(25)</sup> e se comprova pela presença de três tipos de componentes:

a. Formas de hormônio com atividade biológica e/ou imunológica somatotrófica e com massa molecular semelhante ao monômero. Estas formas moleculares são detectadas por diversas técnicas de eletroforese em zona, como em gel de amido<sup>(4,18,19,20,21,31,57)</sup>, em gel de poliacrilamida<sup>(11,22,29,33,34,37,52,54,55,61,63,64,65,69,72,77)</sup>, em eletrofocalização<sup>(11,29,35)</sup> ou pela imunoeletroforese<sup>(19,31,57)</sup>. Discute-se quanto à origem destas formas, sendo interpretadas como produtos gerados artificialmente durante o processo de extração<sup>(31,37,57,62)</sup>, por ação proteolítica<sup>(33,34,35,52,77)</sup> ou como polimorfismo genético<sup>(19,31,69)</sup>.

b. Componentes com atividade biológica e/ou imunológica somatotrófica, mas com massa molecular maior que o HCH monomérico. Estas formas em geral são detectadas por métodos cromatográficos em gel de Sephadex<sup>(18,38,57,62,76,79)</sup>, em gel de troca iônica<sup>(38,41,52,63,72)</sup>, tendo sido também observados em EGPA na presença de redutores<sup>(25,38)</sup>. Estas formas são interpretadas como sendo moléculas de HCH agregadas ou polimerizadas<sup>(22,25,26,34,38,47,57,61,68)</sup>, ligadas a outras proteínas<sup>(64,76)</sup> ou precursoras do HCH<sup>(64,76)</sup>.

Estes dois tipos de componentes, por apresentarem atividade biológica e/ou imunológica somatotrófica, são conjuntamente denominados de isohormônios do HCH<sup>(64)</sup>.

c. Componentes não relacionados ao HCH, que podem ser outros hormônios hipofisários<sup>(16,20,37,44,54,55,62,66,69,72)</sup> ou proteínas teciduais, incluindo enzimas proteolíticas<sup>(33)</sup>. A presença destes componentes, usualmente é comprovada pela pesquisa de sua atividade biológica específica nos preparados de HCH. Em geral, outras atividades hormonais são encontradas em níveis desprezíveis nos preparados clínicos de HCH. Entretanto, uma atividade hormonal não somatotrófica sempre encontrada em maior ou menor grau nos extratos de HCH hipofisário é a prolactina. Parece provável que tanto a atividade somatotrófica como a prolactínica residam em uma mesma molécula, se bem que cada uma, possivelmente, ocupe sítios biologicamente ativos diferentes na molécula<sup>(66,77)</sup>. Durante muito tempo permaneceram dúvidas quanto à existência de um hormônio prolactínico isolado, no homem e nos primatas. Contudo, várias provas biológicas, imunológicas e clínicas favorecem a existência deste hormônio. Muitas das dificuldades em caracterizar a prolactina resultam do fato de que ela é encontrada em quantidades ínfimas na glândula hipofisária, sendo de 20 a 50 vezes menor que a do HCH<sup>(47)</sup>. A sua caracterização química, através da determinação da sequência de aminoácidos poderá estabelecer a sua existência como entidade isolada.

A partir de 1965, após uma visita feita ao Centro de Aplicações Biomédicas de Radiações e Radioisótopos do Instituto de Energia Atômica, pelo Dr. GEMZELL, professor da Universidade de Uppsala, foi iniciada por nosso orientador nesse Centro, a extração e purificação do hormônio de crescimento humano. O método original foi o de ROOS FEVOLD & GEMZELL<sup>(60)</sup>, escolhido por haver condições de armazenamento de hipófises congeladas, fato que permite a extração do hormônio em condições pouco desnaturantes. Inicialmente, usando equipamentos improvisados e hipófises humanas cedidas pelo atual Diretor do Instituto de Medicina Legal de São Paulo, Dr. H. SHIBATA, a metodologia foi sendo modificada, essencialmente, pela introdução de semi-automatização na etapa de fracionamento do extrato daquelas glândulas, em gel de Sephadex G 100<sup>(2)</sup>. Em face dos resultados obtidos, desenvolveram-se planos de pesquisa para a realização de dois objetivos fundamentais: a obtenção de hormônio de crescimento em quantidade adequada para aplicação na terapêutica clínica do nanismo hipofisário — nessa época em andamento nos Estados Unidos com bons resultados — e a obtenção de hormônio suficientemente puro, susceptível de ser marcado com radio-iodo para emprego em sistemas de dosagem radioimunológica.

Antes de sua aplicação clínica era indispensável a caracterização química, imunológica e biológica do produto obtido. Estas características eram necessárias também para que se pudesse usar o hormônio como antígeno a ser marcado com iodeto radioativo, e produto a ser usado como padrão em

comparação com o hormônio padrão internacional da Organização Mundial de Saúde (W.H.O.). Todos estes aspectos foram desenvolvidos de forma mais ou menos simultânea.

Um dos principais interesses deste estudo foi a determinação da massa molecular do HCH. Existem vários métodos para a determinação da massa molecular de proteínas<sup>(32)</sup>, classificados em métodos químicos (baseados na composição de aminoácidos da molécula) e físico-químicos. Os últimos, por sua vez podem ser divididos em 2 categorias: os baseados nas propriedades coligativas da proteína em solução, como o método da pressão osmótica e os baseados na massa molecular da proteína, empregando diversas técnicas de ultracentrifugação para a análise da sedimentação molecular ou técnicas de exclusão cromatográfica em gel de Sephadex<sup>(1,73)</sup>. As técnicas de exclusão avaliam indiretamente a massa molecular através do raio geométrico médio (raio de Stokes) da molécula. Recentemente introduziram-se métodos de exclusão molecular que empregam a eletroforese em zona em matrizes especiais como o gel de amido ou gel de poliacrilamida.

Atualmente, não existe nenhum método físico-químico que possa ser considerado ideal, pois, todos dependem de pressuposições teóricas. Dos métodos, os mais precisos são os que empregam a ultracentrifugação e o da pressão osmótica. Sua aplicação correta depende da aparelhagem sofisticada e de cuidados técnicos elaborados, principalmente do emprego de soluções proteicas altamente puras. Por outro lado, o método cromatográfico em gel de Sephadex e os métodos eletroforéticos podem ser aplicados a proteínas em misturas, desde que se tenham padrões proteicos conhecidos para referência. Com as vantagens adicionais de simplicidade e rapidez de execução, estes métodos têm sido frequentemente empregados, com resultados satisfatórios. Após a introdução dos métodos eletroforéticos, estes vieram a substituir rapidamente o método cromatográfico, pelo seu alto poder de resolução na separação de misturas proteicas e pela economia de material proteico.

A eletroforese em zona em matrizes de géis de amido ou poliacrilamida tira proveito da duas propriedades físico-químicas para efetuar a separação de misturas proteicas: a mobilidade eletroforética e o tamanho molecular. Nos géis sintéticos de acrilamida, a matriz é formada por uma estrutura em malha, devida à polimerização entre a acrilamida (monômero) e o elemento de ligação BIS-acrilamida (polímero). Esta reação é acelerada por catalizadores e exposição à luz (fotopolimerização). Os poros desta malha têm dimensões que se aproximam ao tamanho das moléculas proteicas, retendo-as por fricção. Esta propriedade veio aumentar bastante o poder de resolução na separação eletroforética de misturas proteicas. Uma das principais vantagens dos géis é a possibilidade do controle do tamanho dos poros da matriz, pela variação da concentração dos substratos (acrilamida e BIS-acrilamida). Em comparação ao gel de amido, o gel de poliacrilamida oferece vantagens pelas suas características físicas de transparência, rigidez, termoestabilidade e por ser um meio não-iônico e relativamente inerte do ponto de vista químico<sup>(12,49)</sup>.

ORNSTEIN<sup>(49)</sup> & DAVIS<sup>(12)</sup> padronizaram a técnica de EGPA, estabelecendo as condições para que se tornasse um método altamente reprodutivo. A matriz eletroforética é preparada imediatamente antes do uso e é constituída de 2 géis diferentes: um superior, de concentração baixa em acrilamida, de dimensões pequenas, sobreposto ao gel principal, de maior concentração de acrilamida e longo. A amostra é colocada em cima do primeiro gel ou pode ser incluída em um gel semelhante ao primeiro. Pela escolha de tampões de composição iônica e pH adequados, as espécies iônicas da amostra penetram no primeiro gel e nele se concentram em camadas, de acordo apenas com a sua mobilidade eletroforética. A separação pelo tamanho molecular é levada a efeito quando as camadas proteicas, pela ordem de mobilidade, penetram no segundo gel (também chamado gel principal ou gel de separação). A concentração proteica nas camadas formadas no primeiro gel é muito alta, sendo a espessura da ordem de micrômetros. Este efeito resulta em duas vantagens do método: a separação de espécies iônicas contidas em soluções diluídas e a possibilidade de detectarem-se quantidades muito pequenas de proteínas (da ordem de poucos microgramas)<sup>(12,49)</sup>. A identificação das proteínas após a eletroforese é feita pela coloração dos géis com corantes específicos, revelando-se as proteínas como bandas bem delimitadas e estreitas.

Baseadas nesta técnica, várias metodologias foram elaboradas com a finalidade de estabelecer

métodos simples, reprodutíveis e precisos para a estimativa da massa molecular de proteínas. Estes métodos podem ser divididos em duas categorias: os que mantêm a proteína em seu estado nativo e os que a alteram quimicamente. Na primeira categoria encontra-se o método básico de HEDRICK & SMITH<sup>(28)</sup>, cujo desenvolvimento matemático foi aprofundado por RODBARD & CHRAMBACH<sup>(59)</sup>. Na segunda categoria encontram-se as metodologias nas quais as cargas proteicas são uniformizadas pela reação com substâncias redutoras como o detergente aniônico dodecil-sulfato de sódio (SDS) e beta-mercaptoetanol<sup>(3,7,14,45,67,74)</sup> ou detergentes catiônicos<sup>(27)</sup>. Outras técnicas propõem um aumento da solubilidade da proteína por agentes redutores como a uréia ou o detergente inerte Triton-X<sup>(27)</sup>. Todos estes métodos de uma forma ou de outra, alteram a estrutura molecular. No caso da reação com os detergentes iônicos a discriminação eletroforética processa-se apenas pela massa molecular, desaparecendo eventuais diferenças em mobilidade entre moléculas de massa molecular semelhante.

Diante de todas estas possibilidades de escolha deu-se preferência a um método de EGPA analítico que conserva o estado nativo da molécula proteica. A vantagem do emprego deste tipo de metodologia reside na possibilidade de se obterem informações adicionais sobre o número e tipo de componentes proteicos presentes em um extrato hormonal, conservando a sua integridade imunológica e biológica.

O método adotado para a determinação da massa molecular, foi o descrito por HEDRICK & SMITH<sup>(28)</sup>, usando-se 4 concentrações diferentes de acrilamida no gel de separação. O sistema de EGPA empregado foi o descrito por ORNSTEIN & DAVIS<sup>(12,49)</sup>, omitindo-se a inclusão da amostra em gel, isto é, aplicando-a diretamente sobre o primeiro gel. O tratamento matemático dos resultados seguiu o modelo proposto por RODBARD & CHRAMBACH<sup>(59)</sup>, que permite a caracterização de produtos proteicos quanto a sua massa molecular (pelo raio geométrico médio) e quanto a sua mobilidade eletroforética.

O objetivo da presente dissertação é o de apresentar os resultados obtidos com o fracionamento eletroforético de preparados diferentes de HCH, visando a determinação de sua massa molecular e o estudo comparativo de sua composição proteica. Este estudo foi realizado em vários grupos de amostras, com finalidades diversas. No primeiro grupo, preparações liofilizadas para uso clínico, de procedência diferente, foram comparadas entre si quanto aos dois aspectos acima mencionados. Nos grupos seguintes, três séries de amostras, obtidas pela sequência do fracionamento cromatográfico do extrato hormonal em gel de Sephadex G 100, foram avaliadas quanto à homogeneidade, relacionando-a ao volume da eluição, no intuito de encontrar a fração na qual se pode obter o preparo hormonal mais puro.

## II – MATERIAL E MÉTODOS

### 1 – Extração e Purificação do Hormônio de Crescimento Humano

As extrações de HCH são feitas rotineiramente nos laboratórios do Centro de Aplicações Biomédicas de Radioisótopos e Radiações do Instituto de Energia Atômica, representando para este trabalho apenas um veículo para a obtenção de parte dos produtos submetidos a análise. Uma descrição sucinta das fases mais importantes do processo será exposta.

O método de extração empregado foi o descrito por ROOS, FEVOLD & GEMZELL<sup>(60)</sup>, modificado por ASSIS e cols.<sup>(2)</sup> quanto à primeira extração do material biológico e quanto à semi-automatização durante a fase de fracionamento do extrato em gel de Sephadex G 100.

Os preparados hormonais analisados provêm de 4 extrações recentes (1977) e de 3 extrações realizadas em 1974 e 1975, armazenadas como pó liofilizado a -20°C e recentemente dissolvidas e repurificadas conjuntamente em gel de Sephadex G 100.

Todas as etapas do processamento foram realizadas a 4°C. Cerca de 100 u de hipófise humanas (cedidas pelo Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pelo Instituto Médico Legal), armazenadas congeladas desde a sua obtenção por necrópsia, foram homogeneizadas e extraídas por 4 a 5 vezes, na primeira delas com água destilada e nas outras com tampão fosfato de potássio 0,03 M, pH 6,2. Cada extrato foi centrifugado a 16 000 x g, o resíduo servindo como substrato para a extração seguinte. Os sobrenadantes conjuntos foram levados a pH 7,0 através da titulação com solução de NaOH 1 N. Solução saturada de sulfato de amônio foi adicionada ao extrato até obter-se uma saturação de 50% deste sal, provocando a precipitação de proteínas. O material precipitado foi separado por centrifugação e dialisado contra água destilada até a eliminação completa do sal. Este extrato bruto foi liofilizado e re-extraído por 4 a 5 vezes com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,6, acrescido de NaCl 0,5 M, diluído numa proporção 1:5. O volume deste extrato foi reduzido por ultracentrifugação através de membrana "DIAFLO" PM 10, aplicando-se uma pressão de 3,5 kg/cm<sup>2</sup>. Reduzido para cerca de 30 a 40 ml e contendo até 1,2 g de proteínas quantificadas pelo método de LOWRY (item 7, cap. II), o extrato foi fracionado em coluna refrigerada de Sephadex G 100, de 100 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro (coluna PHARMACIA K 50/100, Uppsala, Suécia), equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,6 contendo NaCl 0,5 M e azida de Na 0,02%. Sendo o sistema fechado, o fluxo ascendente através da coluna foi mantido por meio de uma bomba peristáltica, numa velocidade constante de 45 ml/hora. O eluído foi coletado em frações de 15 ml em coletor automático. O registro simultâneo da eluição proteica através de monitor de luz UV em comprimento de onda de 280 nm (LKB-Uvicord II) foi usado apenas como controle; uma medida mais apurada foi realizada em cada fração coletada, em espectrofotômetro ZEISS-PMQ II, com leitura da absorbância em 280 nm de comprimento de onda em luz UV. Através do registro gráfico destas leituras podem-se distinguir 4 picos proteicos (Figuras 29, 31 e 33), relacionados a seguir com os respectivos volumes de eluição médios, calculados por dados obtidos em diversos fracionamentos, realizados em épocas diferentes.

PICO	V <sub>e</sub> (média ± d.p.)		N
	(ml)		
I	470	40	6
II	870	30	6
III	1 046	67	6
IV	1 860	46	6

V<sub>e</sub> – volume de eluição

N – número de fracionamentos

O HCH, detectado por radioimunoensaio em diversas frações do eluído, é encontrado em quantidades mínimas nos picos I e II; a sua distribuição principal acompanha quantitativamente o cromatograma do pico III do fracionamento em gel de Sephadex G 100; no pico IV não foi determinado<sup>(5)</sup>.

## 2 – Preparações de Hormônio de Crescimento Humano

As preparações abaixo relacionadas diferem entre si pelo método de extração empregado para a sua obtenção, sendo identificadas pelo nome do autor principal do processo. O hormônio extraído em

nosso laboratório, obtido pelo método de ROOS, é identificado pela sigla IEA (Instituto de Energia Atômica), seguida pelo número do lote.

Todos os produtos foram divididos em 4 grupos, de acordo com o objetivo da análise a que foram submetidos. Ao grupo I pertencem os preparos liofilizados (com uma exceção) de outros laboratórios e do IEA, estudados quanto à composição proteica e massa molecular. Nos grupos II, III e IV encontram-se as amostras em solução, coletadas em série nos eluídos do fracionamento cromatográfico em gel de Sephadex; cada grupo corresponde a um lote diferente de HCH-IEA.

## 2.1 – Grupo I

1. HCH RABEN nº30G – doado pelo Dr. M. S. Raben do New England Medical Center Hospital em Boston, E.U.A.
2. HCH STROUD – extraído nos laboratórios do Departamento de Clínica Médica (Divisão), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e gentilmente cedido pelo Dr. A. A. PUPO.
3. HCH MILLS (FC<sub>2</sub>) – extraído no mesmo laboratório acima e doado pelo Dr. A. A. PUPO<sup>(9)</sup>.
4. HCH STROUD – extraído nos laboratórios da Universidade de Brasília e gentilmente cedido pelo Dr. V. B. CRUZ.
5. HCH ROOS – produzido na KABI Laboratorie (Estocolmo, Suécia) doado pela ASTRA Química do Brasil, sendo fornecido em ampolas estéreis para uso clínico. Por radioimunoensaio, a atividade deste hormônio é de 2 U.I./ml.
6. HCH WILHELMI – National Institutes of Health (NIH) – NIH – GH – HS 2160 E – doado pelo Dr. A. E. WILHELMI da Emory University (Atlanta, Georgia – EUA), hormônio puro para radioimunoensaio.
7. HCH IEA LHC 050875 – pó liofilizado em condições estéreis, correspondente ao pico III resultante de uma purificação conjunta do produto de 3 extrações, estocadas liofilizadas a -20°C por 2 a 3 anos.
8. HCH IEA LHC 310177 – pó liofilizado em condições estéreis para aplicação clínica.
9. HCH IEA LHC 270777 – obtido nas mesmas condições da amostra anterior.
10. HCH IEA LHC 270777 – igual ao produto anterior, porém submetido por 2 vezes à liofilização.
11. HCH IEA LHC 031177 – pó liofilizado da fração central de eluído do pico III da purificação em gel de Sephadex (concentração máxima de proteínas).
12. HCH IEA LHC – HCH em solução, pico III total antes da liofilização.

## 2.2 – Grupo II

HCH IEA LHC 050875 – cada amostra corresponde a uma fração dos eluídos de 15 ml, coletados durante a purificação em gel de Sephadex deste lote de hormônio, estocado há 2-3 anos. O lote de extração é o mesmo da amostra 7, grupo I.

Nº da Amostra	Volume de eluição	Identificação
13	860 ml	Início do pico III
14	920 ml	Pico III, porção ascendente
15	980 ml	Pico III, porção ascendente
16	1 040 ml	Pico III, concentração máxima
17	1 100 ml	Pico III, porção descendente
18	1 160 ml	Pico III, porção descendente
19	1 220 ml	Pico III, porção descendente
20	1 280 ml	Pico III, porção descendente
21	1 340 ml	Pico III, porção descendente

### 2.3 – Grupo III

HCH IEA LHC 270777 - Aliquotas coletadas nas mesmas condições do grupo anterior de amostras. O lote de extração é o mesmo das amostras HCH 9 e 10 do grupo I.

Nº da Amostra	Volume de eluição	Identificação
22	840 ml	Pico II, fração de concentração máxima
23	930 ml	Pico III, porção ascendente
24	990 ml	Pico III, porção ascendente
25	1 050 ml	Pico III, concentração máxima
26	1 110 ml	Pico III, porção descendente
27	1 170 ml	Pico III, porção descendente
28	1 230 ml	Pico III, porção descendente
29	1 290 ml	Pico III, porção descendente
30	1 350 ml	Pico III, porção descendente
31	1 410 ml	Pico III, porção descendente
32	1 470 ml	Pico III, porção descendente

### 2.4 - Grupo IV

LHC IEA 031177 - Aliquotas coletadas do mesmo modo que as anteriores; porém de extrato purificado duas vezes na coluna de gel de Sephadex. O 2º fracionamento sucedeu a uma purificação inicial, da qual se eliminou a maior parte do pico I e todo o pico IV; os picos II e III foram reconcentrados por ultrafiltração e repassados pela mesma coluna, ocasião na qual as amostras foram coletadas.

Nº da amostra	Volume de eluição	Identificação
33	400 ml	Pico I, concentração máxima
34	800 ml	Pico II, concentração máxima
35	840 ml	Pico II, porção descendente
36	900 ml	Transição entre picos II e III
37	960 ml	Pico III, porção ascendente
38	1 020 ml	Pico III, concentração máxima
39	1 080 ml	Pico III, porção descendente
40	1 140 ml	Pico III, porção descendente
41	1 200 ml	Pico III, porção descendente
42	1 260 ml	Pico III, porção descendente
43	1 320 ml	Pico III, porção descendente

A dosagem do HCH pelo método de radioimunoensaio desenvolvido por BARTOLINI e cols.<sup>(5)</sup> nos extratos de HCH-IEA (Pico III) estudados, deu os seguintes resultados:

LHC-IEA – 050875 = 1,17 U.I./mg  
LHC-IEA – 310177 = 1,59 U.I./mg  
LHC-IEA – 270777 = 1,95 U.I./mg  
LHC-IEA – 031177 = 0,92 U.I./mg

### 3 – Padrões Proteicos

Estas proteínas puras foram usadas como referência de massa molecular para o estabelecimento da curva-padrão.

1. Bacitracina – Schwarz-Mann, lote nº AZ 2036.
2. Glucagon cristalino – Eli Lilly do Brasil.
3. Insulina porcina cristalina – Eli Lilly Laboratories, lote nº615-D63-10.
4. Mioglobina cristalina (esperma de baleia) – Schwarz-Mann, lote nº AZ 2084.
5. Papaína, duas vezes cristalizada, em suspensão de acetato de Na 0,05 M, pH 4,5 – Sigma.
6. Quimotripsinogênio A (pâncreas bovino) – Schwarz-Mann, lote nº BZ 2598.
7. LH e FSH – Organon do Brasil.
8. Ovalbumina, duas vezes cristalizada – Schwarz-Mann, lote nº Y 3872.
9. Soroalbumina bovina cristalizada – Schwarz-Mann, lote nº AZ 2132.
10. Lactoperoxidase liofilizada – Sigma.

### 4 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

#### 4.1 – Reagentes Analíticos

1. Acrilamida – Bio-Rad.
2. N,N'-metileno bis-acrilamida (BIS) – Bio-Rad.
3. N,N,N',N' tetrametilenodiamina (TEMED) – Bio-Rad.
4. Riboflavina – Roche.
5. Sacarose, cristais – J. T. Baker.
6. Ácido clorídrico concentrado – Carlo Erba.
7. TRIS-hidroximetilaminometano (TRIS básico) – Merck.

8. Glicina – Merck.
9. “Coomassie Brilliant Blue” R-250 – (CBB) – Bio-Rad.
10. Ácido acético glacial – J. T. Baker
11. Azul de bromofenol – Merck.
12. Ácido tricloroacético, cristais – Berzocq.

#### 4.2 – Soluções estoque

##### 4.2.1 – Para Polimerização e Eletroforese

Estas soluções foram preparadas segundo o método descrito por DAVIS<sup>(12)</sup>, mantendo-se a nomenclatura dada por este autor. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar a 4°C, salvo a solução F, que foi armazenada a -15°C.

##### Solução estoque A

TRIS básico	36,6 g
TEMED	0,23 ml
Ácido clorídrico 1 N	48,0 ml
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100 ml
pH 8,9 – ajustado pela adição de HCl 1 N, quando necessário	

##### Solução estoque B

TRIS básico	5,98 g
TEMED	0,46 ml
HCl 1 N	48,0 ml
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100 ml
pH 6,7 – ajustado com HCl 1 N quando necessário	

##### Solução estoque C

Acrilamida	28,0 g
BIS-acrilamida	0,735 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100 ml

##### Solução estoque D

Acrilamida	10,0 g
BIS-acrilamida	2,5 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100 ml

**Solução estoque E**

Riboflavina	4,0	mg
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100	ml

**Solução estoque F**

Sacarose	40,0	g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100	ml

**Solução de azul de bromofenol 0,1%**

Azul de bromofenol	5,0	mg
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	5	ml

**Solução tampão concentrada para eletroforese-TRIS-Glicina 0,4 M**

TRIS básico	6,0	g
Glicina	28,8	g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	1 000	ml
pH 8,3		

**4.2.2 – Soluções Estoque para Fixação, Coloração e Descoloração****Solução de ácido tricloroacético a 50%**

Ácido tricloroacético	50,0	g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	1 000	ml

**Solução CBB a 2%**

Coomassie Brilliant Blue R-250	2,0	g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100	ml

**Solução de ácido acético a 7%**

Ácido acético glacial	70	ml
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	1 000	ml

### 4.3 – Soluções para Polimerização

#### 4.3.1 – Gel de Separação ou Gel Principal

Seguindo a metodologia de HEDRICK & SMITH<sup>(28)</sup>, preparou-se o gel de separação em 4 concentrações diferentes de acrilamida, mantendo constante em 38,1 a relação acrilamida:BIS-acrilamida.

O limite inferior de concentração (7%) foi escolhido por razões práticas, já que concentrações menores, embora possíveis, resultam em géis de baixa consistência, nos quais o fenômeno da difusão proteica é acentuado. Quando ocorre difusão, a banda proteica se apresenta com limites imprecisos, dificultando a medida. O limite superior de 14% foi escolhido para manterem-se as condições de linearidade das retas de FERGUSON, como será explicado no item 5.3. deste capítulo.

Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes da polimerização, depois das soluções-estoque estarem em equilíbrio com a temperatura ambiente.

Para o preparo de cada concentração de gel (A%) foram mantidas as seguintes proporções entre as soluções-estoque:

A%	SOL. A	SOL. C	SOL. E	H <sub>2</sub> O
7	1	2	1	4
10	1	2,85	1	3,15
12	1	3,43	1	2,57
14	1	4	1	2

#### 4.3.2 – Gel Superior

Para qualquer concentração de gel principal o preparo deste gel foi o mesmo, obedecendo à seguinte proporção entre as soluções estoque:

SOL. B	SOL. D	SOL. E	SOL. F
1	2	1	4

Sua concentração em acrilamida foi de 2,5%.

### 4.4 – Material para EGPA

1. Tubos de vidro de 80 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro interno, para moldagem dos géis.
2. Cuba para eletroforese com capacidade para 12 tubos, com reservatórios superior e inferior capazes de conter cerca de 600 ml de tampão (Técnica PERMATRON, São Paulo).
3. Fonte de alta tensão BIO-RAD Modelo 400.
4. Lâmpada para polimerização com luz fluorescente de 15 watts.

5. Micropipetas capilares de 5, 10, 20, 25, 50 e 100 microlitros "Clay Adams", para o preparo de diluições e aplicação das amostras.
6. Seringa de 10 ml, com agulha de aço inoxidável BD 23, de 51 mm de comprimento, usada para a extração dos géis dos tubos de vidro.
7. Tubos de ensaio de 105 x 10 mm, para fixação, coloração e descoloração dos géis.
8. Tubos de vidro de 150 x 6 mm para armazenamento, medida e fotografia dos géis.
9. Régua transparente de 20 cm com divisões de 0,5 mm para medida dos géis.
10. Material fotográfico:  
Câmara fotográfica Asahi Pentax com lente 1:1,4, 50, munida de filtro amarelo e anel de aproximação automático Asahi Pentax nº 1 para ampliações cerca de 1,2 a 1,3 ou nº 2 para as ampliações de 1,5 vezes. Para fotografias coloridas usou-se o filme Kodakolor II de 100 ASA e para as fotografias em preto e branco filme Panatomic X de 32 ASA. Como fundo empregou-se um negatoscópio iluminado. Para fotografar os géis seguiram-se as sugestões dadas por OLIVER<sup>(48)</sup>.

#### 4.5 -- Procedimento Experimental

##### 4.5.1 — Preparo das Amostras Proteicas para Eletroforese

As soluções proteicas de padrões e extratos hormonais foram preparadas de modo que o volume a ser aplicado ao gel contivesse 20 µg de proteínas e 20% de sacarose em solução aquosa. A sacarose foi empregada com a finalidade de aumentar a densidade da solução, evitando sua mistura com tampão no início da eletroforese.

Quando as proteínas eram puras, sob forma cristalizada ou pó liofilizado, eram pesadas em balança analítica com precisão de 0,01 mg e, com base nisto, dissolvidas em água destilada para obter-se concentração de aproximadamente 2,5 mg/ml. Após a quantificação proteica pelo método de LOWRY (item 7, cap. II), quando necessária, a concentração era ajustada com água destilada para 2 mg/ml. Cem microlitros desta solução eram misturados a volume igual de sacarose a 40%, aplicando-se 20 µl desta solução ao gel.

As proteínas não puras ou obtidas em solução, como a papafina e os extratos hormonais coletados durante o fracionamento em Sephadex, eram inicialmente submetidas a diálise contra água destilada a 4°C determinando-se em seguida a quantidade de proteínas. Em muitas amostras dos extratos em solução a concentração proteica era menor que 2 mg/ml; obrigando então ao emprego de maiores volumes de aplicação e/ou à dissolução da sacarose na própria amostra. Quando isto ocorria, procurou-se fixar o volume de aplicação em 50 µl, o que nem sempre foi possível (geralmente nas alíquotas coletadas na porção descendente final do pico III do fracionamento), usando-se por vezes volumes de 60 ou 75 µl. Esta diferença em volume acarretava apenas maior demora na penetração de toda a amostra no gel, não afetando a distância de migração relativa das bandas proteicas no gel principal.

Todas as proteínas assim preparadas ficavam armazenadas a 4°C.

**CONTROLE** — Cada corrida eletroforética foi acompanhada por um gel controle, ao qual se aplicou 20 µl de solução aquosa de sacarose a 20%, preparada ao mesmo tempo que as soluções proteicas, usando-se a mesma solução concentrada de sacarose e a mesma água destilada.

**PROTEÍNAS PADRÃO** -- Dada a escassez do material, glucagon, LH, FSH, papafna e lactoperoxidase tiveram apenas uma determinação em cada concentração de gel. As demais proteínas foram processadas em duplicata, exceto a seroalbumina bovina, que foi analisada em triplicata.

**AMOSTRAS DE HCH** -- Grupo I -- Cada amostra deste grupo foi submetida a eletroforese por uma vez em cada concentração de gel. Grupos II, III e IV. Cada amostra foi analisada uma vez em cada concentração de gel. Sendo as amostras em série, os mesmos componentes apresentaram-se em diversas amostras, podendo então ser consideradas como determinações múltiplas.

#### 4.5.2 – Preparo dos Géis para Eletroforese

Os tubos limpos e secos foram vedados na sua extremidade inferior com filme impermeável adesivo (PARAFILM), para assegurar a formação de uma superfície lisa de gel e dispostos em estante apropriada para manter uma posição rigorosamente vertical.

Logo que estava pronta, a solução de polimerização do gel principal era submetida a vácuo durante 3 a 4 minutos para eliminação de ar e em seguida cuidadosamente dispensada para os tubos de vidro, mantendo uma altura uniforme de 6,5 cm de solução em cada tubo. Sobre a superfície da solução pipetava-se aproximadamente 0,1 ml de água destilada a fim de evitar a formação de menisco na extremidade superior do gel.

A polimerização do gel era levada a efeito deixando os tubos a uma distância de 7 cm da lâmpada fluorescente durante 30 minutos, em temperatura ambiente.

Secada a extremidade superior do tubo, dispensava-se a segunda solução de polimerização, mantendo uma altura de 1 cm. 0,1 ml de água destilada em sua superfície evitavam a formação de menisco. As condições de polimerização eram as mesmas que para o gel principal.

#### Aplicação da Amostra:

Imediatamente antes da aplicação, a solução proteica era homogeneizada em agitador tipo "VORTEX". O volume da amostra era medido em microsipeta capilar, usada para aplicá-lo à superfície do gel superior, adicionando-se 1  $\mu$ l da solução traçadora de azul de bromofenol.

#### 4.5.3 – Eletroforese

Os tubos preparados eram montados verticalmente no aparelho de eletroforese, completando-se o volume de cada um com a solução tampão, antes de preencher os reservatórios com um litro de tampão TRIS-glicina 0,04 M, previamente mantido a 4°C, imergindo completamente as extremidades dos géis.

A eletroforese era efetuada em geladeira a 4°C, com corrente anódica constante de 2 mamp/tubo. A duração da corrida era determinada pela migração da banda visível do traçador até cerca de 5 mm da extremidade inferior do gel.

#### 4.5.4 – Extração dos Géis

Era realizada pela introdução de agulha entre a parede do tubo e a superfície do gel, injetando

água gelada ao mesmo tempo que a agulha era rodada dentro do tubo de modo a desprender toda a superfície do gel.

#### 4.5.5 – Fixação

A fixação das bandas proteicas fazia-se pela imersão dos géis em tubos individuais contendo 7,4 ml de ácido tricloroacético 12,5% por 30 minutos.

#### 4.5.6 – Coloração

Mantendo os géis nos mesmos tubos, adicionava-se 0,2 ml de solução de CBB 2%, resultando numa concentração final de 0,05% do corante. Os géis ficavam durante 18 horas nesta solução.

#### 4.5.7 – Descoloração

Os géis foram descorados por difusão simples, sendo transferidos para tubos de ensaio individuais maiores e lavados com ácido acético a 7%, trocado a cada 4 a 6 horas até o desaparecimento da coloração de fundo.

#### 4.5.8 – Medidas

As medidas de distância de migração das bandas proteicas coradas ( $y$ ), foram feitas ou diretamente no gel ou através de cópias fotográficas. Em ambos os casos, tubos de vidro longos com diâmetro interno ligeiramente maior que o dos géis foram usados para mantê-los em ácido acético a 7%. Tubos idênticos contendo água destilada eram adaptados exatamente por cima dos primeiros tubos, anulando eventuais efeitos de distorção das bandas.

Nos casos em que ocorreu difusão da banda proteica, em geral no gel a 7% de acrilamida, considerou-se o ponto médio da banda como medida da distância de migração.

Em cada gel efetuaram-se as seguintes medidas, expressas em mm:

##### a. Antes da fixação:

1. Comprimento do gel principal –  $l_1$
2. Distância de migração do traçador –  $x_1$

##### b. Após coloração e descoloração:

1. Comprimento do gel principal –  $l_2$
2. Distância de migração de cada banda proteica –  $y$

## 5 – Cálculos

### 5.1 – Correção da Distância de Migração do Traçador Após Coloração – $x_2$ :

$$x_2 = \frac{l_2}{l_1} \cdot x_1$$

## 5.2 – Cálculo da Migração das Bandas Proteicas em Relação ao Traçador – Migração Relativa – $R_m$ :

$$R_m = \frac{y}{x_2} \cdot 100 \quad (ii)$$

Para o cálculo das retas de FERGUSON (item 5.3.), empregou-se o valor de  $\log R_m$  multiplicado por 100. Assim,  $\log R_m$  denota:

$$\log R_m : 100 \cdot \log \frac{y}{x_2} \cdot 100 \quad (iii)$$

### 5.3 – Reta de FERGUSON

FERGUSON<sup>(18)</sup> estabeleceu bem o relacionamento que existe entre as distâncias de migração relativa ( $R_m$ ) de uma proteína e as respectivas concentrações de gel num sistema de eletroforese em gel.

Dentro de um determinado limite de concentração de acrilamida, que vai no máximo até cerca de 15%<sup>(17)</sup> a relação entre o logaritmo da  $R_m$  e a concentração respectiva de acrilamida é linear.

#### 5.3.1 – Equação da Reta

As retas de FERGUSON foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados, não ponderada, em calculadora de mesa (Hewlett – Packard 2 100 B) programada, sendo A% tratado como variável independente (X) e  $\log R_m$  como variável dependente (Y).

Em gráfico, representaram-se na abscissa as concentrações crescentes de acrilamida e na ordenada os valores de  $\log R_m$ .

As fórmulas empregadas no cálculo foram:

Equação da Reta:

$$Y = a + b.X \quad (iv)$$

onde:

$b$  = inclinação da reta

$a$  = intersecção da reta com a ordenada

$X$  = variável independente

$Y$  = variável dependente

Cálculo de  $b$ :

$$b = \frac{N \cdot \sum (x_i \cdot y_i) - \sum x_i \cdot \sum y_i}{N \cdot \sum (x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad (\text{v})$$

onde N = número de dados experimentais.

Cálculo de a:

$$a = \bar{Y} - b \cdot \bar{X} \quad (\text{vi})$$

onde:

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{N} \quad (\text{vii})$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum y_i}{N} \quad (\text{viii})$$

O coeficiente de correlação r é dado por:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{X}) (y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{X})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{Y})^2}} \quad (\text{ix})$$

Substituindo as variáveis na equação iv e introduzindo a nomenclatura correntemente usada para os parâmetros a e b, a reta de FERGUSON pode ser assim escrita:

$$\log R_m = -K_R \cdot A\% + \log Y_0 \quad (\text{x})$$

Os 2 parâmetros obtidos através da reta de FERGUSON são:

- Inclinação da reta: fornece o valor do coeficiente de retardamento  $-K_R$  - (unidade =  $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) da proteína no sistema de EGPA. Este parâmetro é uma função do tamanho molecular da proteína, sendo diretamente proporcional a ele.
- Intersecção da reta com o eixo de ordenadas:  $\log Y_0$  - pela interpretação teórica representa a mobilidade eletroforética da proteína quando a concentração de acrilamida é igual a zero.  
Este parâmetro é indicativo da magnitude da carga negativa molecular. Em outras palavras, quanto maior o valor da carga negativa da proteína, maior é a sua mobilidade em direção ao ânodo, traduzindo-se isto por um valor maior de  $\log Y_0$  quando comparado ao  $\log Y_0$  de uma proteína de mesma massa molecular, mas com menor carga negativa. Os valores conjuntos de  $K_R$  e  $Y_0$  são característicos para cada proteína analisada num dado sistema de EGPA.

### 5.3.2 – Análise Estatística das Retas de FERGUSON

Nas amostras do grupo I, a adequação dos dados experimentais à reta calculada foi avaliada pelo coeficiente de correlação  $r$  (fórmula (ix)).

Nas amostras dos grupos II, III e IV, as determinações repetidas permitiram uma análise de variância, pela qual se pôde avaliar a precisão da reta de regressão e verificar se o modelo de regressão simples foi adequado aos dados experimentais.

Os cálculos estatísticos destes grupos foram realizados no Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo. O modelo seguido e as tabelas consultadas são dados por DRAPER & SMITH<sup>(13)</sup>.

Pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se programas de computador, foram calculados os modelos para os dados agrupados de cada componente.

#### 5.3.2.1 – Regressão da Reta Estimada

A existência de regressão foi avaliada pela análise de variância, testando a hipótese  $H_0: b = 0$ , através da estatística  $F$ , obtida pela análise descrita na tabela ANOVA 1<sup>(13)</sup>:

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DE QUADRA- DOS (SQ)	QUADRADO MÉ- DIO (QM)	$F_1$
REGRESSÃO	1	$b^2 \cdot \sum (x_i - \bar{X})^2$	$\frac{SQ_{Reg}}{G. L.}$	$\frac{QM_{Reg}}{s^2}$
RESÍDUO	$N - 2$	$SQT - SQ_{Reg}$	$s^2 = \frac{SQ_{Res}}{G. L.}$	
TOTAL	$N - 1$	$\sum y^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$		

onde:

G. L. = graus de liberdade

$b$  = parâmetro da reta de regressão (inclinação) – fórmula (v)

$x_i$  = variável independente

$y_i$  = variável dependente

$\bar{X}$  = média dos valores  $x_i$ , dada pela fórmula (vii)

$N$  = número total de observações

$F_1$  =  $F$  calculado

Para a estimativa da existência de regressão, o  $F_1$  foi comparado ao  $F$  tabelado ao nível de confiança de 95%<sup>(13)</sup>. O coeficiente de explicação  $R^2$ , assim como o coeficiente de correlação  $r$ , indica quantitativamente a dispersão dos dados amostrais em relação à reta estabelecida.  $R^2$  é dado por

$$R^2 = \frac{SQ_{Reg}}{SQ_{Total}}$$

### 5.3.2.2 – Adequação da Reta Estimada

Através do resíduo obtido pela análise da tabela ANOVA 1, efetuou-se outra análise para testar se existe ou não uma falta de ajustamento da reta aos dados, dada pelo valor da estatística  $F_2$ , descrita na tabela ANOVA 2:

FORTE DE VARIAÇÃO	G. L.	SOMA DE QUADRADOS (SQ)	QUADRADO MÉ- DIO (QM)	$F_2$
FALTA DE AJUSTAMENTO	$\Sigma (k - 1)$	$SQ_{Res} - SQ_{ep}$	$QM_{fa} = \frac{SQ}{G.L.}$	$\frac{QM_{fa}}{s_0^2}$
ERRO PURO	$\Sigma (k - 1)$	$\Sigma (y_i)^2 - k \cdot \left(\frac{\Sigma y_i}{k}\right)^2$	$s_0^2 = G.L.$	

onde:

$k$  = número de determinações em dado nível de  $X$ .

$SQ_{Res}$  = soma de quadrados do resíduo, dado pela tabela ANOVA 1.

índice  $fa$  = falta de ajustamento

G.L. = graus de liberdade

O confronto de  $F_2$  com o  $F$  tabelado ao nível de significância de 5%, revela se o modelo da reta é ou não adequado.

### 5.3.2.3 – Comparação Entre Duas Médias

A significância da diferença entre duas médias, foi avaliada pelo teste  $t$  de STUDENT, aplicando-se as seguintes fórmulas:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma \sqrt{1/N_1 + 1/N_2}}$$

onde

$$\sigma = \sqrt{\frac{N_1 \cdot s_1^2 + N_2 \cdot s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

$\bar{X}_1$  e  $\bar{X}_2$  = médias a serem testadas

$s_1$  e  $s_2$  = desvios-padrão das respectivas médias

$N_1$  e  $N_2$  = número de dados usados no cálculo das respectivas médias.

O  $t$  calculado foi confrontado ao  $t$  tabelado ao nível de 5% de significância.

### 5.3.3 – Interpretação das Retas de FERGUSON

Segundo o trabalho fundamental de HEDRICK & SMITH<sup>(28)</sup> a interpretação das retas de FERGUSON, características de uma proteína processada por EGPA em concentrações variadas de acrilamida, pode revelar 2 tipos de componentes: os isômeros de carga e os isômeros de massa. Ambos são de ocorrência habitual em uma série de proteínas consideradas puras.

Assim, para uma proteína podem-se identificar várias bandas coradas no gel de poliacrilamida, a principal delas, geralmente o monômero, de coloração intensa. Ao se traçar o gráfico das retas de FERGUSON para cada uma destas bandas, os isômeros de carga caracterizam-se pelo paralelismo entre as retas enquanto que os isômeros de massa são representados por retas convergentes que se cruzam num ponto correspondente a uma concentração de acrilamida próxima a zero, em geral em torno de 2 – 3%<sup>(28,56)</sup>.

Os isômeros de carga caracterizam-se por apresentarem a massa molecular praticamente idêntica ao componente principal, diferindo deste pela mobilidade eletroforética, ou seja, pela carga; este fato se manifesta pela semelhança entre os coeficientes de retardamento  $K_R$ . Os isômeros de massa caracterizam-se por apresentarem massa molecular múltipla da proteína monomérica (polímeros), tendo valores de  $K_R$  maiores que a forma monomérica. Proteínas contaminantes são representadas por retas que não apresentam nenhum destes tipos de relacionamento com a proteína principal.

### 5.4 – Curva Padrão de Referência de Massa Molecular

Sendo o parâmetro  $K_R$  uma função da massa molecular de uma proteína, é este o valor experimental usado para a construção da curva-padrão de massa molecular.

O método de escolha para o estabelecimento da curva padrão foi o desenvolvido por RODBARD & CHRAMBACH<sup>(69)</sup>, que após compararem diversos tipos de curvas, concluíram que o melhor relacionamento entre os valores experimentais ( $K_R$ ) e a massa molecular, era obtido pela raiz quadrada de  $K_R$  ( $\sqrt{K_R}$ ) e pelo emprego de um valor indireto da massa molecular, ou seja, o raio molecular geométrico médio ( $\bar{R}$ ).

#### 5.4.1 – Cálculo do Raio Molecular Geométrico Médio – $\bar{R}$ :

$$\bar{R} = \left( \frac{3 \cdot MM \cdot \bar{v}}{4 \cdot \pi \cdot N} \right)^{1/3} \quad (\text{x})$$

onde:

MM = massa molecular (d)<sup>(51)</sup>

$\bar{v}$  = volume específico parcial da proteína = 0,74 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup> (59)

N = número de Avogadro = 6,0230.10<sup>23</sup> mol<sup>-1</sup>

$\pi$  = 3,1416

Esta fórmula pode ser escrita de maneira simplificada:

$$\bar{R} = C \cdot (MM)^{1/3} \quad (\text{xii})$$

onde:

$$C = \left( \frac{3 \cdot \bar{v}}{4 \cdot \pi \cdot N} \right)^{1/3} \quad (\text{xiii})$$

C é constante e igual a 6,64.10<sup>-9</sup> cm<sup>3</sup>.mol.g<sup>-1</sup>. Para as proteínas padrão, o  $\bar{R}$  foi deduzido pela introdução do valor conhecido de massa molecular. O resultado é dado em nanômetros (10<sup>-9</sup> m).

#### 5.4.2 – Cálculo da Curva Padrão

A dedução desta reta obedeceu às equações dadas para o cálculo da reta de regressão pelo método dos mínimos quadrados, não ponderada e não condicionada, tratando-se os valores de  $\bar{R}$  como variável independente e de  $\sqrt{K_R}$  como variável dependente. As fórmulas empregadas são as mesmas apresentadas no item 5.3.1. do capítulo II – fórmulas (iv) a (ix). Com as devidas substituições, a equação da reta pode ser escrita:

$$\bar{R}_i = b \cdot \sqrt{K_{R_i}} + a \quad (\text{xiv})$$

onde:

b = inclinação da reta

a = intersecção do eixo das ordenadas

#### 5.4.3 – Análise Estatística

A existência de regressão da reta calculada, foi avaliada pela análise de variância dada na tabela ANOVA 1 do item 5.3.2.1. deste capítulo (pág. 20). O F calculado ( $F_c$ ) foi comparado ao F tabelado ao nível de 1% de significância.

#### 5.4.4 – Intervalo de Confiança de um Valor Estimado pela Reta de Regressão

$$\bar{R}(\sqrt{K_{R_i}}) \pm t_{\alpha} \cdot s \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(\sqrt{K_{R_i}} - \sqrt{K_R})^2}{\sum (\sqrt{K_{R_i}} - \sqrt{K_R})^2}} \quad (xv)$$

onde:

$\bar{R}(\sqrt{K_{R_i}}) = \text{Raio molecular geométrico médio estimado pela reta de regressão para } \sqrt{K_{R_i}}$ .

$t_{\alpha}$  = Obtido na tabela t de STUDENT<sup>(13)</sup>, com N-2 graus de liberdade, ao nível de confiança  $\alpha = 0,95$ ;  $t = 1,75$

N = número de observações

s =  $\sqrt{\text{QMRes}}$  – obtido pela análise de variância da tabela ANOVA 1.

#### 5.5 – Estimativas de $\bar{R}$ e da MM das Amostras de HCH

Tendo sido estabelecida uma curva-padrão de referência que associa o dado experimental  $K_R$  ao  $\bar{R}$ , obtivemos diretamente as estimativas deste último, resolvendo a equação da reta, dada pela fórmula (xiv), pela introdução do valor de  $\sqrt{K_R}$  da proteína em estudo.

A estimativa da massa molecular baseou-se no valor calculado de  $\bar{R}$ , introduzindo-o na fórmula simplificada (xii).

Para o cálculo do intervalo de confiança da estimativa da MM, seguiu-se o mesmo processo, ou seja: uma vez calculada a variação de R pela fórmula (xv), conhecia-se os seus valores no limite inferior e no superior, podendo-se então aplicar a fórmula (xii) para determinar o intervalo em termos de MM.

#### 6 – Nomenclatura dos Isohormônios e Outros Componentes

A nomenclatura dos componentes de HCH, que no sistema de EGPA se apresentam como isômeros de carga, seguiu o modelo recentemente proposto por SKYLER e cols.<sup>(64)</sup>.

Neste, os isohormônios, isômeros de carga de HCH, são classificados de acordo com dois critérios:

- 1º MASSA MOLECULAR – de acordo com este critério os isohormônios caem em dois grupos: de massa molecular maior ou igual ao valor de 21 500, designados com letras maiúsculas, de massa molecular menor que o valor acima, designados com letras minúsculas.

2º MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (ou carga negativa crescente) – são os isohormônios A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D e E e os correspondentes de massa molecular menor.

Este sistema de nomenclatura não inclui os isômeros de massa.

Por uma questão de simplificação, a nomenclatura dos componentes considerados secundários, arbitrariamente continuou na sequência do alfabeto, a partir de F.

## 7 – Método de Quantificação Proteica – Método de Lowry

Com a finalidade de uniformizar a quantidade de proteínas a ser aplicada a cada eletroforese em gel de poliacrilamida, havia a necessidade de introduzir-se um método preciso de quantificação de proteínas em solução. Isto deveu-se a 2 fatores:

- 1º À imprecisão observada na pesagem de quantidades da ordem de poucos miligramas de proteínas padrão e de extratos hormonais, disponíveis em quantidades muito pequenas;
- 2º À inconveniência de nova liofilização dos extratos em solução.

O método escolhido foi o desenvolvido por LOWRY e cols.<sup>(42)</sup>. As soluções reagentes foram usadas num volume triplo do originalmente descrito, para que se tivesse um volume adequado às cubetas de leitura espectrofotométrica de maior caminho óptico:

### 7.1 – Padrão Proteico

Soroalbumina bovina, fração V de Cohn (SAB), pó liofilizado – Sigma lote nº 55C-0074.

### 7.2 – Reagentes Analíticos

1. Hidróxido de sódio – Carlo Erba
2. Carbonato de sódio – Carlo Erba
3. Sulfato de cobre pentahidratado – Carlo Erba
4. Tartarato de potássio – Carlo Erba
5. Reativo de Folín-Ciocalteu concentrado – Merck
6. Fenolftaleína – Merck
7. Solução de hidróxido de sódio 0,5 N para titulação – preparada no laboratório de Radioquímica do I E A.

### 7.3 – Soluções Estoque

1. Solução estoque A' (Carbonato de sódio 2%)
 

Carbonato de sódio	10 g
NaOH 0,1 N q.s.p.	500 ml

2. Solução estoque B' (Sulfato de cobre 1%)

Sulfato de cobre pentahidratado	0,5 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	50 ml

3. Solução estoque C' (Tartarato de potássio 2%)

Tartarato de potássio	1 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	50 ml

Todas as soluções estoque filtradas, bem como o reativo de FOLIN CIOCALTEU eram armazenadas a 4°C. Modificou-se o reagente B descrito por LOWRY, transformando-o em duas soluções estoque equivalente – B' e C' – pois havia formação rápida de precipitado durante o armazenamento.

#### 7.4 – Soluções Reagentes

1. Solução reagente A – preparada imediatamente antes do uso.

Solução estoque A' – 100 ml
Solução estoque B' – 1 ml
Solução estoque C' – 1 ml

2. Reativo de FOLIN-CIOCALTEU 1 N

Reativo de FOLIN-CIOCALTEU concentrado foi titulado com NaOH 0,5 N, empregando-se como indicador a fenolftaleína. A média de 3 titulações revelou uma solução 2,36 N.

Antes de seu emprego o reativo concentrado era diluído com água destilada para obtenção de solução 1 N.

#### 7.5 – Material

1. Tubos de ensaio com capacidade para 5 ml, com 10 mm de diâmetro interno.
2. Espectrofotômetro ZEISS PMQ II, com cubetas de vidro de 2 cm de caminho óptico e capacidade volumétrica de 5 ml.
3. Pipetas volumétricas e micropipetas capilares "CLAY ADAMS".
4. Balança analítica METTLER-H.

#### 7.6 – Procedimento Experimental

##### 7.6.1 – Preparo das Amostras de Padrão Proteico

Prepararam-se 3 soluções aquosas idênticas de SAB, pesando 5 mg em balança analítica, dissolvidas em 10 ml de água destilada mediante agitação magnética leve. A partir destas, 14 diluições foram obtidas: de 5 a 60 µg/200 µl, com acréscimos de 5 µg – e de 60 a 80 µg/200 µl – com acréscimos de 10 µg em cada diluição seguinte, conforme o protocolo relacionado a seguir:

Nº	$\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$	$\mu\text{l}$ de solução concentrada	$\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$
1	5	50	950
2	10	100	900
3	15	150	850
4	20	200	800
5	25	250	750
6	30	300	700
7	35	350	650
8	40	400	600
9	45	450	550
10	50	500	500
11	55	550	450
12	60	600	400
13	70	700	300
14	80	800	200

Cada uma destas soluções foi processada em triplicata no ensaio.

## 7.6.2 – Preparo das Amostras Desconhecidas para Dosagem

### 7.6.2.1 – Padrões Proteicos ou Extratos Hormonais Liofilizados

Foram dissolvidos conforme já foi descrito no item 4.5.1. para EGPA. Destas soluções de aproximadamente 2,5 mg/ml, retiravam-se 75 ou 100  $\mu\text{l}$ , diluindo-os, respectivamente, em 925 ou 900  $\mu\text{l}$  de água destilada. O preparo destas diluições era guiado pelo objetivo de se alcançar uma solução que em 200  $\mu\text{l}$  contivesse entre 10 a 60  $\mu\text{g}$  de proteínas, zona de maior confiança na reta de regressão.

### 7.6.2.2 – Soluções Proteicas

Nestas, a escolha do volume adequado para dosagem era empírica, baseada na experiência adquirida após alguns ensaios e no conhecimento da quantidade de proteína aplicada à coluna de gel de Sephadex. Toda solução cuja concentração proteica não se enquadrasse na zona de linearidade da reta padrão era refeita, usando-se a diluição conveniente.

## 7.6.3 – Protocolo do Ensaio

Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente. Cada ensaio seguiu o protocolo a seguir:

Nº DO TUBO	IDENTIFICAÇÃO	SOLUÇÃO PROTEICA ( $\mu$ l)	REAGENTE A (ml)	REATIVO FOLIN- CIOALTEU 1N , (ml)
1 – 3	Controle zero	*	3	0,3
4 – 6	Controle SAB 10	200	3	0,3
7 – 9	Controle SAB 25	200	3	0,3
10 – 12	Controle SAB 40	200	3	0,3
13 – 15	Sol. desconhecida	200	3	0,3
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
(n – 2) – n	Sol. desconhecida	200	3	0,3

\* - 200  $\mu$ l de água destilada

Em cada ensaio havia dois tipos de controle:

- a. **Controle zero** – sem proteína; o volume conjunto destes 3 tubos no final do tempo de reação serviu para calibrar o ponto zero da leitura espectrofotométrica.
- b. **Controles SAB** – três níveis de concentração da proteína padrão foram testados em cada ensaio, para assegurar que as condições estabelecidas para a curva-padrão tinham sido mantidas durante o ensaio. Os controles SAB 10, 25 e 40 correspondem às soluções de nºs 2, 5 e 8 usadas no estabelecimento da curva padrão.

A adição do reagente A foi seguida de homogeneização em agitador tipo "Vortex" e o tempo de reação foi de 10 minutos. A adição do reativo de FOLIN-CIOALTEU foi seguida de agitação imediata e o tempo de reação foi de 30 minutos.

Para o estabelecimento da curva padrão seguiu-se o mesmo protocolo, com exceção dos controles SAB, fazendo a substituição das soluções proteicas desconhecidas pelas soluções padrão conhecidas: de 5 a 80  $\mu$ g de proteína.

#### 7.6.4 – Leitura Espectrofotométrica

Esta leitura era realizada sempre dentro de 2 horas no máximo após a adição do último reativo. Os parâmetros fixos da leitura foram:

- cubetas de vidro com caminho óptico (D) = 2 cm;
- leitura da absorbância em comprimento de onda de luz visível de 750 nm;
- fenda – 0,1

#### 7.7 -- Curva Padrão

As leituras espectrofotométricas correspondentes às 14 diluições das 3 soluções de SAB, em triplicata, encontram-se na tabela XVI do apêndice.

### 7.7.1 – Cálculo da Curva Padrão

Calculou-se uma reta de regressão pelo método dos mínimos quadrados, não ponderada, condicionada, pelas equações (iv) a (ix) dadas no item 5.3.1. deste capítulo. Como variável independente (X) consideram-se os valores de  $\mu\text{g}$  de proteína (P) e como variável dependente (Y) as respectivas médias das leituras espectrofotométricas ( $\bar{A}_{750}$ ), mostrados na Tabela XVII do apêndice. Em gráfico linear observou-se linearidade entre os valores de 0 a 60  $\mu\text{g}$  de proteína, usando-se os valores correspondentes para os cálculos. Foi obtida a seguinte equação para a reta:

$$\bar{A}_{750} = 0,0104 \cdot P + 0,0110$$

com  $r = 0,9993$

A distribuição dos pontos experimentais em gráfico linear assim como a reta média podem ser vistos na Figura 35 do apêndice.

### 7.7.2 – Análise Estatística da Reta

Para a análise estatística empregou-se a análise de variância, pelos testes de  $R^2$  e F, como descrito no item 5.3.2.1. deste capítulo. A tabela com os resultados desta análise encontra-se no apêndice (Tabela XVIII). Pelo valor alto dos coeficientes de correlação  $r$  e de explicação ( $R^2$ ) e pelo confronto de F calculado com o F tabelado, evidencia-se a adequação altamente significativa da reta calculada aos pontos experimentais, ao nível de 1% de significância.

## 7.8 – Quantificação Proteica das Amostras Desconhecidas

Os valores médios das 3 leituras espectrofotométricas das amostras desconhecidas, foram aplicados à equação da reta padrão para a obtenção do resultado em  $\mu\text{g}$  de proteínas. Descartaram-se valores que não se enquadraram na zona de linearidade – 10 a 60  $\mu\text{g}$  – e triplicatas discordantes.

## III – RESULTADOS

### 1 – Curva Padrão para Estimativa do Raio Geométrico Médio ( $\bar{R}$ ) e da Massa Molecular (MM)

#### 1.1 – Caracterização das Proteínas – Padrão

Ao todo foram analisadas dez proteínas puras com MMs conhecidas, apresentadas na Tabela I. Consultando a bibliografia sobre a matéria, encontrou-se uma certa variabilidade quanto às informações sobre o valor da MM de várias proteínas comumente empregadas como referência. Esta inconstância pode ser atribuída ao fato de que não existe nenhum método de determinação de massa molecular em que não haja a introdução de um certo fator de erro nesta estimativa. Mesmo os métodos mais precisos, como o da pressão osmótica ou os baseados na sedimentação por ultracentrifugação, esbarram em dificuldades técnicas e em pressuposições teóricas<sup>(74)</sup>. Em vista disso, no estabelecimento de curva-padrão, consideraram-se para cálculos futuros todos os valores encontrados, relacionados na tabela I. Ao se examinar as médias e os d.p. das MMs atribuídas a uma proteína, verifica-se que o d.p. aumenta nas proteínas maiores, confirmando a observação de que os fatores de erro são tanto maiores quanto maior a massa da proteína<sup>(24)</sup>. Na Tabela I especificam-se as fontes bibliográficas nas quais se obteve os valores de MM.

**Tabela I**  
**Massas Moleculares Monoméricas das Proteínas Padrão**

Nº	PROTEÍNA	MM (d)		MÉDIA ± d.p.	FONTES
1	Bacitracina	1 411	1 450	1 431 ± 28	64; SM*
2	Glucagon	3 485	3 500	3 493 ± 11	64; 1, 45
3	Insulina	5 700	5 730	5 721 ± 18	14, 67; 58; 24, 59
	Porcina	5 733			
4	Mioglobina	17 500	17 600	17 633 ± 153	14, 58; 1, 24; 27, 59, SM
		17 800			
5	Papaína	20 700	23 000	21 850 ± 1 626	59; 74
6	Quimotripsinogênio A	22 825	23 200	24 073 ± 1 243	17; 27; 58; 1; 14, SM
		23 600	25 000		
		25 741			
7	LH	31 000		31 000 ± ...	58
7	FSH	38 000		38 000 ± ...	59; 64
8	Ovalbumina	43 000	43 500	44 900 ± 1 673	24; 17, 59, 64, SM; 1, 7, 27; 14, 70; 28
		45 000	46 000		
		47 000			
9	SAB	64 000	65 000	66 500 ± 1 871	70; 28; 1, 27, 59, 64; 3, 7, 45, 67, 73, 74; 58
		66 000	67 000		
		68 000	69 000		
10	Lactoperoxidase	85 000	90 400	89 340 ± 3 919	58; 17; 74
		92 620			

SM\* = catálogo do laboratório fornecedor da proteína (SCHWARZ-MANN).

A variação da MM média foi de 1 431 a 89 340 d.

Na Tabela II relacionam-se os valores do raio molecular geométrico médio ( $\bar{R}$ ), calculados pela fórmula (xi), para cada um dos valores de MM da Tabela I. A variação das médias do  $\bar{R}$  foi de 0,745 a 4,270 nm.

Tabela II

Valores de  $\bar{R}$  Calculados para cada Valor de Massa Molecular das Proteínas Padrão, com Médias e D.P.

Nº	PROTEÍNA	F*	$\bar{R}$ (nm)	M. $\pm$ d.p.
1	Bacitracina	mo	0,74 0,75	0,745 $\pm$ 0,007
2	Glucagon	mo	1,00 1,01	1,005 $\pm$ 0,007
3	Insulina	mo	1,19 1,19 1,19	1,190 $\pm$ 0,000
	Insulina	di	1,49 1,50 1,50	1,497 $\pm$ 0,006
4	Mioglobina	mo	1,72 1,73 1,73	1,727 $\pm$ 0,006
5	Papafina	mo	1,82 1,89	1,855 $\pm$ 0,049
6	Quimotrip.	mo	1,88 1,89 1,90 1,94 1,96	1,914 $\pm$ 0,034
	Quimotrip.	di	2,37 2,39 2,40 2,45 2,47	2,416 $\pm$ 0,042
7	LH	mo	2,09	2,090 ...
	FSH	mo	2,23	2,230 ...
8	Ovalbumina	mo	2,33 2,34 2,36 2,38 2,40	2,362 $\pm$ 0,029
	Ovalbumina	di	2,93 2,94 2,98 3,00 3,02	2,974 $\pm$ 0,038
9	S.A.B.	mo	2,66 2,67 2,68 2,70 2,71 2,72	2,690 $\pm$ 0,024
	S.A.B.	di	3,35 3,36 3,38 3,40 3,41 3,43	3,388 $\pm$ 0,031
	S.A.B.	tri	3,83 3,85 3,87 3,89 3,91 3,93	3,880 $\pm$ 0,037
	S.A.B.	tetra	4,22 4,24 4,26 4,28 4,30 4,32	4,270 $\pm$ 0,037
10	Lactoperoxidase	mo	2,92 2,98 3,00	2,967 $\pm$ 0,042

F\* = forma da molécula:

mo = monomérica; di = dimérica; tri = trimérica, tetra = tetramérica.

Quimotrip. = Quimotripsinogênio A

## 1.2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os critérios adotados para a caracterização de uma proteína pela EGPA analítica, foram os seguintes:

- reconhecimento como banda bem definida no gel especificamente corado para proteínas;
- Estabelecimento dos parâmetros  $K_R$  e  $Y_0$  da reta de FERGUSON.

O coeficiente de retardamento obtido pela equação da reta de FERGUSON tem valor negativo. Contudo, por uma questão de maior clareza de exposição, ele será citado no texto pelo seu valor absoluto, subentendendo-se que:

$$K_R = -K_R \cdot 10^2 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \quad (24)$$

### 1.2.1 – Identificação das Bandas Proteicas

Todos os componentes citados, em geral apresentaram-se como bandas bem definidas, cuja identificação não causou problemas. A numeração das bandas com algarismos romanos, deu-se pela ordem de intensidade de coloração. A banda com maior intensidade de coloração em todas as proteínas foi considerada como sendo a forma monomérica, a única exceção sendo a insulina, que nas condições de análise é mais abundante na forma dimérica.

### 1.2.2 – Migração Relativa (R<sub>m</sub>) – Retas de FERGUSON

Na Tabela XIX do apêndice, apresentam-se os valores de log R<sub>m</sub> encontrados nas quatro concentrações de gel, para todos os componentes das proteínas padrão, a partir dos quais se obtiveram os parâmetros das retas de FERGUSON.

Nas amostras em duplicata, pode-se verificar a pequena variabilidade entre as medidas correspondentes, indicando a boa reprodutibilidade do método.

A maioria dos índices de correlação entre os pontos experimentais variou em torno de 99%; os valores mais baixos aceitos foram os da bacitracina, cujas bandas se apresentaram um pouco difusas. Retas com índice de correlação menor que 90,00%, como a reta III da SAB (3a. determinação), não foram incluídas nos resultados. A falta de alguns valores de log R<sub>m</sub> se justifica por problemas técnicos ou dificuldades na identificação das bandas.

Nas Figuras de 2 a 11 apresentam-se os gráficos representativos dos padrões, demonstrando-se o paralelismo ou a convergência das retas que orientaram a classificação dos componentes proteicos em isômeros de carga ou isômeros de massa, de acordo com o exposto no item 5.3.3. do Capítulo II.

Classificaram-se como isômeros de carga dos monômeros as bandas I a III da bacitracina, I a IV do glucagon, I a III da mioglobina e I a III da ovalbumina; a banda III da insulina foi considerada isômero de carga do dímero (banda I). Como o coeficiente de retardamento dos isômeros de carga é igual ao da forma principal da proteína, obtêm-se para esta, tantas medidas repetidas do K<sub>R</sub>, quantos forem os isômeros de carga.

Classificaram-se como isômeros de massa dímeros, as bandas I e III da insulina, a banda II do quimotripsinogênio A, a banda IV da ovalbumina e como dímero, trímero e tetrâmero respectivamente, as bandas II, III e IV da SAB. As massas moleculares destas formas poliméricas foram obtidas pelo produto entre a massa molecular do monômero e o número de moléculas associadas.

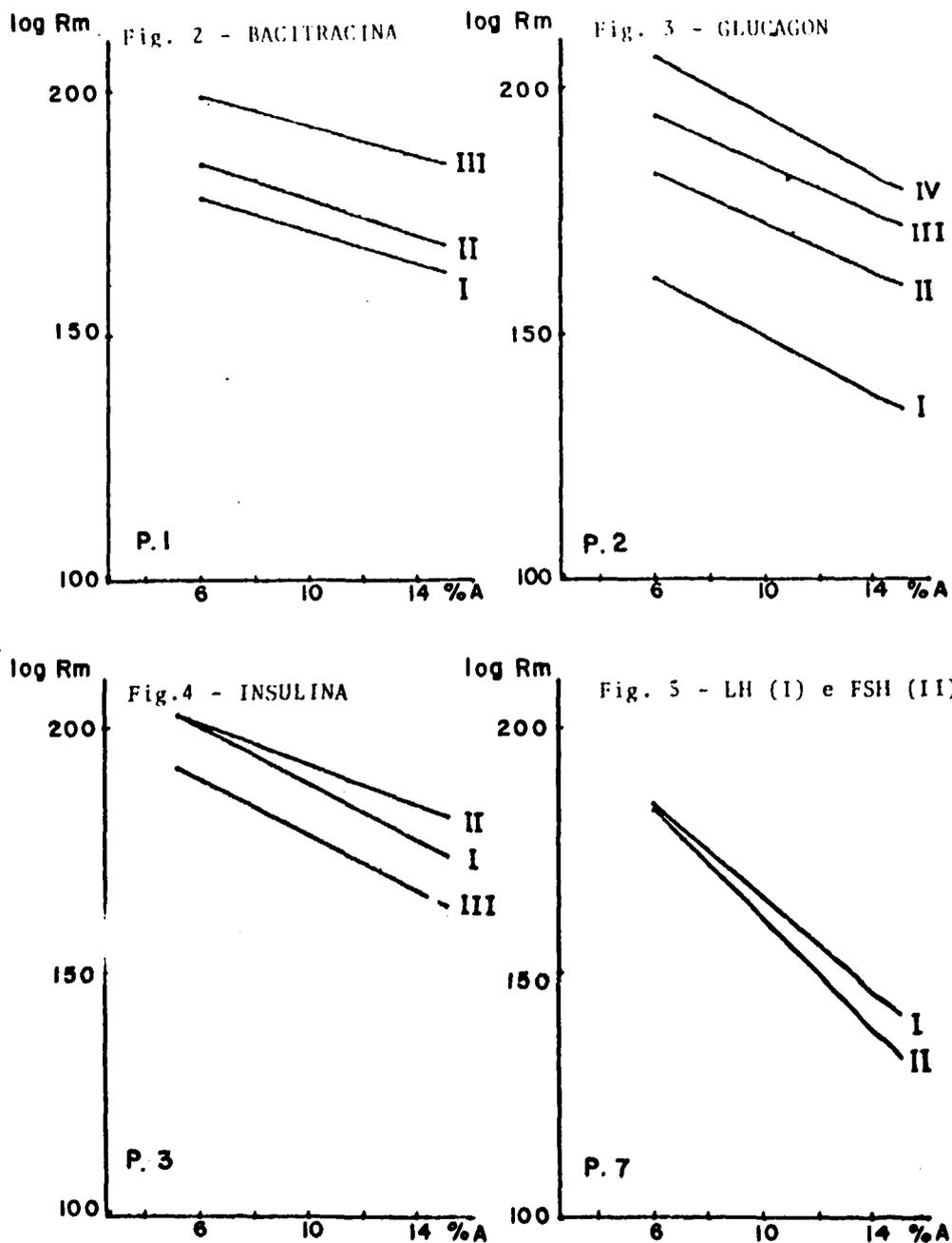
Nos padrões papaína, LH, FSH e lactoperoxidase, identificou-se apenas a forma monomérica.

### 1.3 – Curva Padrão

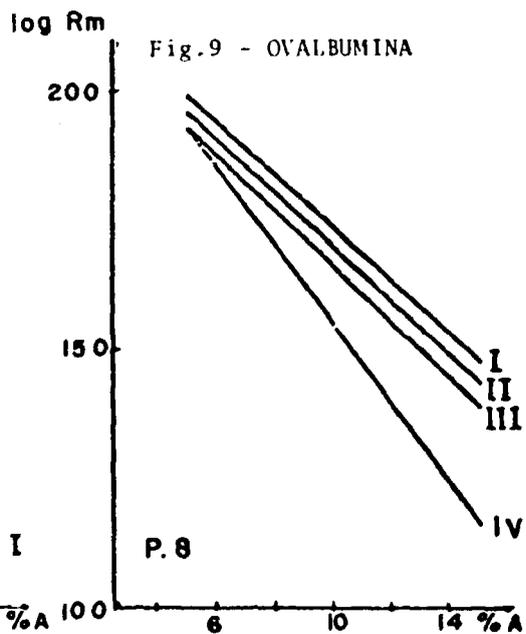
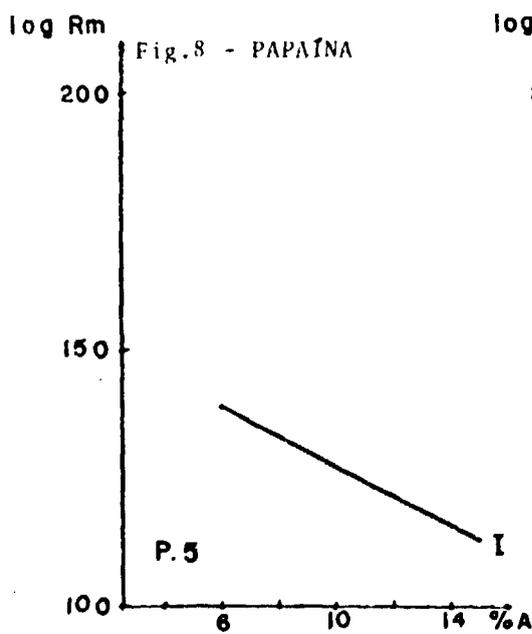
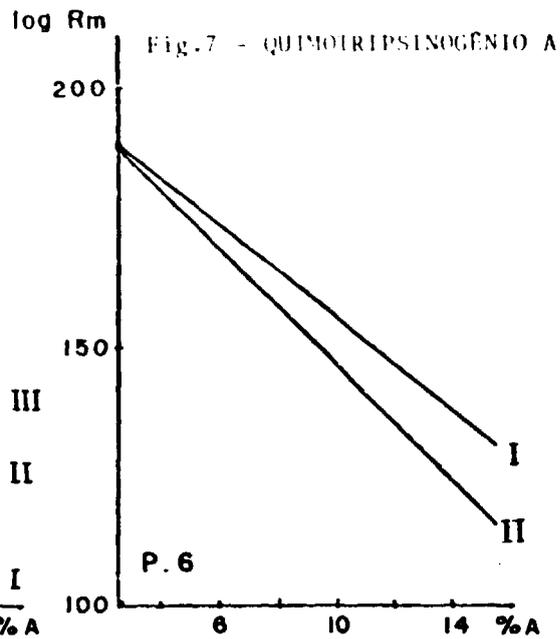
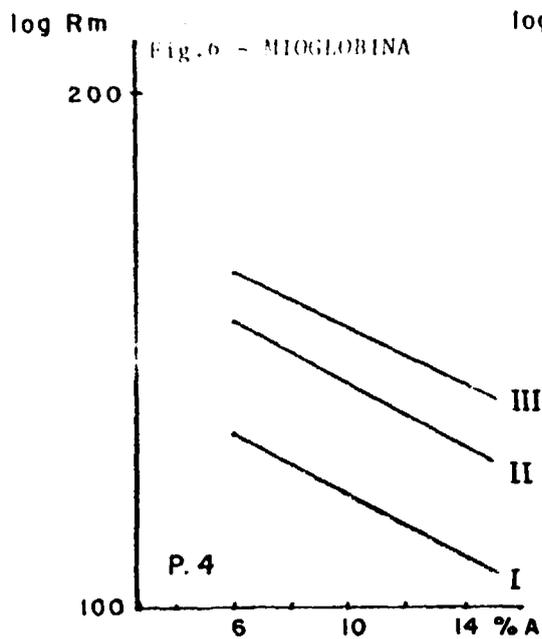
Na Tabela III arrolam-se as médias dos resultados do K<sub>R</sub> ( $\bar{K}_R$ ), assim como os valores de  $\sqrt{\bar{K}_R}$  e  $\bar{R}$  atribuídos a cada forma molecular das proteínas. Além das determinações em duplicata, os isômeros de carga forneceram parâmetros K<sub>R</sub> que podiam ser designados para uma mesma forma de proteínas, explicando o número variável de determinações do K<sub>R</sub> para cada forma proteica. Na resolução das fórmulas que forneceram a equação da reta, empregaram-se os valores médios  $\sqrt{\bar{K}_R}$  e  $\bar{R}$ , totalizando 17 pontos experimentais. A equação resultante foi a seguinte:

$$\bar{R}_i = 1,1316 \cdot \sqrt{K_{R_i}} - 0,3898$$

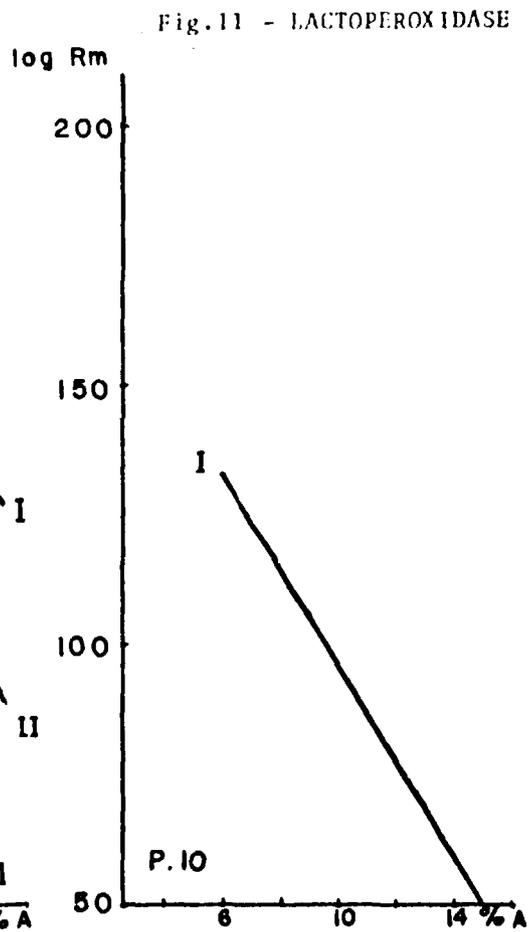
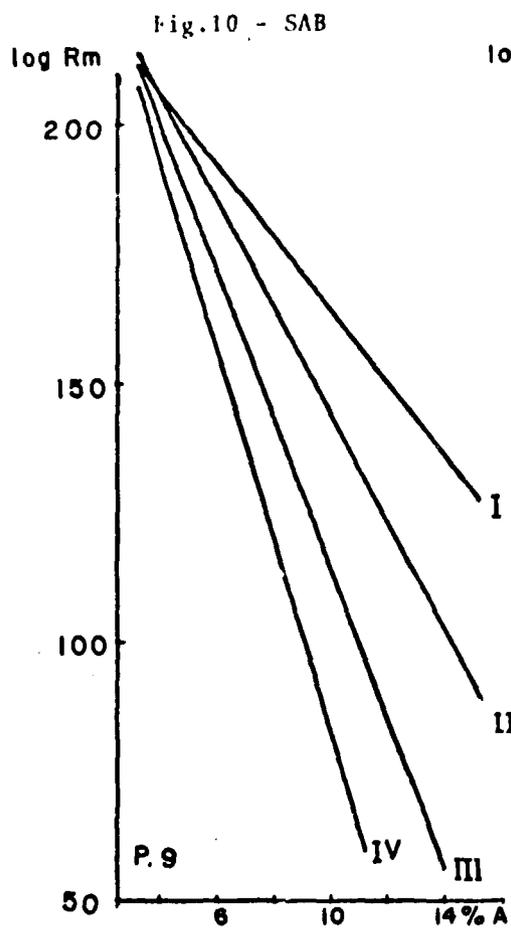
com coeficiente de correlação r = 0,9776,



RETAS DE FERGUSON DOS PADRÕES PROTEICOS (P) - 1, 2, 3 e 7. As formas monoméricas da bacitracina (II) e do glucagon (I) apresentam respectivamente 2 e 3 isômeros de carga, representados por retas paralelas. A banda principal da insulina (I) é a forma dimerica, que tem um isômero de carga (III); a forma monomérica é representada pela banda II.



RETAS DE FERGUSON DOS PADRÕES PROTEICOS (P) - 4, 5, 6 e 8. A mioglobina apresenta dois isômeros de carga da banda principal (I). O quimotripsinogênio A tem um isômero de massa (II). A papaína tem apenas a forma monomérica. A banda principal da ovalbumina (I), apresenta dois isômeros de carga (II e III) e um de massa (IV).



RETAS DE FERGUSON DOS PADRÕES PROTEICOS (P) 9 e 10. A SAB apresenta quatro retas convergentes, representando os três isômeros de massa (II, III e IV) da forma monomérica (I). Na lactoperoxidase encontra-se apenas a forma monomérica.

Tabela III  
 Padrões Proteicos com Valores Médios de  $K_R$ ,  $\sqrt{K_R}$  e  $\bar{R}$ , em Ordem Crescente  
 de  $\bar{R}$ , para Cálculo da Reta Padrão

PROTEÍNA	F*	N <sup>o</sup>	RETA	N	$-K_R$	d.p.	$\sqrt{K_R}$	$\bar{R}$
Bacitracina	mo	1	I - II - III	6	1,595	0,159	1,263	0,745
Glucagon	mo	2	I - II - III - IV	4	2,760	0,273	1,661	1,005
Insulina	mo	3	II	2	1,925	0,233	1,387	1,190
Insulina	di	3	I - III	4	2,943	0,101	1,715	1,497
Mioglobina	mo	4	I - II - III	6	2,718	0,220	1,649	1,727
Papaína	mo	5	I	1	2,850	...	1,688	1,855
Quimotrip.	mo	6	I	2	4,490	0,014	2,119	1,914
LH	mo	7	I	1	4,760	...	2,182	2,090
FSH	mo	7	II	1	5,600	...	2,366	2,230
Ovalbumine	mo	8	I - II - III	6	5,421	0,180	2,328	2,362
Quimotrip.	di	6	II	2	5,465	0,205	2,338	2,461
SAB	mo	9	I	3	7,107	0,099	2,666	2,690
Lactoperoxidase	mo	10	I	1	9,170	...	3,028	2,967
Ovalbumine	di	8	IV	2	7,845	0,247	2,801	2,974
SAB	di	9	II	3	10,743	0,870	3,278	3,388
SAB	tri	9	III	2	13,965	0,643	3,737	3,880
SAB	tetra	9	IV	3	18,747	0,365	4,330	4,270

F\* = forma da molécula:

mo = monomérica; di = dimérica; tri = trimérica; tetra = tetramérica

N<sup>o</sup> = número padrão

N = número de determinações do valor  $K_R$

Quimotrip. = Quimotripsinogênio A

Na Figura 12 representa-se em gráfico a distribuição de  $\bar{K}_R$  em função da MM em escala linear, assim como a curva padrão, cujos parâmetros foram adaptados às grandezas apresentadas nas coordenadas. A mesma representação, na Figura 13, mantém nas coordenadas as mesmas grandezas utilizadas na dedução da reta média, ou seja,  $\bar{R}$  e  $\sqrt{K_R}$ .

Os resultados da análise de variância para a reta de regressão calculada são apresentados na Tabela IV.

Tabela IV

Análise de Variância da Reta de Regressão Calculada para a Estimativa do Raio Molecular

FONTE DE VARIÇÃO	G.L.	SOMA DE QUADRADOS (SD)	QUADRADO MÉDIO (QM)	F <sub>c</sub>
REGRESSÃO	1	14,6580	14,6580	323,58
RESÍDUO	15	0,6792	0,0453	
TOTAL	16	15,3372		

$$R^2 = \frac{14,6580}{15,3372} = 0,9557$$

$$F_{(1, 15, 1\%)} = 8,68$$

A variação do intervalo de confiança para a estimativa de  $\bar{R}$  nos extremos inferior e superior da curva ( $K_R$  de 0,04 e 21,16), foi de  $\pm 0,05$  nm. A zona com o menor intervalo de confiança –  $\pm 0,019$  nm – situa-se entre os valores de  $K_R$  de 5,06 a 6,35 (centro em 5,69). Na região correspondente aos valores de  $K_R$  encontrados para os isohormônios – em torno de 4 – o intervalo de confiança para a estimativa de  $\bar{R}$ , ao nível de 5% de significância variou de  $\pm 0,020$  a  $\pm 0,21$  nm.

## 2 – Amostras de HCH

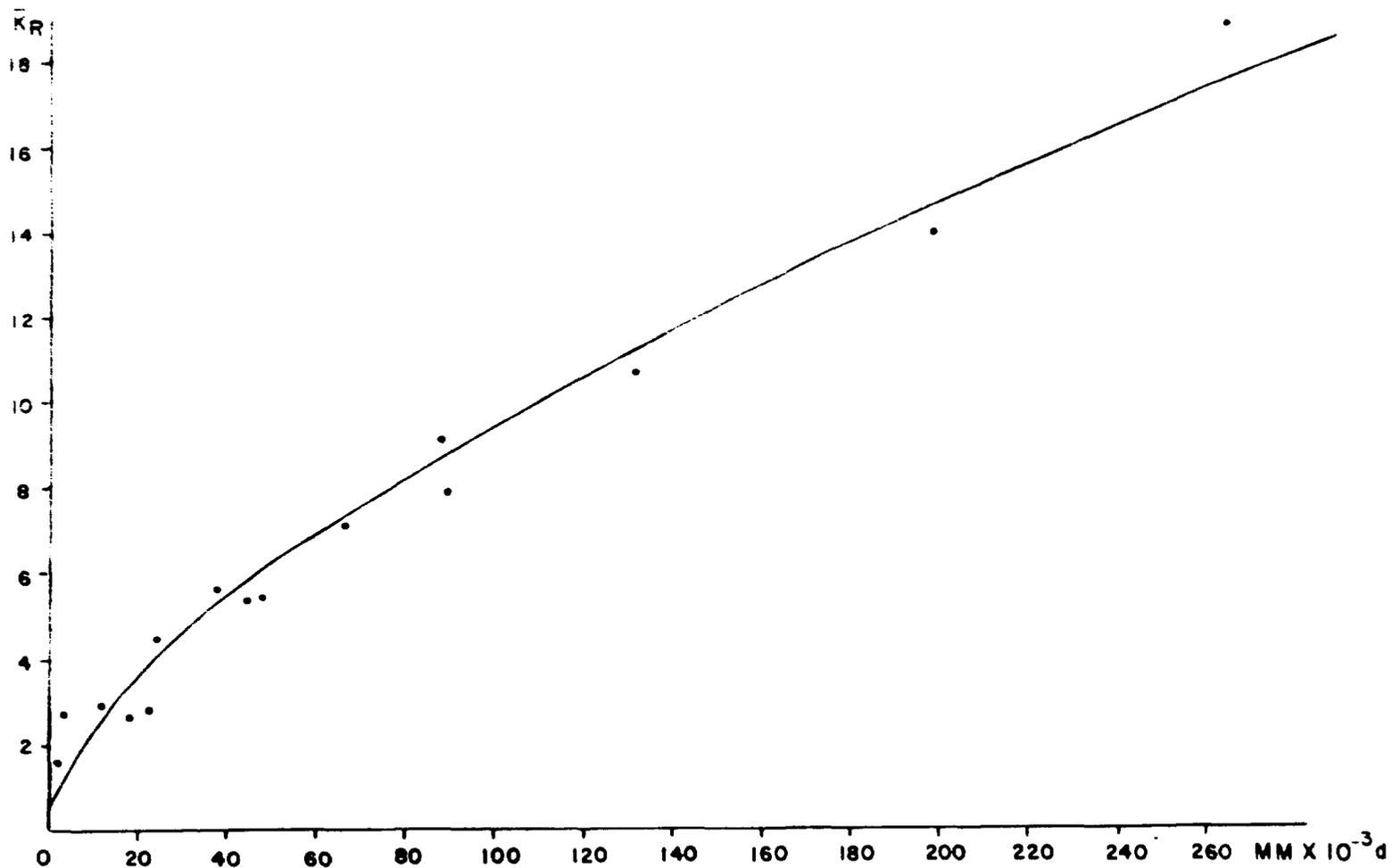
### 2.1 – Generalidades: Identificação das Bandas Proteicas nos Géis

Pela inspeção visual dos quatro géis correspondentes a cada uma das amostras de HCH, identificou-se um número variável de bandas coradas, que de acordo com a análise dos resultados e intensidade de coloração, puderam ser divididas em dois grupos:

#### A. Isohormônios do HCH

#### B. Componentes secundários

#### A. Isohormônios do HCH



**Figura 12** – Distribuição dos valores experimentais de  $\bar{K}_R$  dos padrões proteicos em função das respectivas MMs médias, em escala linear. Na região de valores inferiores a 40 000 d, a sua distribuição não é linear. A figura mostra a reta de referência calculada segundo RODBARD & CHRAMBACH<sup>(59)</sup>, cujos parâmetros foram adaptados às grandezas dos valores nas coordenadas.

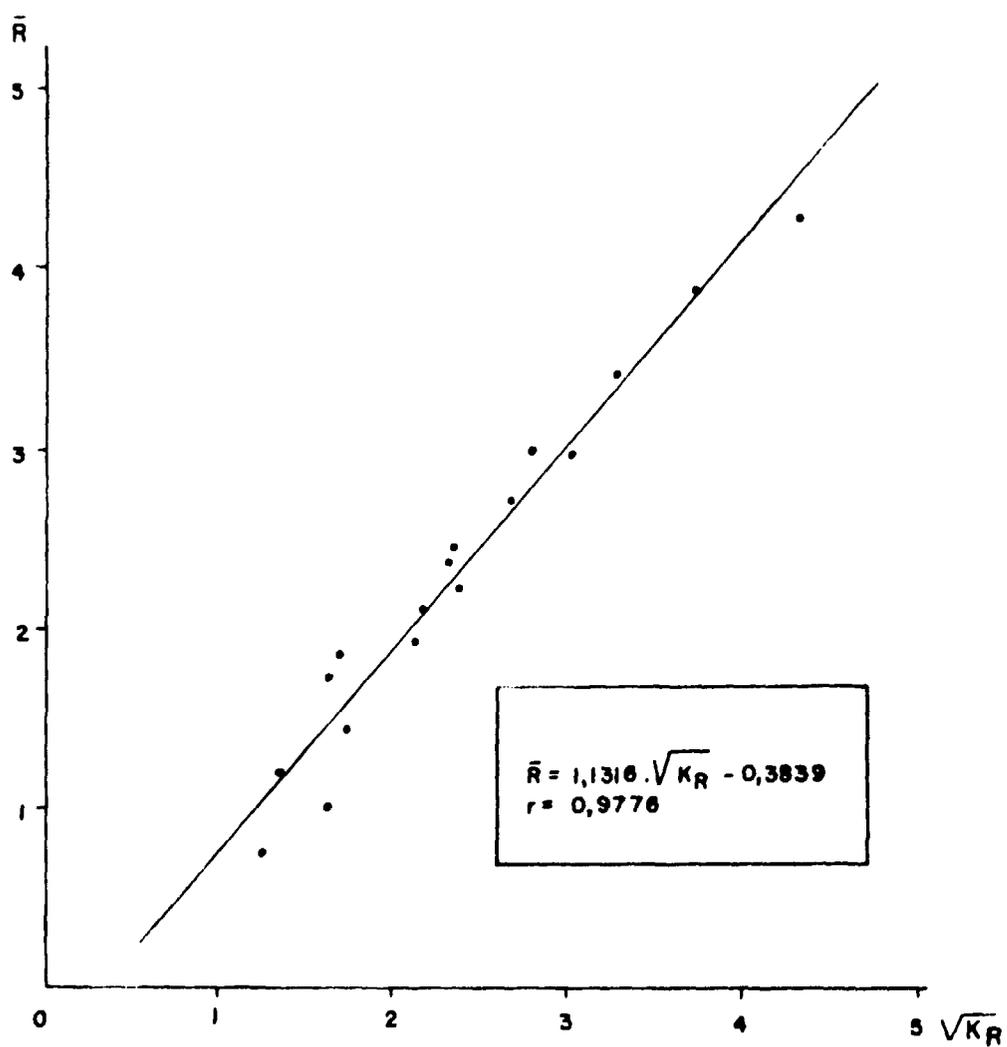


Figura 13 – RETA DE REFERÊNCIA PARA A ESTIMATIVA DO  $\bar{R}$ . Apresenta-se a reta calculada pelo método de RODBARD & CHRAMBACH, junto com a distribuição dos valores experimentais de  $K_R$  em função de  $\bar{R}$ . Em comparação à figura anterior, percebe-se que a zona de linearidade no limite inferior se amplia até um valor de  $\bar{R}$  de aproximadamente 1,5, o que corresponde a uma MM de 11 500 d.

Estes componentes principais caracterizaram-se por bandas intensamente coradas, bem definidas, fato que contribuiu para a redução dos erros metodológicos atribuíveis à medida da distância de migração. A sua identificação nas diversas concentrações de gel não apresentou dificuldades, com exceção de algumas amostras em que o HCH estava em baixa concentração (amostras pertencentes à fase terminal do pico III nos grupos II, III e IV).

Com poucas exceções, cada amostra apresentou três componentes identificáveis como isohormônios, isômeros de carga.

## B. Componentes Secundários

Os componentes secundários foram encontrados em número variável em cada amostra, apresentando em geral coloração pouco intensa. Por isso, nem sempre foi possível a identificação de um componente secundário em todas as concentrações de gel. Isto pôde ser atribuído a dois fatores:

— Quantidade muito pequena do componente nos 20  $\mu\text{g}$  da amostra, não atingindo o nível necessário de concentração no gel para que fosse bem corado. Disto resultaram bandas pálidas, levando a erros na medida da distância de migração.

— Fenômeno da difusão — ocorre principalmente nos géis de menor concentração de acrilamida, nos quais a banda proteica tende a apresentar limites amplos e imprecisos, tornando a coloração, que depende da concentração proteica, total ou parcialmente inefetiva. Isto se deu principalmente nos géis de 7% em acrilamida.

Por estes motivos, as retas individuais da cada amostra, muitas vezes foram calculadas com apenas três valores experimentais, o que reduziu a sua precisão.

## 2.2 – Grupo I – Amostras de HCH 1 a 12

Foram identificadas em cada amostra, de quatro a oito bandas coradas, variando de acordo com o processo de extração do HCH.

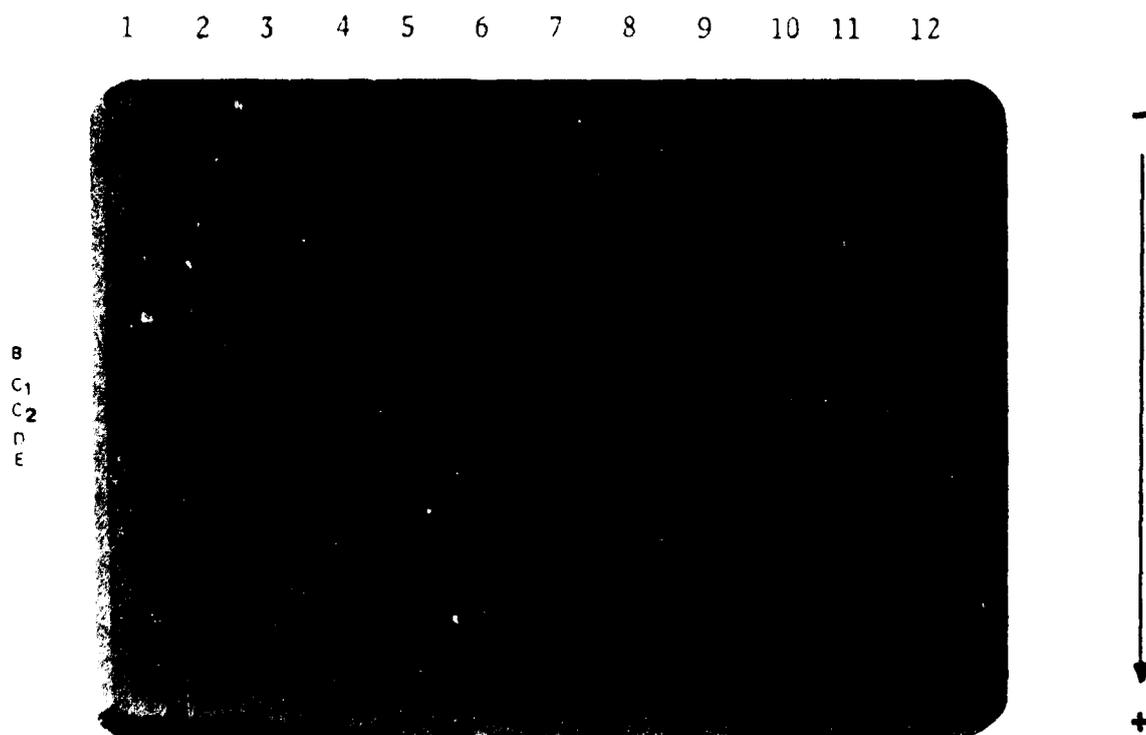
A fotografia dos géis a 10% de cada amostra pode ser vista na Figura 14. Em todos os géis as três bandas de coloração mais intensa correspondem aos isohormônios do HCH, vendo-se que em geral a primeira delas é a mais intensa. A amostra 6 (HCH-WILHELMI-NIH) destaca-se pela preponderância acentuada de um dos isohormônios (B). O HCH IEA 050875 (amostra 7), apresenta uma zona corada bastante difusa na altura correspondente do HCH.

Os componentes secundários em fotografia são pouco destacados, podendo-se contudo identificar melhor aqueles que migram logo atrás do HCH, mais ou menos difusos e que, conforme a amostra, representam os componentes I, J ou K.

SKYLER e cols.<sup>(64)</sup>, propuseram uma classificação dos isohormônios (isômeros de carga) baseada nos valores de  $Y_0$  e  $K_R$ . Contudo, como neste trabalho as amostras foram analisadas apenas uma vez, não se pôde avaliar a variação experimental destes parâmetros. Pequenas variações nas medidas de  $R_m$  causam um desvio da reta calculada, fato que em última análise repercute sobre as estimativas de  $MM$  e de mobilidade. Este aspecto pode ser exemplificado pelos resultados dos componentes das amostras do grupo II, III e IV, onde foi possível a comparação de determinações repetidas de  $R_m$  (ou  $\log R_m$ ) (Tabelas XX, XXI e XXII do apêndice). Pôde-se evidenciar nitidamente a influência exercida mesmo por pequenas variações na medida de  $R_m$ , sobre o resultado de  $K_R$  e  $Y_0$ . Por este motivo optou-se em adotar como critério da classificação de uma banda proteica, seja ela IH ou componente secundário, o conjunto dos quatro valores de  $\log R_m$ . Assim, os componentes que apresentaram

conjuntos de valores semelhantes de  $\log R_m$ , foram considerados como pertencentes a uma determinada classe de proteína.

A denominação dos componentes secundários com letras maiúsculas não necessariamente significa que eles sejam iguais entre si, de uma amostra para outra. A sua nomenclatura e classificação foi sugerida após a análise das amostras em série dos grupos II, III e IV, que será vista adiante. Por questão de simplificação, bandas com características de coloração e com valores de  $R_m$  semelhantes aos das amostras em série, foram denominadas pelas mesmas letras, não se podendo assegurar que sejam os mesmos compostos.



**Figura 14** — BANDAS PROTEICAS OBTIDAS NA EGPA DAS AMOSTRAS DE HCH DO GRUPO I (10% de acrilamida). As três bandas de coloração mais intensa correspondem aos isohormônios do HCH; geralmente a primeira delas é predominante. Nota-se que os IHs das amostras de HCH IEA (7 a 12) migraram distância maior em direção ao ânodo do que os das demais amostras. Os componentes secundários apresentam-se como bandas de coloração fraca, dificilmente reconhecíveis na fotografia. A seta indica o sentido de migração eletroforética.

Na Tabela V apresentam-se todos os valores de  $\log R_m$  das amostras do grupo I, usados para o cálculo dos parâmetros  $K_R$ ,  $\log Y_0$  e  $r$  das retas de FERGUSON. O índice de correlação para a maioria das amostras variou em torno de 99%.

A representação gráfica das retas de FERGUSON de cada amostra pode ser vista nas Figuras 15 a 26. Nelas, evidencia-se o paralelismo entre as retas dos isohormônios, isômeros de carga.

Os resultados de  $K_R$ ,  $Y_0$ ,  $\bar{R}$  e  $MM \pm I.C.$ , obtidos em cada amostra, encontram-se agrupados na Tabela VI, de acordo com a classe de IH a que pertencem. Uma representação gráfica das MMs de todos os IHs pode ser vista na Figura 27. A análise dos resultados dos componentes secundários encontra-se na Tabela VII.

Os resultados apresentados a seguir podem ser acompanhados pelos dados das Tabelas V, VI e VII e pela representação gráfica das Figuras 15 a 26.

#### AMOSTRA HCH 1 RABEN (Figura 15)

No HCH obtido pelo método de RABEN identificaram-se seis componentes proteicos, dos quais três puderam ser classificados como IHs, B,  $C_1$  e  $C_2$ . O parâmetro  $K_R$  destes IHs variou de 3,96 a 4,07, equivalendo a estimativas de  $\bar{R}$  de 1,86 a 1,89 nm e de MM de 22 050 a 23 200 d. Identificaram-se três componentes secundários, todos migrando atrás do IH principal: K com MM próxima às dos IHs (24 600 d), N e P, com MMs semelhantes, aproximadamente o dobro da MM do HCH, tendo respectivamente 41 800 e 45 400 d.

#### AMOSTRA HCH 2 STROUD (Figura 16)

Esta amostra apresentou três isohormônios (B,  $C_1$  e  $C_2$ ) e dois componentes secundários. Para os IHs, os valores de  $K_R$  e das estimativas de  $\bar{R}$  e MM variaram respectivamente de: 3,85 a 3,96; 1,83 a 1,86 nm e 20 950 a 22 000 d. Os dois componentes secundários foram o N, com MM aproximadamente o dobro da forma monomérica – 47 700 d – e o P, com cerca de três vezes a MM do monômero – 72 300 d.

#### AMOSTRA HCH 3 MILLS $FC_2$ (Figura 17)

Este extrato também apresentou os três IHs, B,  $C_1$  e  $C_2$ , com variações de  $K_R$  de 4,01 a 4,21. O  $\bar{R}$  e a MM estimados variaram de 1,88 a 1,93 nm e de 22 550 a 24 600 d respectivamente. Esta amostra foi a que apresentou o maior número de componentes secundários, dois migrando à frente do HCH, com MM menor que este, perto de 8 400 d ( $F_1$  e  $F_2$ ). Dos componentes que migraram atrás do HCH, encontraram-se o componente K de 27 300 d, o componente N com MM de duas vezes a dos IHs – 45 600 d – e o componente P de 54 900 d.

#### AMOSTRA HCH 4 STROUD (Figura 18)

Os IHs B,  $C_1$  e  $C_2$  desta amostra apresentaram variações de  $K_R$ ,  $\bar{R}$  e MM muito pequenas, respectivamente de 4,14 a 4,17; 1,91 a 1,92 nm e 23 900 a 24 200 d. Os componentes secundários diferiram dos da amostra HCH 2, obtida pelo mesmo método em outro laboratório, identificando-se dois componentes mais rápidos –  $F_1$  e  $F_3$  – com MM de 14 200 e 11 500 d e um componente mais lento, K, de 27 550 d.

#### AMOSTRA HCH 5 ROOS (KABI) (Figura 19)

Tabela V

Valores de log Rm e Parâmetros das Restas de Ferguson das Amostras de HCH do Grupo I

AMOSTRA	COMP.	log Rm				N	RETA DE FERGUSON		
		CONCENTRAÇÃO DE ACRILAMIDA					K <sub>R</sub>	log Yo	r
		7%	10%	12%	14%				
HCH- 1	B	178,48	164,66	158,50	149,46	4	4,07	206,55	0,9975
	C <sub>1</sub>	182,70	168,32	163,16	153,93	4	4,01	210,08	0,9946
	C <sub>2</sub>	186,03	172,07	166,69	157,63	4	3,96	213,21	0,9957
	K	...	159,83	151,10	143,01	3	4,21	201,77	0,9998
	N	...	154,40	143,48	131,74	3	5,67	211,19	0,9998
	P	...	146,60	133,79	122,85	3	5,94	205,66	0,9990
HCH- 2	B	179,07	164,95	160,53	150,93	4	3,89	205,68	0,9925
	C <sub>1</sub>	182,79	169,63	163,63	155,44	4	3,85	209,25	0,9977
	C <sub>2</sub>	187,08	172,49	167,91	158,50	4	3,96	214,05	0,9926
	N	...	156,18	145,27	131,74	3	6,11	217,70	0,9981
	P	...	151,95	136,43	120,83	3	7,78	229,76	1,0000
HCH- 3	B	179,65	165,69	158,57	149,88	4	4,21	208,71	0,9988
	C <sub>1</sub>	183,94	169,90	163,40	154,88	4	4,10	212,07	0,9978
	C <sub>2</sub>	186,73	173,49	166,34	158,50	4	4,01	214,39	0,9990
	F <sub>1</sub>	...	182,03	178,66	172,49	3	2,39	206,35	0,9859
	F <sub>2</sub>	...	187,15	184,66	177,82	3	2,33	211,20	0,9656
	K	...	160,21	151,16	142,39	3	4,46	204,71	1,0000
	N	...	153,93	143,44	130,10	3	5,96	213,98	0,9976
	P	...	147,35	132,53	120,83	3	6,63	213,13	0,9977
HCH- 4	B	178,85	164,95	158,50	149,15	4	4,17	207,69	0,9979
	C <sub>1</sub>	183,70	169,22	163,42	153,87	4	4,17	212,34	0,9962
	C <sub>2</sub>	187,08	173,73	167,14	157,60	4	4,14	215,88	0,9983
	F <sub>1</sub>	193,96	181,37	177,82	171,55	4	3,12	214,76	0,9881
	F <sub>3</sub>	199,67	188,69	186,38	179,25	4	2,79	218,53	0,9859
	K	...	159,36	150,93	141,45	3	4,48	204,31	0,9994
HCH- 5	B	178,81	167,17	159,89	148,89	4	4,19	208,76	0,9959
	C <sub>1</sub>	183,02	170,60	164,46	153,51	4	4,10	212,02	0,9954
	C <sub>2</sub>	186,65	173,71	167,94	157,51	4	4,05	215,01	0,9959
	D	189,38	176,49	171,16	160,53	4	4,00	217,34	0,9946
	K	...	162,96	154,32	141,40	3	5,39	215,57	0,9935
	N	...	157,64	145,19	131,55	3	6,52	223,06	0,9997
	P	...	150,47	135,78	119,84	3	7,66	227,25	0,9997
	?	...	141,88	126,44	113,14	3	7,19	213,37	0,9991

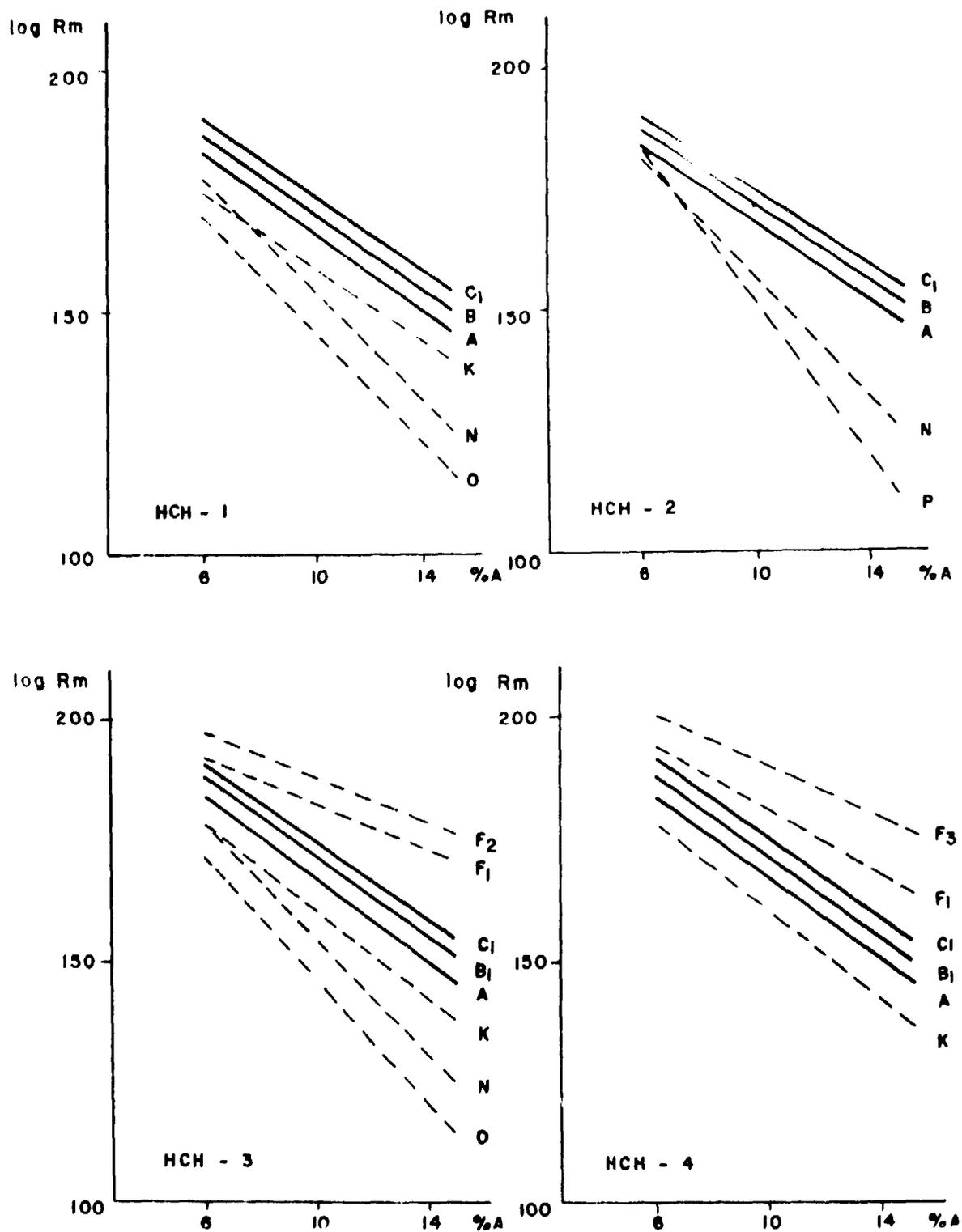
continua.

continuação

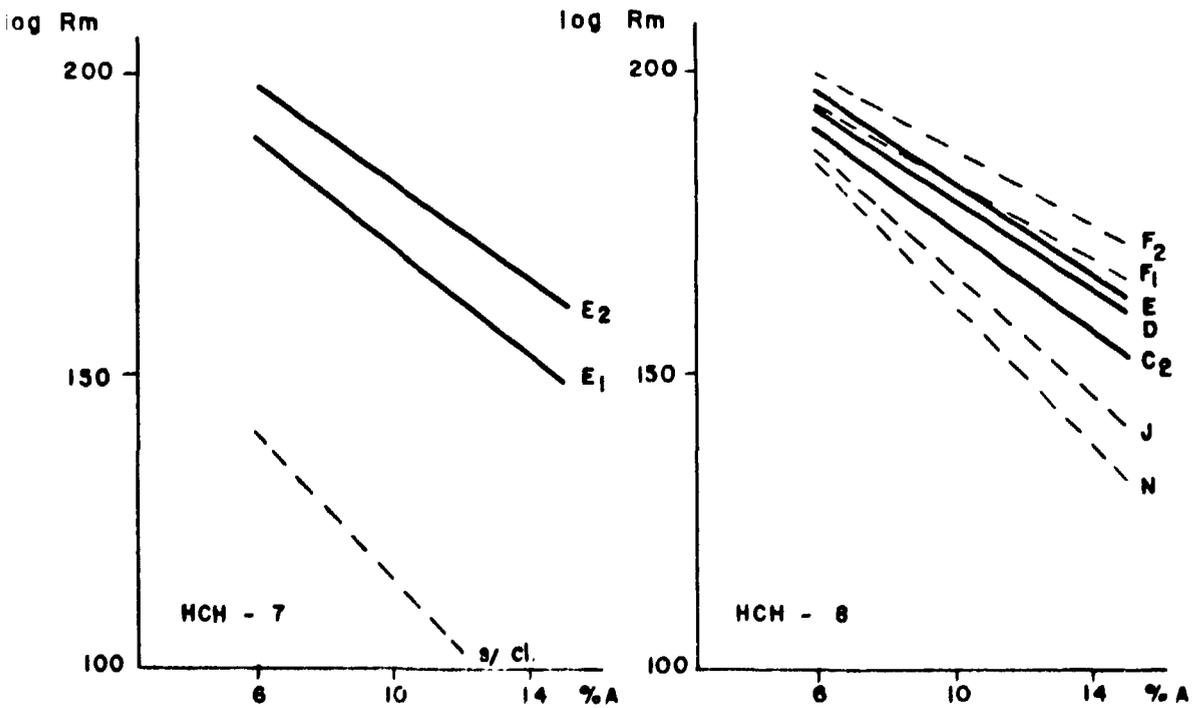
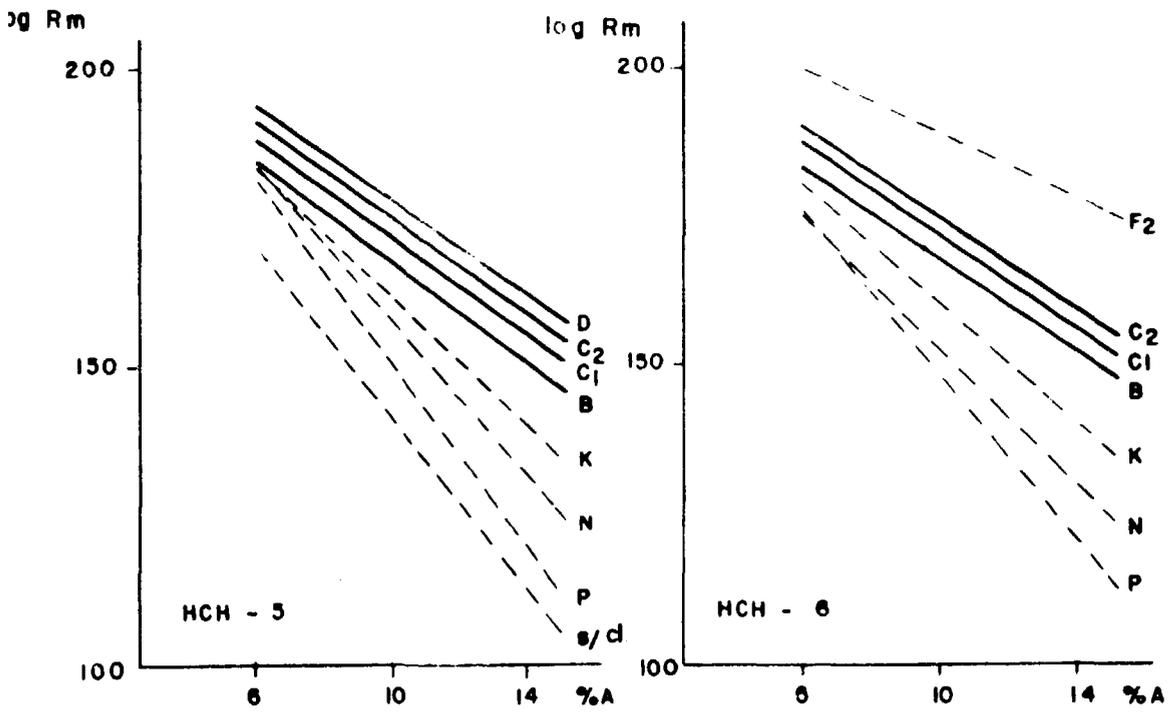
AMOSTRA	COMP.	log Rm				RETA DE FERGUSON			
		CONCENTRAÇÃO DE ACRILAMIDA				N	K <sub>R</sub>	log Y <sub>0</sub>	r
		7%	10%	12%	14%				
HCH- 6	B	178,91	167,31	159,89	151,78	4	3,86	205,96	0,9999
	C <sub>1</sub>	182,81	171,17	163,63	155,22	4	3,92	210,37	0,9998
	C <sub>2</sub>	185,92	173,91	167,91	157,96	4	3,90	213,37	0,9967
	F <sub>2</sub>	197,60	187,15	184,60	177,59	4	2,75	216,25	0,9884
	K	175,53	159,86	149,61	140,79	4	4,99	210,12	0,9993
	N	...	153,60	141,70	130,44	3	5,79	211,39	0,9999
	P	171,86	148,07	135,78	121,16	4	7,18	221,39	0,9988
HCH- 7	E	191,43	182,39	175,37	162,35	4	4,03	221,21	0,9810
	E <sub>1</sub>	199,35	187,17	178,67	172,94	4	3,83	225,74	0,9973
	?	...	114,47	104,90	90,15	3	6,08	176,13	0,9925
HCH- 8	C <sub>2</sub>	187,94	172,61	164,83	157,63	4	4,33	217,33	0,9960
	D	190,83	178,16	171,63	164,19	4	3,78	216,82	0,9986
	E	193,36	180,77	173,48	166,42	4	3,85	219,88	0,9990
	F <sub>1</sub> ?	...	181,77	176,39	168,54	3	3,31	215,26	0,9942
	F <sub>2</sub> ?	...	187,51	180,69	174,94	3	3,14	218,76	0,9988
	J	183,19	167,00	156,77	147,71	4	5,09	218,40	0,9992
	N?	174,21	151,94	...	126,63	3	5,87	221,35	0,9970
HCH- 9	C <sub>2</sub>	187,94	176,01	168,50	159,68	4	4,01	216,11	0,9996
	D	190,63	179,08	170,89	162,26	4	4,05	219,20	0,9996
	E	193,36	180,12	173,89	166,25	4	3,83	219,60	0,9977
	I	186,19	173,53	162,70	153,60	4	4,70	219,55	0,9988
	J	183,19	168,66	159,67	149,76	4	4,75	216,42	0,9999
	M	179,20	158,79	151,05	138,37	4	5,70	218,17	0,9953
HCH-10	C <sub>2</sub>	187,72	175,71	168,86	159,32	4	4,00	215,35	0,9985
	D	190,68	178,41	171,57	161,41	4	4,11	219,65	0,9975
	E	193,48	181,29	174,75	164,69	4	4,03	221,89	0,9975
	F <sub>2</sub>	199,67	189,89	186,00	178,74	4	2,91	219,83	0,9955
	M	178,79	161,94	151,94	138,37	4	5,69	218,96	0,9985
HCH-11	C <sub>2</sub>	189,39	176,43	169,29	159,34	4	4,23	219,05	0,9986
	D	192,13	178,87	172,76	162,28	4	4,16	221,23	0,9966
	E	194,55	182,08	175,36	164,72	4	4,17	224,02	0,9969
	G	...	156,89	151,68	142,53	3	3,59	193,45	0,9877
	I	...	171,78	163,07	149,79	3	5,50	227,52	0,9929
HCH-12	C <sub>2</sub>	189,73	177,16	169,62	159,08	4	4,31	220,24	0,9980
	D	191,93	180,11	172,38	161,86	4	4,24	222,10	0,9974
	E	194,44	183,20	174,97	164,63	4	4,22	224,64	0,9971
	I	...	174,64	164,33	151,45	3	5,80	233,04	0,9980

COMP. = componente

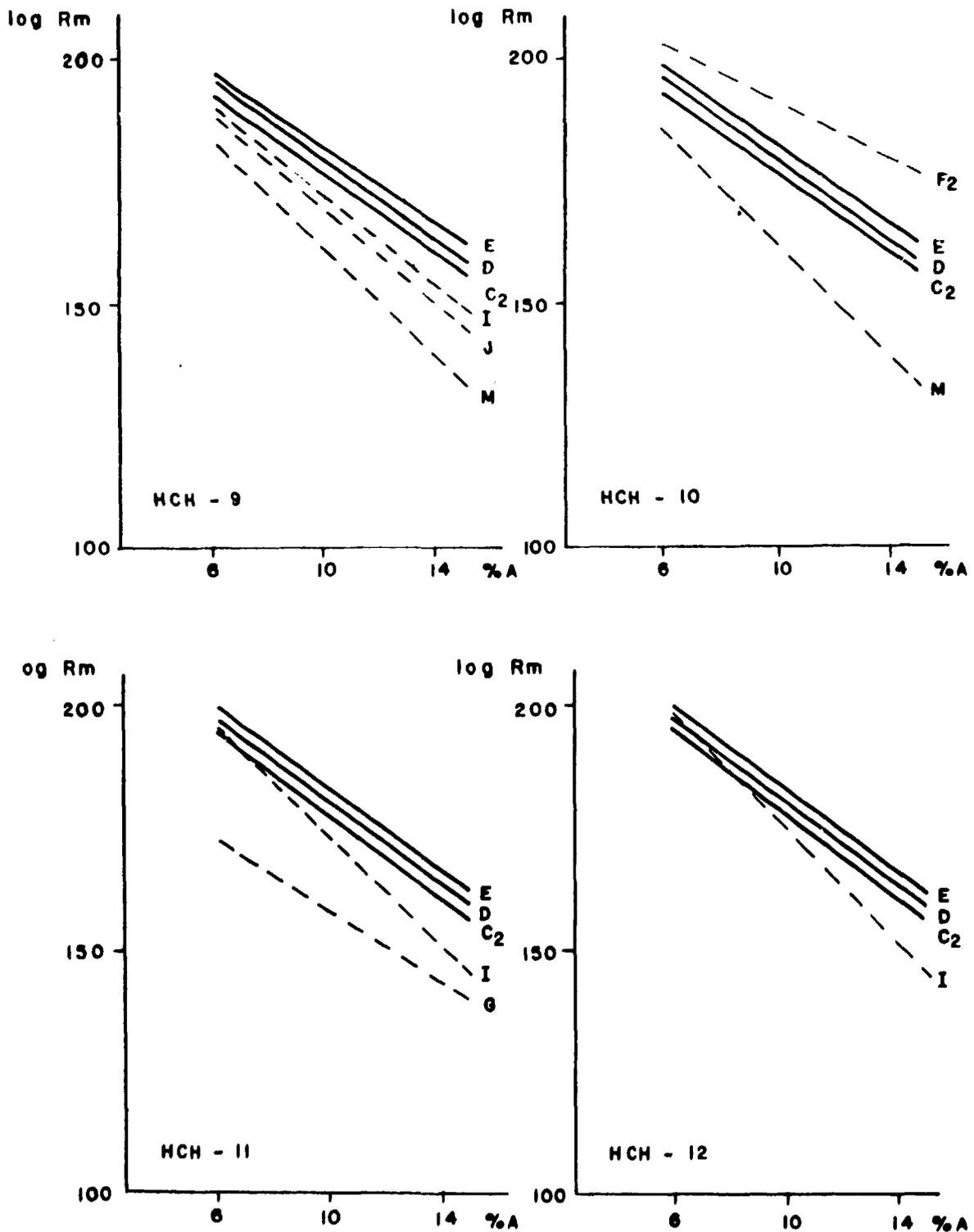
N = número de determinações de log Rm



RETAS DE FERGUSON DAS AMOSTRAS DE HCH 1 a 4. Evidencia-se o paralelismo entre os I<sub>H</sub>s (—), isômeros de carga. A composição dos componentes secundários (---) varia em cada amostra.



HETAS DE FERGUSON DAS AMOSTRAS HCH 5 a 8. Pode-se notar que os I<sub>1</sub>s (—) se apresentam como retas paralelas em todas as amostras. Os componentes secundários (---) variam em cada tipo de preparação. Nas amostras 5 e 7, existem componentes secundários que não encontram correspondentes em nenhuma outra amostra.



RETAS DE FERGUSON DAS AMOSTRAS DE HCH 9 a 12. Nota-se o paralelismo entre os IHS (—). Apesar dos hormônios terem sido extraídos por um mesmo método, observa-se a variação dos componentes secundários (----), bem como nas Figuras 21 e 22.

Tabela VI

Parâmetros Calculados das Retas de Ferguson e Estimativas de  $\bar{R}$  e MM e Intervalo de Confiança, dos Isohormônios das Amostras do Grupo I

AMOSTRA	$K_R$	$Y_0$	$\bar{R}$	MM (d)	I.C.
ISOHORMÔNIO B					
1	4,07	1,16	1,89	23 200	22 400 – 24 000
2	3,89	1,14	1,84	21 350	20 600 – 22 100
3	4,21	1,22	1,93	24 600	23 800 – 25 450
4	4,17	1,19	1,92	24 200	23 400 – 25 000
5	4,19	1,22	1,93	24 400	23 650 – 25 250
6	3,86	1,15	1,83	21 050	20 300 – 21 800
ISOHORMÔNIO C <sub>1</sub>					
1	4,01	1,26	1,88	22 600	21 950 – 23 300
2	3,85	1,24	1,83	20 950	20 200 – 21 700
3	4,10	1,32	1,90	23 500	22 700 – 24 300
4	4,17	1,33	1,92	24 200	23 400 – 25 000
5	4,10	1,32	1,90	23 500	22 700 – 24 300
6	3,92	1,27	1,85	21 650	20 900 – 22 400
ISOHORMÔNIO C <sub>2</sub>					
1	3,96	1,36	1,86	22 050	21 300 – 22 800
2	3,96	1,38	1,86	22 000	21 200 – 22 700
3	4,01	1,39	1,88	22 550	21 800 – 23 300
4	4,14	1,44	1,91	23 900	23 100 – 24 700
5	4,05	1,41	1,89	23 000	22 200 – 23 800
6	3,90	1,36	1,85	21 450	20 700 – 22 200
8	4,33	1,49	1,97	26 000	25 100 – 26 800
9	4,01	1,45	1,88	22 600	21 800 – 23 300
10	4,00	1,44	1,87	22 500	21 700 – 23 250
11	4,23	1,55	1,94	24 850	24 050 – 25 700
12	4,31	1,59	1,96	25 700	24 900 – 26 600
ISOHORMÔNIO D					
5	4,00	1,49	1,87	22 500	21 700 – 23 250
8	3,78	1,47	1,81	20 300	19 500 – 21 000
9	4,05	1,56	1,89	23 000	22 200 – 23 800
10	4,11	1,57	1,90	23 600	22 800 – 24 400
11	4,16	1,63	1,92	24 100	23 300 – 24 900
12	4,24	1,66	1,94	24 950	24 100 – 25 800
ISOHORMÔNIO E					
7	4,03	1,63	1,88	22 800	22 000 – 23 500
8	3,85	1,58	1,83	21 000	20 200 – 21 700
9	3,83	1,57	1,83	21 000	20 000 – 21 500
10	4,03	1,66	1,88	22 800	22 000 – 23 500
11	4,17	1,74	1,92	24 200	23 400 – 25 000
12	4,22	1,76	1,94	24 700	23 950 – 25 600
ISOHORMÔNIO E <sub>1</sub>					
7	3,83	1,81	1,83	20 800	20 000 – 21 500

$Y_0$  = antilog  $Y_0 \cdot 100^{-1}$

I.C. = intervalos de confiança inferior e superior da determinação de MM, ao nível de 95% de confiança

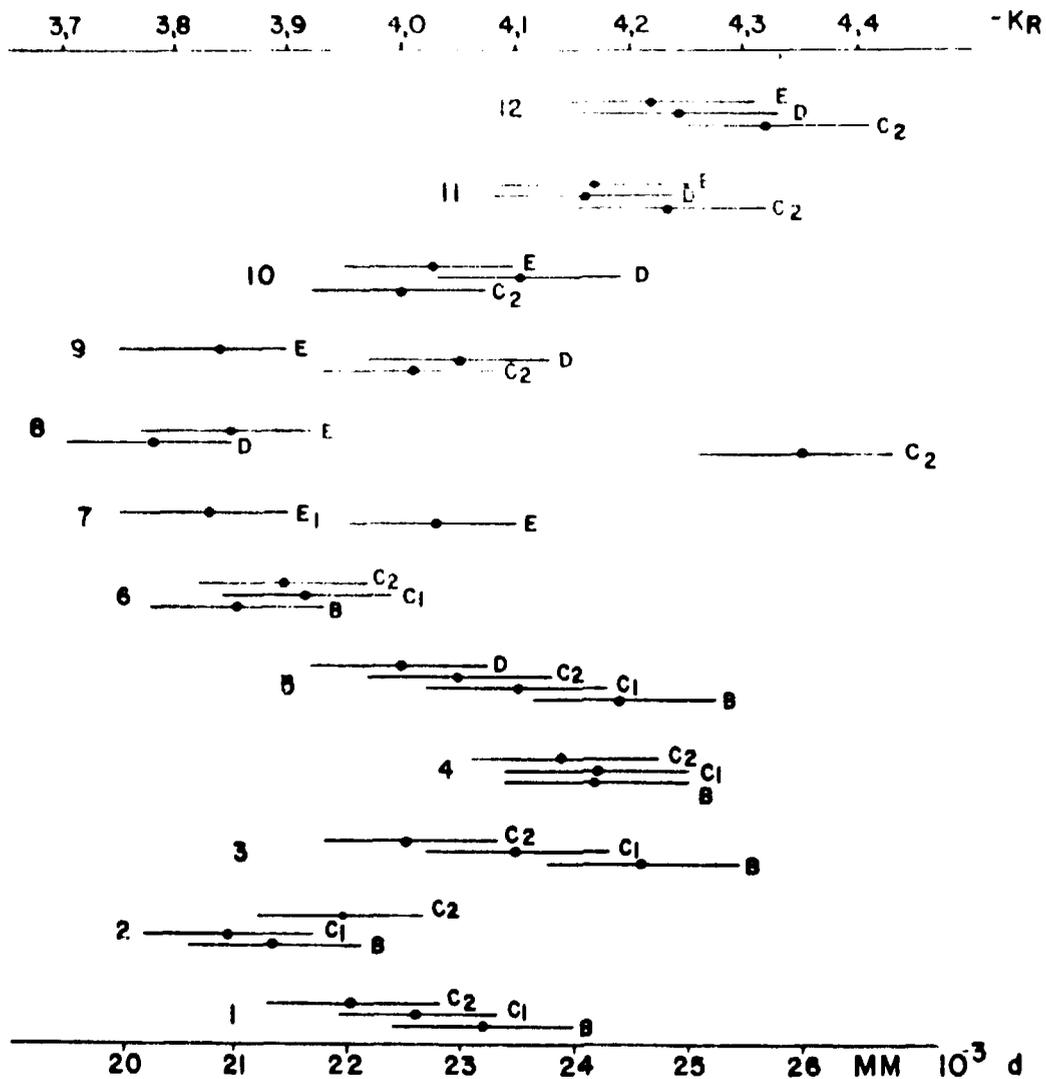


Figura 27 -- MASSA MOLECULAR DOS ISOHORMÔNIOS DAS AMOSTRAS DE HCH 1 a 12. (GRUPO I). O traço horizontal indica a MM pelo intervalo de confiança desta estimativa (significância 5%). O valor de  $K_R$  é indicado pelos pontos centrais (escala superior).

Tabela VII

Valores Estimados de  $K_R$ ,  $Y_0$ ,  $R$ ,  $MM$  e Intervalo de Confiança dos Componentes Secundários dos HCH do Grupo I

N <sup>o</sup> AMOSTRA	COMP.	$K_R$	$Y_0$	$R$ (nm)	$MM$ (d)	I.C. (d)
1 RABEN	K	4,21	1,04	1,93	24 600	23 800 - 25 450
	N	5,67	1,29	2,31	41 800	40 800 - 42 900
	P	5,94	1,14	2,37	45 400	44 300 - 46 500
2 STROUD	N	6,11	1,50	2,41	47 700	46 500 - 48 800
	P	7,78	1,98	2,77	72 300	70 700 - 74 000
3 MILLS FC <sub>2</sub>	F <sub>1</sub>	2,39	1,16	1,36	8 600	8 000 - 9 000
	F <sub>2</sub>	2,33	1,29	1,34	8 200	7 700 - 8 700
	K	4,46	1,11	2,00	27 300	26 500 - 28 200
	N	5,96	1,38	2,34	45 600	44 500 - 46 800
4 STROUD	P	6,63	1,35	2,52	54 900	53 600 - 56 200
	F <sub>1</sub>	3,12	1,40	1,61	14 200	13 600 - 14 900
	F <sub>3</sub>	2,79	1,53	1,50	11 500	11 000 - 12 100
5 KABI	K	4,48	1,10	2,01	27 550	26 700 - 28 400
	N	5,39	1,43	2,24	38 300	37 300 - 39 200
	?	6,52	1,70	2,50	53 400	52 100 - 54 700
6 WILHELMI - NIH	?	7,19	1,36	2,65	63 200	61 800 - 64 650
	P	7,66	1,87	2,74	70 400	68 800 - 72 050
	F <sub>2</sub>	2,75	1,45	1,49	11 200	10 650 - 11 800
	K	4,99	1,26	2,14	33 400	32 450 - 34 300
7 IEA-LHC-050875	N	5,79	1,30	2,33	43 400	42 300 - 44 500
	P	7,18	1,64	2,64	63 000	61 600 - 64 400
	?	6,08	0,58	2,40	47 250	46 200 - 48 400
8 IEA-LHC-310177	F <sub>1</sub> ?	3,14	1,54	1,62	14 400	13 900 - 15 000
	F <sub>2</sub> ?	3,31	1,42	1,67	15 900	15 200 - 16 550
	J	5,09	1,53	2,16	34 600	33 700 - 35 500
	N ?	5,87	1,63	2,35	44 400	43 300 - 45 600
9 IEA-LHC-270777	I	4,70	1,57	2,06	30 000	29 200 - 30 900
	J	4,75	1,46	2,08	30 600	29 700 - 31 500
	M	5,70	1,52	2,31	42 200	41 200 - 43 300
10 IEA-LHC-270777	F <sub>2</sub>	2,91	1,58	1,54	12 500	11 900 - 13 100
	M	5,69	1,55	2,31	42 100	41 100 - 43 150
11 IEA-LHC-031177	G	3,59	0,86	1,75	18 400	17 800 - 19 100
	I	5,50	1,88	2,26	39 600	38 700 - 40 600
12 IEA-LHC-031177	I	5,80	2,14	2,34	43 500	42 500 - 44 600

Este foi o único extrato que exibiu quatro IHS: B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e D. Como nas outras amostras, as variações de  $K_R$ ,  $\bar{R}$  e MM foram pequenas, respectivamente de 4,00 a 4,19; 1,87 a 1,93 nm e 22 500 a 24 400 d. Quatro componentes secundários foram detectados, todos de MM maior que a dos IHS, variando entre 38 300 a 70 400 d. Entre as bandas N e P aparece outra, cujas medidas de  $R_m$  não se enquadraram nos modelos estabelecidos e cuja MM foi de aproximadamente três vezes a do monômero do HCH: 63 200 d.

#### AMOSTRA HCH 6 WILHELMI (NIH) (Figura 20)

Esta preparação destacou-se pela nítida preponderância do IH B em relação aos IHS, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>. As variações de  $K_R$ ,  $\bar{R}$  e MM destes três IHS foram de: 3,86 a 3,92; 1,83 a 1,85 nm e 21 050 a 21 650 d. Apesar de se tratar de uma preparação purificada para radioimunoensaio, apareceram quatro componentes secundários: F<sub>2</sub>, de MM pequena (11 200 d) e os demais com MMs maiores que a dos IHS: componente K de 33 400 d, componente N de 43 400 d e componente P de 63 000 d.

#### AMOSTRA HCH 7 IEA 050875 (Figura 21)

Este extrato de HCH, estocado por 2-3 anos, foi o único a apresentar o IH E<sub>1</sub>, além do IH E, tendo  $K_R$  de respectivamente 3,83 a 4,03. As estimativas de  $\bar{R}$  foram de 1,83 a 1,88 nm, correspondendo a MM de 20 800 a 22 800 d. Apenas um componente secundário, de 47 250 d, pôde ser identificado.

#### AMOSTRA HCH 8 IEA LHC 310177 (Figura 22)

Este extrato purificado apresentou três IHS, classificados como C<sub>2</sub>, D e E. A variação de  $K_R$  foi de 3,78 a 4,33 podendo ser considerada grande em relação às variações apresentadas pelos IHS das outras amostras. Possivelmente foi resultado do erro experimental, tendo em vista a diferença apresentada pelos valores de  $R_m$  do IH C<sub>2</sub> nos géis de 10 e 12% quando comparados aos valores correspondentes nas outras amostras deste grupo. Consequentemente o  $\bar{R}$  e a MM também variaram consideravelmente: de 1,81 a 1,97 nm de 20 300 a 26 000 d. A classificação dos quatro componentes secundários também ofereceu certa dificuldade. Dois componentes ocuparam posição adiante dos IHS, apresentando MM em torno de 15 000 d (F<sub>1</sub>? e F<sub>2</sub>?). A proteína de 34 600 d enquadrou-se na classificação do componente J enquanto que o composto de 44 400 d ocupou uma posição intermediária entre os componentes N e P.

#### AMOSTRAS HCH 9 E HCH 10 – IEA LHC 270777 (Figuras 23 e 24)

Os resultados destas duas amostras serão comentados em conjunto por serem procedentes de um mesmo lote de purificação. A segunda amostra difere da primeira por ter sido submetida a duas liofilizações em vez de uma. Ambas apresentaram os mesmos IHS, C<sub>2</sub>, D e E, não se percebendo diferenças entre os valores de  $K_R$  e consequentemente nas estimativas de  $\bar{R}$  e MM. Na amostra 9,  $K_R$  variou de 3,83 a 4,05; o  $\bar{R}$  de 1,83 a 1,89 nm e a MM de 21 000 a 23 000 d; na amostra 10 as variações respectivas foram de 4,00 a 4,11; 1,87 a 1,90 nm e de 22 500 a 23 600 d. Ambas as amostras apresentaram em comum o componente M, que aparece como banda relativamente intensa logo atrás dos IHS, tendo MM próxima a 42 000 d. O componente F<sub>2</sub>, apesar de ser perceptível no gel a 10% da amostra 9, não pôde ser identificado com clareza nos demais géis, indicando que sua concentração é menor que na amostra 10, onde pôde ser caracterizado. Os componentes I e J, ambos de comportamento eletroforético semelhante e apresentando MM perto de 30 000 d, puderam ser caracterizados na amostra 9 e não na 10.

#### AMOSTRA HCH 11 E HCH 12 LHC 031177 (Figuras 25 e 26)

Estas duas amostras também pertencem a um mesmo lote de extração, a primeira delas representando a fração central do pico III da purificação e a segunda uma alíquota do pico III reunido. Embora estatisticamente não se possa comprovar uma diferença, os valores de  $K_R$ ,  $\bar{R}$  e MM dos IHs deste lote de extração revelaram-se ligeiramente maiores que os dos outros lotes de HCH IEA. Assim, nas amostras 11 e 12, os valores de  $K_R$  variaram respectivamente de 4,16 a 4,23 e de 4,22 a 4,31. Tais valores refletiram nas estimativas do  $\bar{R}$  e da MM, que na amostra HCH 11 variaram de 1,92 a 1,94 nm e 24 100 a 24 850 d e na amostra HCH 12 de 1,94 a 1,96 nm e 24 700 a 25 700 d. Em ambas as amostras identificou-se o componente I, com respectivamente 39 600 d e 43 500 d. Na amostra HCH 11, constatou-se a presença do componente G, com MM de 18 400 d, não encontrado na amostra HCH 12, provavelmente pela sua diluição no volume total do pico III.

A Tabela VIII mostra a diluição comparativa dos tipos de IHs e componentes secundários encontrados na EGPA em cada amostra deste grupo. Os IHs estão sublinhados de acordo com a intensidade de coloração das bandas, denotando a preponderância de determinado tipo de componente em cada amostra. Logo ao primeiro exame nota-se a predominância dos IHs B, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> nos preparados de outros laboratórios, enquanto que nas amostras de HCH IEA os tipos C<sub>2</sub>, D e E são constantes. O número de componentes secundários variou bastante, encontrando-se até cinco na amostra HCH 3.

### 2.3 – Grupo II – Amostras de HCH 13 a 21

Extratos hipofisários liofilizados, armazenados há 2 ou 3 anos a -20°C, foram redissolvidos com tampão fosfato 0,1 M, pH 6,6 contendo NaCl 0,5 M e repurificados em gel de Sephadex G 100. As 9 amostras deste grupo pertencem ao pico III resultante desta repurificação, sendo coletadas alíquotas a cada quatro frações de 15 ml, de eluído da coluna.

Como a quantidade de proteína aplicada aos géis foi mantida constante, a maior ou menor intensidade de coloração de uma determinada banda permite a avaliação da sua concentração relativa em determinada amostra.

Nos géis corados (Figura 28), observou-se uma banda principal larga, de limites imprecisos e de coloração intensa, posicionada à frente da zona habitualmente ocupada pelo HCH. Esta banda representa o único isohormônio identificado nestas amostras, ou seja, o isohormônio E. Evidenciaram-se quatro componentes secundários.

Os valores de  $\log R_m$  e os parâmetros das retas de FERGUSON acham-se agrupados por tipo de componente na Tabela XX do apêndice. Na Tabela IX estão os parâmetros  $K_R$  e  $Y_0$  dos componentes – calculados com todas as medidas agrupadas – e os valores de  $\bar{R}$ , MM e intervalos de confiança da última estimativa. A análise de variância das retas de regressão representativas dos componentes deste grupo é mostrado na Tabela X. O isohormônio E deste grupo de amostras exibiu massa molecular relativamente alta, de 26 600 d.

Na Figura 29 mostra-se a distribuição dos componentes de acordo com o volume de eluição e com a MM. O pico IV não foi incluído no estudo. O isohormônio E, é mais concentrado nas amostras correspondentes às frações centrais do pico III (980 – 1 040 ml). Dois componentes distintos – K e J – com MMs próximas a 30 000 d, aparecem entre 1 040 e 1 340 ml, com concentração máxima em 1 160 e 1 220 ml respectivamente. Dois componentes – F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> – de MM pequena, surgem a partir de 1 200 ml.

### 2.4 – Grupo III – Amostras de HCH 22 a 32

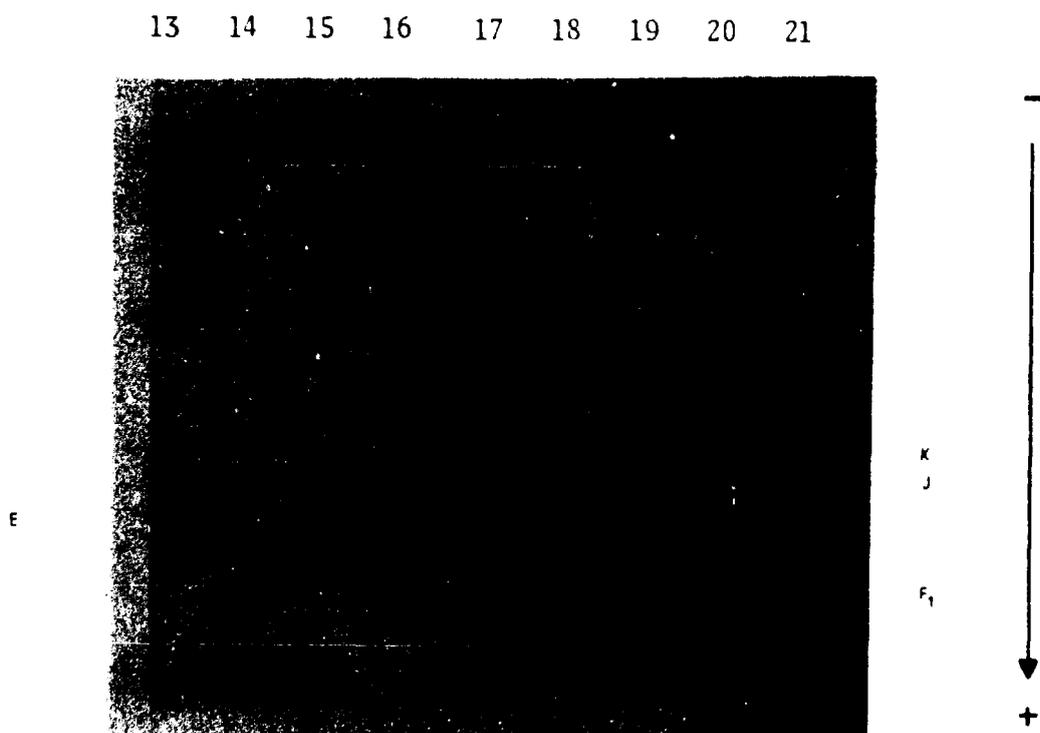
As onze amostras deste grupo, coletadas de modo semelhante às do grupo anterior, correspondem ao fracionamento cromatográfico de um extrato hormonal recém-preparado. Na Figura 30 apresenta-se a fotografia dos géis corados. Este grupo de amostras inclui uma fração correspondente à

Tabela VIII

Distribuição dos Componentes Proteicos em cada Amostra de HCH do Grupo I

	RABEN	STROUD	MILLS FC 2	STROUD	ROSS-KABI	WILHELMI-NIH	IEA 050875	IEA 310377	IEA 270777	IEA 270777	IEA 031177	IEA 031177
AMOSTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
COMP.												
B	x	x	x	x	x	x						
C <sub>1</sub>	x	x	x	x	x	x						
C <sub>2</sub>	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
D					x			x	x	x	x	x
E							x	x	x	x	x	x
E <sub>1</sub>							x					
F <sub>1</sub>			x	x				x?				
F <sub>2</sub>			x			x		x?		x?		
F <sub>3</sub>				x								
G											x	
I									x		x	x
J								x	x			
K	x		x	x	x	x						
M									x	x		
N	x	x	x		x	x		x?				
P	x	x	x		x	x						
s/cl.					x		x					

s/cl. = sem classificação



**Figura 28** – BANDAS PROTEICAS OBTIDAS NA EGPA DAS AMOSTRAS DE HCH DO GRUPO II (10% de acrilamida). O IH E, único encontrado neste grupo, é a banda de coloração mais intensa, de limites pouco precisos. A sua coloração vai aumentando a partir das primeiras amostras, atingindo intensidade máxima nas amostras 15 e 16 (zona central do pico III) e diminuindo gradativamente nas amostras seguintes. Os componentes J e K ocupam posição atrás dos Ihs. A coloração destas bandas é mais intensa nas amostras 17 e 21. Os componentes F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> aparecem apenas nas amostras 20 e 21, como bandas mais ou menos difusas. A seta indica o sentido da migração eletroforética.

Tabela IX

Parâmetros das Retas de Ferguson dos Componentes das Amostras do Grupo II, com Valores Estimados de  $\bar{R}$  e MM com Intervalo de Confiança ao Nível de 95% de Confiança

COMP.	N	$-K_R$	$Y_0$	R	MM (d)	IC (d)
E	36	4,39	1,80	1,98	26 600	25 800 – 27 400
F <sub>1</sub>	9	2,38	1,22	1,36	8 500	8 000 – 9 100
F <sub>2</sub>	11	2,17	1,29	1,28	7 130	6 600 – 7 600
J	23	4,64	1,43	2,05	29 300	28 500 – 30 200
K	10	4,79	1,25	2,09	31 050	30 200 – 31 950

COMP. = componente

N = número de medidas de log Rm.

Tabela X

Análise de Variância das Retas de Regressão Obtidas para os Componentes do Grupo II

COMP.	R <sup>2</sup>	G.L.	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	CONCLUSÃO
E	0,995	1,34	7 168,70	13,240	O Modelo não é adequado
F <sub>1</sub>	0,945	1, 7	119,411	3,971	O Modelo é adequado
F <sub>2</sub>	0,987	1, 9	676,806	0,122	O Modelo é adequado
J	0,989	1,21	1 941,445	0,306	O Modelo é adequado
K	0,983	1, 8	475,372	7,064	O Modelo não é adequado

COMP. = Componente

R<sup>2</sup> = coeficiente de explicação

G.L. = Graus de liberdade, respectivamente para F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>

F<sub>1</sub> = estatística que testa a inclinação da reta

F<sub>2</sub> = estatística que testa a adequação do modelo da reta

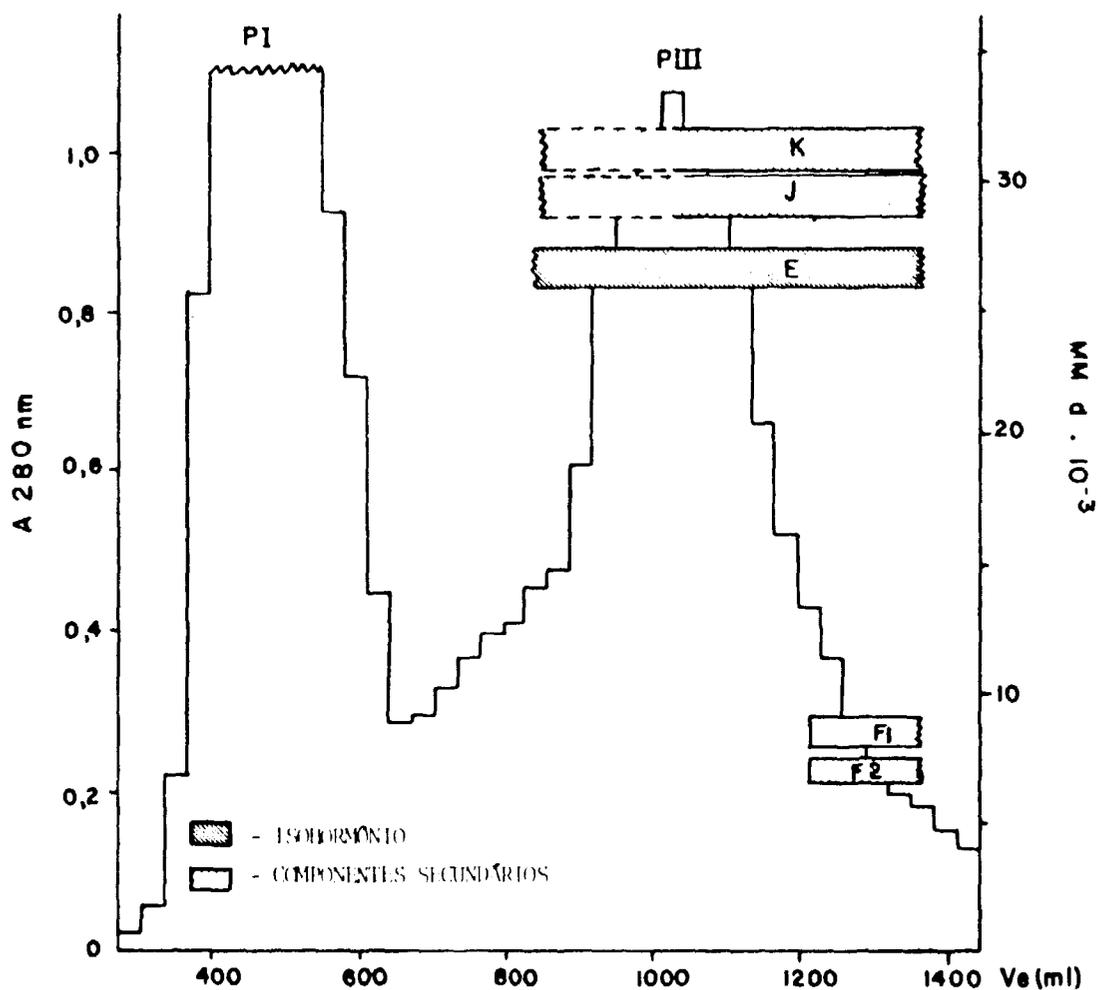
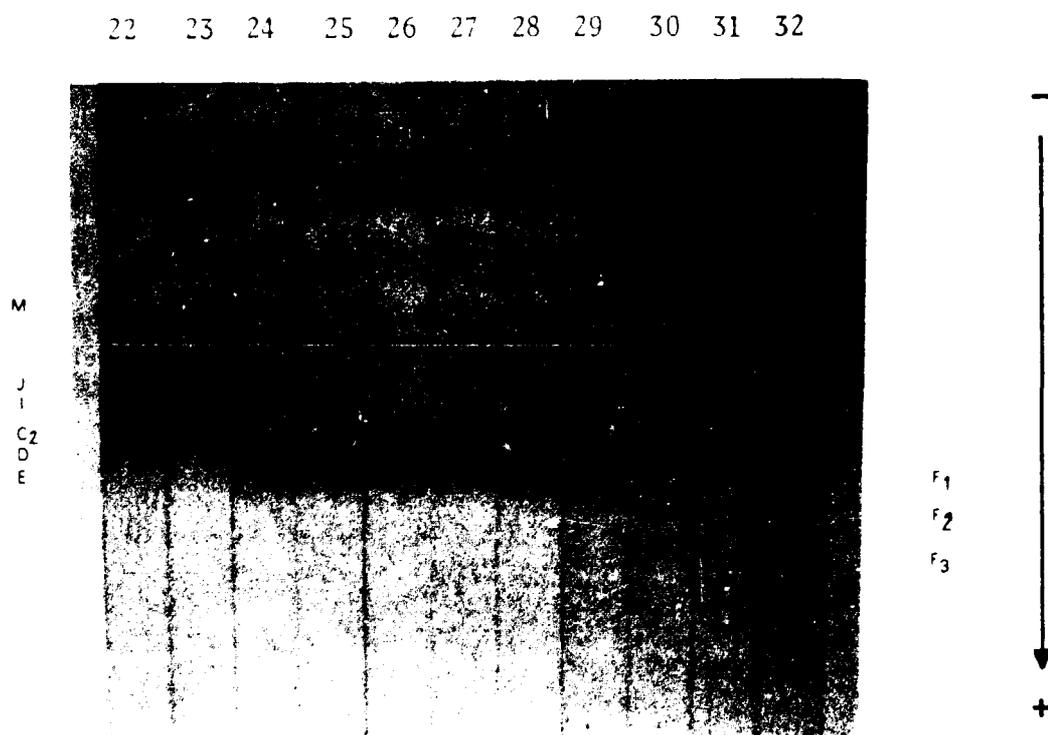


Figura 29 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ABSORBÂNCIA A 280 nm DAS FRAÇÕES ELUÍDAS PELA CROMATOGRAFIA EM GEL DE SEPHADEX G 100 DO HCH-IEA 050875 - GRUPO II. A escala da direita representa a  $MM \cdot 10^{-3}$  d. Os componentes proteicos identificados na EGPA, são representados por barras horizontais, cujo comprimento indica a sua presença no volume de eluído. A largura das barras indica o intervalo de confiança da estimativa de MM.



**Figura 30** – BANDAS PROTEICAS OBTIDAS NA EGPA DAS AMOSTRAS DE HCH DO GRUPO III (10% de acrilamida). Os IHS  $C_1$ ,  $C_2$  e D aparecem como bandas nítidas, cuja intensidade de coloração é máxima nas amostras 25 e 26, diminuindo gradativamente nas amostras anteriores e nas subsequentes. Os IHS  $C_1$  e  $C_2$  apresentam-se com intensidade de coloração praticamente igual nas amostras centrais; o IH D contudo aparece com coloração bem menos intensa. Os componentes I e J são muito intensos e difusos – nas amostras 22 e 23 (pico II) onde se confundem, diminuindo sensivelmente de intensidade ao atingirem o Ve correspondente ao pico III. Os demais componentes secundários aparecem como bandas de coloração fraca, a não ser os do grupo F, que começam a aparecer nitidamente a partir da amostra 29. Na amostra 32, todos os componentes são pouco evidentes. A seta indica o sentido de migração eletroforética.

concentração proteica máxima do pico II, representada pela amostra 22 ( $V_e = 840$  ml); os três isohormônios — C<sub>2</sub>, D e E deste lote de extração são identificados a partir desta amostra, embora em pequena concentração. A intensidade de coloração das bandas dos três IHS mostra que sua concentração é máxima nas amostras 25 e 26 (de 1 050 a 1 110 ml).

Os valores de  $\log R_m$  e os parâmetros das retas de FERGUSON individuais dos componentes, encontram-se agrupados por componente na Tabela XXI do apêndice. Os valores de  $\log R_m$  assim agrupados, foram empregados para o cálculo de uma só reta de FERGUSON para cada componente; os resultados são mostrados na Tabela XI. Nesta tabela encontram-se também as estimativas de  $\bar{R}$  e MM com os respectivos intervalos de confiança. Estes resultados serão comentados com a Figura 30. Na Tabela XII, expõem-se os resultados da análise de variância destas retas.

A distribuição dos componentes conforme sua MM e sua posição no eluído do fracionamento cromatográfico pode ser vista na Figura 31. O pico IV não foi incluído.

Os isohormônios C<sub>2</sub> e D foram eluídos até cerca de 1 400 ml enquanto que o isohormônio E não está mais presente após 1 290 ml. A MM dos três isohormônios pode ser considerada idêntica, variando entre 23 100 e 23 500 d.

Este lote de extração foi o que exibiu o maior número de componentes secundários, compreendendo cinco proteínas de MM maior que o HCH:

- O e P, com respectivamente 64 800 e 66 850 d, presentes do início até pouco mais da metade do pico III;
- M, com 45 800 d, presente de 990 a 1 410 ml do volume eluído;
- I e J, com MMs de 30 000 e 34 000 d respectivamente, cuja distribuição acompanha aproximadamente a dos IHS; a banda I mostra-se muito concentrada no pico II.

Três componentes de MM pequena, pertencentes ao grupo F, foram identificados na fase final do pico III, a partir de 1 290 ml. Todos têm MMs semelhantes, próximas a 13 000 d.

## 2.5 — Grupo IV — Amostras de HCH 33 a 43

Este grupo de doze amostras representa a segunda purificação cromatográfica de um extrato hipofisário, através de uma mesma coluna de gel de Sephadex G 100. A coleta das amostras do eluído cromatográfico foi feita de modo semelhante ao dos dois grupos anteriores.

A fotografia dos géis a 10% de acrilamida é mostrada na Figura 32. Na amostra 33, correspondente à concentração proteica máxima do pico I do fracionamento cromatográfico, nas condições de EGPA empregadas, não se pôde caracterizar nenhum componente. Praticamente todo o material ficou retido no gel superior e as proteínas que passaram ao gel de separação, penetram apenas alguns milímetros, seja nos géis menos ou mais concentrados, impossibilitando uma medida correta da distância de migração. A análise dos componentes desta amostra teria sido possível pelo emprego de géis mais longos ou de menor concentração em acrilamida. O pico II da cromatografia é representado pelas amostras 34 a 36 e o pico III, pelas demais amostras.

Na Tabela XXII do apêndice, estão relacionados os valores de  $\log R_m$  e os parâmetros de cada reta de FERGUSON, agrupados por componente; na Tabela XIII, expõem-se os parâmetros calculados com todos os valores de  $\log R_m$  agrupados, junto com as respectivas determinações de  $\bar{R}$ , MM e intervalos de confiança estimados para a última. Estes resultados serão comentados com a Figura 33. Na Tabela XIV encontram-se os resultados obtidos pela análise de variância destas retas, dados pela estatística  $R^2$ ,  $F_1$  e  $F_2$ .

Tabela XI

Parâmetros das Retas de Ferguson dos Componentes das Amostras do Grupo III, com Valores Estimados de  $\bar{R}$  e MM com Intervalo de Confiança ao Nível de 95% de Confiança

COMP.	N	$-K_R$	$Y_0$	$\bar{R}$	MM (d)	I.C. (d)
C <sub>2</sub>	39	4,10	1,47	1,90	23 500	22 700 - 24 300
D	40	4,06	1,55	1,89	23 100	22 300 - 23 800
E	32	4,07	1,64	1,89	23 200	22 400 - 23 950
F <sub>1</sub>	15	2,98	1,38	1,56	13 100	12 450 - 13 700
F <sub>2</sub>	17	3,20	1,60	1,64	14 900	14 300 - 15 600
F <sub>3</sub>	10	2,88	1,54	1,53	12 250	11 700 - 12 900
I	39	4,72	1,54	2,07	30 200	29 400 - 31 100
J	39	5,05	1,57	2,15	34 100	33 200 - 35 000
M	29	5,97	1,62	2,38	45 800	44 700 - 46 900
O	16	7,30	1,91	2,67	64 800	63 350 - 66 400
P	17	7,43	1,62	2,70	66 850	65 300 - 68 400

COMP. = componente

N = número de medidas de log Rm.

Tabela XII

Análise de Variância das Retas de Regressão dos Componentes do Grupo III

COMP.	R <sup>2</sup>	G.L.	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	CONCLUSÃO
C <sub>2</sub>	0,994	1,37	6 151,962	16,727	O Modelo não é adequado
D	0,993	1,38	5 693,960	16,721	O Modelo não é adequado
E	0,990	1,30	2 847,595	33,560	O Modelo não é adequado
F <sub>1</sub>	0,989	1,13	1 215,093	8,287	O Modelo não é adequado
F <sub>2</sub>	0,998	1,15	1 198,826	0,108	O Modelo é adequado
F <sub>3</sub>	0,981	1, 8	407,786	1,332	O Modelo é adequado
I	0,992	1,37	4 885,073	34,332	O Modelo não é adequado
J	0,995	1,37	6 878,079	7,646	O Modelo não é adequado
M	0,996	1,27	7 110,167	1,288	O Modelo é adequado
O	0,999	1,14	9 409,889	0,560	O Modelo é adequado
P	0,998	1,15	6 424,699	9,881	O Modelo não é adequado

COMP. = componente

R<sup>2</sup> = coeficiente de explicação

G.L. = graus de liberdade, respectivamente para F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>

F<sub>1</sub> = estatística que testa a inclinação da reta

F<sub>2</sub> = estatística que testa a adequação do modelo da reta

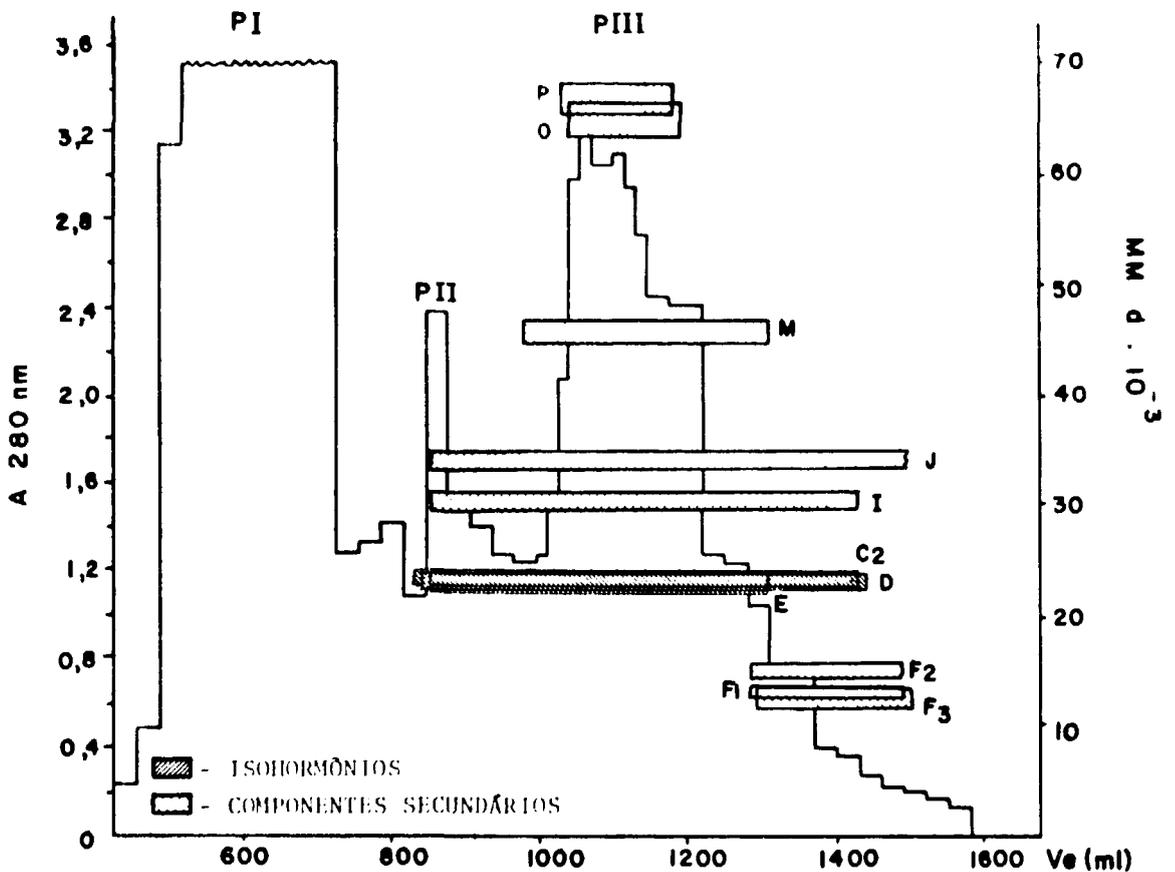
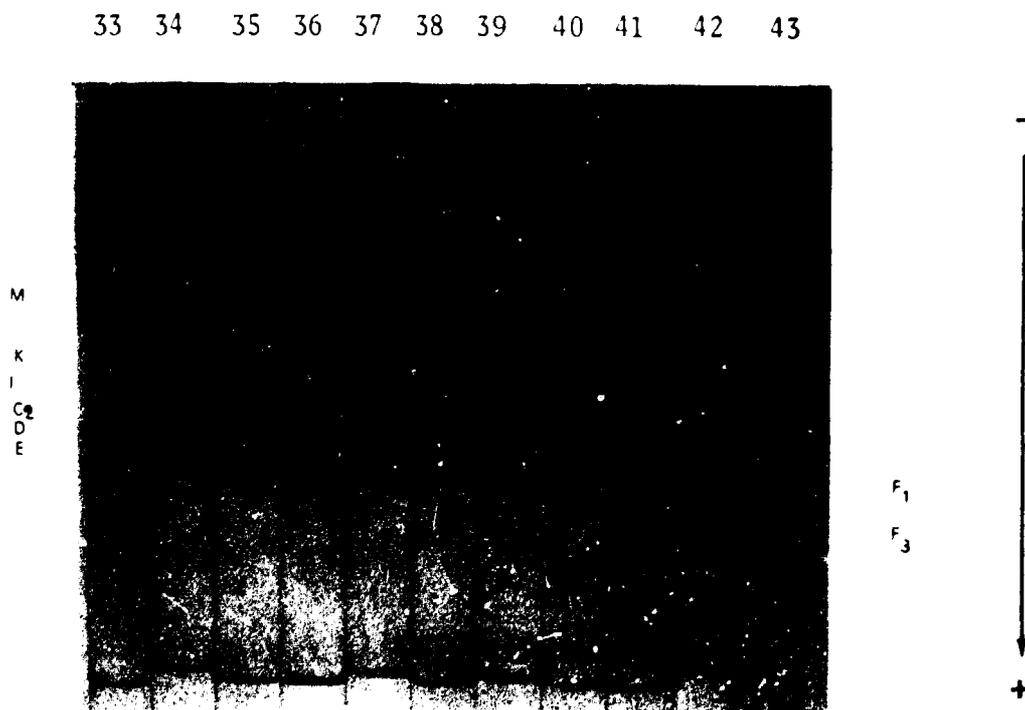


Figura 31 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ABSORBÂNCIA A 280 nm DAS FRAÇÕES ELUÍDAS PELA CROMATOGRAFIA EM GEL DE SEPHADEX G 100 DO HCH-IEA 270777 – GRUPO III. A escala da direita indica a  $MM \cdot 10^{-3}$  d. Os componentes proteicos identificados na EGPA estão representados pelas barras horizontais, que pelo comprimento mostram o volume onde se apresentam e pela altura indicam a sua MM, pelo intervalo de confiança desta estimativa. Todos os Ihs estão presentes a partir do pico II e apresentam MMs coincidentes.



**Figura 32** – BANDAS PROTEICAS OBTIDAS NA EGPA DAS AMOSTRAS DE HCH DO GRUPO IV (10% de acrilamida). Os isohormônios, representados pelas bandas de coloração mais intensa, apresentam-se a partir da amostra 34 (pico II), tendo intensidade máxima de coloração nas amostras 38 e 39 (centro do pico III). Em ordem crescente de intensidade de coloração estão: IH C<sub>2</sub>, C<sub>1</sub> e D. Na amostra 33, reconhece-se uma banda que penetra muito pouco no gel de separação e que não pode ser identificada. Nas amostras correspondentes ao pico II (34 a 36), nota-se a presença de uma banda difusa – I – que depois vai diminuindo gradativamente; nestas amostras, a banda K também pode ser reconhecida com facilidade. As bandas F<sub>1</sub> e F<sub>3</sub> aparecem a partir da amostra 42. As demais bandas aparecem com coloração muito fraca. A banda intensa que aparece isolada na metade superior da amostra 38 é uma proteína contaminante. A seta indica o sentido de migração eletroforética.

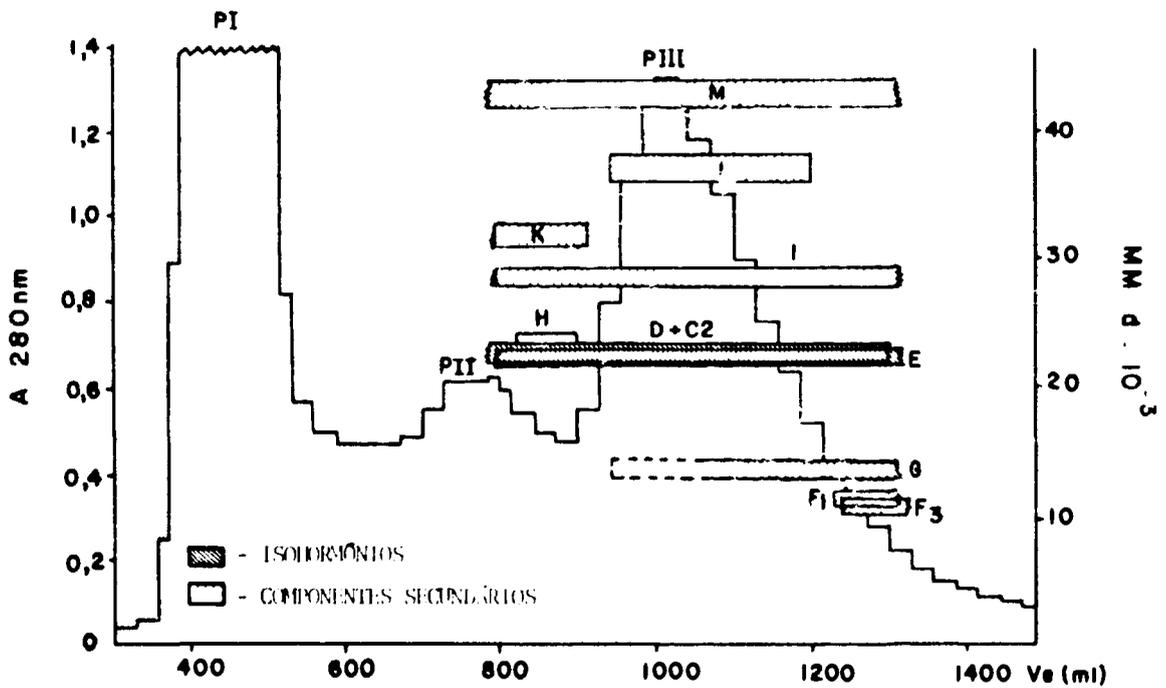


Figura 33 -- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ABSORBÂNCIA A 280 nm DAS FRAÇÕES ELUIDAS PELA CROMATOGRAFIA EM GEL DE SEPHADEX G 100 DO HCH-IEA 031177 -- GRUPO IV. A escala da direita representa a MM em daltons.  $10^{-3}$ . As barras horizontais representam os componentes proteicos identificados na EGPA, mostrando a sua distribuição no  $V_e$  e sua MM, dada pelo intervalo de confiança desta estimativa. Os Ihs  $C_1$ ,  $C_2$  e D superpõem-se quanto ao  $V_e$  e MM, estando presentes já no pico II.

Tabela XIII

Parâmetros das Retas de Ferguson dos Componentes das Amostras do Grupo IV, com Valores Estimados de  $\bar{R}$  e MM com Intervalo de Confiança ao Nível de 95% de Confiança

COMP.	N	$-K_R$	Yo	$\bar{R}$	MM (d)	I.C. (d)
C <sub>2</sub>	40	4,03	1,45	1,88	22 800	22 000 – 23 500
D	40	4,03	1,56	1,88	22 800	22 000 – 23 500
E	40	3,98	1,65	1,87	22 300	21 500 – 23 000
F <sub>1</sub>	8	2,77	1,32	1,49	11 400	10 800 – 12 000
F <sub>3</sub>	8	2,70	1,50	1,47	10 800	10 300 – 11 400
G	26	3,05	0,75	1,57	13 600	13 000 – 14 300
H	6	4,09	0,80	1,90	23 400	22 600 – 24 200
I	36	4,58	1,45	2,03	28 700	27 800 – 29 500
K	9	4,86	1,29	2,11	31 900	31 000 – 32 800
L	14	5,29	1,04	2,21	37 000	36 100 – 38 000
M	36	5,74	1,54	2,32	42 700	41 700 – 43 800

COMP = componente

N = número de medidas de log Rm

Tabela XIV

Análise de Variância das Retas de Regressão dos Componentes do Grupo IV

COMP.	R <sup>2</sup>	G.L.	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	CONCLUSÃO
C <sub>2</sub>	0,992	1,38	4 711,476	15,136	O Modelo não é adequado
D	0,994	1,38	6 141,529	15,797	O Modelo não é adequado
E	0,994	1,38	6 184,277	22,382	O Modelo não é adequado
F <sub>1</sub>	0,993	1, 6	901,085	1,422	O Modelo é adequado
F <sub>3</sub>	0,988	1, 6	490,242	4,123	O Modelo é adequado
G	0,983	1,24	1 414,105	1,971	O Modelo é adequado
H	0,993	1, 4	609,282	2,589	O Modelo é adequado
I	0,993	1,34	4 711,684	0,841	O Modelo é adequado
K	0,986	1, 7	476,836	0,246	O Modelo é adequado
L	0,960	1,12	290,460	0,630	O Modelo é adequado
M	0,992	1,34	4 456,701	2,894	O Modelo é adequado

COMP. = componente

R<sup>2</sup> = coeficiente de explicação

G.L. = graus de liberdade, respectivamente para F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>

F<sub>1</sub> = estatística que testa a inclinação da reta

F<sub>2</sub> = estatística que testa a adequação do modelo da reta

A Figura 33 mostra a disposição dos componentes segundo a sua MM e sua presença nos valores dos picos II e III da eluição cromatográfica. O pico IV não foi incluído. Os IHS do tipo C<sub>2</sub>, D e E eluem-se juntos entre 800 e 1 300 ml, têm MM de 22 300 a 22 800 d e encontram-se em maior concentração no centro do pico III. Apesar da repurificação, no pico III encontram-se diversos componentes secundários, com MMs maiores ou menores que os IHS: o de maior MM é o componente M, de 42 700 d, ocupando o mesmo volume dos IHS; o componente K, de 31 900 d, está presente nas frações iniciais do pico III e nas frações subsequentes, a sua banda no gel de poliacrilamida parece ser substituída pela banda L, de 37 000 d. Outra proteína que acompanha o volume de distribuição dos isohormônios, é a representada pela banda I, de 28 700 d. Entre os componentes de MM menor que o HCH, encontram-se os do grupo F, com cerca de 11 000 d, que aparecem após 1 200 ml e o componente G, de 13 600 d, eluído a partir de aproximadamente 1 000 ml.

#### IV – DISCUSSÃO

##### 1 – Curva-Padrão para Estimativa do $\bar{R}$ e da Massa Molecular

Com o intuito de obter precisão melhor para a curva-padrão e sabendo-se que a massa molecular do HCH varia em torno de 21 500 d, procurou-se obter o maior número possível de proteínas-padrão com massas moleculares desta ordem.

Controlando-se o sistema de EGPA em todas as suas etapas, conseguiu-se medidas de  $K_R$  bastante reproduzíveis, resultando em determinações do  $K_R$  satisfatórias. Na maior parte dos dados, o desvio-padrão das médias do  $K_R$  foi pequeno (Tabela III), sendo de 0,3 a 4,5% do valor da média para 12 estimativas; em quatro proteínas (bacitracina, glucagon, mioglobina e dímero da SAB) foi de 8,0 a 10,0%, enquanto que a maior variação foi encontrada na forma monomérica da insulina, com 12,1%.

Uma comparação dos valores de  $K_R$  obtidos neste trabalho com outros da literatura, para as mesmas proteínas, torna-se praticamente impossível por causa dos sistemas diferentes de EGPA empregados. O sistema que mais se aproximou ao deste estudo foi o usado por HEARING e cols.<sup>(27)</sup>. Apesar das proteínas usadas terem sido solubilizadas em Triton X-100, os valores do  $K_R$  são bastante semelhantes aos obtidos neste trabalho, sendo, respectivamente: insulina (dímero) – 3,1 e 2,943; mioglobina – 3,7 e 2,718; quimotripsinogênio A (monômero) – 4,6 e 4,490; ovalbumina (monômero) – 5,8 e 5,421; SAB (monômero) – 7,8 e 7,107; SAB (dímero) – 12,0 e 10,743.

O sistema eletroforético usado por SKYLER e cols.<sup>(64)</sup> forneceu resultados do  $K_R$  comparáveis para todas as proteínas em comum com as deste estudo, apresentando, respectivamente, os seguintes valores: bacitracina – 1,46 e 1,595; glucagon – 2,39 e 2,760; FSH – 5,64 e 5,600; ovalbumina (monômero) – 5,49 e 5,421; SAB (monômero) – 6,57 e 7,107; SAB (dímero) – 9,48 e 10,743.

Na bibliografia consultada, encontraram-se, basicamente, dois tipos de tratamentos para relacionar os valores experimentais do  $K_R$  às massas moleculares das proteínas, a fim de estabelecer a curva-padrão nos moldes propostos por HEDRICK & SMITH<sup>(28)</sup>. No primeiro tipo, o coeficiente de retardamento  $K_R$  é relacionado diretamente à massa molecular e no segundo tipo, indiretamente, através do raio geométrico médio da molécula proteica ( $\bar{R}$ ). Em cada um destes dois tipos, sugerem-se diversas soluções, transformando uma ou ambas as variáveis em logaritmo ou raiz quadrada. Por exemplo, HEDRICK & SMITH<sup>(28)</sup>, os primeiros autores a explorarem as possibilidades oferecidas pela EGPA como meio de avaliar a MM de proteínas, relacionaram o  $K_R$  diretamente à MM, obtendo uma função linear para MMs de 50 000 a 500 000 daltons. Pela Figura 12, verifica-se que os resultados do  $K_R$  obtidos neste trabalho não variam linearmente com a MM, quando esta é inferior a 40 000 d, adotando a forma de uma parábola. O mesmo tipo de distribuição para massas moleculares pequenas é relatado por diversos autores<sup>(17,24,59,64)</sup>.

Com a finalidade de se obter correlação melhor entre as variáveis, reunindo em um só sistema

tanto as proteínas de menor como as de maior MM, foram propostos diversos tratamentos matemáticos, em geral empíricos. Contudo, RODBARD & CHRAMBACH<sup>(59)</sup> fundamentaram a sua formulação em aspectos teóricos da EGPA associados à geometria molecular. A matriz de gel de poliacrilamida discrimina as proteínas mais pelo seu tamanho físico e forma do que pela sua massa. Os autores acima, aceitando como válida a esfericidade das proteínas globulares, exprimiram o seu tamanho em função do seu raio geométrico médio  $\bar{R}$ . Sabendo-se a massa molecular e o volume específico parcial de uma proteína, o seu raio geométrico pode ser deduzido por meio de fórmulas físicas conhecidas (fórmula xi do capítulo II).

Em outros tipos de correlação tentados como, por exemplo, os de GONENNE & LEBOWITZ<sup>(24)</sup>, ou de HEDRICK & SMITH<sup>(28)</sup>, a zona de linearidade ou a adaptação dos pontos experimentais à reta calculada não foram tão satisfatórios como naquele finalmente escolhido: o de RODBARD & CHRAMBACH<sup>(59)</sup>, ao qual se referem os parágrafos seguintes.

A reta média calculada com os dados experimentais citados por SKYLER e cols.<sup>(64)</sup>, para 19 proteínas globulares com MM variando entre 670 e 450 000 d, obedece à seguinte equação:

$$\bar{R} = 1,3952 \cdot \sqrt{K_R} - 0,8256, \text{ com coeficiente de correlação } r = 0,9757.$$

HEARING e cols. usaram 33 proteínas solubilizadas em Triton X-100, cujas MMs variavam entre 11 500 e 670 000 d, com preponderância das proteínas maiores; a reta média calculada para os seus dados experimentais resultou na equação:

$$\bar{R} = 1,1088 \cdot \sqrt{K_R} - 0,2845, \text{ com coeficiente de correlação } r = 0,9625.$$

A equação da reta média obtida no presente estudo:  $\bar{R} = 1,1316 \cdot \sqrt{K_R} - 0,3898$  e com  $r = 0,9776$ , apresenta parâmetros da mesma ordem de grandeza e coeficiente de correlação comparável aos obtidos por outros autores. A representação gráfica desta reta pode ser vista na Figura 13 e mostra que, embora a linearidade na região de massas moleculares pequenas ainda não seja perfeita, as transformações matemáticas propostas por RODBARD & CHRAMBACH ampliam a zona de linearidade, incluindo proteínas com MMs a partir de aproximadamente 11 500 d ( $\bar{R} \cong 1,50$  nm). Os resultados da análise de variância desta equação, apresentados na Tabela IV, mostram a adequação dos pontos à reta calculada, pelo alto coeficiente  $R^2$ . A estatística  $F_c = 323,58$ , comparada ao F tabelado em 1% de significância<sup>(8,68)</sup>, mostrou que a inclinação da reta é altamente significativa.

Quanto aos intervalos de confiança da reta-padrão, estimados ao nível de 5% de significância, verifica-se que a sua variação em torno do ponto de maior confiança, representa 1,7% da estimativa do  $\bar{R}$  neste ponto; para a zona de valores do  $K_R$  em torno de 4 (estimado para a maior parte dos isohormônios), esta variação representa 2% do valor do  $\bar{R}$  estimado. No extremo inferior da reta, a variação dos intervalos de confiança ultrapassa 50% do valor do  $\bar{R}$ , introduzindo erros grandes na sua estimativa.

Diante destes resultados pode-se chegar às seguintes conclusões:

- a) O sistema de EGPA adotado, usando quatro concentrações de acrilamida, forneceu resultados resprodutíveis e precisos para a obtenção do parâmetro  $K_R$  de cada proteína.
- b) As dez proteínas empregadas como padrões, foram adequadas à finalidade a elas destinada, tendo pureza satisfatória e fornecendo resultados resprodutíveis.

- c) Para os resultados obtidos pelas proteínas-padrão, o tratamento matemático de RODBARD & CHRAMBACH<sup>(59)</sup> mostrou ser o mais adequado para o estabelecimento da curva-padrão, cuja validade se verifica para proteínas globulares com massas moleculares de 11 000 a 260 000 d.
- d) Pelos intervalos de confiança, verificou-se que os valores do  $K_R$  determinados para os isohormônios do hormônio de crescimento humano, caíram dentro de uma zona da curva-padrão, próxima à de menor erro.

## 2 – Amostras do Grupo I

Confirmado os achados de outros autores, já citados na Introdução, todas as preparações de HCH estudadas mostraram ser heterogêneas, apresentando de dois a quatro isohormônios, isômeros de carga, além de um número variável de compostos proteicos menos importantes, denominados de componentes secundários (ver Tabela VIII).

A discussão dos resultados obtidos neste grupo de amostras enfocará os seguintes aspectos:

- 1) Caracterização dos isohormônios e da sua heterogeneidade;
- 2) Avaliação do raio geométrico médio ( $\bar{R}$ ) e da massa molecular (MM) dos isohormônios;
- 3) Estudo dos componentes secundários.

### 2.1 – Caracterização dos Isohormônios e Heterogeneidade do HCH

O comportamento do HCH na EGPA analítica é bastante conhecido, tendo sido estudado nas mais variadas condições de análise, o que permite comparações entre os resultados deste trabalho com os de outros autores.

Pelas Figuras 15 a 26, representativas das retas de FERGUSON dos componentes proteicos encontrados em cada amostra, evidencia-se o paralelismo entre as retas dos isohormônios. Este paralelismo indica a isomeria de carga destes componentes, ou seja, elas podem ser considerados como tendo a mesma massa molecular, diferindo entre si pela carga<sup>(28)</sup>.

Portanto, o que diferencia os IHS entre si é a sua carga diversa, que na EGPA se manifesta por distâncias de migração anódica diferentes e cuja magnitude pode ser avaliada pelo parâmetro  $Y_0$  da reta de FERGUSON<sup>(59)</sup>. Portanto, este valor será analisado em primeiro lugar para caracterizar cada tipo de isohormônio.

Examinando-se os valores do  $\log Y_0$  dos IHS de cada amostra, mostrados na Tabela V, verifica-se haver, com uma única exceção (amostra 8 IH D), um nítido aumento deste parâmetro entre os IHS subsequentes. Houve possibilidade de agrupar-se todos os IHS encontrados de acordo com a sua mobilidade, isto é, com o valor crescente do  $Y_0$ , como está apresentado na Tabela VI. A variação apresentada por  $Y_0$  de cada grupo de IH foi a seguinte (incluindo a amostra 8):

IH	VARIAÇÃO DO $Y_0$	N	MÉDIA $\pm$ D.P.
B	1,14 - 1,22	6	1,180 $\pm$ 0,035
C <sub>1</sub>	1,24 - 1,33	6	1,290 $\pm$ 0,038
C <sub>2</sub>	1,36 - 1,59	11	1,442 $\pm$ 0,075
D	1,47 - 1,66	6	1,563 $\pm$ 0,075
E	1,57 - 1,76	6	1,657 $\pm$ 0,080

Onde N = número de dados

A diferença mais nítida manifesta-se entre os três primeiros tipos de IHS, enquanto que a partir do IH C<sub>2</sub> existe um certo grau de sobreposição dos valores do Yo. Contudo, pelo teste t de STUDENT (item 5.3.2.3., capítulo II), as médias dos valores do Yo de cada tipo de IH revelam diferença significativa ao nível de 95% de confiança. O IH E<sub>1</sub> foi excluído da análise por deficiência de dados.

Sendo cada componente representado no gel por uma banda corada bem delimitada e tendo valores de K<sub>R</sub> e Yo bem definidos, pode-se considerar cada IH como uma espécie molecular distinta.

A caracterização física de quatro componentes do HCH (B, C, D e E), mostrou que são indiferenciáveis quanto ao tamanho, porém, do IH B ao IH E, manifestam um aumento progressivo da carga molecular, estimado em 1 a 1,5 unidades de valência (prótons/molécula) por CHRAMBACH e cols.<sup>(11)</sup> e 0,3 a 0,5 unidades de valência por YADLEY e cols.<sup>(78)</sup>, entre cada isohormônio subsequente.

SKYLER e cols.<sup>(64)</sup> analisaram oito preparações diferentes de HCH. Os resultados destes autores praticamente coincidem com os deste trabalho, permitindo que se faça uma comparação direta entre eles. Em cada amostra encontraram de dois até cinco IH. Apesar de haver uma certa continuidade dos valores de K<sub>R</sub> e Yo de cada IH, de uma amostra para outra, demonstraram por análise estatística que cada IH pode ser considerado uma espécie molecular distinta, tendo valores de Yo e K<sub>R</sub> característicos. Como já foi citado anteriormente, esta caracterização levou a uma proposta de classificação dos IHS, com o propósito de se uniformizarem os resultados obtidos em diversos laboratórios. Pela sua classificação, as variações apresentadas por Yo para os respectivos IHS foram: IH A: 0,95 (apenas uma determinação); IH B: 1,18 a 1,26; IH C<sub>1</sub>: 1,24 a 1,47; IH C<sub>2</sub>: 1,38 a 1,52; IH D: 1,47 a 1,78 e IH E: 1,50 a 1,84. Estes resultados são comparáveis aos encontrados neste estudo, tanto pelo valor numérico como pela sobreposição dos valores observados nos IHS de maior mobilidade. Adicionando-se o fato de que o IH B em geral é descrito como o isohormônio principal em preparações semelhantes às das amostras de 1 a 6<sup>(11,63,64,77,78)</sup>, comprova-se a validade dos resultados, justificando plenamente a classificação adotada. Acrescenta-se à fundamentação de sua classificação como hormônios verdadeiros, a identidade do seu comportamento eletroforético com IHS de atividade biológica específica comprovada<sup>(11,19,20,21,36,64,77,78)</sup>. Além disso, em todas as amostras de HCH IEA a atividade imunológica específica ficou comprovada por radioimunoensaio.

Apenas um hormônio analisado por SKYLER e cols.<sup>(64)</sup>, preparado por método de ultracentrifugação seletiva<sup>(36)</sup>, apresentou o IH do tipo A, que nas amostras aqui estudadas não foi encontrado. Por outro lado, na amostra de HCH de extrações antigas (amostra 7), encontrou-se um componente mais rápido que o IH E, denominado de E<sub>1</sub>. Na realidade, não se pode afirmar que este último represente um isohormônio do HCH, pois sua atividade imunológica e/ou biológica específica teria que ser comprovada, para classificá-lo como tal. Contudo, os seus valores de K<sub>R</sub> e Yo parecem conformar-se à seqüência apresentada pelos valores dos demais isohormônios, justificando assim a sua inclusão nesta classificação.

Em trabalhos mais antigos, não havia a preocupação em caracterizar-se a migração eletroforética (R<sub>m</sub>) dos isohormônios por valores numéricos. Assim, uma comparação quanto a composição de IHS em preparações analisadas por outros autores e as aqui apresentadas, se torna um pouco limitada. De um modo bem genérico, comparando-se os padrões eletroforéticos da EGPA de todas as amostras com os mostrados na literatura (sem tomar em conta o R<sub>m</sub>), observa-se grande semelhança entre eles. As mais diversas preparações de HCH mostram em média três componentes, com espaçamento uniforme entre si<sup>(11,22,25,33,34,52,54,61,64,65,69,77,78)</sup>. Apenas na publicação de SKYLER e cols.<sup>(64)</sup>, encontrou-se um estudo comparativo entre preparações diferentes de HCH, nos moldes semelhantes aos deste estudo. Estes autores, em oito amostras de HCH, encontraram de dois a cinco IHS; o IH B (ou IH b), foi detectado em todas elas, sendo o componente principal em sete das preparações. SINGH e cols.<sup>(63)</sup>, também consideraram como hormônio "nativo" o componente mais abundante, que pode ser identificado ao IH B. Um ou dois IHS do grupo C (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> ou c<sub>2</sub>), também estavam presentes em todas as amostras. O IH D (ou IH d) apareceu em seis e o IH E (ou IH e) foi visto em apenas três das amostras. De um modo geral, pode-se dizer que estas composições em IHS assemelham-se às das amostras HCH de 1 a 6; nenhuma delas apresentou padrão igual ao encontrado para o HCH IEA, sendo que

aquela que mais se aproxima é uma preparação de WILHELMI, purificada em DEAE – celulose, na qual o IH D foi o predominante.

A preparação de WILHELMI NIH, de grau imunológico, e a amostra de HCH 6 (WILHELMI NIH), apresentaram padrão eletroforético e composição de IHS bastante semelhantes, com acentuada predominância do IH B; o IH C<sub>1</sub> apareceu em concentração pequena em ambas e o IH C<sub>2</sub> foi detectado apenas neste estudo.

O preparo de HCH ROOS KABI estudado por SKYLER e cols. apresentou três isohormônios de menor massa molecular: b, c<sub>1</sub> e d, com predominância do IH b.

É interessante notar que nenhum dos cinco lotes de preparações de HCH WILHELMI NIH, estudados por SKYLER e cols. apresentou o mesmo padrão eletroforético, havendo variações quanto ao número, preponderância relativa e tamanho molecular dos IHS. Esta inconstância foi observada também por outros autores<sup>(11,34,35,63,72)</sup>, não sendo restrita apenas a estes aspectos, mas também extensiva às potências biológicas somatotróficas e prolactínicas "intrínseca" do HCH<sup>(11,55,71)</sup>.

As duas amostras de HCH STROUD (HCH 2 e HCH 4), essencialmente, não mostraram diferenças quanto à composição, assim como todas as amostras do HCH IEA, com exceção da amostra HCH 7.

Como já foi visto pela Figura 14 e ao exame da Tabela VIII, logo chama a atenção a distribuição dos tipos de IHS quanto aos métodos de extração, ou seja, os IHS das amostras de outros laboratórios são predominantemente do tipo B, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, enquanto que em todos os HCH IEA (amostras de 7 a 12), predominam aqueles de maior mobilidade, isto é, C<sub>2</sub>, D e E. Em cada amostra sempre foram encontrados tipos consecutivos de IHS, sugerindo uma certa sequência uniforme de eventos determinantes da diferença entre eles.

Embora esteja bem estabelecido o seu comportamento na EGPA, pouco se sabe sobre as diferenças químicas específicas entre os isohormônios isômeros de carga do HCH. A heterogeneidade do hormônio tem sido atribuída à degradação proteolítica, hidrólise, desamidação ou ao polimorfismo genético. Os métodos usados para a comprovação de uma destas supostas causas, baseiam-se principalmente na indução da transformação de um tipo de IH em outro, na análise da composição peptídica ou dos aminoácidos dos IHS isolado, e no estudo de extratos de hipófises frescas.

De um modo geral, os procedimentos físico-químicos de extração do hormônio ou o seu armazenamento, têm sido invocados como agentes desnaturantes capazes de provocar a heterogeneidade<sup>(16,21,31,35,61)</sup>.

RHODE & DÖRNER<sup>(57)</sup> efetuaram seis grupos de extrações hipofisárias, variando as soluções de extração quanto a sua composição, pH e força iônica. Analisando estes extratos por imuno-elektroforese em gel de amido, reconheceram ao todo sete componentes com imunoreatividade específica do HCH, cinco dos quais podem ser interpretados como isômeros de carga e dois como isômeros de massa. Todas as extrações resultaram em composição qualitativa – e quantitativamente – diferente dos componentes. Concluíram que esta heterogeneidade já é determinada pela primeira extração, podendo alterar-se também conforme a sequência dos processos utilizados. Observaram que o pH alcalino, a força iônica elevada e a filtração dos extratos através de gel de Sephadex G 200, são determinantes na formação de componentes de maior mobilidade eletroforética. Infelizmente, a metodologia diferente empregada no seu reconhecimento, não permite que se faça uma correspondência direta destes componentes com os IHS de maior mobilidade encontrados neste estudo. Contudo, como cinco IHS isômeros de carga são conhecidos, por analogia pode-se supor que os referidos IHS mais rápidos equivalem aos IHS D e E.

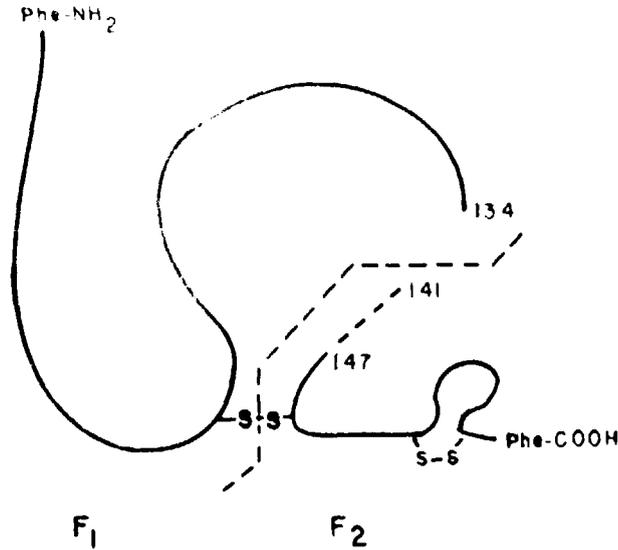
LEWIS, CHEEVER e seus colaboradores, estão entre os autores que mais exploraram as possíveis causas da heterogeneidade do HCH<sup>(33,34,35)</sup>. Observando as condições experimentais que

provocavam a conversão irreversível de IHS de menor mobilidade em componentes mais rápidos, concluíram que dois tipos de reações de conversão podiam ocorrer. A primeira delas<sup>(33,34)</sup>, manifesta-se pela incubação do HCH em meio alcalino, formando, a partir do IH B, componentes mais negativos, de espaçamento irregular entre si na EGPA. Estas transformações são evitadas por inibidores enzimáticos, como o di-isopropil-fluorofosfato (DFP). A análise de aminoácidos de cada componente, revelou diferenças nos aminoácidos terminais (NH<sub>2</sub>). Concluíram que este tipo de conversão dos IHS era mediado por enzimas proteolíticas contaminantes, originárias do tecido glandular, cuja presença em extratos hipofisários parece ser variável. RHODE & DÖRNER<sup>(57)</sup> concordam com esta hipótese, aventando que a heterogeneidade seja induzida logo após a morte, durante o armazenamento ou pela homogeneização das hipófises, favorecendo-se a atuação enzimática pela exposição do extrato a bases fortes. PECKHAM<sup>(52)</sup>, extraíndo o HCH pelo método de ROOS, modificado pela adição do inibidor enzimático DFP na fase de purificação cromatográfica, obteve um produto menos heterogêneo; MILLS e cols.<sup>(44)</sup>, empregando a mesma substância durante a purificação do hormônio em DEAE-celulose, observaram um aumento no rendimento do HCH, que na EGPA se apresentava essencialmente homogêneo. Estas duas últimas observações, embora não sejam muito claras em relação à modificação do padrão eletroforético, conseguida pela presença do DFP, contribuem à hipótese de que a heterogeneidade pode ser consequência, pelo menos em parte, da proteólise do hormônio durante a fase de purificação cromatográfica.

Os trabalhos mais decisivos para estabelecer a proteólise como causadora da transformação do HC, foram realizados por dois grupos de pesquisadores: o de CHRAMBACH, YADLEY, RODBARD & BEN-DAVID<sup>(11,77,78)</sup> e o de SINGH, ao qual pertence LEWIS<sup>(63)</sup>. O primeiro grupo de autores estava interessado em descobrir a gênese da heterogeneidade eletroforética apresentada pelo HC e, especificamente, se era possível conseguir-se a conversão do IH B em IHS de maior mobilidade. Este interesse ligava-se a diferenças da atividade biológica dos produtos, que será discutida posteriormente. Partiram do conhecimento de que a hidrólise do HCH por tripsina e do HC bovino por plasmina, resultavam em preparações com predominância dos componentes de mobilidade eletroforética aumentada, mantendo a atividade biológica. O padrão eletroforético destes hormônios digeridos era muito semelhante ao apresentado por uma amostra de HCH na qual predominavam os IH D e IH E (a mesma estudada por SKYLER e cols.<sup>(64)</sup>, preparação WILHELMI-NIH semelhante às amostras HCH IEA, anteriormente citada). Uma preparação rica em IH B ou então o IH B isolado, incubados na presença de plasmina, resultou na transformação gradativa do IH B nos componentes D e E, sem que se detectassem alterações da massa molecular<sup>(77)</sup>. Estudos comparativos entre as atividades biológicas dos IHS E, obtidos "naturalmente" pela extração hipofisária ou gerados pela digestão plasmínica, mostraram que ambos são comparáveis<sup>(78)</sup>. A diferença de carga encontrada entre os IHS foi atribuída à hidrólise proteolítica<sup>(11,77)</sup>.

O grupo de SINGH e cols.<sup>(63)</sup> também modificou o IH B pela digestão plasmínica, obtendo três componentes mais negativos, denominados  $\alpha_{1,2}$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta$ , que na EGPA apresentaram migração relativa bastante semelhante aos IHS C<sub>2</sub>, D e E, respectivamente, encontrados nas preparações de HCH IEA. Como os autores do grupo anteriormente citado, estes também não detectaram diferença entre o comportamento eletroforético dos IHS de migração mais rápida obtidos por extração hipofisária e os produtos gerados pela digestão enzimática. O mapeamento peptídico de  $\alpha_2$  (IH C<sub>2</sub>), indicou a falta de um fragmento de seis aminoácidos da alça maior do hormônio (135-140); a análise de  $\alpha_3$  (IH D), mostrou a ausência de um fragmento maior, de 12 aminoácidos (135-146). No componente  $\beta$  (IH E), além das alterações notadas em  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , presume-se que ocorreram uma série de clivagens da cadeia entre os resíduos 147 a 158. Os componentes  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  podem esquematicamente ser representados como na Figura 34.

A ponte dissulfeto mantém unidos os dois fragmentos formados – F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> – sem que a forma globular da molécula se altere. Esta seria uma explicação por que não se detectam diferenças de massa molecular entre os diversos IHS pelos métodos de EGPA. Comprovando esta hipótese de clivagem, os autores conseguiram demonstrar a presença de dois novos componentes, de aproximadamente 16 000 e 9 000 d após a redução dos componentes  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  pelo mercapto-etanol. A soma da massa molecular destes dois fragmentos corresponde aproximadamente à do HCH intacto.



**Figura 34** – HCH clivado pela plasmina, segundo SINGH e cols.<sup>(63)</sup>. O componente  $\alpha_2$  perde o fragmento 135-140 e o componente  $\alpha_3$  perde o fragmento 135-146. A linha pontilhada indica a dissociação em fragmentos  $F_1$  e  $F_2$ , provocada pelo mercapto-etanol.

O segundo tipo de reação de conversão descrito por LEWIS e cols., ocorreu em todas as amostras por eles analisadas<sup>(34,35)</sup> e predomina quando o pH do meio é fortemente alcalino. Este tipo de conversão dá-se na presença de inibidores de enzimas proteolíticas e é acompanhado por liberação de  $\text{NH}_3$ , sem que aconteçam modificações nos aminoácidos terminais dos componentes. Cada componente de migração mais rápida seria formado pela perda de um mol de  $\text{NH}_3$ . O estudo cinético desta desamidação em preparação diversas de HC bovino, mostrou que sua velocidade depende do método de obtenção do hormônio. Como esta desamidação não-enzimática é acelerada por uma série de fatores externos, como contato com solventes orgânicos, aumentos de temperatura, de pH ou força iônica<sup>(35)</sup>, diálise e liofilização<sup>(37)</sup>, supõe-se que nestas condições o hormônio poderia ser modificado suficientemente, como por exemplo, sofrer desdobraimento, expondo os radicais passíveis de perderem um grupo amídico (glutamina e asparagina).

SAXENA & HENNEMANN<sup>(61)</sup> já haviam atribuído a heterogeneidade à diferença entre o número total de resíduos de nitrogênio amídico apresentada por três componentes isolados de uma preparação de HCH.

Já CHRAMBACH e cols.<sup>(11)</sup>, obtendo os IHS isolados e purificados por sistema de eletroforese preparativa, constataram que a diálise, a liofilização, o armazenamento no estado liofilizado e a filtração em gel, não afetam a migração relativa (Rm) dos IHS B, C, D e E na EGPA. Não observaram também a interconversão destes IHS após o seu armazenamento em soluções neutras congeladas.

A desamidação de outras proteínas, como citocromo c, mioglobina e lactoperoxidase<sup>(35)</sup> e do ACTH<sup>(4)</sup>, comprovada quimicamente, tem como consequência a formação da bandas eletroforéticas de maior mobilidade. Por analogia, acredita-se que o mesmo mecanismo explique a heterogeneidade da prolactina, muito semelhante à do HCH<sup>(35)</sup>.

Como a proteólise do HCH, induzida pela plasmina, não é acompanhada pela liberação de  $\text{NH}_3$ , supõe-se que os IHS assim formados são diferentes do HCH desamidado descrito por LEWIS. Tal fato não nega a existência desta última forma em condições experimentais diferentes, nem a possibilidade de que em alguns sistemas os dois tipos – desamidado e hidrolisado – possam coexistir<sup>(77)</sup>.

Resumindo, pode-se encontrar basicamente, dois tipos de preparações de HCH<sup>(64)</sup>:

- a) aquelas em que predomina o IHB e nas quais a presença de substâncias redutoras não altera o seu aspecto eletroforético – formas desamidadas;
- b) aquelas em que predominam os IHS de maior carga negativa e que pela redução se desdobram em dois componentes menores, de aproximadamente 12 000 e 16 000 d (ou 9 000 e 16 000 d<sup>(63)</sup>) – formas enzimaticamente degradadas, que aparentam atividade biológica aumentada.

Por outro lado, existem referências sobre a inativação do HCH, atribuída à possível contaminação do extrato por proteinases hipofisárias. O seu efeito é observado no hormônio mantido em solução a 4°C, em pH de 7,0 a 8,5, podendo ser evitado pela acidificação das soluções<sup>(66)</sup> ou pelo armazenamento dos extratos sob a forma liofilizada, a -20°C<sup>(9)</sup>. Não havendo referências sobre a caracterização química destas formas degradadas, pode-se supor que estas resultaram de um mecanismo de ação diferente daquele descrito, no qual a atividade biológica é aumentada pela digestão plasmínica<sup>(63,77)</sup>.

A terceira explicação possível para a heterogeneidade – o polimorfismo genético – foi investigada por vários pesquisadores pela análise eletroforética de extratos de hipófises frescas individuais. Estas extrações em geral foram efetuadas por simples homogeneização das glândulas, seguida de centrifugação em ambiente frio<sup>(57)</sup> ou empregando soluções de molaridade e pH próximos aos fisiológicos, assim evitando possíveis efeitos sobre a estrutura química do hormônio. Em todos os casos, os componentes das diversas hipófises eram semelhantes entre si, excluindo a hipótese de um polimorfismo geneticamente determinado<sup>(19,21,31,57)</sup>.

Diante de todas estas observações, procurou-se encontrar alguma razão que explicasse a predominância constante de IHS de maior mobilidade nas preparações de HCH IEA.

A hipótese de que a diferença dos HCH IEA seria um produto de artefato de técnica gerado pela EGPA, pode ser excluída logo de início, pois todas as amostras deste grupo foram analisadas ao mesmo tempo, estando portanto sujeitas às mesmas condições de análise.

Com os conhecimentos atuais, duas causas podem ser postas em discussão:

- 1) A desamidação do hormônio, favorecida pelos processos físico-químicos utilizados durante a extração, que modificam a estrutura molecular do hormônio;
- 2) A degradação proteolítica, favorecida por condições que facilitam a atuação enzimática, notadamente o tempo e condições (pH e temperatura) de estocagem, tanto das hipófises como dos produtos da extração, durante e após a sua obtenção e evidentemente pela presença de enzimas contaminantes.

Os procedimentos mais importantes de cada método de extração que poderiam fornecer alguma indicação sobre a formação da heterogeneidade, estão arrolados na Tabela XV.

Esta Tabela indica que a amostra 5, de HCH ROOS, preparada comercialmente pelo Laboratório KABI, é o ponto de referência para o esclarecimento dos vários aspectos metodológicos postos em foco. Isto porque neste preparado, encontraram-se, predominantemente, os mesmos IHS – B, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> – que nas preparações obtidas por métodos bastante diversos (amostras 1 a 4 e 6), ao passo que o mesmo método básico, empregado no IEA, em quatro lotes diferentes de extração, mostrou a predominância dos isohormônios de maior carga negativa – C<sub>2</sub>, D e E.

Comparando-se os procedimentos usados nas amostras com a mesma composição de IHS (amostras 1 a 6) verifica-se que a conservação das hipófises em acetona ou congeladas, a exposição ou

Tabela XV

Comparação entre os Procedimentos mais Importantes dos Métodos de Extração de HCH das Amostras do Grupo I

MÉTODO	Amostras de HCH	Armazenamento	Variações de pH	Precipitação	Purificação	Diálises	Liofilizações
				Proteica	Cromatográfica		
RABEN	1	A	4,8 – 12,0	Etanol	não	0	1
STROUD	2 e 4	A	4,8 – 10,0	Etanol	Sephadex G 100 NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 0,1M	0	2
MILLS FC <sub>2</sub>	3	A	3,5 – 12,0	S.A.	não	2	2
WILHELMI	6	A	1,5 – 9,0	pH 9,0 e S.A.	DEAE – celulose	6	5
ROOS KABI	5	C	6,2 – 7,0	S.A.	Sephadex G 100 Glicina 0,5M	1	2
ROOS IEA	7 a 12	C	6,2 – 7,0	S.A.	Sephadex G 100 Fosfato 0,1M + NaCl 0,5M	2	2 ou 3

A = hipófises acetinizadas; C = hipófises congeladas; S.A. = sulfato de amônio.

Todas as etapas de extração são realizadas em temperaturas em torno de 4°C, com exceção do método de RABEN, no qual há uma exposição inicial do material biológico a 70°C.

não a níveis extremos de pH, a precipitação por etanol ou sulfato de amônio, a purificação cromatográfica, ou o número de diálises e liofilizações, não podem ser responsabilizados pela predominância de um ou outro tipo de IH no produto final. Pelo que foi anteriormente exposto, pode-se supor que todos estes processos contribuíram principalmente para a heterogeneidade devida à desamidação não-enzimática, podendo ter um ou outro componente produzido por degradação proteolítica (como na amostra 5, por exemplo).

Procurou-se então encontrar a explicação nas diferenças entre o método de ROOS empregado pelo KABI e aquele pelo IEA. A única diferença encontrada, foi na etapa de purificação cromatográfica em Sephadex G 100; o laboratório KABI introduziu um tampão de eluição cromatográfica com constituintes diferentes, de menor força iônica e pH maior que o originalmente descrito por ROOS, mantido no IEA; respectivamente são: tampão glicina-fosfato 0,5 M, pH 7,2 e tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,6 com NaCl 0,5 M. A diferença mais importante entre estes dois tampões é dada pela presença de quantidade grande de sal no tampão usado por ROOS, resultando em solução de força iônica relativamente alta em comparação ao usado pelo KABI, respectivamente 0,676 e 0,265. De acordo com os dados da literatura<sup>(57,63)</sup>, esta diferença poderia ser considerada, se não responsável, pelo menos contribuinte para alguma alteração química do HCH, transformando-o em moléculas de maior mobilidade eletroforética, conservando a sua massa molecular aparente.

Contudo, a predominância dos IHS C<sub>2</sub>, D e E, é mais indicativa de uma degradação proteolítica do hormônio<sup>(63,64)</sup>. Tomando isto como hipótese, a ocorrência de uma proteólise enzimática seria possível tanto no tecido glandular, antes da extração, assim como durante o período de preparação. A possibilidade de que o hormônio tenha sofrido degradação antes ou durante a autópsia, quando as glândulas permaneceram fora das condições "ideais" de conservação, não é aceitável, já que as preparações feitas na FMUSP (amostras HCH 2 e HCH 3) provêm de hipófises da mesma origem que as do HCH IEA. Além disso, é de se supor que todas as glândulas usadas em outros laboratórios estejam sujeitas ao mesmo tipo de condições durante a coleta. Mesmo o tempo de estocagem das glândulas congeladas nos laboratórios do IEA, variável de alguns meses até dois anos, não difere do de outros laboratórios.

Outra condição que favorece a atuação enzimática, é a manutenção do hormônio em soluções levemente alcalinas (pH 7,5)<sup>(33)</sup>; a transformação dos IHS nestas soluções procede lentamente a temperatura de 4°C. Pelo método de extração de ROOS, contudo, o hormônio nunca fica exposto a soluções alcalinas. O tempo em que o hormônio fica em solução, a 4°C, antes da primeira liofilização, não ultrapassa 7 dias; o mesmo tempo é levado a partir da extração do pó liofilizado até o final da purificação cromatográfica. Se a proteólise realmente ocorre, ela só poderia efetuar-se durante algumas destas fases de extração, pois o produto recém-eluído da coluna cromatográfica já apresenta o padrão eletroforético encontrado em todas as amostras de HCH IEA do grupo I – como pode ser visto pelos resultados dos grupos II a IV – mantendo-se estável em solução aquosa mesmo após 50 dias. Nos outros métodos os extratos ficam em solução por períodos de tempo semelhantes, incluindo em geral etapas nas quais o hormônio permanece em soluções alcalinas, sem contudo manifestar o mesmo tipo de composição de isohormônios que do HCH IEA.

SINGH e cols.<sup>(63)</sup>, atribuíram à filtração de extrato em gel de Sephadex, em tampão de eluição alcalino e de força iônica baixa, a formação de hormônio enzimaticamente degradado, já que a adição de DFP nesta fase, preveniu a formação da mesma heterogeneidade. Por outro lado, o tampão usado pelo KABI é também levemente alcalino e esta heterogeneidade não se manifesta.

Resta ainda a possibilidade de que o método de ROOS facilite mais a extração das próprias enzimas proteolíticas hipofisárias e/ou mantenha melhor sua forma ativa, permitindo que exerçam sua função nas condições de extração empregadas. Contudo, as amostras HCH ROOS do KABI, das quais se conhece a composição – a de SKYLER e cols.<sup>(64)</sup> e a amostra HCH 5 – parecem desmentir esta hipótese.

Já que as conversões seguem uma ordem certa do IHB ao IHE e são irreversíveis, conclui-se

que o tempo de armazenamento do produto final liofilizado, dentro de certos limites, não influi sobre a composição de IHS das amostras aqui apresentadas. Todas as preparações de outras fontes, encontravam-se por aproximadamente um ano nos laboratórios do IEA, desconhecendo-se o período de estocagem anterior, no laboratório de origem. Esta estabilidade na composição dos IHS foi relatada por SKYLER e cols.<sup>(64)</sup>, que verificaram a conservação do padrão eletroforético de uma amostra por um período de cinco anos e por CHRAMBACH e cols.<sup>(11)</sup>.

O que se observa na amostra HCH 7, que resultou de uma repurificação de hormônio estocado liofilizado durante um longo período de tempo (2-3 anos), poderia ser a indicação de degradação proteolítica do hormônio. Sem dúvida, este hormônio sofreu alguma alteração maior, perceptível já pelo seu aspecto eletroforético grosseiro, bastante diverso do padrão eletroforético habitual do HCH (Figura 14) e comparável ao do hormônio degradado após incubação a 37°C em pH fortemente alcalino<sup>(33)</sup>. Nesta amostra, encontrou-se predominantemente o IHE e também o IHE<sub>1</sub>, que são os tipos de isômeros de maior carga negativa. A uniformidade dos HCH IEA de outros lotes parece ser constante, porém, na falta de uma análise anterior deste hormônio, quando era recém-preparado, pode-se apenas especulativamente supor que seu padrão eletroforético era semelhante aos outros e que o fator tempo tenha favorecido esta alteração dos seus IHS. Aqui pode-se adiantar que o mesmo lote de hormônio, estudado no grupo II, antes que o produto passasse pelas fases finais de diálise, ampolização em condições estéreis e liofilização – como ocorreu com a amostra HCH 7 – apresentou unicamente o IHE. Talvez estes procedimentos tenham contribuído para mais uma transformação deste componente. Se o IHE realmente sofre as clivagens múltiplas, como foi proposto por SINGH e cols.<sup>(63)</sup>, ele poderia ser menos estável quando agredido por tais procedimentos. Esta observação se baseia no fato de não ter sido detectada uma transformação maior dos IHS C<sub>2</sub>, D e E nos lotes de HCH IEA 270777 (amostras 9 e 10 e grupo III) e HCH IEA 031177 (amostras 11 e 12 e grupo IV), manipulados do mesmo modo. De qualquer forma, este hormônio ainda pôde ser reconhecido pelos anticorpos específicos do sistema de radioimunoensaio, onde sua atividade correspondeu a 1,17 UI/mg.

Resumindo, colocando-se em foco apenas os dados encontrados na literatura, no método de ROOS não se reconheceram condições que pudessem indicar um favorecimento da proteólise do hormônio, a não ser a cromatografia, especialmente com solução de força iônica alta, poderia ser implicada na indução do tipo de heterogeneidade observada no HCH IEA. De qualquer modo, estas indicações não podem ser definitivas. Como todos os componentes formados pela desamidação podem ter migração eletroforética relativa semelhante à de produtos da degradação proteolítica<sup>(34)</sup>, uma prova de que um ou outro mecanismo (ou ambos) está atuando, só pode ser alcançada depois de uma análise das preparações na presença de redutores.

Esta parte de discussão não poderia ser encerrada sem que se abordasse alguns aspectos das implicações fisiológicas aventadas para a heterogeneidade do HCH.

YADLEY e cols.<sup>(78)</sup> e SINGH e cols.<sup>(63)</sup>, avaliaram em animais de laboratório as potências biológicas prolactínica e somatotrófica dos isohormônios isolados e verificaram que, do IHB ao IHE, existe um aumento gradativo de ambas. Em outras palavras, existe uma relação direta entre estas atividades biológicas e a mobilidade eletroforética dos IHS. A atividade prolactínica do IHE aumentou aproximadamente três vezes em relação ao IHB. A potencialização da atividade somatotrófica do IHE foi mais significativa ainda, chegando a ser de oito a onze vezes maior que a do IHB<sup>(78)</sup>. SINGH e cols.<sup>(63)</sup>, mostraram que para o seu componente  $\alpha_3$  (IHD) há uma potencialização prolactínica maior que a somatotrófica, tendo ambas fatores de aumento próximos a sete e três, respectivamente. O componente  $\beta$  (IHE) por outro lado, apresentou aumentos menos significativos das atividades avaliadas. É de interesse assinalar que esta potencialização é observada tanto nos IHS "naturais", i.é., obtidos em extratos hipofisários, como naqueles gerados pela digestão plasmínica.

Uma série de questões foram levantadas com esta descoberta, a maioria delas, porém, ainda sem resposta definitiva. Em primeiro lugar, estes resultados indicariam que a forma mais ativa do HCH não parece ser o hormônio intacto<sup>(63)</sup>, sendo provável que ele necessite de uma ativação, possivelmente através de uma proteólise limitada, para que exerça seu efeito biológico completo. Isto implicaria na

possibilidade de que a molécula de HCH seja armazenada na hipófise e liberada na circulação sob a forma de um precursor ou pró-hormônio, analogamente a outros hormônios conhecidos<sup>(47)</sup>. Especialmente as dúvidas relacionadas à função fisiológica destes compostos no homem permanecem sem esclarecimento. Não há nenhuma indicação, por exemplo, de que as atividades aumentadas em animais de laboratório, também tenham maior potência no homem. Também continua sendo uma incógnita a implicação fisiológica que existiria para a atividade prolactínica intrínseca do HCH. Aqui cabe ressaltar que estes hormônios de alta atividade prolactínica não se identificam à prolactina humana, nem na EGPA, onde este último hormônio migra até uma posição semelhante à do IHA, atrás do componente principal do HCH<sup>(47,63)</sup> e nem na reação com anticorpos específicos contra a prolactina<sup>(63)</sup>.

Outro fator de importância é que todos os IHS são relatados como tendo a mesma capacidade de reagir com anticorpos específicos contra o HCH<sup>(63,78)</sup>, ou seja, considera-se que tenham os mesmos determinantes antigênicos. Isto significaria que a medida da imunorreatividade de uma preparação de HCH não dá indicação sobre a potência biológica ou composição em isohormônios. Contudo, esta observação só seria válida se houvesse a certeza de que o hormônio usado como antígeno na produção dos anticorpos, tenha sido uma preparação altamente purificada, contendo estritamente um dos isohormônios.

Estas descobertas sem dúvida criaram novas perspectivas para a melhor utilização de preparações de HCH. Se ficar provado que a atividade somatotrófica do HCH no homem pode ser potencializada pela sua transformação em isohormônios mais ativos, a sua obtenção neste estado poderia resultar em maior aproveitamento do material biológico, cuja obtenção atualmente é um problema em todo o mundo. Por outro lado, não se pode esquecer que praticamente nada se sabe sobre a natureza das formas ativas circulantes do HCH e nem sobre as eventuais transformações que o hormônio possa sofrer ao ser injetado em pacientes.

## 2.2 – Avaliação do $\bar{R}$ e da Massa Molecular dos Isohormônios

Ao se testar a homogeneidade ou identidade de uma ou mais preparações, o melhor parâmetro a ser comparado é o  $K_R$ , em vez do  $\bar{R}$  ou da MM, dele derivados<sup>(59)</sup>.  $K_R$  representa o resultado experimental que menos sofre a influência de transformações matemáticas ou pressuposições teóricas. As estimativas do  $\bar{R}$  e da MM estão sujeitas à variação dada pelo erro experimental, introduzido pela sua dedução através da curva-padrão. A avaliação comparativa portanto será baseada o máximo possível no parâmetro  $K_R$ .

Como já foi citado, todos os IHS de uma mesma amostra de HCH apresentaram MMs semelhantes, indicado pelo paralelismo das retas de FERGUSON, ou ainda, pela semelhança entre os coeficientes de retardamento  $K_R$ . Este fato confirma-se ainda pelo exame da figura 27, onde as massas moleculares dos IHS estão indicadas pelos intervalos de confiança desta estimativa: na maioria das amostras, há uma sobreposição destes valores.

A diferença entre o maior e o menor valor de  $K_R$  dos IHS de uma amostra (Tabela V), não ultrapassou o valor de 0,48 unidades (amostra B), sendo a média destas diferenças de 0,16 unidades. Pode-se afirmar então, que os resultados de  $K_R$ ,  $\bar{R}$  e MM dos IHS de uma mesma amostra não apresentaram variação importante (Tabela VI).

Como a composição de IHS nas amostras é variada, não surpreende que as classes de IHS, de B até E, também não se diferenciem pelo  $\bar{R}$  e pela MM. Os valores médios calculados para o  $K_R$  dos IHS agrupados conforme a classe (Tabela VI), claramente mostram esta igualdade: IH B:  $4,07 \pm 0,16$ ; IH C<sub>1</sub>:  $4,03 \pm 0,12$ ; IH C<sub>2</sub>:  $4,08 \pm 0,15$ ; IH D:  $4,06 \pm 0,16$  e IH E:  $4,02 \pm 0,16$ . Estes resultados tiveram ampla confirmação na bibliografia consultada<sup>(11,63,64)</sup>. Apenas SKYLER e cols.<sup>(65)</sup> descreveram uma sutil, porém progressiva diminuição de  $K_R$  do IH B ao IHE, em uma preparação hormonal. Esta diminuição foi interpretada como indicativa de uma hidrólise parcial progressiva, consolidada pela mesma observação em hormônio digerido pela plasmína. Realmente esta diminuição do  $K_R$  pôde ser notada em

5 das 12 amostras (HCH 1, 3, 4, 5, 12), porém, tendo em mente o erro experimental do método, esta variação pode ser considerada como fortuita.

Tomando-se as amostras como um todo, o  $K_R$  dos IHS variou em torno de 4, apresentando o valor mínimo de 3,78 (IH D da amostra HCH 8) e máximo de 4,33 (IH C<sub>2</sub> da mesma amostra), com a ressalva de que este último valor, relativamente alto, possa ter sofrido a influência de erro experimental. Tais valores equivalem a variações do  $\bar{R}$  de 1,81 a 1,97 nm e da MM de 20 300 a 26 000 d. As médias para todos os resultados foram:  $K_R = 4,05 \pm 0,15$ ;  $\bar{R} = 1,89 \pm 0,04$  nm e  $MM = 23\ 000 \pm 1\ 500$  d. Estes resultados comparam-se aos determinados em condições experimentais semelhantes, referidos na literatura. CHEEVER & LEWIS<sup>(10)</sup> obtiveram um valor de 4,4 para o  $K_R$  da forma monomérica do HCH, correspondendo a 23 000 d de MM. Os valores médios obtidos por CHRAMBACH e cols.<sup>(11)</sup> para os quatro isohormônios de três preparações de HCH, foram:  $K_R = 4,31 \pm 0,38$ ;  $\bar{R} = 2,00 \pm 0,13$  nm e  $MM = 27\ 000 \pm 5\ 000$  d. Pela avaliação do  $K_R$ , SKYLER e cols.<sup>(64)</sup> descreveram dois tipos de preparações de HCH. Ao primeiro tipo pertencem cinco das suas amostras, com variação do  $K_R$  entre 3,93 e 4,40 (valor médio - 4,1), correspondendo a estimativas do  $\bar{R}$  e da MM de 1,94 a 2,14 nm e de 24 900 a 33 500 d, respectivamente. No segundo tipo, descrito em três amostras (incluindo uma de HCH ROOS do KABI semelhante à amostra HCH 5), o  $K_R$  variou entre 3,23 e 3,88 (valor médio - 3,7), equivalente a estimativas do  $\bar{R}$  e da MM indo respectivamente de 1,24 a 1,92 nm e de 16 200 a 23 400 d. Os valores do  $K_R$  aqui obtidos, enquadraram-se apenas no primeiro tipo de SKYLER. Os resultados de  $\bar{R}$  e MM são próximos, porém maiores no estudo de SKYLER, certamente por influência das diferenças entre as curvas-padrão usadas para estas estimativas.

Diversos outros métodos têm sido aplicados à determinação da MM do HCH. Citam-se os mais relevantes, seguidos dos resultados: equilíbrio de sedimentação - 21 500<sup>(39,65)</sup>, 22 000<sup>(15)</sup> e 24 000<sup>(25)</sup>; cromatografia em gel de Sephadex - 20 700, 24 900<sup>(69)</sup>, 22 000<sup>(5,22)</sup> e pressão osmótica - 22 100<sup>(65)</sup>. Apesar do emprego de preparações diferentes do hormônio, estes resultados foram considerados como condizentes com os valores esperados.

Levando-se em conta que cada metodologia apresenta um certo grau de variação experimental, pode-se afirmar que os resultados obtidos neste estudo por meio da EGPA, coincidem com os de outros métodos, estando de acordo também com o valor calculado com base na sequência de aminoácidos, que é de 22 100 d<sup>(65)</sup>.

Os IHS de menor MM foram os das amostras 2 (HCH STROUD), 6 (HCH WILHELMI NIH) e 8 (HCH IEA 310177), cada uma obtida por método de extração diferente; os de maior MM foram os das amostras 11 e 12 (HCH IEA 031177). As demais preparações exibiram IHS com MMs intermediárias entre estes dois extremos, havendo considerável sobreposição dos resultados. Na amostra 7, de HCH de extrações mais antigas, apesar das alterações observadas no aspecto eletroforético, os IHS apresentaram MM comparável aos IHS das outras amostras, mais recentes.

O aumento do  $K_R$  médio, observado nas amostras de HCH IEA pertencentes a quatro lotes diferentes de preparação, é gradativo das amostras 7 e 8 para a 12, englobando os valores mínimo e máximo encontrados neste estudo. Estes resultados mostraram que uma mesma metodologia, repetida por um mesmo laboratório, pode resultar em pequenas variações de MM dos IHS de um lote de extração para outro. Assim sendo, neste estudo não cabe uma eventual correlação entre os resultados relativos à MM e o processo de extração. Pode-se dizer, contudo, que nas preparações estudadas, o método de armazenamento das hipófises, os níveis de pH diferentes aos quais o hormônio exposto durante a extração, a purificação cromatográfica, a diálise ou o número de liofilizações, não contribuíram para que a MM do produto fosse sensivelmente alterada.

Baseando-se nas observações de que algumas preparações apresentaram IHS de menor MM, SKYLER e cols.<sup>(64,65)</sup> são de opinião de que o processo de extração pode ser responsabilizado por isto, atuando de algum modo sobre a conformação molecular. Ao mesmo tempo, os próprios autores não excluem a possibilidade da ocorrência de variações experimentais no método de EGPA.

Pelos resultados obtidos neste estudo e pelos dados da literatura, pode-se concordar com esta hipótese, quando se aceita a possibilidade dos processos físico-químicos provocarem alterações de conformação molecular, atuando de alguma maneira, sobre a qual ainda não se tem controle.

### 2.3 – Componentes Secundários

Todas as amostras apresentaram componentes secundários, que variaram quanto ao número e ao tipo, de acordo com o método de extração da preparação (Tabelas VII e VIII). Assim, os componentes G, I, J e M foram identificados apenas nas amostras de HCH IEA, enquanto que os componentes K, N e P só se manifestaram nas amostras de outros laboratórios. Já os componentes  $F_1$ ,  $F_2$  e  $F_3$  estavam presentes em algumas das amostras de outras origens como em algumas de HCH IEA. Como era esperado, todos os componentes secundários apareceram em quantidades ínfimas em relação ao hormônio de crescimento, manifestando-se nos géis apenas como bandas pálidas ou mal definidas, situadas em sua maioria antes do HC (Figura 14).

Diante da incerteza criada pela dificuldade das medidas de  $R_m$  e dado o desconhecimento do tipo de contaminantes, grande parte dos componentes secundários não puderam ser identificados com proteínas conhecidas, impossibilitando também uma comparação entre as amostras. Desta forma, eles serão caracterizados apenas pela sua MM. Muitas vezes, certa proteína poderia estar presente numa amostra, porém, se ela não se manifesta em pelo menos três concentrações de gel, sua identificação é impraticável. Contudo, alguns resultados sugerem a presença de compostos descritos na literatura.

De um modo geral, podemos verificar que os componentes secundários caem em quatro grupos de grandeza de MM. O principal deles compreende os componentes I, J, K dos quais pelo menos um é encontrado em praticamente todas as amostras. Embora uma grande variabilidade seja notada, o valor do  $K_R$  foi ligeiramente maior que o do HCH, resultando em MMs em torno de 27 000 a 30 000 d. Pelas Figuras 22, 23, 25 e 26, representando amostras de HCH IEA, vê-se que as retas de FERGUSON destes componentes ocupam uma posição muito semelhante ao IH B.

A semelhança entre os valores do  $K_R$  dos componentes K, I e J permite que estes sejam interpretados como isômeros de carga, à semelhança do que se observa para os isohormônios. Pode-se supor, que os mesmos mecanismos que transformaram os IHS das amostras HCH IEA em compostos de carga negativa aumentada, tenham atuado do mesmo modo sobre estes componentes. Esta hipótese é reforçada pelo conhecimento de que a prolactina pode sofrer os mesmos tipos de reação de conversão que os isohormônios<sup>(34,35)</sup>, assim como outras proteínas conhecidas são passíveis de sofrerem uma desamidação<sup>(4,35)</sup>.

Em dez das doze amostras encontraram-se componentes com aproximadamente o dobro da MM do HCH monomérico, variando entre 41 800 e 53 400 d. Nas amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 8, foi denominado de N. Nas amostras 9 e 10, a banda M representa um composto que tem massa perto de 42 000 d. Os compostos M e N diferenciam-se pelos valores de  $\log R_m$ , fato que poderia ser atribuído também a modificações da carga molecular do componente M, como foi discutido no parágrafo anterior. Esta hipótese pode ser aceita quando se verifica que os valores de  $K_R$  dos compostos M e N são semelhantes. Para N, as variações de  $K_R$  foram 5,67 a 6,52;  $Y_0$  variou bastante, de 1,29 a 1,70. Por outro lado, M apresentou um valor de  $K_R$  de 5,70 com  $Y_0$  de 1,52 e 1,55. Valores do  $K_R$  em torno de 7<sup>(10)</sup> ou 6,2<sup>(38)</sup> são relatados para as formas dimericas de HCH. O fato que corrobora a hipótese de que estas formas sejam os dímeros do HCH, é que as respectivas retas convergem para a banda principal do HCH, interceptando-a em pontos correspondentes a 2,61 a 6,14% (N) e 1,22 e 1,84 % (M) de concentração de acrilamida, o que está de acordo com a descrição de HEDRICK & SMITH<sup>(28)</sup> para os isômeros de massa e com os resultados de CHEEVER & LEWIS<sup>(10)</sup>, que encontraram um ponto de convergência em torno de 6% de acrilamida.

Em quatro amostras - 2, 3, 5 e 6 - detectou-se o componente P, com aproximadamente três vezes o valor da MM do HCH monomérico. Seu  $K_R$  variou entre 6,63 e 7,78;  $Y_0$  entre 1,35 e 1,98 e a

MM de 54 900 a 72 300 d. CHEEVER & LEWIS, para o seu componente de 69 000 d, considerado o trîmero do HCH, obtiveram valor do  $K_R$  maior, em torno de 9, cuja reta de FERGUSON intercepta a do IH principal em torno de 6% de acrilamida. As retas de P interceptam as dos IHS principais a um nível de 1,83 a 6,2% de acrilamida. O componente P da amostra 1, identifica-se como tal pelos valores de  $\log R_m$  nos géis de 10 e 12% de acrilamida. O valor de seu parâmetro  $K_R$  e consequentemente o da MM, devem estar subestimados por erro na medida de  $R_m$  no gel de 14% em acrilamida.

Formas de HCH com massas maiores que a forma monomérica, têm sido encontradas tanto no plasma humano<sup>(8)</sup>, perfazendo de 14 a 39%<sup>(76,79)</sup> do HCH imunorreativo, como nos extratos hipofisários. LEWIS e cols.<sup>(38)</sup>, por exemplo, relatam que todas as preparações de HCH contêm cerca de 15% da forma dimérica do hormônio. Como não têm a sua estrutura química definida, estes compostos na literatura de língua inglesa por vezes são genericamente denominados de hormônios "big" ou "big-big". Estas formas poderiam representar moléculas agregadas do HCH monomérico<sup>(8,15,37,57,61,64,68)</sup> ou o hormônio ligado a outras proteínas<sup>(64)</sup>, peptídeos<sup>(76)</sup> ou ácidos ribonucleicos<sup>(57)</sup>, podendo ou não representar um precursor ou pró-hormônio, à semelhança do que ocorre com outros hormônios proteicos<sup>(76,79)</sup>. Os agregados podem formar: o dímero, com MMs entre 40 500 e 48 000 d<sup>(10,38,47,76)</sup>, o trîmero, de 69 000<sup>(10,22)</sup>, o tetrâmero, de aproximadamente 89 000 d ou então moléculas altamente polimerizadas<sup>(22,68)</sup>.

A formação de agregados a partir do HCH monomérico, tem sido atribuída a uma série de fatores, todos encontrados em qualquer um dos processos de extração. Entre eles, citam-se a liofilização<sup>(10,26,34,36,61)</sup>, a diálise<sup>(34,61)</sup>, o congelamento<sup>(34)</sup>, a exposição do HCH a níveis de pH extremos<sup>(36)</sup>, ácidos ou mesmos neutros<sup>(22,34,37)</sup>, a força iônica alta<sup>(37,57)</sup>, a filtração cromatográfica através do gel de Sephadex<sup>(57,61)</sup>, a exposição a solventes orgânicos<sup>(36)</sup>, concentrações maiores que 5 mg/ml do hormônio<sup>(76)</sup> e a precipitação com acetona-etanol<sup>(10,34)</sup> ou com sulfato de amônio<sup>(37)</sup>. Em última análise, são fatores que levam à formação de hormônios com cargas negativas altas<sup>(34)</sup>, que geram um teor elevado em resíduos hidrofóbicos, alterando as moléculas hormonais de tal forma que elas tenderiam à agregação. Outra possibilidade reside na atração entre grupos proteicos de carga oposta<sup>(22)</sup>. Além destas, descrevem-se também formas diméricas e poliméricas existentes na própria hipófise, formadas pela interligação de duas moléculas de HCH por pontes dissulfeto<sup>(38)</sup> ou outro mecanismo<sup>(68,76,79)</sup>. Por outro lado, existem condições que favorecem a desagregação destas formas hipofisárias, plasmáticas ou de extratos hipofisários, como a exposição à uréia 8 M<sup>(76,79)</sup> guanidina - HCl<sup>(25)</sup>, o congelamento e descongelamento<sup>(76)</sup>, pH básico ou levemente ácido<sup>(22,25)</sup>. Esta desagregação, todavia, nem sempre é completa, podendo ser aumentada através da ação enzimática<sup>(76)</sup>. Tal observação levou à conclusão de que no tecido hipofisário podem existir formas diferentes de HCH associado; moléculas unidas entre si por ligações não-covalentes e moléculas unidas por ligações covalentes a outros peptídeos.

Os componentes F - F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> - de MM pequena (8 200 a 15 900 d), claramente são substâncias que aparecem no extrato hormonal bruto e que na purificação em gel de Sephadex eluem-se nas frações terminais do pico III, como se demonstra nos grupos I, III e IV.

Entre outros compostos presentes em algumas preparações de HCH, estudadas por técnicas diversas, podem-se citar proteínas séricas contaminantes<sup>(4,37,54,55)</sup>, carboidratos, ligados ou não a proteínas ou ácidos nucleicos<sup>(37)</sup>. Em geral, nas preparações clínicas são encontrados somente traços de outros hormônios hipofisários, detectados por ensaios biológicos<sup>(37,54,55,60)</sup>. Sem se conhecerem outras atividades e sem se terem padrões eletroforéticos de proteínas possivelmente contaminantes, a identificação dos compostos não é possível.

Tendo em mente que métodos eletroforéticos podem revelar a presença de até 70 componentes em extratos hipofisários brutos<sup>(19)</sup> e que os componentes secundários em todas as amostras estudadas se apresentaram como bandas de intensidade de coloração desprezível em relação ao hormônio de crescimento, pode-se considerar que a heterogeneidade de todas as amostras não é muito acentuada. Deve-se lembrar contudo, que no sistema de EGPA empregado, moléculas com MMs superiores a

260 000 d dificilmente penetrariam os géis de separação, principalmente os de maior concentração em acrilamida; além disso, substâncias não proteicas e proteínas que porventura tenham carga positiva no pH básico<sup>(8,9)</sup> da eletroforese, também não podem ser detectadas.

Em relação à pureza cabe uma ressalva, que se refere à presença e ao conteúdo dos assim chamados agregados do hormônio. A presença destes compostos (ou mesmo outros genericamente designados como "impurezas") tem sido relacionada à formação de anticorpos contra o HCH, resultando às vezes em bloqueio do seu efeito terapêutico no homem<sup>(9,36,37,44,68,69,71)</sup>. Por este motivo, muitos autores recomendam uma maior purificação do extrato destinado a uso clínico<sup>(9,16,44,60,62,68,72)</sup>, que inicialmente era evitada por acarretar perdas de material biológico ativo. Contudo, cada vez mais se reconhece que estas perdas podem ser compensadas pelo aumento da atividade somatotrófica específica (UI/mg), pela reconstituição melhor do pó liofilizado e pela maior precisão na formulação do produto<sup>(61,62,68)</sup>.

Desconhece-se qual seria a concentração mínima de agregados que poderia ser responsabilizada pelos seus efeitos adversos. Contudo, pode-se supor que mesmo traços de impurezas, administrados repetitivamente, possam induzir à formação de anticorpos. Quanto a este aspecto podemos comparar as amostras de HCH 1 (RABEN) com a amostra de HCH 5 (ROOS KABI). Em ambas reconheceram-se traços equivalentes dos mesmos compostos de MM elevada. Enquanto que à primeira delas se atribui um alto poder antigênico<sup>(62)</sup>, a segunda é geralmente relatada como não antígena<sup>(30)</sup>. Certos padrões de pureza deveriam ser estabelecidos para a melhor interpretação de reações clínicas indesejáveis atribuídas aos componentes contaminantes das preparações. Para tanto, estudos de extrações repetidas, com um controle mais rigoroso de todas as suas etapas, poderiam levar a um conhecimento melhor dos fatores que aparentemente levam a uma irreprodutibilidade dos métodos. Este conhecimento poderia estabelecer condições de produção de preparações de formulação mais uniforme, evitando conclusões errôneas sobre os efeitos clínicos de determinada preparação.

### 3 – Amostras dos Grupos II, III e IV

Como os três grupos de amostras são semelhantes, a discussão dos seus resultados será feita em conjunto. A avaliação da eficiência de purificação dos extratos hormonais, baseou-se na identificação de compostos de MMs diversas, em volumes diferentes do fracionamento cromatográfico.

#### 3.1 – Análise Estatística

A análise estatística dos resultados destas amostras, por serem determinações repetidas, permitiu que se avaliasse as metodologias adotadas de eletroforese e de cálculo. A reprodutibilidade da EGPA, evidencia-se pelos resultados do log Rm apresentados nas Tabelas XX, XXI e XXII do apêndice.

A análise estatística das retas de FERGUSON (Tabelas X, XII e XIV) mostrou que todos os coeficientes de explicação tiveram um valor muito próximo ao unitário, mostrando a adaptação dos pontos experimentais à reta calculada. A estatística  $F_1$  em todos os casos também teve um valor muito alto, indicando que a sua inclinação é altamente significativa a um nível de significância de 5%. Embora a validade da reta de FERGUSON fique comprovada por estes parâmetros, a estatística  $F_2$  indicou que o modelo da reta de regressão simples ( $y = ax + b$ ), nem sempre foi adequado para o correlacionamento do log Rm com a concentração de acrilamida. Este impasse provavelmente foi causado pela escolha da concentração de 14% de acrilamida, que é um valor muito próximo do limite máximo da condição de linearidade deste sistema de EGPA. A escolha do ponto médio como medida da distância de migração em uma banda difusa, talvez nem sempre tenha sido correta, contribuindo para esta discrepância.

Atualmente, a conduta adotada para relacionar os valores do log Rm à concentração dos géis emprega o valor da concentração total de polímeros nos géis (T%), que é definida pelos gramas de acrilamida e BIS-acrilamida em 100 g de solução polimerizante, mantendo fixa a concentração de

BIS-acrilamida (C%). Relata-se que esta correção chega a satisfazer melhor as condições de linearidade da reta de FERGUSON<sup>(24,59)</sup>. Esta possibilidade não foi testada neste estudo, que seguiu a proposta inicial de HEDRICK & SMITH<sup>(28)</sup> e CHEEVER & LEWIS<sup>(10)</sup>, de expressar apenas a concentração em acrilamida, mantendo um valor fixo de proporção acrilamida: BIS-acrilamida. Em gráfico não se notou um desvio importante dos pontos experimentais que pudessem indicar uma fuga da condição de linearidade. Contudo, esse achado não invalida os resultados que sempre foram de reprodutibilidade satisfatória e forneceram avaliações corretas do  $\bar{R}$ , da MM e inclusive da mobilidade eletroforética dos componentes proteicos.

### 3.2 – Cromatografia do HCH em Gel de Sephadex G 100

A leitura da absorbância das frações eluídas, em comprimento de onda específico para proteínas, mostrou um perfil semelhante para os três extratos (Figuras 29, 31 e 33), comparável aos realizados em condições experimentais parecidas<sup>(8,25,38,54,60,61,62)</sup>.

Excluiu-se o pico IV, que não contém proteínas e nem atividade somatotrófica<sup>(61)</sup>, mas apenas sais e ácidos nucleicos<sup>(54)</sup>. Esse pico normalmente se elui num volume perfeitamente separado do pico III.

O pico I sempre é o predominante, contendo em torno de 50% das proteínas, que têm massa molecular muito grande. A amostra 33, do grupo IV (Figura 32), representa uma fração do pico I e mostra que ele deve ser composto de material proteico com massas moleculares superiores a 260 000 d, que não penetram o gel de separação. Proteínas desta grandeza, como a forma tetramérica da SAB são identificáveis no sistema de EGPA empregado. Neste pico proteico encontram-se as formas altamente polimerizadas do HCH, para as quais se determinou massas moleculares que variam de 120 000 a 450 000 d<sup>(8,22,25)</sup>. Nele podem ser encontradas também as formas agregadas de menor MM, de 50 000 a 70 000 d<sup>(25)</sup>. É possível que estas formas, nos extratos, representem o HCH desnaturado pelos processos físico-químicos de extração, cujo poder de agregação é extremamente elevado<sup>(25,66)</sup>. Supõe-se também que contenha outros tipos de proteínas inertes, incluindo proteinases<sup>(62,68)</sup>. As proteínas deste pico em ensaios biológicos não apresentam atividade somatotrófica<sup>(25,61)</sup> e a dosagem do HCH por radioensaio revela quantidades desprezíveis.

O pico II, contendo de 10 a 15% das proteínas, é o mais variável, e em geral elui-se muito próximo do pico III.

O pico III sempre apresenta um perfil característico, com uma fase ascendente rápida enquanto que a descendente é mais arrastada. Em média contém de 35 a 40% das proteínas.

Os picos II e III serão discutidos a seguir, juntamente com os resultados obtidos pela análise eletroforética.

### 3.3 – Eluição dos Isohormônios

Os três isohormônios C<sub>2</sub>, D e E (grupos III e IV) eluem-se juntos e são indiferenciáveis quanto ao  $\bar{R}$  e à MM (Tabelas XI e XIII). Nos três grupos de extratos estudados, já são identificáveis a partir do pico II, em baixas concentrações e o volume no qual são eluídos em maior concentração parece ser definido entre 840 ~ 1 220 ml (grupo II), 990 e 1 290 ml (grupo III) e 900 e 1 320 ml (grupo IV). Em todos os extratos, a sua concentração máxima correspondeu às frações centrais, confirmando-se os resultados anteriores obtidos para um outro lote de HCH IEA e no qual a quantificação do hormônio por radioensaio mostrou a mesma distribuição<sup>(5)</sup>. A presença do HCH no pico II, evidenciada pela EGPA, tem sido relatada<sup>(25,54)</sup>; sua presença como componente principal do pico III é indiscutível, tendo sido amplamente comprovada por análises eletroforéticas, dosagens radioimunológicas ou ensaios biológicos<sup>(8,10,22,25,52,60,61,62,63)</sup>.

### 3.4 – Eluição dos Componentes Secundários

No grupo II, onde se esperava encontrar maior parte de componentes secundários, evidenciou-se que esses se restringiram a um número pequeno em comparação aos outros dois grupos. Este fato pode ter sido decorrência de dois fatores: em primeiro lugar, os extratos armazenados já haviam sido purificados anteriormente, com eliminação de grande parte dos contaminantes e, em segundo lugar, a dissolução deste material apresentou certa dificuldade e uma parte considerável do pó ficou precipitada, sem penetrar no gel de Sephadex. Por outro lado, os dois outros extratos, recém-preparados, mostraram que vários componentes de MM variável puderam ser identificados em todas as frações.

Pela análise das Figuras 29, 31 e 33, vê-se claramente que o pico III, cujo volume normalmente é reunido para uso clínico, contém uma série de componentes que quimicamente não se identificam ao HCH monomérico. Assim, os componentes I, J e K de MM próxima a 30 000 d, e o componente L de 37 000 d, apesar de terem maior concentração no pico II, praticamente acompanham o HCH em todo o seu volume de eluição. Isto é facilmente explicado pela semelhança entre as MMs destes componentes e a do hormônio, podendo-se prever que dificilmente se conseguirá separá-los por uma cromatografia em gel de Sephadex. Um composto semelhante a estes, de 30 000 d, foi descrito por SINGH e cols.<sup>(63)</sup>, sem que pudessem caracterizá-lo.

Os parâmetros da reta de FERGUSON e a MM do componente H, identificam-no ao IH A<sup>(64)</sup>, cuja provável identidade com a prolactina ainda não está estabelecida<sup>(47,64)</sup>.

As formas agregadas, diméricas ou triméricas, em geral são descritas como pertencentes ao pico II<sup>(8,10,22,25,54,61,68)</sup>. Neste estudo, porém, demonstra-se a presença do componente M, de 45 800 a 42 700 d, ocupando grande parte do volume do pico III (grupos III e IV), assim como os componentes O e P, com massas moleculares próximas de 66 000 d (grupo III). Estes componentes provavelmente representam respectivamente a forma dimérica e trimérica do hormônio. Certamente estes compostos de MM grande eluem-se também em frações anteriores àquelas onde foram identificadas. A sua caracterização nas frações do pico II certamente devia estar mascarada por algum motivo não reconhecido.

Entre os componentes de MM pequena, apenas o G (grupo IV), de 13 600 d, ocupa uma fração importante do pico III. Os componentes F, encontrados nos três extratos, caracteristicamente começam a ser eluídos a partir de cerca de 1 260 ml. As suas MMs variaram de extrato para extrato; de 7 000 a 14 000 d. Também estes componentes são descritos por SINGH e cols.<sup>(63)</sup>, desconhecendo-se a sua natureza.

Várias análises sobre a pureza de preparações hormonais, obtidas após processos de fracionamento, confirmaram a presença de formas inativas<sup>(5,62,63)</sup>. A fração central é tida como a mais homogênea<sup>(5,52)</sup>, o que se explicaria pela sua maior concentração em HCH. Contudo, de dois a cinco compostos foram encontrados nesta fração.

Ensaio biológicos no pico III do HCH ROOS, revelaram a presença de traços de FSH, LH, ACTH e TSH<sup>(60)</sup>. No pico II, encontraram-se também atividades de LH<sup>(54,60)</sup> e FSH<sup>(60)</sup>. A identidade dos compostos I, J ou K com LH ou FSH pela semelhança das MMs e das retas de FERGUSON, é uma hipótese que necessita de comprovação. A presença de compostos de MMs grandes no pico III (onde apenas compostos com MMs semelhantes ao HCH deveriam aparecer), pode ter sido consequência de aplicação excessiva de proteínas à coluna de gel de Sephadex, resultando em separações incompletas de substâncias de MM diferente, numa primeira purificação. O pico I e o pico II manifestam-se ainda após uma repurificação do pico III, fato descrito por outros autores<sup>(54,61,62)</sup>.

Este problema pode ser solucionado de várias maneiras: pela diminuição da quantidade de proteínas aplicada à coluna, pela mudança das características do fracionamento (coluna maior, velocidade de fluxo mais lenta, emprego de gel Sephadex com maior poder de discriminação) ou pela repurificação do pico III, ou II e III reunidos.

A ausência de compostos de MM grande nas frações do grupo II, não encontrou outras explicações senão a de que grande parte já estava eliminada pelas purificações anteriores ou a de que foram precipitadas com o pó insolúvel.

A presença de dímeros e trímeros no extrato hormonal pode estar associada à alta concentração do extrato, no momento da ser aplicado à coluna<sup>(76)</sup>.

A necessidade de se efetuar uma purificação cromatográfica dos extratos brutos hormonais parece ser essencial para o método de ROOS bem como para os outros métodos de preparação.

De qualquer forma a obtenção de uma preparação clínica completamente livre de contaminantes, especialmente aqueles de massa molecular semelhante ao HCH parece ser muito difícil, pois o compromisso necessário entre rendimento, pureza e/ou ausência de antigenicidade das preparações, precisa ser considerado.

Para o emprego do hormônio para fins de pesquisa, a fração central do pico III é a indicada, e conforme a finalidade, pode ser repurificada de diversas maneiras para eliminar proteínas estranhas.

Este trabalho sugere a melhor investigação dos aspectos metodológicos envolvidos na extração e purificação do HCH, a fim de que se possa ter um melhor controle sobre a obtenção de um hormônio uniforme quanto à composição em IHS e de sua MM, incluindo critérios de pureza que permitam que se criem condições de avaliação melhor do seu efeito clínico.

## V – CONCLUSÕES

1. O sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) analítica adotado, foi de reprodutibilidade satisfatória, fornecendo resultados confiáveis.

2. Os valores experimentais do  $K_R$  das proteínas padrão, relacionados às massas moleculares, adotaram uma distribuição não linear em valores de MM inferiores a 40 000 d. A zona de linearidade no limite inferior, pôde ser ampliada para proteínas com MM de 11 000 d, pelas transformações matemáticas porpostas por RODBARD & CHRAMBACH.

3. A heterogeneidade das preparações de HCH para uso clínico, obtidas pelos métodos de RABEN, STROUD, MILLS (FC 2) e ROOS KABI e o hormônio altamente purificado pelo método de WILHELMI (NIH), é definida pela presença dos isohormônios B, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, com predominância do primeiro. Uma causa provável desta heterogeneidade é a desamidação da molécula de HCH.

4. A heterogeneidade de três preparações recentes de HCH IEA para uso clínico, é definida pela presença dos IHS C<sub>2</sub>, D e E, enquanto que preparações de HCH IEA armazenadas por dois a três anos, após repurificação, apresentaram os IHS E e E<sub>1</sub>. A heterogeneidade dos IHS dos extratos de HCH IEA não tem causa definida mas, provavelmente, é devida a uma proteólise enzimática limitada.

5. Todos os IHS agrupados puderam ser caracterizados como isômeros de carga, apresentando massas moleculares semelhantes entre si e destacando-se pela diferença de mobilidade eletroforética (carga). A MM dos IHS variou entre 20 300 e 26 000 d; o  $\bar{R}$  dos IHS variou entre 1,81 a 1,97 nm, ambos confirmados pelos dados da literatura.

6. Todas as doze preparações de HCH obtidas por métodos diversos, apresentaram componentes secundários em número variável. Entre eles, os mais frequentes foram: componentes de MM pequena, de 7 000 a 15 000 d (F); com MM próxima a 30 000 d (I, J e K); os de cerca de 44 000 d, provavelmente dímeros (M e N) e os de cerca de 60 000 a 70 000 d, provavelmente trímeros (P).

7. Nos volumes eluídos do fracionamento cromatográfico de HCH IEA, os IAs são eluídos em baixa concentração em frações do pico II e no pico III a sua concentração relativa acompanha aproximadamente o perfil da leitura de absorvância específica para proteínas (280 nm em luz UV).

8. Vários componentes secundários acompanham o volume de eluição dos IAs, nos picos II e III, durante o fracionamento cromatográfico do extrato de HCH IEA em gel de Sephadex G 100, compreendendo compostos com MM perto de 30 000 d, aproximadamente 44 000 d – provavelmente o dímero – e de cerca de 66 000 d – provavelmente o trímero. Um composto com MM de aproximadamente 13 000 d (G) aparece na segunda metade do pico III e compostos de MM variável entre 7 000 a 15 000 d, caracteristicamente eluem-se na fase terminal do pico III, a partir de aproximadamente 1 260 ml. Os resultados demonstram a necessidade da realização da etapa de purificação do extrato de HCH.

9. Os resultados sugerem, mantido o equipamento em uso para a separação do HCH (coluna 5 x 100 cm), que se reduza a quantidade de extrato aplicado, para se tentar eliminar contaminantes indesejáveis na preparação final.



**IV – APÉNDICE**

Tabela XVI

Valores da Leitura Espectrofotométrica das 3 Soluções Padrão de Soro Albumina Bovina, em Triplicata  
(1 - 2 - 3) pelo Método de LOWRY, para a Construção da Curva-Padrão do Método

Nº	µg de proteína	SOL. SAB 1			SOL. SAB 2			SOL. SAB 3		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	5	0,084	0,115	0,064	0,062	0,054	0,063	0,063	0,050	0,052
2	10	0,120	0,098	0,129	0,098	0,119	0,098	0,118	0,107	0,106
3	15	0,187	0,202	0,144	0,159	0,162	0,163	0,163	0,165	0,151
4	20	0,224	0,232	0,202	0,177	0,220	0,212	0,212	0,228	0,216
5	25	0,300	0,276	0,284	0,272	0,288	0,264	0,281	0,276	0,268
6	30	0,348	0,360	0,359	0,326	0,324	0,320	0,325	0,329	0,325
7	35	0,380	0,375	...	0,427	0,368	0,394	0,381	0,381	0,371
8	40	0,456	0,446	0,435	0,398	0,415	0,442	0,421	0,418	0,440
9	45	0,504	0,510	0,505	0,452	0,467	0,466	0,464	0,474	0,472
10	50	0,511	0,559	0,526	0,558	0,573	0,550	0,490	0,517	0,511
11	55	0,608	0,580	0,595	0,537	0,540	...	0,565	0,580	0,572
12	60	0,648	0,654	0,654	0,586	0,629	0,619	0,618	0,604	0,643
13	70	0,722	0,668	0,738	0,728	0,692	0,705	0,678	0,698	0,718
14	80	0,762	0,832	0,812	0,728	0,795	0,788	0,750	0,785	0,790

Tabela XVII

Leituras Espectrofotométricas dos Padrões de SAB, Utilizadas para o Estabelecimento da Curva-Padrão do Método de LOWRY

Nº	µg de proteína	N	$\bar{A}_{750} \pm \text{d.p.}$
1	5	9	0,067 0,020
2	10	9	0,110 0,012
3	15	9	0,166 0,018
4	20	9	0,214 0,017
5	25	9	0,279 0,011
6	30	9	0,335 0,016
7	35	8	0,385 0,019
8	40	9	0,430 0,018
9	45	9	0,479 0,021
10	50	9	0,533 0,028
11	55	8	0,572 0,025
12	60	9	0,628 0,024

N = número de leituras a cada nível de proteína

$\bar{A}_{750}$  = média das leituras espectrofotométricas

Tabela XVIII

Análise de Variância da Reta de Regressão para Quantificação Proteica pelo Método de LOWRY

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	$F_c$
REGRESSÃO	1	0,49213	0,49213	11,945
RESÍDUO	11	0,00047	0,00004	...
TOTAL	12	0,49260	...	...

$$F_{(1, 11, 1\%)} = 9,65$$

$$R^2 = 0,99898$$

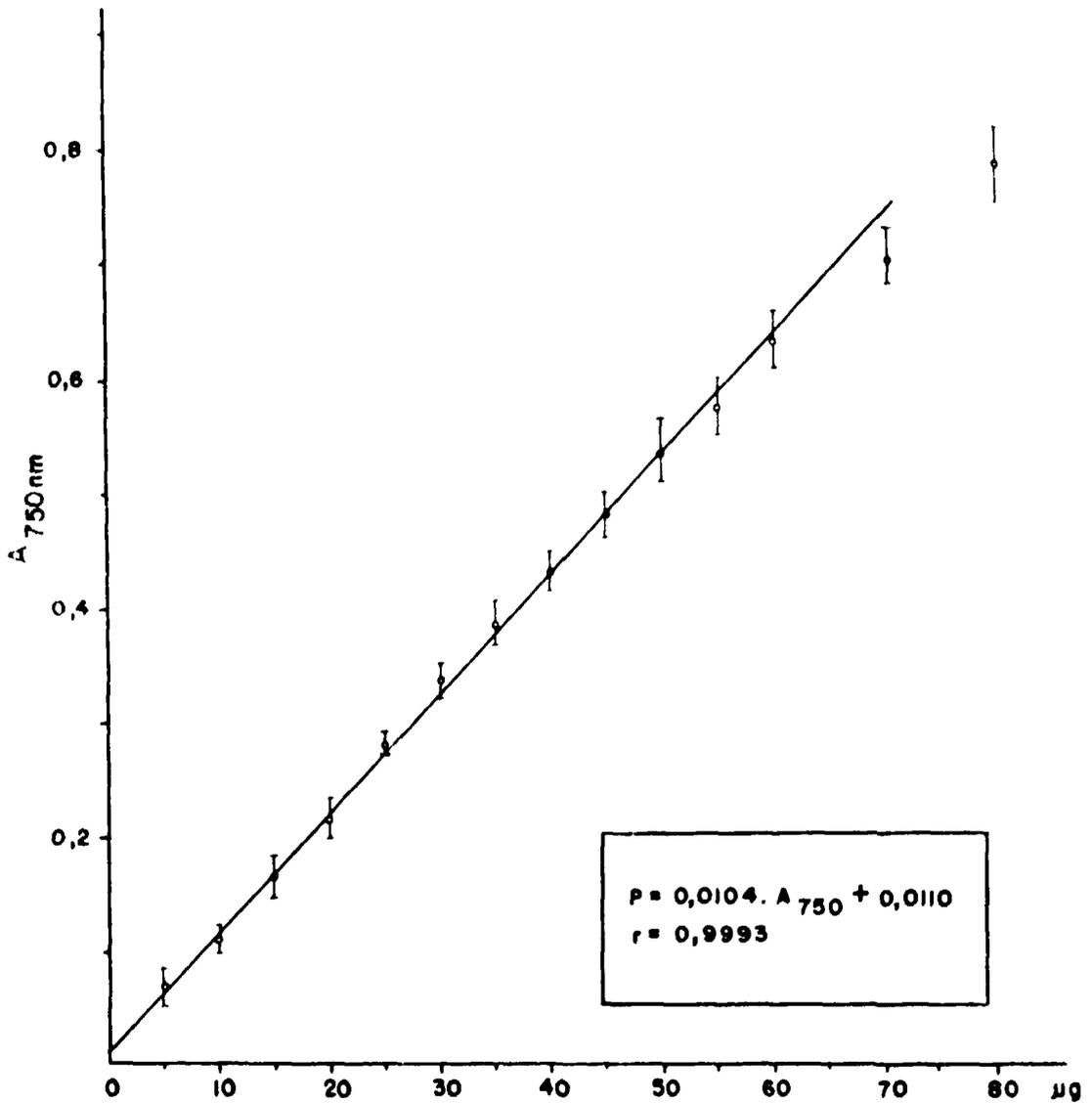


Figura 35 - CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO PROTEICA PELO MÉTODO DE LOWRY. O gráfico em escala linear, mostra a distribuição dos valores médios e desvios-padrão das leituras da absorvância ( $A_{750}$ ) das doze amostras de padrão de BSA mostradas na Tabela XVII. Incluíram-se no gráfico as duas amostras de 70 e 80  $\mu g$  de BSA, demonstrando que não se enquadram na zona de linearidade. A reta média ajusta-se perfeitamente aos valores experimentais ( $P = \mu g$  de proteína).

Tabela XIX

Padrões Proteicos: Medidas de log Rm e Parâmetros das Retas de Ferguson

Nº	RETA	log Rm				N	Reta de Ferguson		
		Concentração de Acrilamida					-K <sub>R</sub>	log Y <sub>0</sub>	r
		7%	10%	12%	14%				
1	I	176,86	172,53	...	166,48	3	1,48	187,30	0,9999
	II	181,92	176,20	172,31	172,45	4	1,44	191,12	0,9532
	III	195,70	189,47	190,50	183,61	4	1,54	206,34	0,9260
1	I	176,85	171,22	164,32	166,46	4	1,69	187,86	0,9063
	II	183,55	177,02	172,58	170,87	4	1,87	196,11	0,9869
	III	197,27	191,40	190,58	185,71	4	1,55	207,53	0,9781
2	I	157,89	149,45	...	137,23	3	2,96	178,75	0,9997
	II	178,76	172,86	169,52	160,01	4	2,54	197,64	0,9685
	III	190,68	184,86	181,28	172,28	4	2,51	209,28	0,9731
	IV	...	193,43	189,15	181,30	3	3,03	224,35	0,9859
3	I	197,31	188,17	184,60	176,26	4	2,90	217,71	0,9915
	II	198,54	192,55	189,20	183,52	4	2,09	213,46	0,9949
	III	186,90	177,54	173,02	166,50	4	2,86	206,79	0,9982
3	I	197,31	188,06	184,51	176,07	4	2,92	217,87	0,9912
	II	197,98	192,41	189,20	...	3	1,76	210,25	0,9992
	III	188,96	177,48	...	167,16	3	3,09	209,75	0,9936
4	I	133,21	127,52	119,84	116,15	4	2,54	151,46	0,9894
	II	153,62	146,01	140,76	135,79	4	2,55	171,50	1,0000
	III	163,71	155,61	149,94	146,25	4	2,54	131,16	0,9968
4	I	131,08	120,16	116,95	109,69	4	2,95	151,21	0,9915
	II	152,78	142,35	137,77	131,22	4	3,03	173,56	0,9973
	III	162,93	152,88	148,41	143,93	4	2,70	181,12	0,9937
5	I	136,00	126,09	123,59	114,71	4	2,88	156,15	0,9851
6	I	168,88	155,41	146,38	...	3	4,50	200,38	1,0000
	II	163,09	146,25	...	123,82	3	5,61	202,36	1,0000
6	I	168,56	155,41	146,15	...	3	4,48	199,38	0,9999
	II	163,15	147,50	...	125,96	3	5,32	200,47	1,0000
7	I	...	165,12	155,93	146,08	3	4,76	212,83	0,9998
	II		160,90	149,56	138,50	3	5,60	216,85	1,0000

continua...

continuação

N <sup>o</sup>	RETA	log R <sub>m</sub>				N	Reta de Ferguson		
		Concentração de Acrilamida					-K <sub>R</sub>	log Y <sub>0</sub>	r
		7%	10%	12%	14%				
8	I	182,62	173,32	163,36	153,71	4	5,13	225,18	0,9996
	II	186,00	169,90	159,89	149,29	4	5,23	222,48	0,9999
	III	182,82	165,82	155,67	144,94	4	5,39	220,30	0,9997
	IV	178,83	154,50	...	124,99	3	7,67	232,03	0,9996
8	I	190,82	173,37	163,42	...	3	5,51	229,10	0,9991
	II	187,04	169,90	159,36	...	3	5,55	225,75	0,9998
	III	182,90	165,76	155,35	...	3	5,53	221,42	0,9997
	IV	181,08	154,69	...	124,72	3	8,02	236,38	0,9990
9	I	185,18	162,26	149,28	135,59	4	7,06	233,97	0,9993
	II	171,21	138,37	118,62	101,64	4	10,13	241,60	0,9979
	III	158,74	105,27	87,39	62,64	4	13,51	248,75	0,9898
	IV	141,78	80,97	59,52	6,21	4	18,61	272,18	0,9910
9	I	185,88	162,88	149,09	136,75	4	7,04	234,37	0,9987
	II	174,82	144,11	123,46	102,23	4	10,36	247,51	1,0000
	III	159,96	109,04	87,29	57,51	4	14,42	258,41	0,9966
	IV	138,65	81,03	47,50	8,35	4	18,47	267,49	0,9997
9	I	193,60	173,48	156,11	143,93	4	7,22	244,42	0,9983
	II	181,09	145,18	121,48	99,12	4	11,74	262,90	0,9999
10	I	124,04	...	75,74	60,70	3	9,17	187,65	0,9987

N<sup>o</sup> = número do padrão proteico  
N = número de medidas de R<sub>m</sub> usados para o cálculo da reta de Ferguson

Tabela XX

Medidas de log Rm e Parâmetros das Retas de Ferguson de Cada Amostra de HCM do Grupo II, Agrupadas de Acordo com a sua Classificação

AMOSTRA	log Rm				N	Reta de Ferguson		
	Concentração de Acrilamida					-K <sub>R</sub>	log Yo	r
	7%	10%	12%	14%				
ISOHORMÔNIO E								
13	195,25	181,76	172,38	165,18	4	4,34	225,34	0,9988
14	194,61	181,83	170,56	164,92	4	4,37	224,99	0,9946
15	195,02	180,95	172,10	164,27	4	4,41	225,51	0,9992
16	195,12	181,19	172,10	164,31	4	4,43	225,79	0,9993
17	195,66	182,10	172,14	163,59	4	4,62	227,99	0,9997
18	195,29	181,31	172,63	164,74	4	4,38	225,56	0,9993
19	195,53	180,78	171,49	164,66	4	4,46	226,06	0,9971
20	194,56	181,21	172,56	164,87	4	4,26	224,10	0,9995
21	195,53	181,14	173,61	166,05	4	4,20	224,26	0,9978
COMPONENTE F <sub>1</sub>								
19	190,96	...	178,14	174,57	3	2,38	207,45	0,9974
20	...	186,41	179,25	176,49	3	2,48	210,48	0,9687
21	...	186,89	180,83	175,74	3	2,79	214,60	0,9987
COMPONENTE F <sub>2</sub>								
19	195,17	188,54	184,60	180,11	4	2,14	210,09	0,9998
20	196,91	190,52	...	181,19	3	2,25	212,79	0,9997
21	195,53	189,91	185,48	180,89	4	2,09	210,43	0,9987
COMPONENTE J								
16	183,37	170,25	...	150,27	3	4,74	216,97	0,9993
17	182,54	168,67	157,69	149,25	4	4,82	216,43	0,9989
18	182,69	167,31	158,33	149,60	4	4,73	215,30	0,9991
19	181,32	167,94	158,05	150,27	4	4,48	212,61	0,9993
20	183,96	169,90	160,78	151,60	4	4,62	216,23	1,0000
21	184,24	169,53	161,80	153,02	4	4,43	214,76	0,9988
COMPONENTE K								
16	177,71	159,13	...	142,35	3	5,01	211,45	0,9938
17	...	...	...	...	.	...	...	...
18	...	...	...	...	.	...	...	...
19	176,26	161,35	152,61	143,57	4	4,66	208,53	0,9995
20	177,32	159,35	154,95	...	3	4,59	208,28	0,9755

N = número de medidas de Rm usado no cálculo da reta de Ferguson

Tabela XXI

Medidas de log Rm e Parâmetros das Retas de Ferguson de Todas as Amostras de HCH do Grupo III, Agrupadas de Acordo com a sua Classificação

AMOSTRA	log Rm				N	Reta de Ferguson		
	Concentração de Acrilamida					-K <sub>R</sub>	log Y <sub>0</sub>	r
	7%	10%	12%	14%				
ISOHORMÔNIO C <sub>2</sub>								
22	189,04	174,08	166,36	160,65	4	4,09	216,50	0,9925
23	188,27	174,47	167,18	161,29	4	3,88	214,48	0,9948
24	188,04	175,20	168,28	159,39	4	4,04	216,20	0,9992
25	183,61	175,43	166,81	159,54	4	4,18	217,54	0,9992
26	188,61	174,47	166,81	159,95	4	4,10	216,58	0,9971
27	188,17	175,09	166,81	160,36	4	4,01	215,72	0,9979
28	188,61	175,63	166,81	158,50	4	4,31	218,75	1,0000
29	188,80	175,05	166,95	159,15	4	4,31	219,01	0,9987
30	188,10	174,91	166,23	160,05	4	4,06	215,97	0,9973
31	187,94	174,54	167,12	...	3	3,98	214,72	0,9996
ISOHORMÔNIO D								
22	181,54	176,96	168,36	163,49	4	4,08	218,97	0,9910
23	181,21	176,73	169,90	163,51	4	3,96	217,86	0,9943
24	181,51	178,04	170,84	162,55	4	3,97	218,13	0,9997
25	181,54	177,82	169,56	161,62	4	4,33	221,57	0,9997
26	180,72	177,47	169,56	163,09	4	3,97	217,93	0,9977
27	180,93	177,47	169,56	163,41	4	3,96	217,96	0,9967
28	180,93	178,15	169,56	163,09	4	4,02	218,68	0,9983
29	191,69	177,82	169,58	162,55	4	4,18	220,40	0,9981
30	191,46	178,46	169,90	162,90	4	4,11	219,89	0,9989
31	190,02	178,46	168,73	161,92	4	4,08	218,69	0,9984
ISOHORMÔNIO E								
22	193,81	179,13	170,52	166,53	4	3,99	220,40	0,9866
23	193,58	179,91	171,83	166,99	4	3,86	219,61	0,9922
24	193,71	181,21	172,66	165,50	4	4,06	221,92	0,9994
25	194,30	180,62	172,16	164,16	4	4,23	223,44	0,9988
26	193,76	180,05	171,52	165,36	4	4,11	221,80	0,9966
27	193,53	180,27	171,52	166,26	4	3,97	220,57	0,9947
28	193,53	180,32	171,52	165,36	4	4,08	221,55	0,9972
29	193,97	179,71	171,58	164,47	4	4,23	222,91	0,9977
COMPONENTE F <sub>1</sub>								
29	192,47	183,11	176,91	172,15	4	2,93	212,69	0,9983
30	193,43	184,23	177,54	173,55	4	2,90	213,36	0,9960
31	193,82	183,76	177,89	173,22	4	2,97	214,05	0,9969
32	193,92	183,32	177,30	...	3	2,33	208,90	0,9713

continua...

continuação

AMOSTRA	log Rm				N	Reta de Ferguson		
	Concentração de Acrilamida					-K <sub>R</sub>	log %o	r
	7%	10%	12%	14%				
COMPONENTE F <sub>2</sub>								
28	...	...	...	178,58	1	...	...	...
29	197,98	187,83	182,85	175,39	4	3,09	219,42	0,9985
30	198,18	188,74	182,10	176,08	4	3,17	220,37	0,9999
31	197,85	188,53	181,47	175,40	4	3,23	220,55	0,9997
32	198,35	188,34	181,77	175,23	4	3,30	221,43	1,0000
COMPONENTE F <sub>3</sub>								
29	198,82	189,98	184,03	177,82	4	2,99	219,86	0,9999
30	...	...	...	...	.	...	...	...
31	199,34	189,73	182,68	...	3	3,32	222,69	0,9997
32	...	188,62	184,51	180,39	3	2,06	209,20	1,0000
COMPONENTE I								
23	186,50	170,85	161,18	153,37	4	4,77	219,25	0,9980
24	186,38	169,90	162,67	154,32	4	4,54	217,13	0,9955
25	186,35	170,54	160,74	152,28	4	4,89	220,09	0,9988
26	185,92	170,22	162,31	151,71	4	4,82	219,35	0,9987
27	186,53	170,22	161,51	154,32	4	4,63	217,87	0,9955
28	186,38	170,22	162,31	153,49	4	4,67	218,28	0,9976
29	187,00	170,22	161,61	154,07	4	4,72	218,93	0,9955
30	186,63	170,87	162,64	153,73	4	4,68	218,74	0,9984
31	187,07	169,57	161,59	152,22	4	4,93	220,65	0,9967
32	...	169,90	161,93	154,03	3	3,97	209,56	1,0000
COMPONENTE J								
23	...	168,92	159,12	148,97	3	4,99	218,85	1,0000
24	183,35	169,90	160,61	151,69	4	4,53	215,11	1,0000
25	183,52	170,24	158,55	148,58	4	5,04	219,40	0,9985
26	183,54	169,90	157,79	146,65	4	5,30	221,48	0,9979
27	183,68	169,90	158,25	148,88	4	5,03	219,25	0,9989
28	183,54	169,90	158,56	148,42	4	5,05	219,41	0,9990
29	183,86	170,22	158,56	148,67	4	5,07	219,87	0,9988
30	184,07	169,90	158,50	148,30	4	5,14	220,48	0,9993
31	183,38	169,57	157,59	148,94	4	5,00	218,64	0,9984
32	184,14	169,90	157,81	147,28	4	5,31	221,86	0,9988

continua. . .

continuação

AMOSTRA	log Rm				N	Reta de Ferguson		
	Concentração de Acrilamida					K <sub>R</sub>	log Y <sub>0</sub>	r
	7%	10%	12%	14%				
COMPONENTE M								
24	178,87	162,31	...	136,10	3	6,13	222,48	0,9989
25	179,45	161,91	150,17	135,56	4	6,21	223,52	0,9985
26	179,45	161,56	149,25	136,98	4	6,07	220,06	1,0000
27	179,24	161,56	148,48	136,84	4	6,09	222,03	0,9998
28	179,45	161,37	148,48	137,41	4	6,05	221,69	0,9997
29	179,53	...	149,67	138,23	3	5,91	220,86	1,0000
30	179,38	...	147,71	...	2	6,33	233,72	...
31	178,81	...	150,02	...	2	5,76	219,12	...
32	178,25	...	151,28	140,68	3	5,37	215,83	1,0000
COMPONENTE O								
23	...	...	141,09	...	1	...	...	...
24	...	155,48	...	...	1	...	...	...
25	...	154,65	140,94	126,70	3	6,99	224,61	0,9999
26	...	155,28	140,12	126,29	3	7,25	227,53	0,9997
27	177,36	154,31	140,12	124,35	4	7,53	230,03	0,9999
28	177,16	154,26	140,12	126,29	4	7,27	227,60	0,9997
COMPONENTE P								
23	166,81	147,17	...	...	2	6,55	212,64	...
24	168,43	148,48	...	...	2	6,65	214,98	...
25	167,88	147,13	131,41	115,82	4	7,45	220,62	0,9994
26	168,95	146,78	131,41	116,15	4	7,55	221,96	1,0000
27	168,94	147,94	132,05	...	3	7,35	220,68	0,9994
28	...	...	131,40	116,15	2	7,63	222,90	...

N = número de medidas de Rm usadas no cálculo da reta de FERGUSON.

Tabela XXII

Medidas de log Rm e Parâmetros das Retas de Ferguson das Amostras de HCH do Grupo IV, Agrupadas de Acordo com sua Classificação

AMOSTRA	log Rm				N	Reta de Ferguson		
	Concentração de Acrilamida					$-K_R$	log $Y_0$	r
	7%	10%	12%	14%				
ISOHORMÔNIO C <sub>2</sub>								
34	189,82	175,88	168,03	161,38	4	4,08	217,67	0,9971
35	188,96	175,75	167,66	162,13	4	3,89	215,36	0,9954
36	188,24	175,73	167,05	160,83	4	3,97	215,64	0,9980
37	188,52	175,29	167,05	161,19	4	3,95	215,51	0,9964
38	187,42	175,18	166,97	160,35	4	3,90	214,42	0,9990
39	188,04	175,10	167,21	158,81	4	4,16	217,03	0,9999
40	189,37	175,11	167,85	160,55	4	4,11	217,37	0,9973
41	188,44	174,60	166,95	159,04	4	4,19	217,28	0,9989
42	188,66	174,16	166,92	159,64	4	4,14	216,80	0,9968
43	188,66	175,11	168,26	161,11	4	3,92	215,43	0,9975
ISOHORMÔNIO D								
34	192,80	178,67	170,79	163,64	4	4,18	221,36	0,9978
35	191,60	178,61	170,84	164,39	4	3,91	218,41	0,9979
36	191,20	178,73	169,76	162,99	4	4,08	219,53	0,9988
37	191,14	178,25	170,05	164,26	4	3,89	217,74	0,9967
38	191,04	178,17	166,97	163,38	4	3,98	218,47	0,9984
39	191,21	177,76	171,33	162,04	4	4,16	217,03	0,9999
40	192,07	178,20	170,80	163,86	4	4,03	219,58	0,9973
41	190,99	177,68	169,44	162,52	4	4,09	219,16	0,9985
42	191,59	177,85	169,80	162,49	4	4,17	220,24	0,9986
43	191,48	178,81	171,06	164,27	4	3,91	218,38	0,9988

continua...

continuação

AMOSTRA	log Rm					Reta de Ferguson			
	Concentração de Acrilamida					N	-K <sub>R</sub>	log Y <sub>0</sub>	r
	7%	10%	12%	14%					
ISOHORMÔNIO E									
34	195,46	182,04	173,34	166,82	4	4,14	223,89	0,9978	
35	194,28	181,30	173,04	166,55	4	4,00	221,77	0,9981	
36	193,98	180,98	172,30	166,60	4	3,98	221,20	0,9963	
37	194,21	181,02	172,85	167,39	4	3,89	220,65	0,9953	
38	194,32	181,51	172,77	166,60	4	4,02	221,97	0,9976	
39	194,45	180,77	174,86	165,63	4	4,03	222,29	0,9971	
40	194,17	181,07	174,10	166,66	4	3,91	221,06	0,9986	
41	193,99	180,56	172,91	165,74	4	4,04	221,74	0,9985	
42	194,13	180,60	173,38	166,23	4	3,98	221,37	0,9980	
43	193,99	181,39	173,98	167,21	4	3,84	220,37	0,9987	
COMPONENTE F <sub>1</sub>									
42	192,67	184,33	177,72	173,22	4	2,83	212,38	0,9982	
43	192,75	185,29	178,78	174,11	4	2,71	211,85	0,9984	
COMPONENTE F <sub>3</sub>									
42	198,25	191,06	180,97	179,49	4	2,57	217,70	0,9966	
43	198,61	192,02	184,89	180,59	4	2,65	217,47	0,9951	
COMPONENTE G									
37	...	157,28	150,22	145,26	3	3,01	186,98	0,9950	
38	...	155,66	151,96	146,19	3	2,37	179,68	0,9921	
39	166,02	156,45	151,15	146,19	4	2,84	185,44	0,9980	
40	166,63	157,18	150,89	145,15	4	3,08	188,08	0,9998	
41	165,95	156,15	149,98	145,35	4	2,97	186,33	0,9974	
42	167,78	155,11	149,64	144,27	4	3,35	190,20	0,9923	
43	165,87	156,41	150,43	142,25	4	3,33	189,49	0,9978	
COMPONENTE H									
35	...	149,42	140,74	133,66	3	3,94	188,55	0,9983	
36	...	150,38	140,75	133,42	3	4,24	192,40	0,9970	

continua...

continuação

AMOSTRA	log R <sub>n</sub>				N	Reta de Ferguson		
	Concentração de Acrilamida					-K <sub>R</sub>	log Y <sub>0</sub>	r
	7%	10%	12%	14%				
COMPONENTE I								
34	...	170,84	161,63	153,46	3	4,35	214,12	0,9994
35	...	169,38	160,69	153,11	3	4,07	209,87	0,9992
36	...	169,75	160,72	152,01	3	4,44	214,05	1,0000
37	...	169,76	160,77	153,04	3	4,18	211,35	0,9991
38	184,23	169,20	161,70	151,98	4	4,60	216,21	0,9984
39	184,26	169,78	162,72	150,53	4	4,70	217,30	0,9961
40	184,33	170,11	161,46	151,58	4	4,65	216,85	0,9998
41	183,57	169,74	160,86	153,93	4	4,28	212,98	0,9982
42	184,24	169,56	159,34	150,09	4	4,90	218,49	0,9999
43	184,26	170,83	161,80	149,85	4	4,85	218,86	0,9975
COMPONENTE K								
34	...	163,59	154,13	143,33	3	5,07	214,46	0,9993
35	...	162,62	152,43	142,94	3	4,92	211,70	0,9998
36	...	161,98	150,67	143,66	3	4,58	207,06	0,9909
COMPONENTE L								
37	...	...	139,34	128,90	2	5,22	201,98	...
38	162,66	...	137,35	128,24	3	4,95	197,15	0,9997
39	...	147,81	135,09	123,44	3	6,09	208,56	0,9997
40	...	150,97	142,22	129,18	3	5,45	206,16	0,9936
41	...	149,32	138,68	125,16	3	6,04	210,20	0,9976
COMPONENTE M								
34	...	161,98	152,46	140,92	3	5,27	214,97	0,9985
35	...	160,95	150,65	137,82	3	5,78	219,20	0,9980
36	...	160,24	150,44	140,48	3	4,94	209,67	1,0000
37	179,28	160,93	150,22	139,82	4	5,64	218,17	0,9991
38	179,47	160,45	149,67	140,21	4	5,63	217,96	0,9977
39	177,76	...	151,15	135,58	3	5,89	219,62	0,9957
40	180,18	160,88	150,88	137,89	4	5,97	221,59	0,9989
41	178,71	159,47	149,02	137,57	4	5,85	219,04	0,9991
42	179,31	160,01	149,64	137,35	4	5,94	220,74	0,9992
43	178,33	161,25	150,43	136,31	4	5,93	220,33	0,9985

N = número de medidas de R<sub>m</sub> usado para o cálculo da reta de FERGUSON.

## ABSTRACT

Twelve human growth hormone (hGH) preparations were studied on analytical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) with acrylamide concentrations of 7, 10, 12 and 14%. The purpose was an evaluation of the degree of homogeneity of the extracts, the geometric mean radius ( $\bar{R}$ ) and the estimation of the molecular weight (MW) of the protein hormone.

A standard curve was used for ten proteins of known molecular weight, where the square root of the retardation coefficient ( $K_R$ ) was plotted against  $\bar{R}$ .

Five isohormones were identified and defined as charge isomers, based on their different relative free mobility and on their similar  $\bar{R}$  (1.81 – 1.97 nm) and MW (20 300 – 26 000 d) values. The heterogeneity of all preparations was due to the presence in general of three isohormones. In the HABEN, STROUD, MILLS (FC 2), WILHELM (INH) and ROOS (KABI) preparations, isohormones B, C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub>, probably formed by deamidation of the hGH molecule, were predominant. In recent hGH (IEA) preparations by the method of ROOS, the isohormones C<sub>2</sub>, D and E were identified while in an older one, isohormones E and E<sub>1</sub>, probably all derived from a limited enzymatic digestion, were detected.

From two to five minor components were found in all samples, with molecular weights ranging from 7 000 to 15 000 d around 30 000 d; 40 000 d (hGH dimers) and 66 000 d (hGH trimers).

Moreover the same type of analysis was carried out on several fractions from protein peaks II and III eluting from Sephadex G 100 purification of three hGH (IEA) extracts. The isohormones start to appear in peak II and their relative concentration is in agreement with the peak III profile read at 280 nm. Practically all secondary components were present in peak II and in most of peak III, showing a type of heterogeneity due to hGH polymeric forms and a relatively small presence of contaminants.

## VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. ANDREWS, P. Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. *Biochem. J. (Liverpool)*, 91:222-33, 1964.
2. ASSIS, L. M.; 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.*, 18:299-304, 1972.
3. BANKER, G. A. & COTMAN, C. W. Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis. *J. biol. Chem.*, 247:5856-61, 1972.
4. BARRETT, R. J.; FRÍSEN, H. H.; ASTWOOD, E. B. Characterization of pituitary and peptide hormones by electrophoresis in starch gel. *J. biol. Chem.*, 237:432-9, 1962.
5. BARTOLINI, P.; ASSIS, L. M.; SCHWARZ, I.; PIERONI, R. R. An accurate determination of human growth hormone content in different pituitary extracts, using a radioimmunoassay with polyacrylamide gel electrophoresis as a bound-free separation system. *Clinica chim. Acta*, 79:223-36, 1977.

(\*) As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IEA foram revistas e enquadradas na NB-66 da ABNT.

6. BAUMANN, G. & CHRAMBACH, A. Gram-preparative protein fractionation by isotachopheresis: isolation of human growth hormone isohormones. *Proc. natn Acad. Sci. U.S.A.*, 73:732-6, 1976.
7. BICKLE, T. A. & TRAUT, R. Differences in size and number of 80s and 70s ribosomal proteins by dodecyl-sulphate electrophoresis. *J. biol. Chem.*, 246:6828-34, 1971.
8. BIELER, E. V.; PITOUT, M. J.; STROUD, S. W.; ROOYEN, R. J.van. Conversion of monomeric human growth hormone into different molecular weight forms in vitro after injection into humans. *Hormone Res.*, 8:29-36, 1977.
9. CARNEIRO, A. C. C. *Extração, para uso clínico, do hormônio de crescimento humano. Purificação, avaliação da atividade biológica em ratas e terapêutica de nanicos hipofisários.* São Paulo. (Dissertação de mestrado).
10. CHEEVER, E. V. & LEWIS, U. J. Estimation of the molecular weights of the multiple components of growth hormone and prolactin. *Endocrinology*, 85:465-73, 1969.
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*, 93:848-57, 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. DRAPER, N. R. & SMITH, H. Fitting a straight line by least squares. In: DRAPER, N. R. & SMITH, H.; eds. *Applied regression analysis.* New York, N. Y., Wiley, 1966. p.1-43.
14. DUNKER, A. K. & RUECKERT, R. R. Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel. *J. biol. Chem.*, 244:5074-80, 1969.
15. ELLIS, G. J.; MARLER, E.; CHEN, H. C.; WILHELMI, A. E. Molecular weight of bovine, porcine, and human growth hormone by sedimentation equilibrium. *Fedn Proc.*, 25:348, 1966.
16. ELRICK, H.; YEARWOOD-DRAYTON, V.; ARAI, Y.; LEAVER, F.; MORRIS, H. G. Collection, processing and fractionation of human pituitary glands. *J. clin. Endocr. Metab.*, 23:694-703, 1963.
17. FELGENHAUER, K. Evaluation of molecular size by gel electrophoretic techniques. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 355:1281-90, 1974.
18. FERGUSON, K. A. Starch-gel electrophoresis – application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism*, 13:985-1002, 1964.
19. FERGUSON, K. A. & WALLACE, A. L. C. The characterization of pituitary hormones by starch gel electrophoresis. *Recent Prog. Horm. Res.*, 19:1-55, 1963.
20. FERGUSON, K. A. & WALLACE, A. L. C. Prolactin activity of human growth hormone. *Nature (London)*, 190:632-3, 1961.
21. FERGUSON, K. A. & WALLACE, A. L. C. Starch-gel electrophoresis of anterior pituitary hormones. *Nature (London)*, 190:629-30, 1961.
22. FØNSS-BECH, P. & SCHMIDT, K. D. Studies on human somatotropin. Preparation and some physico-chemical properties. *Int. J. Protein Res.*, 1:85-92, 1969.

23. GLICK, S. M.; ROTH, J.; YALOW, R. S. Immunoassay of human growth hormone in plasma. *Nature (London)*, 199:784-7, 1963.
24. GONENNE, A. & LEBOWITZ, J. Estimation of molecular weights of small proteins on polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 64:414-24, 1975.
25. GRÁF, L.; SZALONTAI, B.; BARÁT, E.; ZÁVODSZKY, P.; BORVENDÉG, J.; HERMANN, I.; CSEH, G. Studies on the multiplicity of polypeptide hormones. I. Isolation of human pituitary growth hormone and characterization of the aggregates. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 9:309-17, 1974.
26. HANSON, L. A.; ROOS, P.; RYMO, L. Heterogeneity of human growth hormone preparations by immuno-gel filtration and gel filtration electrophoresis. *Nature (London)*, 212:948-9, 1966.
27. HEARING, V. J.; KLINGLER, W. G.; EKEL, T. M.; MONTAGUE, P. M. Molecular weight estimation of triton X-100 solubilized proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 72:113-22, 1976.
28. HEDRICK, J. L. & SMITH, A. J. Size and charge isomers separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Archs. Biochem. Biophys.*, 126:155-64, 1968.
29. HUMMEL, B. C. W.; BROWN, G. M.; HWANG, P.; FRIESEN, H. G. Human and monkey prolactin and growth hormone: separation of polymorphic forms by isoelectric focusing. *Endocrinology*, 97:855-67, 1975.
30. ILLIG, R. Antibodies to human growth hormone. In: STUART MASON, A. ed. *Human growth hormone*. London, William Heinemann Medical Books, 1972. p. 144-57.
31. KAPLAN, S. L. & GRUMBACH, M. M. Electrophoretic and immunological characteristics of native and purified human growth hormone. *Nature (London)*, 196:336-8, 1962.
32. LEHNINGER, A. L. Proteins: behavior in solution. In: LEHNINGER, A. L. *Biochemistry.*, New York, N. Y., Worth, 1970. p. 129-46.
33. LEWIS, U. J. Enzymatic transformations of growth hormone and prolactin. *J. biol. Chem.*, 237:3141-5, 1962.
34. LEWIS, U. J. & CHEEVER, E. V. Evidence for two types of conversion reactions for prolactin and growth hormone. *J. biol. Chem.*, 240:247-52, 1965.
35. LEWIS, U. J.; CHEEVER, E. V.; HOPKINS, W. C. Kinetic study of the deamidation of growth hormone and prolactin. *Biochim. biophys. Acta*, 214:498-508, 1970.
36. LEWIS, U. J.; CHEEVER, E. V.; SEAVEY, B. K. Aggregate-free human growth hormone. I. Isolation by ultrafiltration. *Endocrinology*, 84:325-31, 1969.
37. LEWIS, U. J.; PARKER, D. C.; OKERLUND, M. D.; BOYAR, R. M.; LITTERIA, M.; VANDERLAAN, W. P. Aggregate-free human growth hormone. II. Physicochemical and biological properties. *Endocrinology*, 84:332-9, 1969.
38. LEWIS, U. J.; PETERSON, S. M.; BONEWLAD, L. F.; SEAVEY, B. K.; VANDERLAAN, W. P. An interchain disulfide dimer of human growth hormone. *J. biol. Chem.*, 252:3697-702, 1977.
39. LI, C. H. The chemistry of human pituitary growth hormone: 1956-1966. In: PECILE, A.

MÜLLER, E. E., eds. *Growth hormone: proceedings of the first international symposium. Milan, Italy Sep. 11-13, 1967.* Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, 1968. p. 3-28.

40. LI, C. H.; BEWLEY, T. A.; BLAKE, J.; HAYASHIDA, T. Human somatotropin: restoration of full biological activity by noncovalent interaction of a natural and a synthetic fragment of the hormone. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:1016-9, 1977.
41. LI, C. H.; LIU, W. K.; DIXON, J. S. Human pituitary growth hormone. VI. Modified procedure of isolation and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence. *Archs. Biochem. Biophys.*, (Suppl. 1):327-32, 1962.
42. 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.
43. MCGARRY, E. E. & BECK, J. C. Metabolic effects of human growth hormone: In: STUART MASON, A., ed. *Human growth hormone.* London, William Heinemann Medical Books, 1972. p.25-38.
44. MILLS, J. B.; ASHWORTH, B.; WILHELMI, A. E.; STOCKELL HARTREE, A. Improved method of the extraction and purification of human growth hormone. *J. clin. Endocr. Metab.* 29:1456-9, 1969.
45. NEVILLE JR., D. M. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. biol. Chem.*, 246:6328-34, 1971.
46. NIALL, H. D. Revised primary structure for human growth hormone. *Nature New Biol.*, 230:90-2, 1971.
47. NIALL, H. D.; HOGAN, M. L.; TREGEAR, G. W.; SEGRE, G. V.; HWANG, P.; FRIESEN, H. The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones. *Recent Prog. Horm. Res.*, 29:387-416, 1973.
48. OLIVER, D. & CHALKLEY, R. An improved photographic system for polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.*, 44:540-2, 1971.
49. ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:321-48, 1964.
50. PARLOW, A. F.; WILHELMI, A. E.; REICHERT JR., L. E. Further studies on the fractionation of human pituitary glands. *Endocrinology*, 77:1126-34, 1965.
51. PAUL, M. A. Molecular mass. *Nature (London)*, 229:142-3, 1971.
52. PECKHAM, W. D. The preparation of homogeneous monkey and human pituitary growth hormones. *J. biol. Chem.*, 242:190-6, 1967.
53. RABEN, M. S. Human growth hormone. *Recent Prog. Horm. Res.*, 15:71-114, 1959.
54. REISFELD, R. A.; HALLOWS, B. G.; WILLIAMS, D. E.; BRINK, N. G.; STEELMAN, S. L. Purification of human growth hormone on "Sephadex G-200". *Nature (London)*, 197:1206-7, 1963.
55. REISFELD, R. A.; LEWIS, U. J.; BRINK, N. G.; STEELMAN, S. L. Human growth hormone: preparation from acetone powder. *Endocrinology*, 71:559-63, 1962.

56. RESSLER, N. A systematic procedure for the determination of the heterogeneity and nature of multiple electrophoretic bands. *Analyt. Biochem.*, 51:589-610, 1973.
57. RHODE, M. & DÖRNER, G. Immunochemical studies on the heterogeneity of human growth hormone (HGH). Electrophoretical pattern and behavior in gel filtration of HGH in various pituitary extracts. *Acta endocr. (Kobenhaven)*, 60:101-11, 1969.
58. RIGHETTI, P. G. & CARAVAGGIO, T. Isoelectric points and molecular weights of proteins: a table. *J. Chromat.*, 127:1-28, 1976.
59. RODBARD, D. & CHRAMBACH, A. Estimation of molecular radius, free mobility and valence using polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 40:95-134, 1971.
60. ROOS, P.; FEVOLD, H. R.; GEMZELL, C. A. Preparation of human growth hormone by gel filtration. *Biochem. biophys. Acta*, 74:525-31, 1963.
61. SAXENA, B. B. & HENNEMAN, P. H. Isolation and properties of the electrophoretic components of human growth hormone by sephadex-gel filtration and preparative polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J. (Liverpool)*, 100:711-7, 1966.
62. SCHALEYER, M.; SCHRÖDER, K. E.; HINZ, A. Comparative investigations of different human growth hormone preparations. *Hormone Metabolic Res.*, 2:174-80, 1970.
63. SINGH, R. N. P.; SEAVEY, B. K.; RICE, V. P.; LINDSEY, T. T.; LEWIS, U. J. Modified forms of human growth hormone with increased biological activities. *Endocrinology*. 94:883-91, 1974.
64. SKYLER, J. S.; BAUMANN, G.; CHRAMBACH, A. A catalogue of isohormones of human growth hormone based on quantitative polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta endocr. (Kobenhaven)*, 85(suppl.):5-40, 1977.
65. SKYLER, J. S.; CHRAMBACH, A.; LI, C. H. Quantitative polyacrylamide gel electrophoresis and specific activities of human somatotropin and its derivatives. *Biochim. biophys. Acta*, 49:566-72, 1977.
66. STOCKELL HARTREE, A. Preparation and properties of human growth hormone. In: STUART MASON, A., ed. *Human growth hormone*. London, William Heinemann Medical Books, 1972. p. 1-24.
67. SOTOKLOSA, J. T. & LATZ, H. W. Molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulphate in just the sample solution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58:74-9, 1974.
68. STROUD, S. W.; HOOG, J. M. C.; BIELER, E. U. A simple method for the extraction and purification of human growth hormone and its assay by paper chromatography. *J. clin. Endocr. Metab.*, 37:860-6, 1973.
69. TRYGSTAD, O. & FOSS, I. The lipid-mobilizing effect of some pituitary gland preparations . IV. Subdivision of a human growth hormone preparation into a somatotrophic and an adipokinetic-hyperglycaemic agent. *Acta endocr. (Kobenhaven)*, 58:295-317, 1968.
70. TUNG, J. S. & KNIGHT, C. A. Relative importance of some factors affecting the electrophoretic migration of proteins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.*, 48:153-63, 1972.

71. VINCE, F. P. & TANNER, J. M. Treatment of dwarfism with HGH. In: STUART MASON, A., ed. *Human growth hormone*. London, William Heinemann Medical Books, 1972. p.158-83.
72. WALLACE, A. L. C. & FERGUSON, K. A. Preparation of human growth hormone. *J. Endocr.*, 23:285-90, 1961.
73. WASYL, A.; LUCHTER-WASYL, E., BIELANSKY JR., W. The estimation of polypeptide chain molecular weight by thin-layer gel filtration in urea and sodium dodecyl sulphate solution. *Biochim. biophys. Acta*, 285:279-86 1972.
74. WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.*, 244:4406-12, 1969.
75. WILHELMI, A. E. Fractionation of human pituitary glands. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39:1659-68, 1961.
76. WRIGHT, D. R.; GOODMAN, D. A.; TRIMBLE, K. D. Studies on "Big" growth hormone from human plasma and pituitary. *J. clin. Invest.*, 54:1064-73, 1974.
77. YADLEY, R. A. & CHRAMBACH, A. Isohormones of human growth hormone. II. Plasmin-catalyzed transformation and increase in prolactin biological activity. *Endocrinology*, 93:858-65, 1973.
78. YADLEY, R. A.; RODBARD, D.; CHRAMBACH, A. Isohormones of human growth hormone. III. Isolation by preparative polyacrylamide gel electrophoresis and characterization. *Endocrinology*, 93:866-73, 1973.
79. YALOW, R. S. Heterogeneity of peptide hormones. *Recent Prog. Horm. Res.*, 30:597-633, 1974.



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

7 1