

**PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO.
ISOLAMENTO DA VARIANTE 22k.
ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICA E RADIOIMUNOLÓGICA.**

MARIA APARECIDA PIRES CAMILLO

**Dissertação apresentada com o parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Tecnologia Nuclear.**

Orientador: Dr. José Roberto Rogero

**SÃO PAULO
1985**

Ao Cris
meu marido.

Às meus pais

ERNESTO e ARMELINA,
e à ROSI.

Ao Dr. JOSÉ ROBERTO ROGERO,

pela orientação, compreensão e apoio
que muito contribuíram para a minha
formação.

NOSSOS AGRADECIMENTOS

Aos Drs. CLÁUDIO RODRIGUES, Superintendente do IPEN-CNEN/SP; ROBERTO FÚLFARO, Diretor de Segurança Nuclear e LAÉRCIO ANTONIO VINHAS, Chefe do Departamento de Proteção Radiológica, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Dra. OLGA ZAZUCO HIGA pelo apoio, estímulo e valiosas sugestões na revisão global desta dissertação.

À Dra. EMIKO MURAHOTO pelo apoio e colaboração na realização do ensaio biológico.

À Profa. MARIA TERESA C.P. RIBELA pela colaboração na realização do radioimunoensaio.

Ao Dr. PAULO BARTOLINI, pelos ensinamentos durante a iniciação científica.

Ao Dr. ANTONIO SOARES DE GOUVEIA pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados e uso do computador.

Ao Prof. Dr. RUI RIBEIRO FRANCO pela revisão segura e criteriosa do texto.

Aos Drs. ROBERTO DE LÚCIA, NÉLIDA LÚCIA DEL MASTRO, ELSIE NEIVA DOMINGUES DA SILVA, RICARDO DE OLIVEIRA MARTINS, que dentro de nobre espírito de colaboração científica, contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

À Bibliotecária MERV ZAMUDIO IGAMI pela revisão das referências bibliográficas.

À Sra. WILMA GARCIA DE SOUZA LOURENÇO pela dedicação e eficiente trabalho de datilografia.

Ao Desenhista JOSÉ ANTONIO PEREIRA pela dedicação e eficiente trabalho.

Ao Sr. ARI PEREIRA JR. e Sra. SANDRA REGINA DAMATTO pela colaboração técnica.

A todos os colegas da Divisão de Radiobiologia pelo companheirismo e momentos agradáveis de convivência diária.

RESUMO

PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO. ISOLAMENTO DA VARIANTE 22 K. ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICA E RADIOIMUNOLÓGICA.

MARIA APARECIDA PIRES CAMILLO

O hormônio de crescimento humano purificado de extratos hipofisários geralmente não é uma única substância, mas uma mistura de diferentes proteínas denominadas variantes. Estas são, possivelmente, originadas por hidrólise enzimática, acetilação, dimerização, perda de amidas, diferenças na seqüência primária etc. Recentemente tem sido sugerido que cada variante possui um papel fisiológico distinto. A principal limitação para comprovar a possibilidade sugerida é a dificuldade de se obter quantidades ponderáveis de cada forma do hormônio, para os ensaios.

O presente trabalho descreve um método de extração de HCH, a partir de hipófises humanas congeladas, com alto rendimento: 8,7 mg de HCH por glândula processada. A preparação não apresenta variantes de massa pois se mostrou homogênea em SDS-EGPA 10%. O peso molecular calculado por este método foi 21.537 ± 196 daltons. Entre as variantes de carga a forma íntegra (HCH-22 K) constitui 63% da preparação (calculado por análise em EGPA 7%).

Por meio da técnica de isoeletrofocalização foi possível isolar a variante íntegra da preparação total de HCH. O pico principal, com pI 5,12, foi separado e submetido a uma cromatografia em Sephadex G-50 fino para isolá-lo das anfolinas e sacarose utilizadas na focalização.

Nos ensaios de caracterização da variante 22 K verificou-se que: possui fenilalanina como aminoácido NH_2 terminal; não apresenta grupos -SH livres; no espectro de absorção ultravioleta a absorção máxima ocorre em 277 nm; possui um coeficiente de extinção molar 14.888 e $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 6,92; possui identidade imunológica com a preparação total de HCH verificado por radioimunoensaio e possui atividade de no ensaio de aumento de peso corpóreo realizado em ratos hipofisectomizados.

ABSTRACT

PURIFICATION OF HUMAN GROWTH HORMONE. ISOLATION OF THE 22 K VARIANT. ASSAYS OF BIOLOGICAL AND RADIO - IMMUNOLOGICAL ACTIVITIES.

MARIA APARECIDA PIRES CAMILLO

Usually, isolated human growth hormone (hGH) appears not to be a single substance, but a mixture of different proteins originated by the action of hydrolytic enzymes, acetylation, dimerization, desamidation or also it might present different aminoacid sequences. Recently, several papers have presented the idea that possibly each of the hGH forms might be actually a distinct hormone, with a proper physiological role for each form. The main difficult to work in this field is to obtain, through a simple and reproducible technique, an homogeneous amount of each variant.

The present work describes an extracting method for hGH from frozen human pituitaries with high yield: 8,7 mg per processed gland. The preparation did not present mass variants as shown by homogeneity in a SDS-PAGE 10 % system. Molecular weight calculated by this method was 21.537 ± 196 daltons. Among the charge variants, the integral form (hGH-22K) performed 68% of the preparation (calculated by

PAGE 7% analysis).

Isoelectric focusing studies made it possible to isolate an integral variant of the total preparation of hGH. The main peak localized at PI 5,12 was pooled and chromatographed on a Sephadex G-50 column to remove the ampholines and sucrose. After liophylization the protein was analysed in polyacrylamide gel electrophoresis showing only one protein band that corresponds to the 22 K variant. The protein prepared by this method had phenylalanine as the amino terminal group; it did not present free -SH groups; maximum extinction in ultraviolet absorption spectrum was at 277 nm; it had a molar extinction coefficients of 14.888 and $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 6,92. The protein showed immunochemical identity with total hGH preparation and proved to be biologically active as shown by body weight increase of the hypophysectomized rats.

ABREVIATURAS

A	- Absorvância
ADN	- Ácido desoxiribonucleico
CADN	- Ácido desoxiribonucleico complementar
ARN	- Ácido ribonucleico
B	- Ligação específica
B₀	- Ligação específica máxima
CBB	- Coomassie Brilliant Blue
DTNB	- 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DNS-Cl	- Cloreto de 5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfonila
DNS-Arg	- DNS-Arginina
α-DNS-His	- α-DNS-Histidina
ξ-DNS-Lys	- ξ-DNS-Lisina
ECG	- Eletrocardiograma
EDTA	- Ácido dietiltetracético
EGPA	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
FSH	- Hormônio folículo estimulante
HC	- Hormônio de crescimento
HCH	- Hormônio de crescimento humano
HCH-22 K	- Hormônio de crescimento humano - variante 22 K
LH	- Hormônio luteotrófico
met-HCH	- Hormônio de crescimento "sintético"
PEG	- Polietilenoglicol
Phe	- Fenilalanina
PI	- Ponto isoelétrico
pit-HCH	- Hormônio de crescimento humano natural
P.M.	- Peso molecular
PRL	- Prolactina
RIE	- Radioimunoensaio
R_m	- Migração relativa
SAB	- Soro albumina bovina
SDS	- Sulfato de sódio
SDS-EGPA	- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

ÍNDICE

PÁGINA

I. INTRODUÇÃO

1. HISTÓRICO	1
2. HETEROGENEIDADE DAS PREPARAÇÕES	7
2.1 - Variantes de carga	10
2.2 - Variantes de massa	15
3. CONJETURAS SOBRE AS FUNÇÕES DAS VARIANTES	18

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO HCH	21
1.1 - Aspectos gerais	21
1.2 - Parte experimental	22
1.2.1 - Extração	22
1.2.2 - Purificação	26
1.2.3 - Dosagem proteica	26
2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	29
2.1 - Aspectos gerais	29
2.2 - Parte experimental	29
2.2.1 - EGPA 7%	29
2.2.2 - SDS-EGPA 10%	32
2.2.3 - Cálculos	33
3. ISOELETROFOCALIZAÇÃO	34
3.1 - Aspectos gerais	34
3.2 - Parte experimental	37
3.2.1 - Cromatografia em Sephadex G-50 fino. 40	
3.2.2 - Reação de biureto	41
4. IDENTIFICAÇÃO DO AMINOÁCIDO -NH ₂ TERMINAL	41
4.1 - Aspectos gerais	41
4.2 - Parte experimental	42

	PÁGINA
5. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS -SH	46
5.1 - Aspectos gerais	46
5.2 - Parte experimental	47
6. ESPECTRO DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA E COEFICIENTE DE EXTINÇÃO	47
6.1 - Aspectos gerais	47
6.2 - Parte experimental	49
7. PROVAS DE ATIVIDADE	49
7.1 - Radioimunoensaio	50
7.1.1 - Aspectos gerais	50
7.1.2 - Parte experimental	52
7.1.2.1 - <u>Marcação com ¹²⁵I</u>	52
7.1.2.2 - <u>Técnica do RIE</u>	54
7.1.2.3 - <u>Cálculos e análise estatística.</u>	57
7.2 - Ensaio biológico	58
7.2.1 - Aspectos gerais	58
7.2.2 - Parte experimental	59
7.2.3 Análise estatística	61
8. APARELHOS	61

III. RESULTADOS

1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO HCH	63
1.1 - Dosagem protéica	63
1.2 - Extração	66
1.3 - Purificação	66
1.4 - Cálculo de rendimento para o monômero de HCH	66
2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	68
2.1 - EGPA 7%	69
2.2 - SDS-EGPA 10%	71
3. ISOELETROFOCALIZAÇÃO	75
3.1 - Isolamento da variante 22 K	75
3.2 - Cromatografia em Sephadex G-50 fino	79
4. IDENTIFICAÇÃO DO AMINOÁCIDO -NH ₂ TERMINAL	79
5. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS -SH	82
6. ESPECTRO DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA E COEFICIENTE DE EXTINÇÃO	82

	PÁGINA
7. PROVAS DE ATIVIDADE	82
7.1 - Radioimunoensaio	82
7.2 - Ensaio biológico	93
8. EGPA 7%	95
IV. DISCUSSÃO	100
V. CONCLUSÕES	120
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

I. INTRODUÇÃO

1. HISTÓRICO

Desde o fim do século XIX, acreditava-se que a glândula pituitária era o centro regulatório do crescimento. Entretanto, isto sómente foi confirmado em 1944, por LI & EVANS, ao demonstrarem a ação do hormônio de crescimento (HC), isolado de um preparado homogêneo de glândulas bovinas, em ratos hipofisectomizados. No entanto, BENNETT (1950) e KNOBIL (1954) ao administrarem o HC bovino no homem e no macaco não observaram os efeitos esperados. Todos os trabalhos clássicos mencionados, estão citados na Revisão de LI, C.H. (1968)⁽⁵²⁾.

Surgiram várias hipóteses para explicar este fato, por exemplo, que o homem não possuía um hormônio regulador do crescimento; que a inatividade observada era devida a preparações impuras, ou ao desenvolvimento de resistência imunológica, ou ainda, considerava-se a possibilidade de existir uma diferença química entre os hormônios de espécies diferentes^(17,55,71). Esta última hipótese ficou comprovada em 1956, quando LI & PAPERKOFF⁽⁵¹⁾ isolaram o hormônio somatotrófico de hipófises humana e de macaco, e demonstraram a sua ação no homem e algumas diferenças físico-químicas com as demais moléculas.

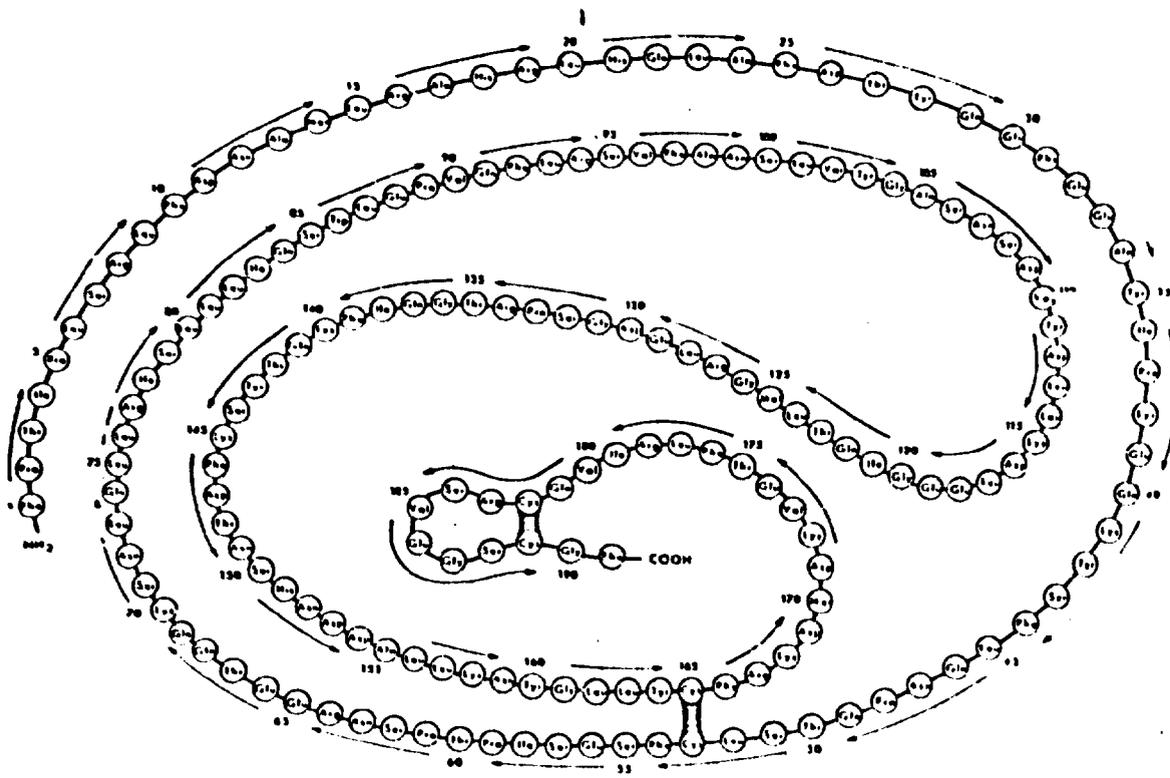


FIGURA 1 - Sequência de aminoácidos do hormônio de crescimento humano.

Atualmente a seqüência primária do HC de várias espécies é total ou parcialmente conhecida, citando-se como exemplos, o hormônio humano⁽⁵³⁾ (vide fig. 1), o bovino e o porcino⁽⁸³⁾. Quando comparamos estas seqüências verificamos que há grandes segmentos homólogos entre as proteínas de diferentes espécies, mas as porções distintas atribuem a cada uma delas propriedades físico-químicas próprias, por exemplo: ponto isoelétrico, número de pontes de enxofre, conformação da molécula etc.⁽⁸³⁾

A comprovação de que o HC de primatas era capaz de provocar efeitos metabólicos no homem, levantou a possibilidade de que ele poderia ser utilizado clinicamente, notadamente na terapia substitutiva para os casos de nanismo hipossomatotrófico. RABEN, em 1958⁽⁶⁹⁾, foi o primeiro a empregar o HCH em terapia, relatando uma aceleração na velocidade de crescimento estatural do paciente. Assim, há mais de 25 anos o HCH tem sido administrado a pacientes com deficiência deste hormônio.

Atualmente, sabe-se que o crescimento resulta de uma série de efeitos metabólicos, fisiológicos e anatômicos que estão resumidamente esquematizados na tabela 1.⁽⁸⁰⁾

Assim que ficou estabelecida a eficácia clínica do HCH os pesquisadores depararam-se com o problema de obtenção de hipófises humanas para as extrações. Em alguns locais, por exemplo, os Estados Unidos da América

TABELA 1 - AÇÕES DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

Metabólicas	<ul style="list-style-type: none">- Estímulo de transporte de aminoácidos.- Estímulo de síntese protéica em muitos tipos celulares.- Estímulo de síntese de ADN/ARN em muitos tipos de células.- Estímulo de síntese de poliaminas.- Estímulo de lipólise.- Inibe a ação da insulina no metabolismo da glicose.
Fisiológicas	<ul style="list-style-type: none">- Aumenta o fluxo sanguíneo nos rins, a taxa de filtração glomerular e a reabsorção tubular de PO_4.- Aumenta a taxa metabólica basal.- Estimula o crescimento ósseo.- Estimula a eritropoiese.- Expande o espaço para o fluido extracelular.
Anatômicas	<ul style="list-style-type: none">- Acelera o crescimento linear- Reduz a massa adiposa e aumenta a massa de sustentação do organismo (músculo, fígado, rins, coração, pâncreas, esqueleto e tecido conectivo).

ca^(94,71) e Grã-Bretanha⁽⁹⁰⁾ foram criados Bancos Nacionais para Coleta de Hipófises. Para se conseguir um suprimento adequado foi necessário montar um sistema de coleta complexo e de funcionamento perfeito. Mesmo assim, por mais eficiente que seja o sistema, a demanda tem sido sempre superior⁽²⁸⁾.

Em face das dificuldades expostas, durante a década de 1970 desenvolveram-se pesquisas que visavam encontrar um produto que pudesse substituir o HC extraído de hipófises humanas. As experiências realizadas neste sentido concentravam-se na busca de fragmentos sintéticos ativos ou a obtenção de produtos resultantes de digestão enzimática, principalmente do HC bovino. A sintese química integral foi e continua sendo inviável, pois o HCH é uma molécula muito grande (191 aa) para esta metodologia. Quanto a segunda possibilidade, apesar de se ter conseguido isolar fragmentos com atividade somatotrófica no homem⁽⁶³⁾, sua aplicação em clínica não foi possível por causa da elevada antigenicidade.

O advento da tecnologia do ADN-recombinante e o subsequente desenvolvimento neste campo, sugeriram que HCH poderia ser produzido comercialmente por esta técnica. O problema foi muito simplificado por ser o tecido hipofisário relativamente rico de ARN mensageiro para esta proteína; e ela não ser glicosilada. Assim, o mARN para o HCH foi isolado de pituitárias de adultos e

o cADN correspondente aos resíduos 24-191, foi produzido por técnicas enzimáticas. O fragmento de ADN correspondente aos resíduos 1-23, com o $-NH_2$ terminal adicional (metionina), foi produzido por síntese química; e enzimaticamente combinado com a porção correspondente ao $-COOH$ terminal. Este gene, com o código para o HCH biosintético (Met-HCH), foi inserido no genoma de *ESCHERICHIA COLI* K 12 e após o crescimento da bactéria em meio de cultura adequado, o hormônio humano é encontrado no citosol⁽²⁹⁾. O HCH pode ser isolado do lisado, após desintegração da bactéria, sendo purificado por métodos convencionais de separação bioquímica⁽⁶⁵⁾.

Provas físico-químicas, biológicas e toxicológicas parecem evidenciar a identidade das duas preparações, ou seja, do HC pituitário e do obtido por "engenharia genética", exceto pelo resíduo de Metionina na posição $-NH_2$ terminal presente no segundo⁽²³⁾.

Tem sido uma preocupação constante, por questões de segurança⁽²⁴⁾, que o grau de pureza destas preparações para uso clínico, seja o maior possível (perto de 100%). Pode-se estar na presença de contaminantes de origem bacteriana, do qual pouco se sabe sobre suas propriedades, concentração e principalmente quais as implicações que podem ocorrer.

Já existem relatos sobre os primeiros ensaios realizados no Japão, em humanos voluntários normais.

As respostas obtidas para o Met-HCH e o pit-HCH foram se melhantes nos diversos parâmetros analisados: E.C.G., con tagem sanguínea, nível de ácidos graxos livres e aumento de somatomedina A (61,92).

A produção em grande escala do HCH por bactérias em cultura significa um grande avanço para a terapia.

O Brasil, assim como muitos outros países, ainda não dispõe totalmente dessa tecnologia para a produ^{ção} do HCH em grande escala. Entre nós já existem investimentos e diversos grupos de pesquisa se dedicando à área. Por enquanto, o tratamento de pacientes hipossomatotróficos ainda é feito por hormônio extraído de pituitá^{rias} humanas.

2. HETEROGENEIDADE DAS PREPARAÇÕES DE HCH

O refinamento das técnicas de análise de proteínas e, principalmente, a introdução da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), permitiram verificar que as preparações de HCH apresentavam uma heterogeneidade quanto aos aspectos físicoquímicos (16,87,83).

Esta observação gerou muita discussão, pois, se alguns pesquisadores acreditavam tratar-se de arte^{fatos} e/ou contaminações resultantes dos processos de ex^{tração}; outros atribuíam a heterogeneidade a característi^{ca}.

cas da própria molécula⁽³¹⁾. Na realidade ambas as posições estavam corretas. No decorrer dos anos foi possível demonstrar a presença de outras proteínas em preparações de HCH, como enzimas proteolíticas⁽⁴⁰⁾ e outros hormônios pituitários^(59,96). Mas com o aprimoramento dos métodos de purificação, estes contaminantes foram eliminados, e no entanto, a heterogeneidade persistiu. Várias observações evidenciaram tratar-se de multicomponentes derivados de uma mesma molécula denominada HCH íntegro, ou nativo ou HCH-22K.

Diversas variantes foram caracterizadas a partir de diferentes fontes, por exemplo, extratos de diferentes origens⁽⁸⁸⁾, do meio de cultura de tecido hipofisário⁽⁹³⁾, de preparações de Met-HCH^(80,89) e diretamente do plasma de indivíduos normais e de acromegálicos⁽¹⁰⁾.

Neste ponto cabe uma ressalva: aos diversos componentes presentes em uma preparação de hormônio de crescimento, com atividade biológica semelhante, chamou-se inicialmente de "isohormônios". Atualmente este termo tende a ser substituído por "variantes", com exceção talvez do 20K, que poderia ainda ser designado como isohormônio. Esta alteração de nomenclatura decorre das recomendações da IUPAC-IUB "Commission on Biochemical Nomenclature" (CNB), de 1976⁽³⁷⁾; onde é sugerido que o termo "isoenzima ou isozima" seja reservado para múltiplas formas de enzimas surgidas por diferenças determinadas ge

neticamente em sua estrutura primária, e não para os derivados resultantes de modificações na mesma sequência primária.

As diferenças entre as variantes do HCH, atualmente, tem sido atribuídas a modificações:

a) Pós-ribossomal: como agregação, formação de dímeros por pontes dissulfeto, desamidação, alterações por enzimas proteolíticas etc.

b) Pré-ribossomal: que implicaria a origem da variante ou isohormônio 20 K.

Faz-se a identificação de cada variante, tomando-se por base, principalmente, a migração em EGPA e por características físico-químicas^(16,88). Para quase todas, foi demonstrado possuir atividade biológica, havendo inclusive, trabalhos que indicam que as formas mais ácidas possuem maior potência em promover o crescimento corporal⁽⁸⁵⁾.

Estes multicomponentes podem ser classificados em "variantes de carga" e em "variantes de massa". No primeiro grupo, a diferença está na carga molecular total do hormônio, e no segundo há heterogeneidade de tamanho.

2.1 - VARIANTES DE CARGA

2.1.1 - Formas Enzimaticamente Alteradas

Estas variantes foram isoladas de extratos pituitários crus ou de HCH grau clínico ou imunoquímico e se mostraram idênticas em tamanho molecular mas apresentaram um aumento progressivo na carga molecular total, ou seja, uma diminuição do ponto isoelétrico. As formas mais ácidas D e E são de particular interesse porque a bioatividade medida por ensaio lactogênico, ensaio da tibia em ratos e capacidade de aumentar os níveis plasmáticos de somatomedina, mostraram-se três a oito vezes maior que a forma íntegra ou 22K⁽¹⁰⁵⁾. No ensaio de aumento de peso em ratos hipofisectomizados, a forma mais ácida (E) foi apenas duas vezes mais potente que o 22K.

Podem ser produtos de uma ou mais clivagens. O ponto exato do rompimento da cadeia para se obter estes aumentos de atividade não são conhecidos, embora a procura de uma ou mais enzimas que pudessem produzir quebras similares às encontradas nas formas isoladas, seja sendo objeto da atenção de muitos pesquisadores^(32,56,60,73).

A região da molécula entre os resíduos 134 e 150 é muito sensível à ação enzimática. BAUMAN e NISSELEY (1979)⁽⁸⁾ mostraram que a plasmina converte B para D e E por clivagem proteolítica na alça maior. Alguns por

tos de clivagem com as formas obtidas estão esquematizados na figura 2⁽⁴⁷⁾.

SINGH et al. (1974)⁽³¹⁾ isolaram e caracterizaram por EGPA quatro variantes de carga de HCH a partir de extratos salinos de glândulas pituitárias. Estas formas denominadas α_1 , α_2 , α_3 , e β parecem ser similares em termos de mobilidade eletroforética, respectivamente, às formas B, C, D e F descritas por CHRAMBACH (1973)⁽¹⁶⁾ e SKYLER (1977)⁽³⁸⁾; embora esta correlação não tenha sido estabelecida formalmente.

A taxa de depuração renal dos hormônios enzimaticamente modificados é significativamente menor do que para a forma 22K; fato este que poderia explicar, em parte, o aumento de atividade observada⁽⁹⁾.

2.1.2 - HCH-24K

Pela análise em SDS-EGPA foi identificada uma variante do HCH na posição de 24.000 d^(41,86). Esta variante parece ser produto de uma alteração enzimática específica, pós-ribossomal⁽¹⁵⁾. Mostrou-se idêntica ao HCH-22K, exceto por um rompimento na cadeia peptídica entre os resíduos 139-140, originando uma forma de duas cadeias. Não há perda de aminoácidos. Esta clivagem gera um aumento no raio molecular, levando a um acréscimo aparente no peso molecular.

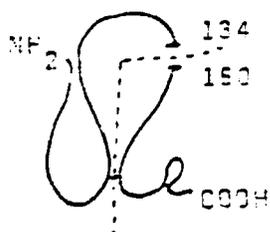
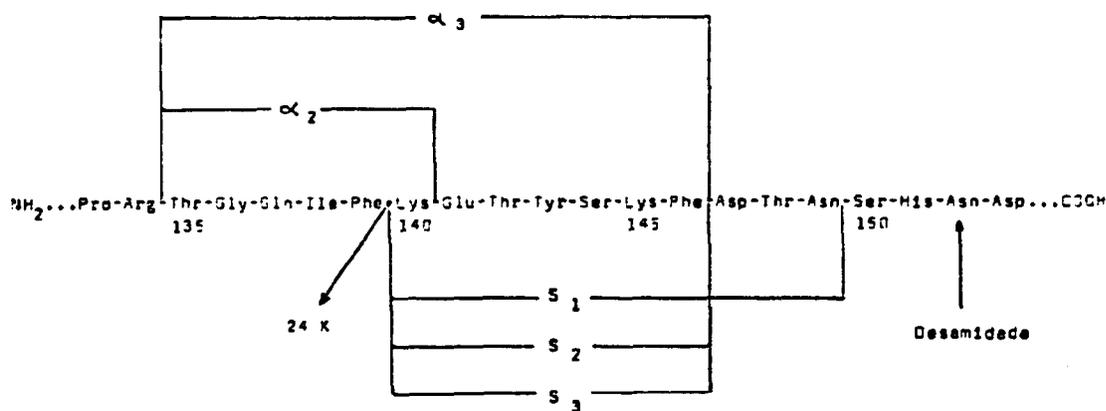


FIGURA 2 - Esquema dos sítios de ataque enzimático na molécula do HCH. As clivagens ocorrem na região entre os resíduos 134 e 150 e resultam na remoção de pequenos peptídeos e formação de variantes com duas cadeias. As formas α_2 e α_3 foram isoladas de extratos pituitários; as formas S₁, S₂ e S₃ foram purificadas a partir da digestão limitada do HCH por subtilisina. As formas S₂ e S₃ diferem apenas no resíduo 152: Asn em S₂ e Asp em S₃. A variante 24 K possui apenas uma clivagem na Phe 139.

A variante 24 K apresenta-se inativa no ensaio da tibia, mas em ensaio lactogênico é mais potente do que o HCH-22 K. Isto levou a se pensar na possibilidade de que a atividade prolactínica, usualmente associada ao HC, seja devida ao HCH-24 K^(15,47).

Esta variante ainda não foi detectada no plasma, mas os fatores limitantes podem ser sua baixa concentração e a falta de um anticorpo específico⁽¹⁵⁾.

2.1.3 - Formas de Migração Lenta

As formas "slow" e "slow-slow" foram identificadas em EGPA (pH 7,8 e pH 10) na presença de uréia, onde apresentavam uma migração mais lenta do que a forma íntegra⁽⁴⁵⁾.

O componente 22 K, se retirado do gel e reanalisado neste sistema, não apresenta estas formas lentas. Isto demonstra que não está havendo a conversão do HC nestas formas por exposição à uréia. Parecem não possuir peso molecular maior do que o HCH, o que exclui a possibilidade de serem agregados. Por análise em SDS-EGPA não se evidenciou a presença de fragmentos⁽⁵⁰⁾.

Tem sido sugerido que as propriedades destas formas alcalinas resultam da exposição de aminoácidos básicos escondidos, quando a proteína é colocada na presença de um agente desnaturante⁽⁴⁷⁾.

A menos alcalina das duas formas possui atividade semelhante a prolactina maior do que o HCH, embora a curva dose - resposta não seja paralela ao controle, tratado com prolactina. Por RIE as duas formas são essencialmente equipotentes⁽⁵⁰⁾.

2.1.4 - Forma Desamidada

A desamidação é acompanhada por liberação de amônia. Cada componente de migração mais rápida seria formado pela perda de um mol de $-NH_2$. Nesta reação, não se observam alterações nos aminoácidos terminais e predomina quando o meio é fortemente alcalino e com alta força iônica⁽⁴¹⁾. Supõe-se que nestas condições o hormônio poderia sofrer modificações estruturais, por exemplo, sofrer desdobramentos expondo os radicais passíveis de perderem um grupo amida (Glutamina e Asparagina).

Estas alterações parecem direcionar o ponto de clivagem enzimática na cadeia peptídica do hormônio, originando produtos diferentes⁽⁴⁵⁾.

2.1.5 - HCH com o grupo amino terminal bloqueado

A forma "Fast" foi descrita por LEWIS (1979)⁽⁴⁵⁾ em EGPA, pH 7,8, onde apresentava uma migração um pouco maior do que o componente principal. Possui uma

carga quase idêntica à forma desamidada analisada por iso eletrofocalização, no entanto, em eletroforese em disco migra mais lentamente, provavelmente por fatores estéricos.

A análise estrutural indicou um bloqueio do aminoácido amino-terminal por um grupo acetilo (Acetil-Phe-R). Esta alteração é provavelmente responsável pelo seu comportamento em eletroforese em disco e em DEAE-celulose.

Esta variante possui atividade somatotrófica e parece constituir 5% do HC da glândula pituitária.

2.2 - VARIANTES DE MASSA

2.2.1 - Dímero

Na análise de extratos pituitários em gel filtração, obtem-se imunorreatividade para o HCH em duas regiões. A primeira corresponde ao PM de 45000 d (45 K) e a segunda a 22000 d (22 K). Alguns autores obtiveram a dissociação do 45 K em duas moléculas de 22 K, por tratamento com guanidina⁽²⁷⁾ ou com β -mercaptoetanol e uréia⁽³⁰⁾. Acredita-se que seja formado principalmente por ligações dissulfeto, mas não fica excluída a possibilidade de ligações não covalentes.

O dímero dissulfeto do HCH demonstrou ser

essencialmente inativo em promover o crescimento, mas se reduzido e alquilado, a atividade é recuperada⁽⁵⁴⁾.

Assemelha-se à forma "Big" detectada no plasma^(30,43), mas a sua função fisiológica é desconhecida. Considerando-se que apresenta ligação específica com receptores de HC e de lactogênio⁽⁵⁰⁾ esta forma merece estudos mais minuciosos.

2.2.2 - HCH-20 K

A variante 20 K parece ser um produto direto do gene, portanto, diferindo das demais variantes, não é resultante de modificações pós-ribossomal do 22 K. É uma única cadeia polipeptídica; idêntica à forma 22 K exceto pela ausência de um segmento de 15 aminoácidos composto pelos resíduos 32 a 46; o que lhe atribui o P.M. de 20.000 daltons⁽⁴⁶⁾.

WALLIS (1980)⁽⁹⁹⁾ sugeriu que a remoção dos 15 aminoácidos da porção interna da molécula, seria originada pela presença de seqüências de inserção no gene, ou seja, que a ausência deste segmento na proteína fosse devido a íntrons no gene. Uma outra possibilidade sugerida foi a presença de vias alternativas de síntese para o HCH-22 K e o HCH-20 K, em que a glândula pituitária processaria o HCH-mARN por uma ou duas vias diferentes.

O 20 K é cerca de 10% do HC pituitário,

estimula o crescimento e possui algumas atividades semelhantes ao HC, enquanto que outras atividades estão ausentes ou diminuídas⁽⁴⁷⁾.

A variante 20 K possui cerca de 20 a 40% da capacidade do HCH em deslocar o ^{125}I -HCH de seu anticorpo^(35,47). Esta reação cruzada tem dificultado a produção de anticorpos específicos contra o 20 K, impedindo medidas diretamente no sangue.

2.2.3 - Fator Diabetogênico

Entende-se por diabetogênese a produção de hiperglicemia e hiperinsulinemia após injeção da substância teste em cachorros em jejum há 10 horas.

Foi demonstrado que uma preparação homogênea de HC era inativa quanto à capacidade de produzir diabetogênese; enquanto que uma variante mais ácida era evidentemente ativa⁽⁴²⁾. Finalmente, um fragmento com peso molecular entre 5.000 e 10.000 d que apresenta esta atividade foi isolado por DEAE-celulose, utilizando tampão bicarbonato de amônio e uréia.⁽⁴⁷⁾

Há muitas indicações de que a molécula intacta do HCH não é um fator pituitário com propriedades diabetogênicas. Poderia ser o substrato de uma reação enzimática cujo produto apresenta esta atividade, mas não há um consenso sobre que parte da molécula do hormônio se

ria a responsável por esta atividade. Há, ainda uma segunda possibilidade, embora remota, de que não o HCH mas um peptídeo contaminante da preparação seja o elemento responsável por esta propriedade⁽⁴⁷⁾.

3. CONJETURAS SOBRE AS FUNÇÕES DAS VARIANTES

As atividades fisiológicas caracterizadas para o hormônio de crescimento (resumidas na tabela 1) vão, no decorrer dos estudos, sendo atribuídas à cada variante.

Diversas suposições foram formuladas para tentar explicar o amplo espectro de ações fisiológicas e a multiplicidade de formas do hormônio de crescimento. BORNSTEIN⁽¹²⁾ propôs que a molécula intacta do HC atuaria como um pró-hormônio para pequenos peptídeos ativos, cada um com uma ação metabólica restrita e específica. LEVINE e LUFT⁽³⁹⁾ sugeriram que o HC não seria uma única substância e sim duas, uma com ação anabólica e outra catabólica. MILLS⁽⁶⁰⁾ propôs que a diversidade de ações estaria ao nível de uma variedade de receptores, cada um desencadearia uma ação fisiológica distinta, reagindo com diferentes porções da molécula do hormônio.

A presença das variantes suporta as três possibilidades: cada uma delas pode reagir com seu próprio receptor, ou pode servir de substrato em uma reação proteç

lítica específica, originando fragmentos com afinidade por determinados receptores.

Se o HC serve como um pró-hormônio, todo o mecanismo que permite as clivagens específicas deve ser encontrado. Poderia se pensar que nos processos fisiológicos houvesse um direcionamento para estas clivagens, por exemplo, através das duplas de aminoácidos básicos. (O HCH possui apenas um par: Arg₁₆₇-Lys₁₆₈) ou pela desamidação (frequente nos resíduos de Asn e Gln)⁽⁴⁷⁾.

A acilação do -NH₂ terminal poderia alterar o arranjo da cadeia peptídica expondo novas áreas para o ataque proteolítico. A substituição de aminoácidos em duas formas alcalinas de HCH pode, não só alterar a estrutura terciária, como também formar seqüência de duplas básicas para clivagem.

A ausência de 15 aminoácidos na variante 20 K, altera o arranjo da cadeia peptídica o que poderia expor novas partes da molécula. Considerando-se o fato que o 20 K é mais resistente à proteólise do que o HCH⁽⁴⁸⁾, sua menor atividade hiperglicêmica pode ser devida à incapacidade de se produzir um fragmento com esta atividade por clivagem. Fato semelhante pode ocorrer para dímeros dissulfeto intercadeias. Assim, alterações pós-tradução podem fornecer uma variedade de fragmentos a partir de um número pequeno de estruturas. Mas estas alterações também podem produzir estruturas inativas, por

exemplo, HCH₁₋₁₃₄, cujo arranjo espacial pode estar inibindo a ação enzimática. A regeneração da atividade biológica por recombinação de fragmentos, assim como o aumento da atividade para o hormônio de duas cadeias podem ser atribuídas a uma configuração mais favorável do substrato para interação com a enzima.

Nenhum peptídeo se mostrou eqüipotente em base molar com o HC intacto. Isto pode ser devido ao fato de que o crescimento somático é resultante da ação de um grupo de fragmentos, mas a ação de cada peptídeo isolado é uma reação celular bem definida.

Diante de todos os tópicos postos em foco, relativos às dúvidas e hipóteses relacionadas com a molécula do hormônio de crescimento humano e as suas variantes e sua fisiologia, fica evidente que para um estudo inicial neste campo é necessário o desenvolvimento de métodos preparativos deste hormônio e o isolamento de cada um de seus componentes.

Neste sentido, durante o desenvolvimento desta dissertação buscaremos descrever um esquema de extração simples e com alto rendimento para o hormônio de crescimento a partir de hipófises humanas congeladas. E em uma fase seguinte, obter o isolamento da forma íntegra, o HCH-22 K.

Após os dois processos serão realizados ensaios de pureza e caracterização química e/ou biológica e imunológica do hormônio isolado.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO HCH

1.1 - ASPECTOS GERAIS

Para a obtenção do HCH para uso clínico existem, basicamente, dois processos que evitam a deterioração das hipófises coletadas até a sua extração: a conservação em acetona e o congelamento.

O primeiro método não necessita de condições especiais de temperatura, permite o armazenamento de grande número de glândulas durante vários anos à temperatura de 4°C, sob a forma de pó acetonado, que possui cerca de 1/6 do volume original, sendo vantajoso para o transporte e armazenamento. Contudo, os processos de extração do hormônio deste material são relativamente drásticos, empregando-se ácido acético glacial aquecido⁽⁷⁰⁾, soluções fortemente ácidas⁽⁷⁵⁾ ou alcalinas^(59,68,91,101).

As hipófises congeladas, obviamente não oferecem as mesmas facilidades para armazenamento e transporte, mas por outro lado, fornecem melhor rendimento⁽⁶⁴⁾, calculado em miligrama de HCH extraído por grama de hipófise processado; permite a utilização de soluções tampões diluídas com pH próximo à neutralidade, e dá origem a uma proteína com menor tendência à agregação e com menor antigenicidade⁽⁸⁴⁾.

Escolhemos o método de ROOS et alii (1963)⁽⁷⁸⁾ para o processo de extração por utilizar hipófises congeladas, condições suaves de extração, seguir uma metodologia simples, fornecer uma proteína prontapara a utilização clínica, além de permitir uma posterior obtenção de outros hormônios pituitários como LH, FSH, PRL etc.

Foram introduzidas várias alterações visando automatizar algumas fases e diminuir o tempo de manipulação do extrato.

Durante toda a extração houve uma preocupação com o grau de pureza do HC isolado e com o rendimento do processo.

1.2 - PARTE EXPERIMENTAL

1.2.1 - Extração

As hipófises humanas utilizadas na preparação foram obtidas do Instituto Médico Legal e do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Logo após a coleta, as hipófises foram congeladas (-20°C) e mantidas nesta condição até a realização do processo de extração. Vinte e quatro horas antes de iniciarmos a extração, elas eram transferidas

para a geladeira (5-8°C).

Inicialmente, foram lavadas com 250 ml de solução salina (cloreto de sódio 0,87% em água destilada) a 5°C. Em seguida, transferidas para o homogeneizador que mantinha o recipiente com as hipófises mergulhada em banho de gelo. Utilizamos tampão fosfato de sódio 0,03 M (pH 6,2) contendo 5 mM de EDTA, 0,02 de azida sódica e 50 UI/ml de Trasylol. Trasylol é o nome comercial de um inibidor enzimático produzido pela Bayer. Quimicamente, é denominado de aprotinina. É um polipeptídeo básico (P.I. 10,5), composto de 58 resíduos de aminoácidos com peso molecular ao redor de 6500 d, e que possui grande tendência a formar dímeros. (103)

As fases da extração estão esquematizadas na figura 3 .

Todas as centrifugações foram realizadas à temperatura entre 4-8°C em uma centrífuga refrigerada, a 11750 rpm (16000 g).

A homogeneização das glândulas foi realizada em três fases: a primeira foi subdividida em duas fases de 2 minutos, com respectivamente 1,5 e 3,0 ml de tampão por grama de tecido. A segunda foi realizada com 5 ml por grama e a terceira com 1/4 deste volume. Ao término de cada homogeneização houve uma centrifugação nas condições já descritas. O precipitado resultante, ainda

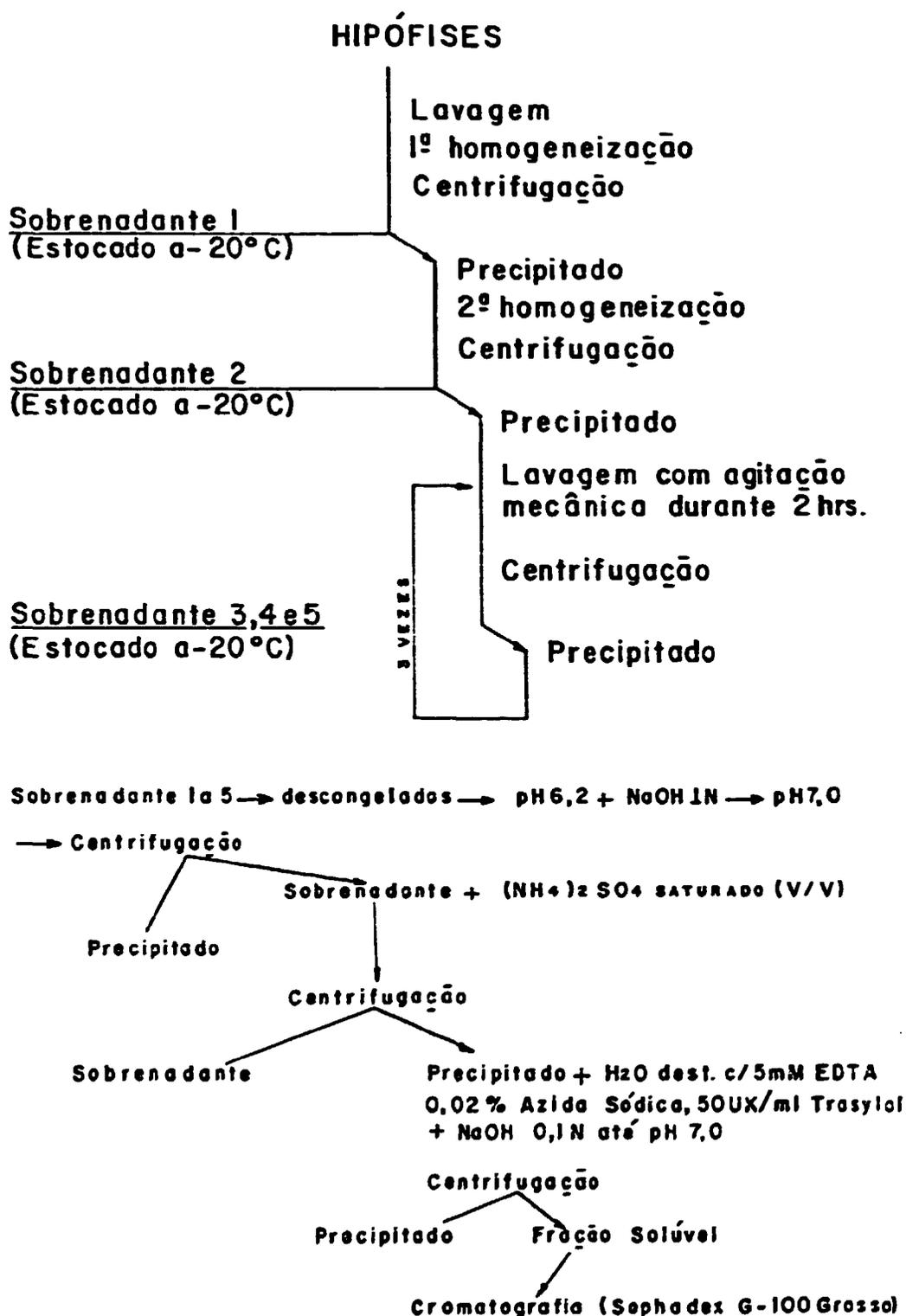


FIGURA 3 - ESQUEMA DA EXTRAÇÃO DE HCH.

foi lavado por mais duas vezes com um volume menor de tampão, ficando sob agitação mecânica por 2 horas em cada caso.

Ao final de cada centrifugação, os sobrenadantes foram coletados separando-se amostras de 1 ml para dosagens protéicas, que foram mantidas congeladas enquanto se processava as demais lavagens, a fim de se determinar o rendimento da extração.

Terminada esta fase os sobrenadantes foram misturados e neutralizados com hidróxido de sódio 1 N. Em seguida, foram centrifugados nas condições já descritas.

O volume total dos sobrenadantes foi medido e um volume igual de solução de sulfato de amônio saturada a 5°C, foi adicionado lentamente por uma bomba peristáltica, e sob agitação contínua por meio de um agitador magnético. Negligenciando-se a pequena contração de volume, esta solução é considerada como sendo 50% saturada em sulfato de amônio. Terminada a adição da solução salina, o extrato permaneceu sob agitação suave e lenta durante toda a noite.

O precipitado foi coletado por centrifugação e retomado em 50 ml de água destilada contendo 5 mM EDTA, 50 UI/ml de Trasylol e 0,02% de azida sódica. Procedeu-se novamente a neutralização do pH, com hidróxido de sódio 0,1 N. Finalmente, a suspensão foi agitada (30 minutos) e centrifugada.

1.2.2 - Purificação

Dividiu-se a fração solúvel em alíquotas de 10 ml, sendo posteriormente purificada em uma coluna refrigerada de 2,5 x 80 cm, contendo Sephadex G-100 grosso, equilibrada com tampão fosfato-glicina 0,5 M (pH = 7,2) previamente esterilizado em autoclave.

Coletaram-se frações de 3,5 ml nos tubos 1 a 35 e 3,0 ml a partir do 36, sob um fluxo de 4,6 ml/hora.

O perfil cromatográfico foi obtido por leitura das frações pares em Espectrofotômetro, em 230 nm, com cubetas de quartzo de 1 ml e percurso óptico de 1 cm.

As frações correspondentes a cada pico foram misturadas e dosadas em seu teor protéico.

1.2.3 - Dosagem protéica

A dosagem protéica foi por nós utilizada como um parâmetro para quantificar as taxas de rendimento das fases do processo de extração.

Para determinar o teor protéico das amostras coletadas baseamo-nos no método de MILLER⁽⁵⁸⁾. Utilizamos três soluções estoques, a saber: a) Carbonato de sódio 10% em hidróxido de sódio 0,5 N; b) Tartarato de sódio e potássio 1%; c) Sulfato de cobre 5%. Para

preparar o reagente tartarato de cobre, estas soluções foram misturadas nas seguintes proporções e seqüência: 0,5 ml solução "c" + 4,5 ml solução "b" + 50 ml da solução "a" no momento de sua utilização.

O reagente de Folin-Ciocalteu foi utilizado diluído 1:10 (v/v) com água destilada.

Por intermédio deste método é possível dosar amostras contendo, no máximo, 250 mg de proteína, em até 1 ml de solução.

Para a curva de calibração utilizamos uma solução inicial de SAB 1,0 mg/ml da qual obtivemos outras soluções de menor concentração, diluindo esta solução em água destilada, conforme a tabela 2.

Obteve-se o branco do ensaio com 200 μ l de água destilada e foi comparado com 200 μ l do tampão que estão diluídas as amostras. Para as amostras coletamos também 200 μ l em duplicatas.

À solução protéica adicionamos 1 ml do reagente de tartarato de cobre, procedendo-se agitação logo após cada pipetagem. Ao final desta fase, os tubos permaneceram à temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionamos, então 3 ml do reagente de Folin diluído sob agitação e incubamos em banho-maria a 50°C por 10 minutos.

Decorrido este intervalo de tempo, os tubos foram resfriados e determinamos a extinção em 650nm contra o branco do ensaio, em cubetas de vidro com 2 cm de percurso óptico.

TABELA 2 - Diluições seriadas da solução padrão de SAB 1,0 mg/ml para construção da curva de referência, e quantificação do conteúdo de proteína nas diversas amostras de extração de HCH.

DILUIÇÃO	SOLUÇÃO PROTÉICA (ul)	H ₂ O DEST. (ul)	VOL. NA REAÇÃO (ul)	TOTAL DE PROT. (ug)
A	500 Sol.padr.	500	200	200
B	500 Sol. A	500	200	100
C	500 Sol. B	500	200	50
D	500 Sol. C	500	200	25
E	500 Sol. D	500	200	12,5

2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

2.1 - ASPECTOS GERAIS

A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica amplamente utilizada no momento, apresentando boa sensibilidade e alto poder de resolução. A separação observada nesta técnica, baseia-se em características de carga e/ou peso molecular da amostra.

Os géis de poliacrilamida formam-se a partir de polimerização via radical livre, do monômero acrilamida e de ligações cruzadas do co-monômero N,N-metileno-bis-acrilamida. Variando-se a concentração destes reagentes obtêm-se diferentes graus de polimerização, e conseqüentemente uma matriz com poros maiores ou menores. Assim, o tamanho dos poros pode ser ajustado de forma a se otimizar a separação dos componentes da amostra.

2.2 - PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1 - EGPA 7%

Utilizamos nesta fase experimental o método de DAVIS⁽¹³⁾ e ORNSTEIN et alii⁽⁶⁶⁾. O gel de separação foi polimerizado usando riboflavina e luz como catalizadores. O gel de separação foi preparado em tu

bos de ensaio, seguindo a proporção das soluções estoque, para obter uma concentração final de 7% em acrilamida e poros de aproximadamente 50Å. (1A+2C+4H₂O+1E)

Utilizamos cilindros de vidro de 11x0,72 cm abertos nas duas extremidades com 0,5 cm de diâmetro interno, vedados em uma das pontas com "Parafilm". A seguir, agitou-se e colocou-se a mistura para a formação do gel de separação nos cilindros com pipeta Pasteur, evitando-se a formação de bolhas de ar. Para tanto, foi conveniente colocar, previamente, a solução em sistema de vácuo para eliminar o ar nela presente. A seguir, ajustamos a solução a uma altura de 9,3 cm e com auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta curva e muito fina, adicionamos cerca de 100 ul de água destilada para evitar a formação de menisco na superfície do gel.

Colocou-se a estante com os tubos a 7 cm de uma fonte de luz fria por 45 minutos, para a polimerização do primeiro gel. Retiramos o "Parafilm" da extremidade inferior e secamos a água da superfície com papel absorvente.

Aplicamos então, a amostra sobre o gel de separação, tendo estas um volume final de 150 ul (40 ul de glicerol, 10 ul de azul de bromofenol 0,1 mg/ml e 100 ul da solução protéica contendo aproximadamente 50ug).

Paralelamente, a cada amostra analisada, corriamos um branco e um controle de SAB. No branco es

tavam presentes todos os reagentes menos a proteína, que foi substituída por um volume idêntico do tampão utilizado na sua dissolução. Com a análise do controle, determinamos o R_m da forma monomérica de SAB. Esta foi tomada como referência, para corrigir variações interensaios.

Os cilindros com as amostras foram transferidos para a cuba de eletroforese. Adicionamos lentamente sobre as amostras o tampão da corrida (tris-glicina 0,4 M, pH 8,3) diluído 1/10 (v/v) em água destilada.

A eletroforese foi efetuada em uma geladeira (5-8°C) e teve uma diferença de potencial nunca superior a 220 V e com 2 mA por gel. O ensaio foi interrompido quando o traçador chegou a 1 cm da extremidade inferior do gel. Os géis foram fixados em ácido tricloroacético 12,5% por 30 minutos, e em seguida, determinamos o perfil de proteínas em densitômetro, sob luz U.V. (220 a 310 nm). A coloração foi feita em uma solução de CBB-R.250 0,25% durante 30 minutos sendo descorados com ácido acético 7%⁽¹⁰⁰⁾ e finalmente, fotografados.

Por causa da pequena diferença de carga entre as variantes, a reprodutibilidade interensaios é vital para que se possa identificar os componentes das preparações do HCH. Fez-se o controle tomando-se como referência a média dos R_m da fração monomérica da SAB, determinado em 17 medidas intersaios.

A razão entre a média dos R_m e o obtido no ensaio que se está analisando nos fornece um fator de correção, com os quais corrigimos os R_m obtidos para as variantes.

$$\text{Fator de correção} = \frac{\text{R}_m \text{ de referência da SAB}}{\text{R}_m \text{ do ensaio para a SAB}}$$

2.2.2 - SDS-EGPA 10%

A análise em SDS-EGPA seguiu a metodologia descrita por WEBER & OSBORN (1969)⁽¹⁰⁰⁾.

Utilizamos uma placa de 10x6x0,1 cm, que continha aproximadamente 9 cm de gel de separação a 10% e 1 cm de gel mais poroso (5%) para alinhar a entrada das amostras.

A 100 ul de amostra (com aproximadamente 100 ug de proteína) foram adicionados 100 ul de solução desnaturante (tampão fosfato de sódio 0,02 M, 1% SDS, 1% β -mercaptoetanol). Em algumas amostras foi adicionado 0,1 grama de uréia de forma a se obter a concentração final de 8 M. Esta solução foi fervida em banho-maria (em capela) durante 2 minutos.

Para se obter a curva de calibração por PM utilizamos um Kit da Sigma, com os seguintes pontos: Soro albumina bovina (PM 66.000); Ovoalbumina

(PM 45.000); Pepsina (PM 34.700); Tripsinogênio (PM 24.000); Lactoglobulina (PM 18.400) e Lisosima (PM 14.300). Estes padrões receberam o mesmo tratamento descrito para as amostras.

Terminado o tratamento, a 100 ul desta solução adicionamos 10 ul de azul de bromofenol 0,05%, 40 ul de glicerol e 5 ul de β -mercaptoetanol. Desta mistura final, foram aplicados 100 ul na placa com o gel de poliacrilamida.

Em cada corrida foi possível a análise de até 10 amostras. Na eletroforese propriamente dita utilizamos tampão fosfato de sódio com 0,2% de SDS. A corrida foi à temperatura ambiente, com uma diferença de potencial de 140 V e uma corrente de 210 mA, sendo interrompida com o traçador a 1 cm do final da placa. A fixação, coloração e descoloração do fundo seguiu a metodologia já citada.

As medidas das distâncias de migrações das proteínas e do traçador na placa foram feitas após o processo de coloração.

2.2.3 - Cálculos

Nos dois sistemas de eletroforese a mobilidade relativa (R_m) foi calculada por:

$$R_m = \frac{\text{distância de migração da proteína}}{\text{distância de migração do traçador}}$$

Na técnica de EGPA, o R_m é uma característica de cada proteína, sendo útil como um parâmetro de identificação. Baseado neste sistema, SKYLER (1977)⁽⁸⁸⁾ propôs uma classificação das variantes do HCH.

Na análise com SDS-EGPA, utilizando-se padrões de peso molecular conhecido, foi possível construir um gráfico da mobilidade relativa (R_m) por peso molecular. Expressando-se em escala semi logarítmica, obtêm-se uma relação linear e por meio desta é possível calcular o peso molecular de uma determinada proteína.⁽¹³⁾

3. ISOELETRIFOCALIZAÇÃO

3.1 - ASPECTOS GERAIS

Desde que foi descrito que as variantes do HCH diferem principalmente pela carga, utilizaram-se vários métodos de fracionamento de proteína que se baseiam nesta propriedade com a finalidade de isolar cada um dos componentes. (7,36,38,62,105)

Toda proteína, ou outro anfólitico qualquer, tem o chamado ponto isoeletrico (PI), isto é, o valor de

pH no qual a carga resultante é zero. Se a proteína é adicionada a uma solução com um valor de pH maior que seu PI (solução básica) ela perde prótons, tornando-se carregada negativamente. Por outro lado, se o meio tiver um pH inferior ao seu PI (solução ácida), o anfólito captura prótons tornando-se positivamente carregado.

Em sistemas de eletroforese geralmente se utiliza um pH constante. No entanto, se utilizarmos arranjos que permitam variar o pH obtém-se um gradiente em que os menores valores estão no ânodo, e os maiores no cátodo.

Na constituição desse gradiente, utiliza-se um grande número de anfólitos de cadeia alifática do tipo poliamino-policarboxílicos. Cada uma destas substâncias possui seu próprio PI, diferindo das demais. Quando submetidas a uma diferença de potencial, se distribuem segundo suas características, formando ao longo da coluna um grande gradiente de pH. Estes compostos são comercializados pela LKB como nome de "Ampholine^R".

A adição de uma amostra protéica ao sistema fará com que esta adquira diferentes cargas moleculares migrando pelo gradiente de pH até o valor de seu PI. Neste ponto a proteína está eletricamente neutra e irá estacionar (fig. 4).

O método de separação de proteínas por seu ponto isoelétrico em um gradiente de pH é denomina-

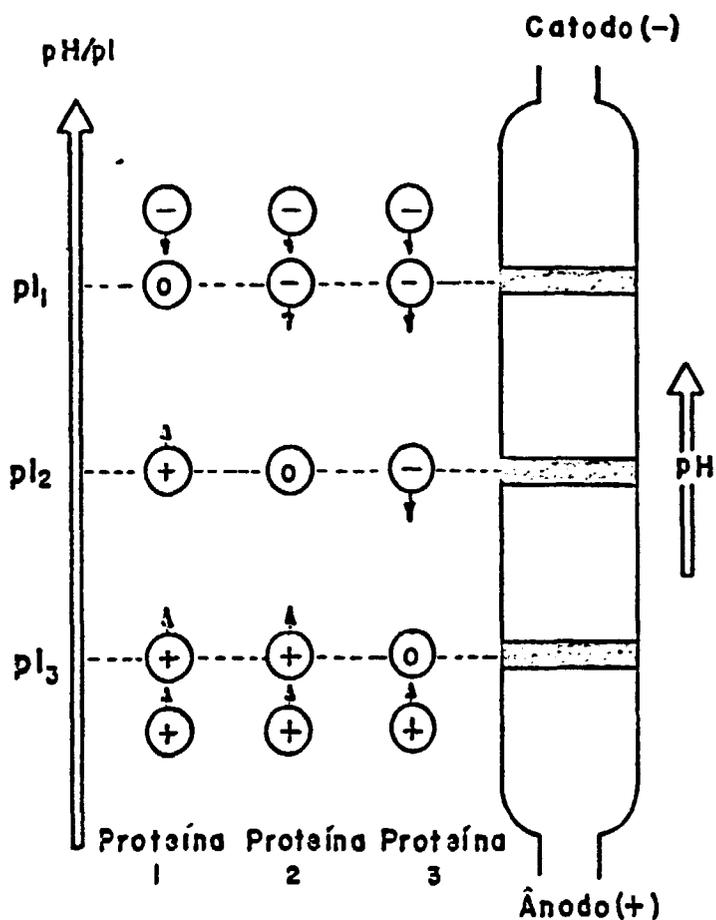


FIGURA 4 - Distribuição de proteínas com diferentes PI ao longo do gradiente de pH gerado na isoeletrificação. Ao atingir o valor de pH igual ao seu PI a proteína está eletricamente neutra e para sua migração.

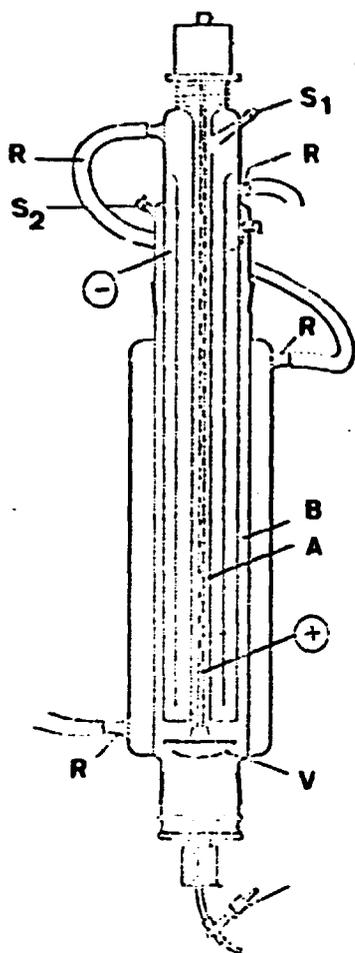
do Isoeletrofocalização.

3,2 - PARTE EXPERIMENTAL

Para a separação das variantes do HCH por isoeletrofocalização utilizamos uma coluna LKB modelo 8100 (fig. 5). Esta possui dois compartimentos distintos: um central (A) para o pólo positivo e outro externo (B) contendo o volume efetivo de separação (110 ml) e o pólo negativo. O isolamento entre os dois compartimentos é importante, pois no pólo positivo formam-se bolhas de gás, que são eliminadas durante a corrida (S) sem interferir com a separação, pois não entram no tubo externo. O tubo central pode ser isolado pelo fechamento de uma válvula (c), o que permite evitar a contaminação da amostra com a substância do eletrodo.

Utilizou-se uma solução contendo 0,4 ml de etilenodiamina e 14 gramas de sacarose em 14 ml de água destilada como pólo positivo. Com a válvula fecha da colocamos esta solução no tubo central. A seguir, a brimos a válvula e sobre esta solução adicionamos 5 ml de solução aquosa de sacarose (50%), e iniciamos a adição do volume de separação.

Para a formação do gradiente utilizamos o Gradiente Mixer LKB modelo 8121, constituído de dois reservatórios (fig. 5). No primeiro colocou-se a solução



Coluna para isoeletrofocalização

A - Compartimento central (polo positivo +)

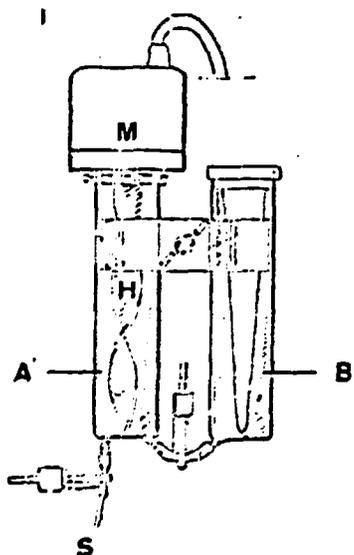
S₁ - Saída de A.

B - Compartimento externo (polo negativo -).

S₂ - Saída de B.

V - Válvula.

R - Sistema de refrigeração.



Sistema formador do gradiente

A' - primeiro reservatório
AMPHOLINE pH 4-6 - 4 ml
SACAROSE 50% - 50 ml

B' - segundo reservatório
AMPHOLINE pH 4-6 - 1,4 ml
HCH em H₂O-DEST. (25 mg)-52,6 ml

M - motor de agitação

H - hélice para agitação

S - saída para a coluna

FIGURA 5 - Aparelhos utilizados para a Isoeletrofocalização.

aquosa de sacarose 50% com 3/4 do volume total de anfolina utilizado, e no outro uma solução protéica com 1/4 do volume total de anfolinas.

A adição do gradiente à coluna foi feita lentamente (0,5 ml/min).

Adicionou-se, sobre o gradiente, ácido fosfórico a 1% em água destilada, em volume suficiente para cobrir o eletrodo negativo (aproximadamente 5 a 10 ml).

Terminada a adição dos componentes, iniciou-se a refrigeração da coluna através de um banho de circulação contendo uma mistura 3:1 de água e etileno-glicol, a 4°C. Esta temperatura foi mantida por todo o tempo de eletroforese.

Decorridos 30 a 45 minutos do início da refrigeração submeteu-se o sistema a uma diferença de potencial crescente de 300 a 600 volts durante 72 horas, e manteve-se por mais 20 horas a voltagem final. Portanto, o tempo total de eletroforese foi 92 horas.

Desligada a fonte de alta tensão, fechou-se a válvula de comunicação com o tubo central e coletou-se o gradiente acoplado a saída da coluna a um coletor de frações. Foram coletadas frações de 1,1 ml, com um fluxo de 0,5 ml/minuto.

Determinou-se o perfil de pH obtido na isoeletrofocalização por leitura, em um potenciômetro.

As frações foram em seguida diluídas, adicionando-se 1 ml de uma solução de bicarbonato de amônio 0,1 M (pH 8,0) o que permitiu solubilizar as zonas protéicas isoeletricamente precipitadas. A leitura da absorvância em 280 nm foi feita em um espectrofotômetro. Utilizamos cubetas de quartzo de 1 ml e 1 cm de percurso óptico.

3.2.1 - Cromatografia em Sephadex G-50 fino

Para separar as anfolinas e sacarose da proteína empregou-se a cromatografia de exclusão molecular. Neste caso utilizou-se uma coluna refrigerada (5-8°C), com a dimensão de 1,5 x 20 cm. A matriz foi Sephadex G-50 fino e a solução de eluição foi bicarbonato de amônio 0,1 M, com cloreto de sódio 0,1 M (pH 7,8).

As frações da isoeletrofocalização correspondentes ao pico da variante 22 K foram misturadas e submetidas à cromatografia neste sistema. Para uma amostra de 5 ml aplicada à coluna foram coletadas 90 frações de 0,53 ml, sob um fluxo de 0,2 ml/minuto.

O perfil de eluição da coluna foi determinado de duas maneiras diferentes: pela densidade óptica em 280 nm que evidencia a eluição somente do componente protéico e pela reação de biureto⁽⁵⁷⁾ que evidencia a eluição do componente protéico e das anfolinas.

3.2.2 - Reação de biureto

Para esta reação utilizamos o reativo de biureto, que foi preparado da seguinte forma:

Água destilada	500 ml
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,5 g
Tartarato de K e Na	6.0 g
Hidróxido de sódio 10%	300 ml
Água destilada q s p	1000 ml

No ensaio, adicionamos 0,25 ml das frações ímpares da eluição da cromatografia em Sephadex G-50 fino, 1,75 ml de solução salina (cloreto de sódio 0,87%) e 2 ml do reativo.

No branco adicionamos 2 ml de solução salina e 2 ml do reativo.

A mistura ficou em repouso por 15 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, determinou-se a absorvância de cada fração por leitura em 550 nm com cubeta de vidro de 2 cm de percurso óptico.

4. IDENTIFICAÇÃO DO AMINOÁCIDO -NH₂ TERMINAL

4.1 - ASPECTOS GERAIS

Os derivados sulfonamídicos do cloreto de

5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfonila (DNS-Cl ou Cloreto de dansila) começaram a ser utilizados em química de proteína por volta de 1952, em substituição aos derivados do fluorodinitrobenzeno. O método inicial foi posteriormente aperfeiçoado⁽³⁴⁾, sendo ainda hoje muito utilizado nesta área.

Estes derivados apresentam intensa fluorescência quando expostos à luz ultravioleta, o que facilita a análise dos aminoácidos terminais de peptídeos e proteínas. A fluorescência obtida depende da polaridade do solvente e do pH da reação.

O método de marcação é simples, ocorrendo em um meio contendo tampão bicarbonato e 50% de acetona. A acetona suprime a ionização do grupo amino e solubiliza o reagente.

Faz-se a separação para identificação dos aminoácidos dansilados por cromatografia ascendente em folhas de poliamida. Estas são constituídas por grupos ϵ -policaprolactamas ligados a folhas de poliéster resistentes a solventes⁽¹⁰⁴⁾. A corrida é bidimensional em três sistemas de solventes, conforme representado na figura 6. A resolução obtida é boa para todos os aminoácidos. No caso de se obter ambiguidades entre ϵ -DNS-Lys, α -DNS-His e DNS-Arg deve-se recorrer a uma corrida adicional na mesma direção que os sistemas de solventes 2 e 3, com fosfato-trisódico 0,05 M e etanol (3:lv/v). No caso do DNS-ácido cistéico a resolução melhora

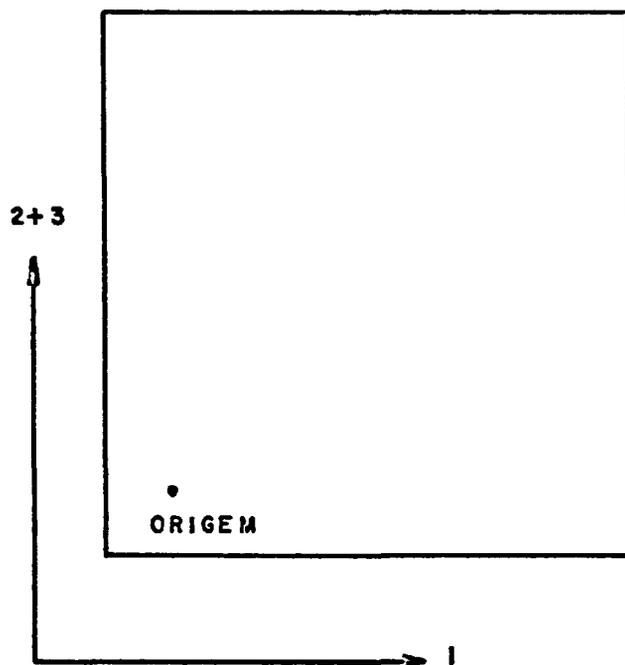


FIGURA 6 - Cromatografia ascendente em placa de poliamida (7,5 x 7,5 cm). para identificação do aminoácido -NH_2 terminal. A corrida é bidimensional e em três sistemas de solventes:

- 1º - Ácido fórmico 1,5% (v/v)
- 2º - Benzeno-ácido acético 9:1 (v/v)
- 3º - Acetato de etila - Metanol-ácido acético (20:1:1)

O sentido de cada corrida está esquematizado no esquema acima.

com mais uma corrida na mesma direção do segundo sistema de solventes, usando amônio 1 M e etanol (1:1 v/v)⁽³⁴⁾

Finalizando, é oportuno salientar que este é um método rápido, sensível e de grande utilidade em química de proteínas.

4,2 - PARTE EXPERIMENTAL

Utilizou-se o método de cloreto de dansila⁽³⁴⁾ para a identificação do $-NH_2$ terminal do HCH-22K.

Partimos de uma ampola contendo 100 ug de HCH-22K, liofilizado. A proteína foi dissolvida em 100 ul de água destilada e a seguir adicionamos 100 ul de DNS-Cl (2,5 mg/ml em acetona), obtendo-se uma mistura final com 50% de acetona (pH 9,8). A mistura foi imediatamente agitada, selada com "Parafilm" e incubada por 1 hora a 37°C, em banho-maria.

Terminada a incubação, seccou-se a amostra, evaporando-se o solvente. Adicionaram-se 50 ul de ácido clorídrico 6 M, lacrando-se a ampola em vácuo. Procedeu-se à hidrólise por 18 horas, em estufa a 105°C.

A amostra foi, então, centrifugada por 10 minutos a 2.000 rpm (500 g) e o sobrenadante foi neutralizado com 50 ul de hidróxido de sódio 6 M, sendo em seguida evaporado.

Adicionaram-se, finalmente, 50 ul de piridina concluindo-se as fases de marcação e hidrólise da proteína.

A identificação do(s) resíduo(s) na placa de poliamida medindo 7,5 x 7,5 cm , em três sistemas de solventes:

1º - Ácido Fórmico 1,5% (v/v)

2º - Benzeno-Ácido acético 9:1 (v/v)

3º - Acetato de etila - Metanol - Ácido Acético
20:1:1 (v/v).

O sentido de cada corrida está esquematizada na figura 6.

A amostra foi analisada em duplicata. Na primeira placa aplicamos, aproximadamente, 30 ul do hidrolisado em uma das faces e 10 ul do padrão de DNS-Phe na face oposta, mas na mesma posição, ou seja, as duas amostras se sobrepõem quando observadas por transparência. Na segunda placa aplicamos na mesma face e na mesma posição o hidrolisado e o padrão com volumes idênticos ao caso anterior. Todas as aplicações foram feitas lentamente utilizando-se um capilar de vidro e com o auxílio de um fluxo contínuo de ar quente para apressar a evaporação do solvente. Em ambas as placas a difusão

das amostras não passou de 0,5 cm.

Antes de cada corrida no sistema de solvente subsequente, as placas foram completamente secas e examinadas sob luz ultravioleta, em uma câmara escura.

5. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS -SH

5.1 - ASPECTOS GERAIS

Sendo conhecida a seqüência primária do ECH sabe-se que a molécula possui quatro cisteínas, que estão ligadas formando duas pontes dissulfeto (Cys 165-Cys 53 e Cys 182-Cys 189).⁽⁸⁵⁾

As pontes delimitam duas alças, que são geralmente esquematizadas da seguinte forma:



A identificação de grupos -SH livres permite verificar se houve ruptura destas pontes, o que constitui um parâmetro de observação de possíveis alterações moleculares causadas pela metodologia empregada.

5.2 - PARTE EXPERIMENTAL

Para a verificação de grupos -SH livres nas preparações de HCH (HCH total e HCH 22 K), utilizou-se o método descrito por ELLMAN, G. (1959)⁽²²⁾ modificado, e cisteína como padrão.

A 0,5 ml da solução de proteína contendo 0,1 mg juntou-se 0,88 ml de tampão tris-HCl 0,1 M pH 8,0; 0,03 ml de solução de EDTA 0,1 M no mesmo tampão e 3,0 ml de água destilada. Em seguida, adicionou-se à mistura 0,02 ml do Reativo de Ellman (20 mg do ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzóico em 5 ml de tampão tris-HCl 0,1 M, pH 8,0).

Após 10 minutos, fez-se a leitura da absorvância em 412 nm contra o branco (Tris, EDTA, água e DTNB).

Para pesquisar a existência de grupos -SH livres, porém "escondidos" e não acessíveis ao reagente, adicionamos ao meio uréia em uma concentração final de 6 M.

6. ESPECTRO DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA E COEFICIENTE DE EXTINÇÃO

6.1 - ASPECTOS GERAIS

O HCH apresenta um espectro de absorção

no ultravioleta próximo (230 a 300 nm) característico dos aminoácidos aromáticos presentes em sua estrutura.

Utilizando os valores de absorvância obtidos em 280 e 277 nm, calculou-se o coeficiente de extinção molar (E). Para tanto, utilizou-se a Lei de Lambert-Beer:

$$A(\lambda) = C \cdot E(\lambda) \cdot \ell \quad (13)$$

onde A é a absorvância em um dado comprimento de onda,

C é a concentração,

λ é o comprimento de onda considerado

ℓ é o percurso da luz na solução. Neste caso foi de 1 cm.

Se a concentração for expressa como molaridade temos:

$$C = \frac{\text{massa (gr)}}{\text{volume (l)}} = \frac{\frac{m}{\text{PM}}}{V} = \frac{m}{\text{PM} \cdot V}$$

O coeficiente de extinção molar pode ser calculado por

$$A = \frac{m}{\text{PM} \cdot V} \cdot E \cdot \ell$$

$$E = \frac{A \cdot \text{PM} \cdot V}{m \cdot \ell}$$

Se a concentração for expressa em porcen

tagem peso/volume, o coeficiente de absorção é designado por $E_{1\%}$

$$E_{1\%} = \frac{A}{c \cdot l}$$

6.2 - PARTE EXPERIMENTAL

Dissolveu-se a variante HCH-22 K, estocada da liofilizada em ampolas, em 2 ml de uma solução de bicarbonato de amônio 0,1 M pH 8,0, contendo 0,5% de cloreto de sódio. Após completa dissolução filtrou-se a amostra em um sistema Millipore.

Realizou-se o espectro de absorção ultravioleta no intervalo de comprimento de onda de 350 a 230 nm. Utilizou-se a solução diluente como branco do ensaio. A leitura do espectro foi feita a temperatura ambiente, em cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico. O intervalo de absorvância considerado foi de 0 a 1,0, com o comprimento de onda variando 1,0 nm por segundo e o papel 50 nm por polegada.

Determinou-se o conteúdo protéico da solução pelo método descrito no item II.1.2.3.

7. PROVAS DE ATIVIDADE

A interação de uma proteína com seu r_2

ceptor ou anticorpo depende não somente do tipo de agrupamento químico envolvido, mas também de sua conformação. Assim, uma alteração em qualquer nível de organização da proteína irá, provavelmente, se refletir nas características de sua ligação antígeno-anticorpo e na atividade biológica.

7.1 - RADIOIMUNOENSAIO

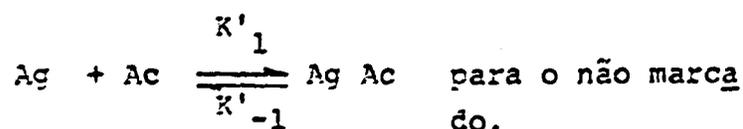
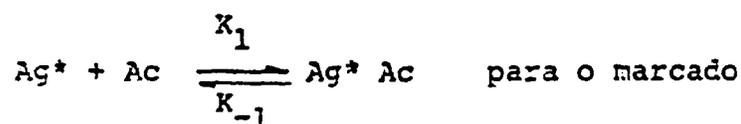
7.1.1 - Aspectos Gerais

A reação entre o antígeno e o anticorpo correspondente é de natureza química e como tal, vários tipos de forças podem agir contribuindo na união. Muito embora fracas (interações hidrofóbicas, forças coulômbicas, pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals) as forças atuantes se somam de modo a formar complexos relativamente estáveis. Este tipo de interação possui outras características que nos permitem considerá-la como um tipo particular dentro das ligações químicas, por exemplo, sua especificidade. Esta advém do fato de que as células imunologicamente competentes sintetizam o anticorpo compatível com as características estruturais do antígeno, o que faz com que a seqüência de aminoácidos do sítio de combinação do anticorpo e sua configuração espacial sejam adequadas, de modo a complementar a confi-

guração do grupo determinante antigênico. É freqüente o conceito de que a distribuição dos agrupamentos químicos, bem como as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária são relevantes na imunogenicidade de uma substância⁽²⁴⁾.

Desta forma, é possível utilizar a reação antígeno-anticorpo como um parâmetro de avaliação da integridade da molécula do HCH-22 K (no caso o antígeno) através da ligação com seu respectivo anticorpo.

O Radioimunoensaio (RIE) tem por princípio fundamental a competição entre o hormônio tornado radioativo pela marcação com o radioisótopo (Ag^*) e o hormônio não radioativo (Ag), para se ligarem ao anticorpo específico anti-hormônio (Ac). De acordo com a Lei de Ação das Massas, segue-se:



No equilíbrio tem-se:

$$\frac{[Ag^* Ac]}{[Ag^*][Ac]} = \frac{K_1}{K_{-1}} = K_a$$

onde K_a é a constante de associação. De uma forma semelhante, esta situação de equilíbrio ocorre para o antígeno não marcado.

Em resumo, a razão entre o hormônio marcado ligado ao anticorpo e o hormônio livre, cai progressivamente na proporção do aumento da concentração do hormônio não marcado no meio⁽¹¹⁾. Esta relação é expressa na curva padrão conforme figura 7.

O RIE é uma técnica de alta sensibilidade, permitindo dosagens da ordem de 10^{-9} , 10^{-12} gramas. A marcação de antígenos protéicos é geralmente feita com ^{125}I .

7.1.2 - Parte Experimental

7.1.2.1 - Marcação com ^{125}I

Neste estudo utilizamos, para a iodação o HCH purificado segundo o método de Roos (1962)⁽⁷³⁾ modificado, conforme descrito no item II.1.2.

A marcação do hormônio seguiu o método clássico com cloramina T^(3,33).

A reação foi feita em um tubo de ensaio de fundo cônico, de 70 mm x 10 mm. Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem e quantidade, sob agitação moderada e contínua com o uso de microinã:

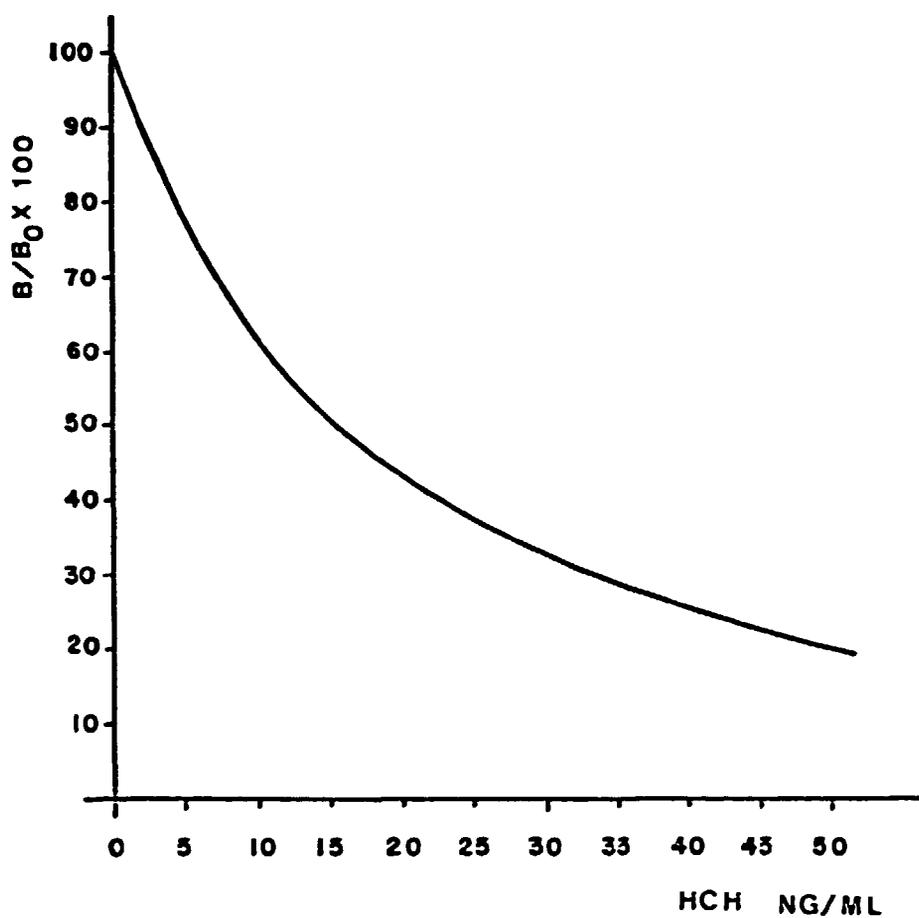


FIGURA 7 - Curva padrão para o ensaio radioimunológico do HCH.
A fração ligada está representada como $B/B_0 \times 100$.

Tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 7,4	40 ul
Na ¹²⁵ I (≅ 0,5 mCi)	1 a 3 ul
HCH (1 mg/ml)	5 ul (5 ug)
cloramina T (50 ug)	10 ul
Metabissulfito de sódio (200 ug)	20 ul
Iodeto de potássio (2 mg)	200 ul

A quantidade de iodo radioativo variou de acordo com a atividade específica de cada partida.

A mistura foi agitada no "Vortex" e imediatamente aplicada a uma coluna (50 cm x 2 cm) de Sephadex G-100 grosso. A eluição foi em tampão veronal 0,025 M, pH 8,6, 1% SAB, com um fluxo de 12 ml/h. Foram coletadas frações de 2,0 ml.

7.1.2.2 - Técnica do RIE

Todas as diluições e a incubação foram feitas em tampão veronal 0,025 M, pH 8,6 contendo 0,25% de SAB.

Utilizou-se para o RIE 100 ul da fração monomérica purificada do HCH-¹²⁵I, diluída 1 : 20 no tampão de incubação, com um total de aproximadamente 25.000 contagens por minuto, por tubo.

O anti-soro utilizado no ensaio foi produzido em coelhos do biotério do IPEN-CNEM/SP, e estoca-

do diluído 1:2.000 em solução salina com 0,02% de timerosal e 1% de soro de coelho normal. Para a utilização no RIE este soro estoque foi diluído 1:200.000 no tampão, e incubou-se 800 ul por tubo.

Para o HCH-total e para o HCH-22 K as soluções iniciais foram de 0,02 mg/ml. Foram ensaiadas em diferentes doses, seguindo diluições seriadas, conforme tabela 3.

As concentrações finais nas soluções de incubação foram para o anti-soro 1:250.000, para o marcado 1:200 (25.000 cpm/tubo) e para o antígeno frio 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100 ng/ml.

Com os tubos 1 a 3 e 19 a 21 determinamos o porcentual das ligações inespecíficas que foi descontado da ligação total. Com os tubos 4 a 6 e 19 a 21, a ligação total (B_0), pois nestes tubos não foi adicionado o antígeno frio para competir (tabela 3).

Uma vez concluídas as pipetagens, os tubos foram agitados e incubados a 5°C, por 22 horas.

Terminado o período de incubação, de cada tubo foram separados 200 ul e analisados no contador para determinar as contagens totais na incubação.

Para a separação das frações livre e li-gada foram pipetados 200 ul, em duplicata, de cada tubo de incubação. Adicionaram-se a eles 30 ul de soro humano normal e 500 ul de uma solução de PEG 6.000 a 25% em

TABELA 3 - PROTOCOLO DE INCUBAÇÃO DO RIE

Diluições dos antígenos (HCH-total e HCH-22K).

Solução inicial 0,02 mg/ml.

A - 200 ul Sol. inicial	<u>1:2</u> →	400 ul (10 ug/ml)
B - 20 ul Sol. A	<u>1:100</u> →	2 ml (100 ng/ml)
C - 1 ml Sol. B	<u>1:2</u> →	2 ml (50 ng/ml)
D - 0,8 ml Sol. C	<u>1:2,5</u> →	2 ml (20 ng/ml)
E - 1 ml Sol. D	<u>1:2</u> →	2 ml (10 ng/ml)
F - 1 ml Sol. E	<u>1:2</u> →	2 ml (5 ng/ml)
G - 1 ml Sol. F	<u>1:2</u> →	2 ml (2,5 ng/ml)

AMOSTRA	TAMPÃO (ul)	ANTI-SORO (ul)	HCH-tot. (ul)	HCH* (ul)
1-3 branco		800	100 A	100
4-6 Bo	100	800		100
7 2,5 ng/ml		800	100	100
8 5,0 ng/ml		800	100	100
9 10,0 ng/ml		800	100	100
10 20,0 ng/ml		800	100	100
11 50,0 ng/ml		800	100	100
12 100,0 ng/ml		800	100	100
HCH-22 K				
13 2,5 ng/ml		800	100	100
14 5,0 ng/ml		800	100	100
15 10,0 ng/ml		800	100	100
16 20,0 ng/ml		800	100	100
17 50,0 ng/ml		800	100	100
18 100,0 ng/ml		800	100	100
19-21 branco		800	100 A	100
22-24 Bo	100	800		100

tampão veronal 0,025 M (pH 8,6). Agitou-se imediatamente após cada adição, e em seguida foi feita uma centrifugação em 4.000 rpm (2520 g), entre 5 e 8°C, por 20 minutos. O sobrenadante contendo a fração livre foi descartado, sendo aspirado através de uma bomba de vácuo.

O precipitado foi lavado com 300 ul de cloreto de sódio 0,4 M e 0,5 ml da solução de PEG 6.000, sendo novamente centrifugado a 4.500 rpm (3300 g) entre 5 e 8°C por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e contou-se o precipitado resultante (fração ligada).

7.1.2.3 - Cálculos e análise estatística

$$\text{Ligação total (\%)} = \frac{\text{cpm do ligado}}{\text{cpm total}} \times 100$$

$$\text{Ligação específica (B)} = \% \text{ ligação total} - \% \text{ ligação do branco}$$

Na curva dose - resposta utilizamos a relação $B/B_0 \times 100$, onde B_0 representa a máxima ligação obtida entre o anticorpo e o hormônio marcado, já subtraída a ligação inespecífica.

Para as curvas obtidas no RIE a representação gráfica do logarítmo da concentração do hormônio versus a porcentagem de ligação, resultou em curvas em "S" (fig. 20). Estas apresentaram uma porção linear que

permitiu utilizar o tratamento estatístico de uma regressão linear convencional. (98)

Os cálculos foram realizados no Computador IBM/370 modelo 155 do Departamento de Processamento de Dados do IPEN-CNEN/SP em um programa denominado SAS ("Statistical Analysis System") desenvolvido no SAS Institute Incorporation - USA (1982) (72)

O teste de paralelismo entre as curvas das duas preparações foi feito comparando-se as declinações das duas curvas pelo Teste de Fisher-Snedecor (Teste F).

7.2 - ENSAIO BIOLÓGICO

7.2.1 - Aspectos Gerais

Sabe-se há muito tempo, que quando um rato em crescimento é hipofisectomizado, ele imediatamente pára de ganhar peso e comprimento, mas ao receber uma injeção de extrato pituitário o crescimento retorna. Sabe-se também que os ratos possuem uma sensibilidade supranormal ao HC. Assim, o aumento de peso em ratos hipofisectomizados tem sido utilizado como um indicador da atividade biológica das purificações de fatores que promovem o crescimento (81). É um ensaio impreciso visto

que se está trabalhando com um processo muito complexo e uma pequena população de animais. Por outro lado, é o único ensaio que reflete as múltiplas atividades do hormônio, resultando no crescimento corporal. Soma-se a este fato, a facilidade de sua realização e a não utilização de equipamentos custosos. (102)

Outro ensaio muito utilizado para determinar a atividade biológica do HCH é o da tibia⁽⁹⁵⁾. Nesta prova avalia-se o crescimento da cartilagem da tibia durante o tratamento com o hormônio. Este ensaio possui precisão, sensibilidade, reprodutibilidade e correlação com o ensaio de aumento de peso. No entanto, é mais trabalhoso, exige um equipamento mais caro e enfoca apenas a ação sobre a cartilagem. (102)

Muitos outros efeitos biológicos poderiam ser utilizados como parâmetros de avaliação da potência do HC administrado, por exemplo, incorporação de ³H-timidina no ADN, ou de ³H-leucina nas proteínas, conversão de ¹⁴C-glicose em ¹⁴CO₂ (81); mas adotou-se internacionalmente o ensaio do aumento de peso por ser, como já foi dito, o parâmetro que melhor reflete a ação total do HC. (4)

7.2.2 - Parte Experimental

Para realização do ensaio biológico uti

lizamos ratos Wistar, fêmeas, nascidas e mantidas no biotério do IPEN-CNEN/SP. Manteve-se a temperatura do ambiente entre 25 e 29°C. Os ratos foram expostos a um ciclo de luz natural e receberam água e comida "ad libitum".

A cirurgia para hipofisectomia foi realizada quando os animais atingiam 80 ± 5 gramas, o que ocorria entre o 35º e 40º dia de vida.

Permaneceram no biotério, nas condições descritas, por aproximadamente dois meses entre a cirurgia e o início do ensaio. Neste período, controlou-se o peso dos animais e os que apresentaram uma variação de peso superior a 7 gramas foram eliminados. Finalmente, os demais foram separados, ao acaso, em três grupos contendo 11 animais cada e tiveram o peso controlado diariamente durante mais uma semana. No primeiro dia do ensaio, foi feita uma nova pesagem e o dado obtido foi considerado como o valor inicial para os cálculos de atividade do hormônio.

O grupo controle recebeu 0,4 ml de solução salina (cloreto de sódio 0,87% em água destilada). Os grupos experimentais foram dois: o primeiro recebeu 0,2 ml (10 µg) e o segundo, 0,4 ml (20 µg) da solução de HCH-22 K 0,05 mg/ml em solução salina.

Este tratamento não sofreu interrupção durante 9 dias, sendo feita uma pesagem final no 10º dia.

Todas as pesagens foram feitas em balança analítica. Calculamos para cada animal a diferença entre o peso inicial e o peso do 10º dia, ou seja, após o tratamento. Utilizamos estas diferenças para a análise estatística do ensaio.

7.2.3 - Análise estatística

Inicialmente calculou-se a média das diferenças de peso para cada grupo e a análise de variância do ensaio.

Uma vez verificada a diferença global, fizemos o teste de Duncan para estabelecer se todos os grupos diferiam um dos outros e em que nível de significância isso ocorria. (19)

8. APARELHOS

- . Agitador magnético FANEN
- . Agitador mecânico com hélice rotativa
- . Agitador Vortex.Genie. Modelo K550G. Scientific Industries Incorporation.
- . Balança analítica Mettler H10T. Precisão 0,1 mg (para pesagem de reagentes).
- . Balança analítica Marte. Precisão 0,1 grama (utilizada para pesagem de ratos,

- . Bomba de vácuo.
- . Bomba peristáltica LKB modelo 4912A.
- . Centrífuga refrigerada automática Sorval Superspeed. Modelo RC2-B. (Rotores SS-34 e GSA).
- . Coletor de frações refrigerado automático. Ultrorac 7000. LKB.
- . Coluna de isceletrofocalização LKB. Modelo 8100.
- . Colunas cromatográficas Pharmacia, providas de sistema de refrigeração externa.
- . Computador IBM/370. Modelo 155.
- . Densitômetro Joyce Lcebl/Scan 400, com luz ultravioleta entre 220 e 310 nm.
- . Espectrofotômetro automático de cintilografia, tipo poço, com cristal de NaI (Tl). Nuclear Chicago Corporation.
- . Espectrofotômetro Carl Zeiss. Modelo PMQII.
- . Espectrofotômetro Cary. Modelo 118.
- . Fonte de alta tensão A.C. Power Suply LKB. Modelo 3371A.
- . Gel electrophoresis cell. Modelo 150A. Bio-Rad Laboratories.
- . Homogeneizador de tecidos Virtis "45".
- . Lâmpada fluorescente com 15 W e 110 V.
- . Lâmpada ultravioleta Mineral light. UVSL-25.
- . Liofilizador Virtis. Modelo 10-102-MD.
- . Potenciômetro Ionalyser-Orion Research. Modelo 801/digital pH.
- . Recirculating Water Cooler. Savant Instruments Incorporation.
- . Sistema formador de gradiente LKB. Modelo 3121.

III. RESULTADOS

Neste item serão expostos os resultados obtidos nos diferentes ensaios descritos anteriormente.

1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO PCH

1.1 - DOSAGEM PROTÉICA

O andamento do processo de extração foi acompanhada pela determinação do conteúdo protéico recuperado em cada fase, procurando-se assegurar, desta forma, o rendimento final desejado. As amostras coletadas durante a extração foram dosadas pelo método descrito no item II.1.2.3. A tabela 4 relaciona a absorvância obtida ($A_{650 \text{ nm}}$) para as diferentes concentrações de soro albumina bovina, com as quais se construiu a curva de referência (figura 9). Os valores ideais de absorvância ($A_{\text{calculada}}$) para esta reta foram obtidos por cálculo de regressão linear.

TABELA 4 - Valores de absorvância obtidos para a curva de referência de soro albumina bovina na dosagem de proteínas.

SAB (μg)	$A_{650 \text{ nm}}$	$A_{\text{calculada}}^*$
12,5	0,100	0,135
	0,103	
25,0	0,197	0,205
	0,199	
50,0	0,365	0,344
	0,372	
100,0	0,655	0,622
	0,665	
200,0	1,150	1,180
	1,165	

* Valores calculados pelo modelo de regressão linear ($Y = A + B X$).

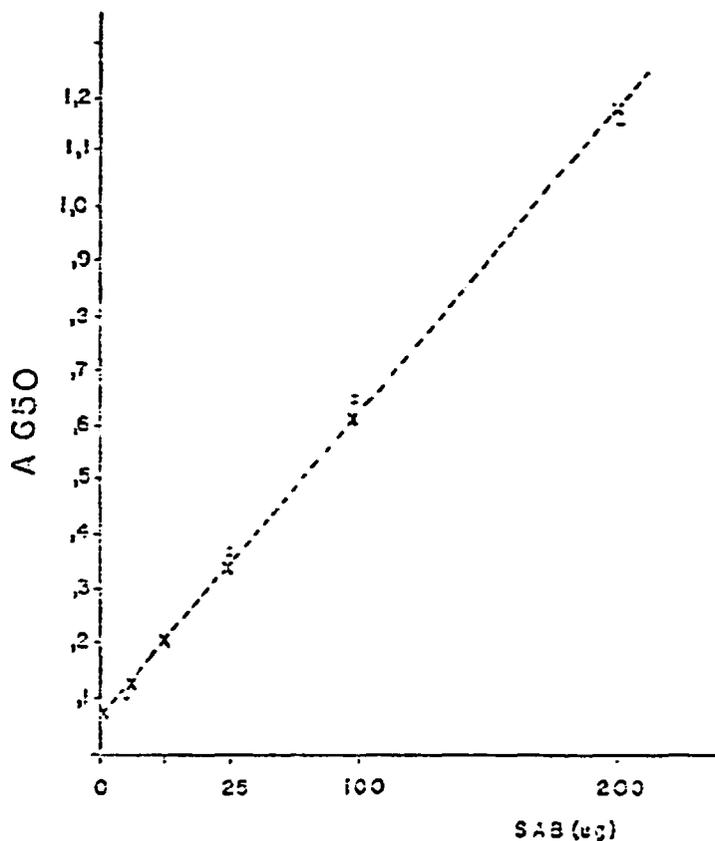
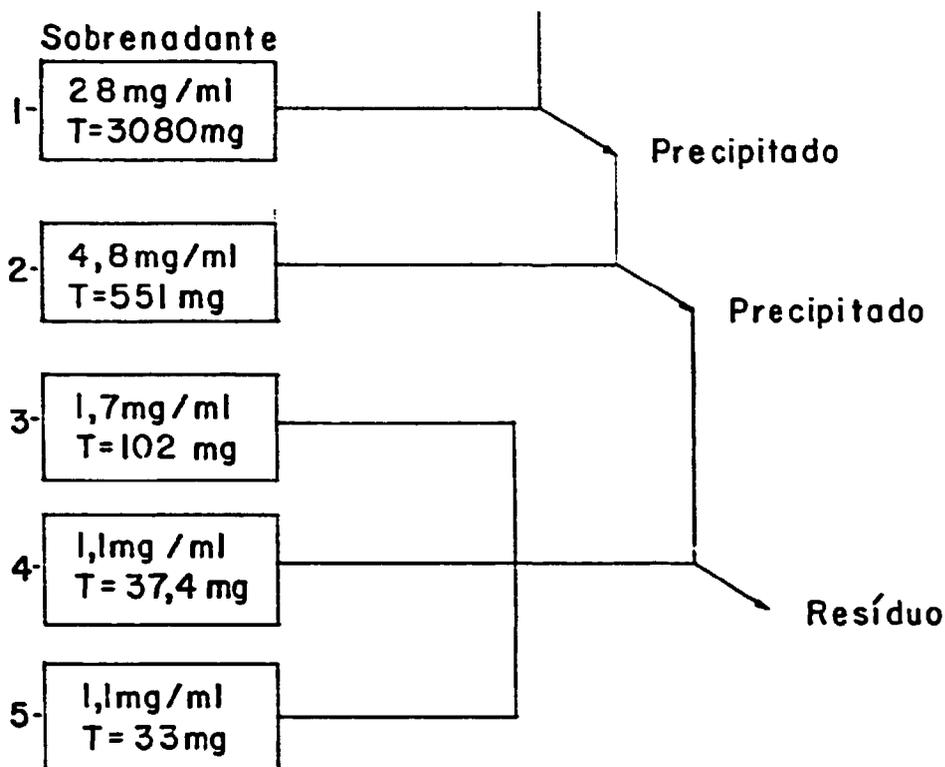


FIGURA 9 - Curva de referência, para dosagem protéica, obtida utilizando-se solução padrão de SAB 1,0 mg/ml em água destilada. Os parâmetros que a definem foram calculados por regressão linear, obtendo-se $Y = 0,065 + 5,571 X$; com um coeficiente de correlação de 0,9974.



Sobrenadante 1 a 5 \rightarrow pH 6,2 + NaOH 1 N \rightarrow pH 7,00 Centrifugação

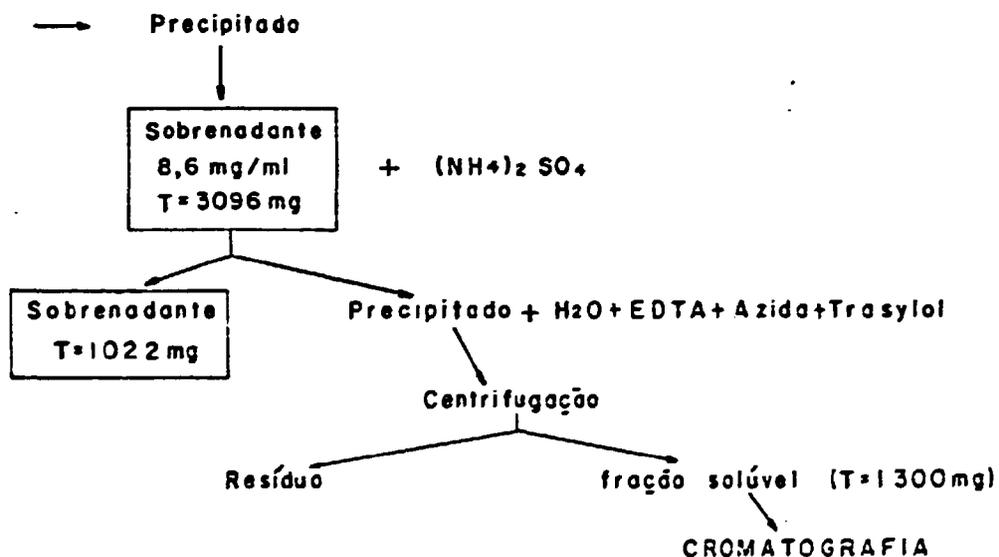


FIGURA 10 - Esquema do processo de extração do HCH a partir de hipófises humanas congeladas, indicando-se o conteúdo protéico recuperado em cada passada metodológica.

1.2 - EXTRAÇÃO

Esquematizou-se, na figura 10, a concentração e o conteúdo protéico total extraído durante o processo. É de nosso interesse salientar neste resultado que concluída a homogeneização e lavagem do tecido hipofisário, tem-se a solubilização de aproximadamente 10 gramas de proteínas por grama de hipófises processadas. Esta observação será um dado de referência para extrações futuras.

1.3 - PURIFICAÇÃO

A fração precipitada com sulfato de amônio 50% e solubilizada com água destilada, contendo os inibidores enzimáticos e os de crescimento bacteriano, foi purificada em uma coluna de Sephadex G100 grosso. O perfil cromatográfico resultante da purificação está na figura 11. Separaram-se quatro regiões protéicas indicadas como PI, PII, PIII e PIV; sendo que, o pico PIII corresponde ao monômero de HCH.

1.4 - CÁLCULO DE RENDIMENTO PARA O MONÓMERO DE HCH

Considerando-se os valores das quatro cromatografias calculou-se uma relação percentual comparando-se o conteúdo protéico de cada pico (Tabela 5), onde se observa que o monômero de HCH (PIII) é o principal constituinte da amostra purificado em Sephadex.

As frações componentes de cada pico nas

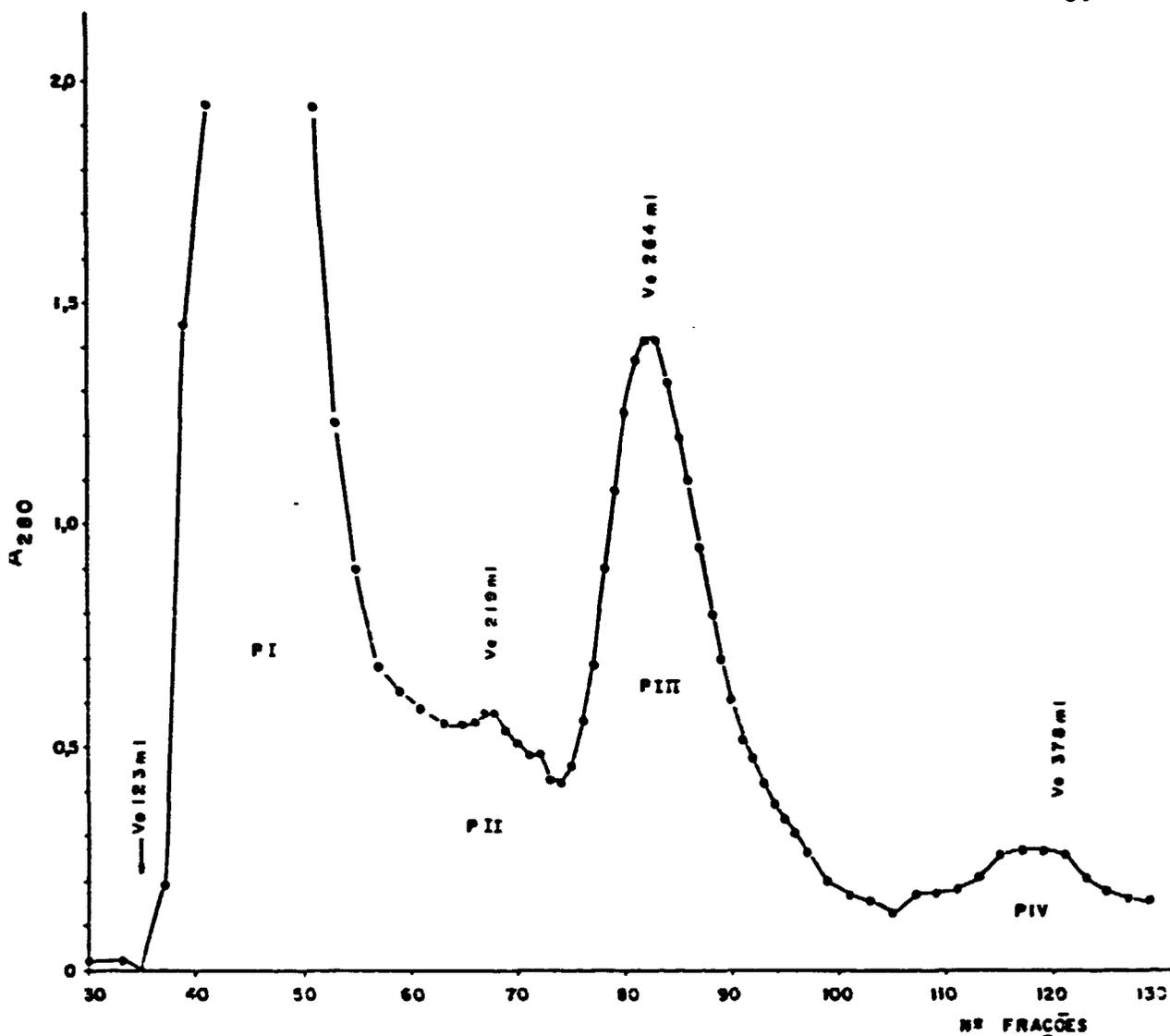


FIGURA 11 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100 GROSSO PARA ISOLAMENTO DO HCH. O volume da amostra foi de 10 ml e foram coletadas frações de 3,5 ml nos tubos 1 a 35 e 3,0 ml a partir do tubo 36, com o fluxo de 4,6 ml/hora do eluente tampão fosfato-glicina 0,5 M pH 7,2. Utilizou-se uma coluna refrigerada de 2,5 x 80 cm. Esta amostra purificada foi proveniente da fração precipitada com sulfato de amônio 50%, a qual foi solubilizada em água destilada contendo 5 mM EDTA, 50 UI/ml Trasylol e 0,02 % azida sódica. Separou-se as frações componentes de cada pico da seguinte maneira: PI do tubo 36 ao 59 (72 ml); PII do tubo 60 ao 71 (36 ml); PIII do tubo 72 ao 95 (72 ml) e PIV do tubo 96 ao 130 (105 ml).

outras três cromatografias foram agrupadas de forma semelhante à descrita para o perfil da Figura 11.

TABELA 5 - Conteúdo protéico e relação percentual dos picos isolados nas cromatografias em Sephadex G-100 grosso.

	CONTEÚDO PROTÉICO (mg)*	PORCENTAGEM
PI	416	33
PII	263	21
PIII	524	42
PIV	56	4
Total	1.259	100

* Esta determinação baseou-se no método descrito no item II.1.2.3.

O rendimento da extração pôde ser calculado relacionando-se o conteúdo protéico do PIII com o peso e o número de hipófises processadas:

PIII - 524 mg de HCH por 30 gramas de hipófises

ou 17,5 mg de HCH por grama de hipófises,

ou 8,7 mg de HCH por hipófise.

2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A preparação de HCH foi avaliada quanto à sua composição em variante de carga e de massa por meio das técnicas de eletroforese em gel de poliácrlamida, respectivamente, EGPA 7% e SDS-EGPA 10%.

2.1 - EGPA 7%

Nesta técnica a reprodutibilidade interensaios foi avaliada por intermédio do Rm do monômero de SAB. Os valores obtidos em 17 determinações interensaios estão na Tabela 6. Obteve-se a média 0,767, com o desvio padrão de 0,520 e o coeficiente de variação de 6,8%. O valor 0,767 é considerado o Rm de referência da SAB no cálculo do fator de correção (item II.2.2.1).

No perfil eletroforético do controle de SAB (Figura 12) observa-se a presença do monômero e do dímero. Neste ensaio a SAB foi analisada em duplicata, resultando nos valores de Rm 0,688 e 0,687. A razão entre o Rm de referência e estes dados fornece um fator de correção médio de 1,1156.

$$\frac{0,767}{0,688} = 1,1148$$

$$\frac{0,767}{0,687} = 1,1164$$

Fator de correção = 1,1156

TABELA 6 - Valores de Rm do monômero de SAB em diferentes corridas em EGPA 7%

Ensaio nº	Rm	Ensaio nº	Rm	Ensaio nº	Rm
1	0,814	7	0,762	13	0,849
2	0,743	8	0,761	14	0,667
3	0,815	9	0,688	15	0,687
4	0,737	10	0,773	16	0,809
5	0,757	11	0,848	17	0,762
6	0,764	12	0,748		

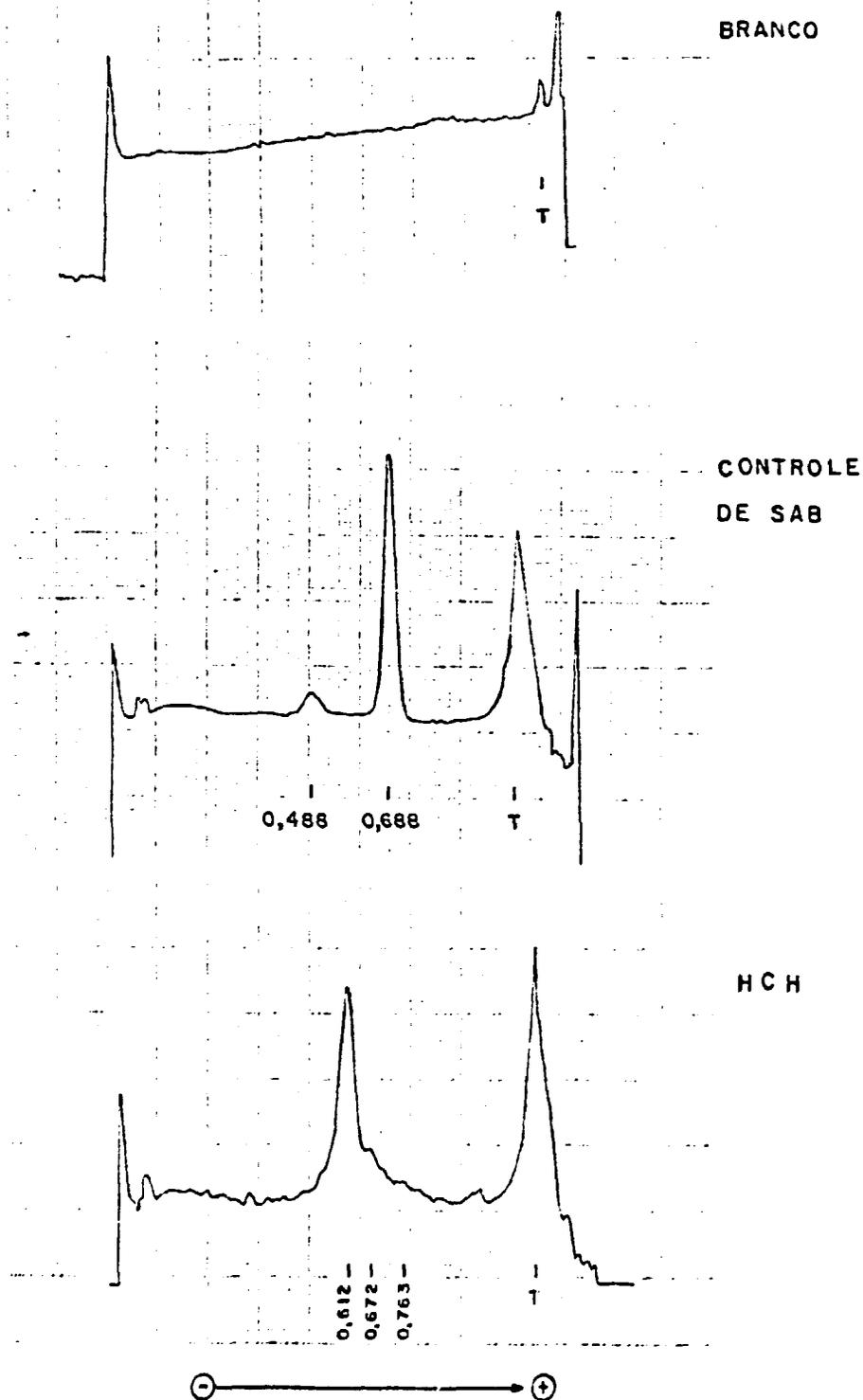


FIGURA 12 - Perfil eletroforético (EGPA 7%) do branco, controle de SAB e monômero de HCH. Os gráficos foram obtidos por leitura em densitômetro. Utilizou-se azul de bromofenol como traçador (T). Estão indicados os R_m corrigidos dos principais componentes observados na preparação de HCH total.

A análise em EGPA 7% do HCH purificado permitiu visualizar a presença de pelo menos três componentes neste hormônio, sendo que a variante íntegra constitui 68% da preparação, calculado pela relação de área sobre os picos.

O fator de correção obtido com o controle de SAB foi utilizado para "normalizar" o R_m das variantes de carga do HCH obtendo-se, assim, R_m 0,612; 0,672 e 0,763 para os componentes assinalados na Figura 12.

2.2 - SDS-EGPA 10%

No ensaio de SDS-EGPA 10% a preparação de HCH total se mostrou homogênea mesma na presença de uréia 8 M, o que exclui a possibilidade da presença de variantes de massa. Esta observação se repetiu para a variante 22 K (Figura 13).

Utilizando-se a migração relativa obtida para os padrões protéicos com diferentes pesos moleculares (Tabela 7) foi possível calcular o PM do HCH. Uma vez que as preparações de HCH se mostraram igualmente homogêneas neste sistema de análise utilizaram-se os R_m obtidos para as quatro amostras ensaiadas simultaneamente para o cálculo do PM. Obteve-se 21.587 d, com o desvio padrão de 196.

A reta obtida entre R_m e o logarítmo do PM dos padrões protéicos (Figura 14) possui o coeficiente de correlação 0,9947 e os seguintes parâmetros: $Y = 4,997 - 1,135 R_m$.

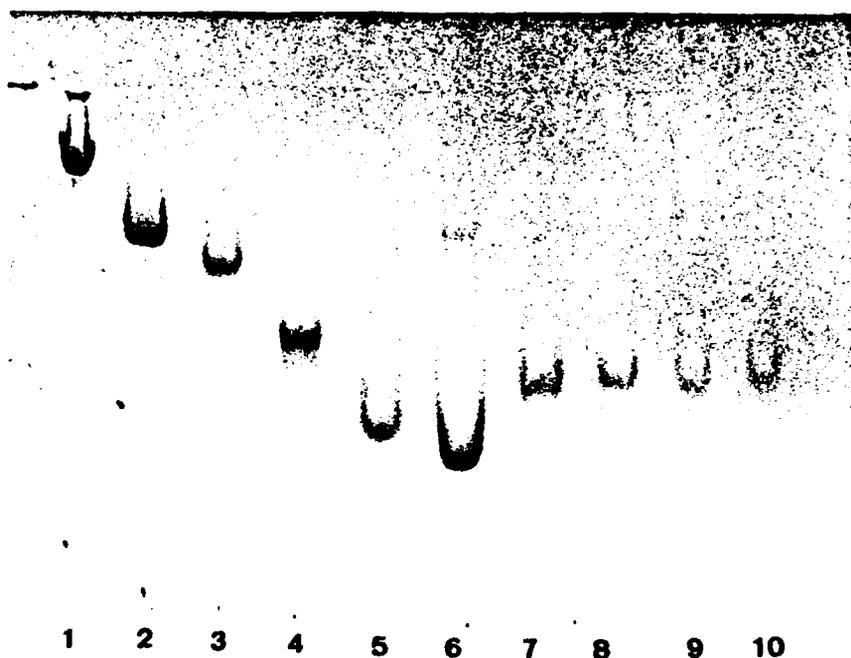


FIGURA 13 - Padrão eletroforético em SDS-EGPA 10% de proteínas de peso molecular conhecido, HCH e HCH-22 K. Cada proteína é identificada por seu número na tabela 7. A eletroforese foi desenvolvida em tampão fosfato de sódio 0,2 M com 0,2% SDS, 140 V e 210 mA. Verifica-se que a preparação total e a variante 22 K são igualmente homogêneas, na presença e ausência de uréia 6M.

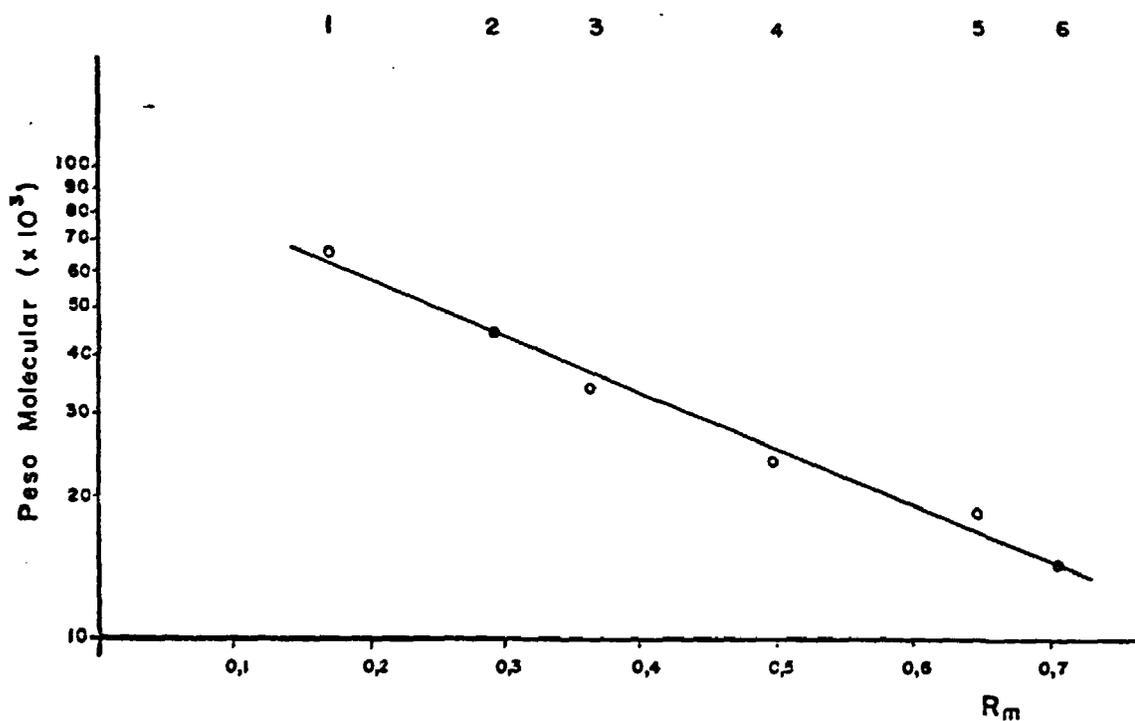


FIGURA 14 - Representação gráfica do logaritmo do peso molecular dos padrões proteicos versus sua mobilidade relativa (R_m) em SDS-EGPA 10%. Cada proteína é identificada por seu número na tabela 7.

TABELA 7

MIGRAÇÃO RELATIVA em SDS-PAGE 10 %

PROTEÍNAS	P.M. (dalton)	Log (P.M.)	MÉDIAS DE MIGRAÇÃO PROTEÍNA TRACADOR		R _m
1. SSB	66.000	4,820	1,50	8,95	0,168
2. Ovalbumina	45.000	4,653	2,62	8,95	0,293
3. Pepsina	34.700	4,540	3,15	8,70	0,302
4. Tripsina	24.000	4,380	4,30	8,80	0,499
5. Lactesolulina	18.400	4,265	5,80	8,95	0,648
6. Lisosina	14.300	4,155	6,31	8,95	0,705
7. PCV-total + uréia	21.318*	4,329	5,95	8,95	0,564
8. PCV-total	21.789*	4,338	4,98	8,95	0,556
9. PCV-22R + uréia	21.611*	4,335	5,00	8,95	0,559
10. PCV-22R	21.631*	4,335	4,95	8,95	0,553

* valores calculados a partir da curva de calibração obtida com as proteínas padrões (1 a 6).

3. ISOELETROFOCALIZAÇÃO

3.1 - ISOLAMENTO DA VARIANTE 22 K

Na isoeletrofocalização foram separadas diversas variantes de carga do HCH; sendo que a melhor resolução foi obtida para a variante 22 K (figura 15).

As anfolinas utilizadas nesta separação não apresentam absorção em 280 nm ($A_{280\text{nm}}^{1\%}$ é 0,04 segundo especificações do fabricante), logo o perfil obtido, se deve aos componentes protéicos da amostra.

Os valores de absorvância e de pH medidos estão na tabela 8. A linearidade no gradiente de pH foi obtida no intervalo de 4 a 6.

As frações assinaladas com X na figura 15 foram analisadas em EGPA 7%; os perfis obtidos nesta técnica (figura 16) evidenciam a distribuição de variantes do HCH ao longo do gradiente de pH gerado na coluna de isoeletrofocalização.

Separou-se a região entre as frações 31 a 37 onde se localiza a variante 22 K. Os valores de pH nestes tubos variaram de 5,27 a 5,12, sendo que onde está localizada a maior concentração de proteína o pH é 5,12, o que permite tomar este valor como o PI da variante.

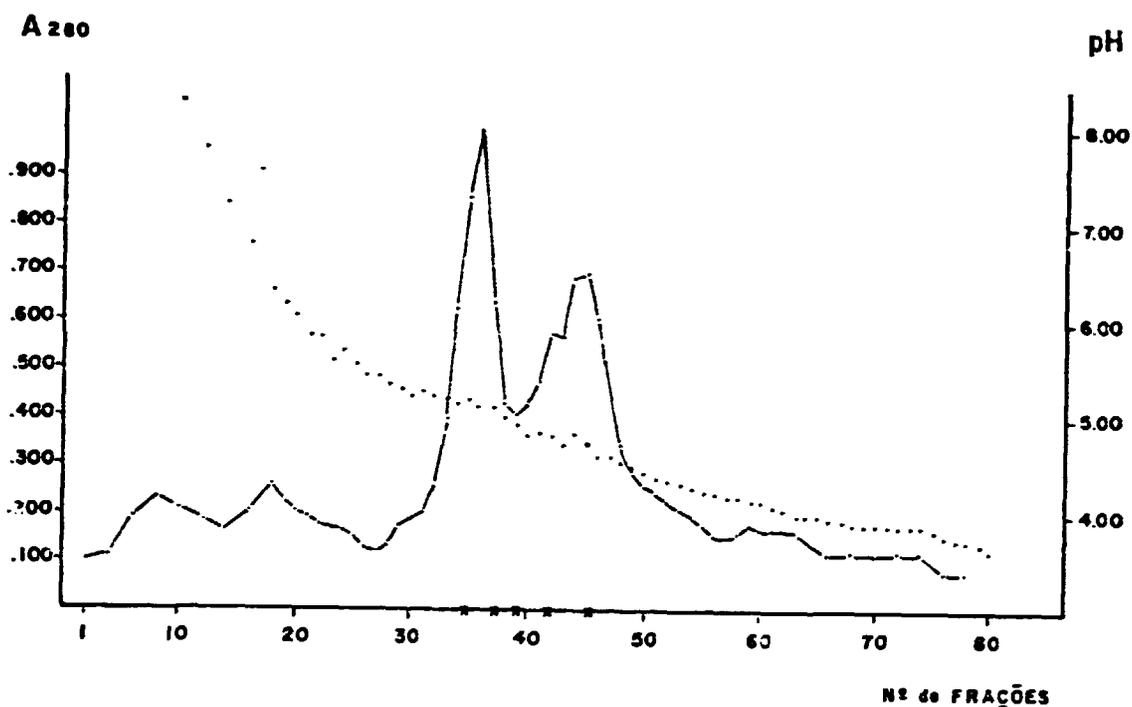


FIGURA 15 - PERFIL DE SEPARAÇÃO DE VARIANTES DO HCH POR ISOELETRIFICAÇÃO. O volume da amostra foi 50 ml (25 mg) e foram coletadas frações de 1,1 ml, com o fluxo de 0,5 ml/minuto. No perfil observa-se a separação de variantes do HCH por diferença de carga, no gradiente de pH gerado (entre os valores 4 a 6). A voltagem aplicada variou de 300 a 600 V durante 72 horas e manteve-se por mais 20 horas a voltagem final. Toda a eletroforese ocorreu à temperatura de 4°C. As frações assinaladas com x foram analisadas em EGPA 7%.

TABELA 8 - Valores de pH e absorvância do perfil de eluição da coluna de isoeletrofocalização.

FRACÇÃO Nº	pH	A _{260 nm}	FRACÇÃO Nº	pH	A _{260 nm}
2	9,98	0,100	30	4,93	0,410
4	9,94	0,110	31	4,92	0,425
6	9,80	0,100	31	4,90	0,430
8	9,40	0,235	32	4,83	0,575
10	8,23	0,210	32	4,70	0,570
12	7,80	0,185	34	4,35	0,690
14	7,20	0,162	35	4,75	0,700
16	6,90	0,205	36	4,60	0,610
18	6,30	0,260	37	4,60	0,430
19	6,15	0,320	38	4,55	0,345
20	6,05	0,205	39	4,50	0,325
21	5,83	0,188	50	4,16	0,260
22	5,80	0,175	51	4,40	0,215
23	5,57	0,170	52	4,30	0,325
24	5,70	0,160	53	4,35	0,210
25	5,54	0,150	54	4,30	0,300
26	5,45	0,138	55	4,30	0,175
27	5,45	0,133	56	4,35	0,155
28	5,35	0,135	57	4,30	0,155
29	5,30	0,175	58	4,20	0,160
30	5,22	0,100	59	4,15	0,175
31	5,27	0,205	60	4,12	0,170
32	5,23	0,200	61	4,10	0,170
33	5,22	0,400	62	4,05	0,170
34	5,15	0,600	63	4,00	0,165
35	5,20	0,800	64	3,95	0,125
36	5,10	1,000	65	3,90	0,125
37	5,10	0,610	71	3,80	0,120
38	5,00	0,430			

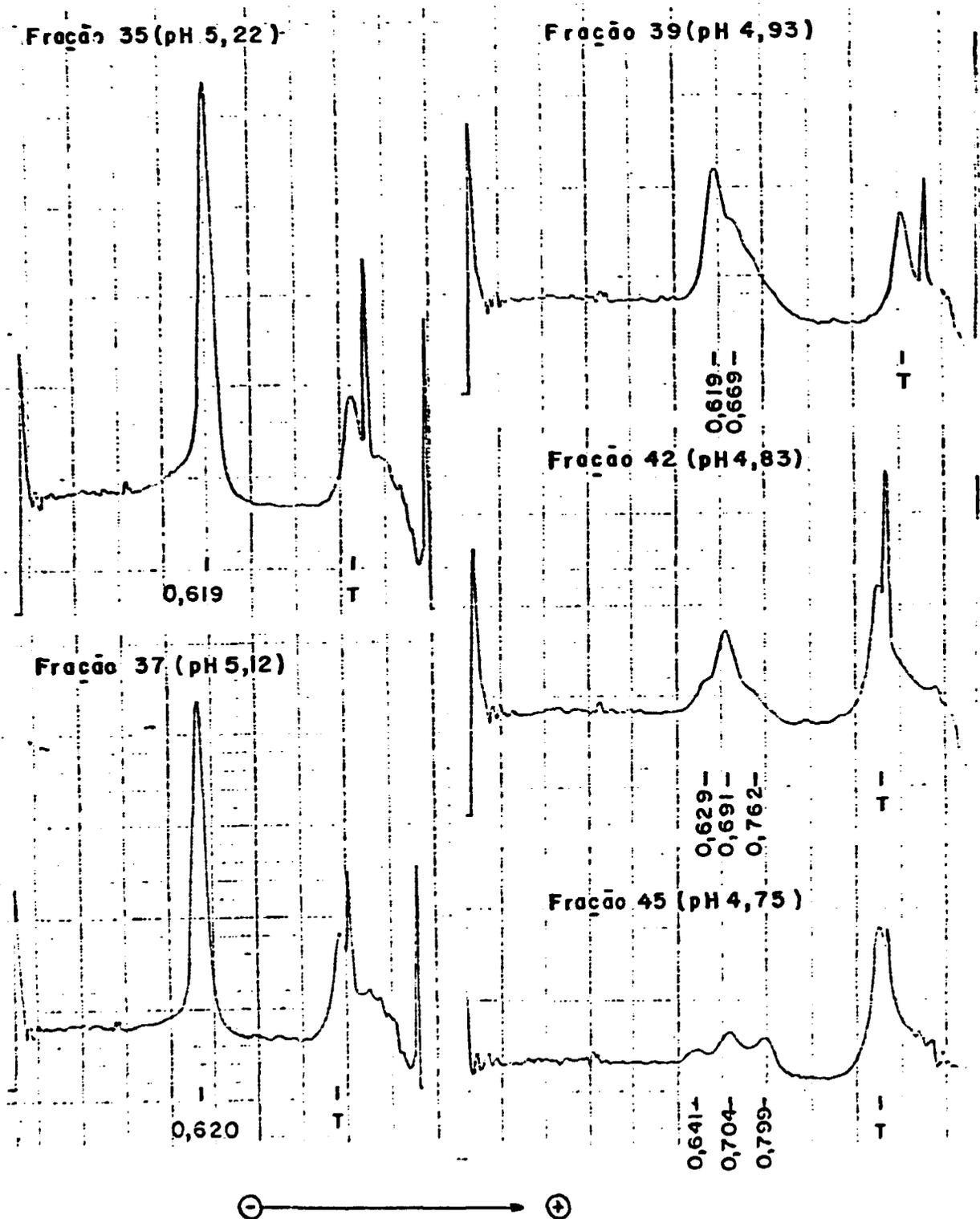


FIGURA 16 - ANÁLISE EM EGPA 7% DAS FRAÇÕES ASSINALADAS NO PERFIL DA ISOELETRIFOCALIZAÇÃO: Os perfis eletroforéticos foram obtidos pela leitura dos géis em densitômetro, após 30 minutos de fixação em TCA 12,5%. Por meio desta técnica é possível visualizar a separação das variantes do HCH no gradiente de pH gerada durante a isoeletrifocalização, e a boa resolução para a variante íntegra (frações 31 a 37). Os R_m expressos na figura foram corrigidos com o fator 1,0833 (R_m da SAB neste ensaio foi 0,709).

3.2 - CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-50 FINO

A separação da variante 22 K dos reagentes utilizados para o seu isolamento na isoeletrofocalização (anfolinas e sacarose) foi possível por cromatografia em Sephadex G-50 fino, obtendo-se dois picos bem resolvidos (figura 17). O pico das anfolinas, de peso molecular menor (V_e 33,4 ml), foi revelado pela absorvância obtida em 550 nm após a reação de biureto. A absorvância medida em 280 nm diretamente nas frações eluídas da coluna forneceu a posição da proteína no perfil (V_e 18,6 ml).

4. IDENTIFICACAO DO AMINOÁCIDO $-NH_2$ TERMINAL

A reação para a identificação do grupo $-NH_2$ terminal evidencia apenas um aminoácido. Na cromatografia ascendente em placa de poliamida observamos apenas uma mancha fluorescente, na posição de DNS-Phe. Tal fato ocorreu nas placas em que dispunhamos a amostra e o padrão na mesma posição e em uma única face da placa, como na análise em que estavam em faces opostas.

Os produtos de reação DNS-OH e DNS- NH_2 não interferiram na análise do resultado pois foram facilmente identificados por apresentarem uma posição característica e uma pequena diferença na coloração (figura 13).

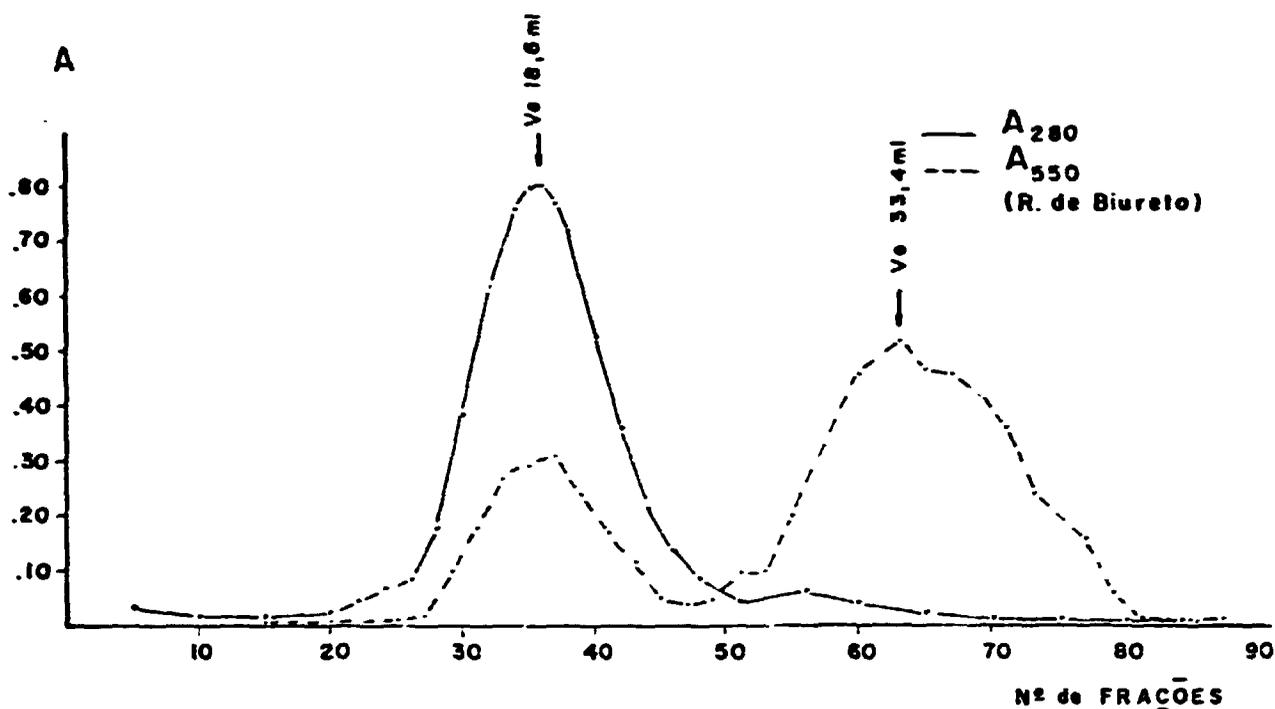


FIGURA 17 - PEFIL CROMATROGRÁFICO DA FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-50 FINO DA VARIANTE 22 K ISOLADA POR ISOELETROFOCALIZAÇÃO.

O volume da amostra foi de 5 ml e foram coletadas frações de 0,53 ml, com o fluxo de 0,2 ml/minuto do eluente bicarbonato de amônio 0,1 M e cloreto de sódio 0,1M pH 7,8. Utilizou-se uma coluna refrigerada ($5-8^{\circ}\text{C}$) de 1,5 x 20 cm. O pico de eluição das anfolinas (V_e 33,4 ml) foi visualizado apenas após a reação de biureto.

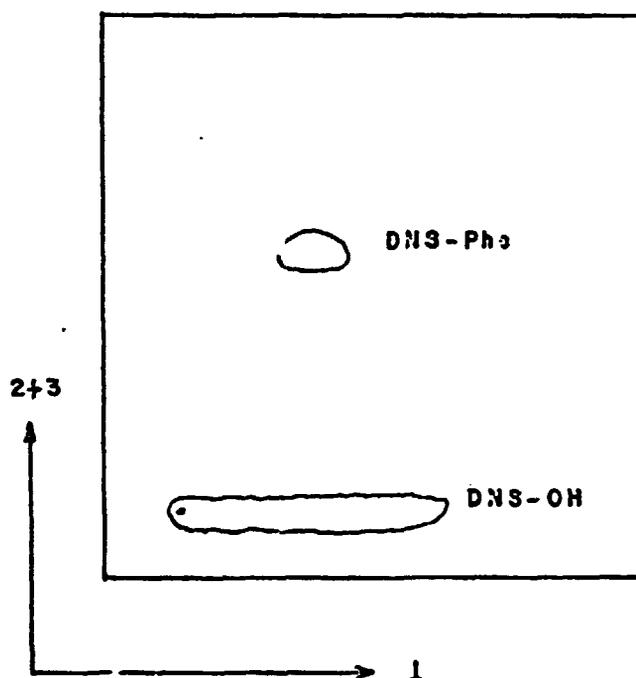


FIGURA 18 - Resultado da cromatografia em camada delgada para identificação do aminoácido $-NH_2$ terminal após a reação com cloreto de dansila. A cromatografia ascendente, foi realizada em placa de poliamida (7,5 x 7,5 cm) e em três sistemas de solvente. O primeiro foi ácido fórmico 1,5% (v/v); o segundo, benzeno-ácido acético 9:1 (v/v) e o terceiro, acetato de etila-metanol-ácido acético (20:1:1). O sentido de cada corrida esta representado no esquema acima.

5. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS -SH

A reação de Ellmann com o padrão de cisteína foi positiva, indicada por uma coloração amarela.

As amostras de HCH e HCH-22 K permaneceram incolores, de forma semelhante ao branco do ensaio, tanto na presença como na ausência de uréia 6 M. Isto demonstra que não há grupos -SH livres nas proteínas nas condições analisadas.

6. ESPECTRO DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA E COEFICIENTE DE EXTINÇÃO.

O espectro de absorção da variante 22 K no ultravioleta foi obtido para o intervalo de comprimento de onda entre 350 e 230 nm (figura 19). Observa-se a maior absorção (0,4224) em 277 nm. Utilizamos este dado para calcular o $E_{277 \text{ nm}}$ e o $E_{277 \text{ nm}}^{1\%}$, conforme descrito no item II.6.1. De forma análoga estes índices foram determinados para 280 nm, onde a absorção obtida foi 0,4143.

$$E_{277 \text{ nm}} = 14.888$$

$$E_{277 \text{ nm}}^{1\%} = 6,92$$

$$E_{280 \text{ nm}} = 14.602$$

$$E_{280 \text{ nm}}^{1\%} = 6,79$$

7. PROVAS DE ATIVIDADE

7.1 - RADIOIMUNOENSAIO

O HCH- ^{125}I utilizado no RIE e obtido na reação de radioiodação, apresentou uma atividade específica de 39,8 uCi/ μg .

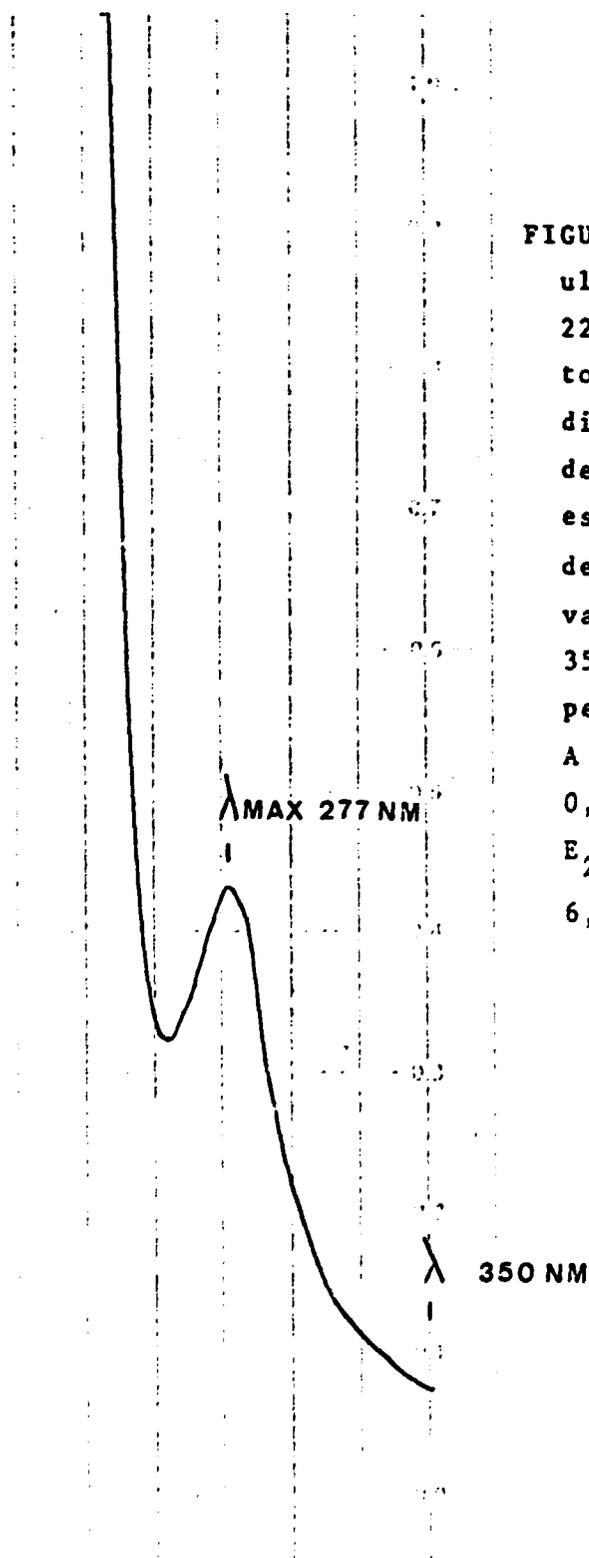


FIGURA 19 - Espectro de absorção no ultravioleta. A amostra de HCH-22 K foi dissolvida em bicarbonato de amônio 0,1M e cloreto de sódio pH 8,0, com uma concentração de 0,610 mg/ml. Na leitura do espectro utilizou-se o intervalo de absorvância de 0 a 1,0, com uma variação de λ de 1,0 nm/seg, entre 350 e 230 nm. A velocidade do papel foi 50 nm/2,54 cm.

A absorvância máxima observada foi 0,4224, em 277 nm. Calculando-se $E_{277 \text{ nm}}$ temos 14,888 e $E_{277 \text{ nm}}^{1\%}$, 6,92.

As ligações inespecíficas obtidas foram 3,7% (tubos 1, 2 e 3) e 3,6% (tubos 19, 20 e 21). Estes valores foram subtraídos das ligações totais obtidas para as diferentes doses de HCH e da variante 22 K. De forma semelhante, calcularam-se as ligações específicas máximas (B_0), obtendo-se 52% (tubos 4, 5 e 6) e 54% (tubos 22, 23 e 24).

Na representação gráfica (figura 20), assim como na análise estatística, utilizou-se a relação $B/B_0 \times 100$ para expressar as ligações específicas obtidas.

As curvas dose resposta da preparação total de HCH e da variante 22 K obtidas no RIE, apresentaram uma porção linear entre as doses 5 e 50 ng/ml (figuras 21 e 23). A este intervalo de dose aplicou-se o modelo:

$$\text{Ligado} = A + B \ln (\text{Dose})$$

e calculou-se o ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto por análise de variância (tabelas 9 e 10).

Verificou-se, inicialmente, se a variável "ligado" ou ligações específicas obtidas dependem ou não significativamente da variável $\ln(\text{Dose})$ por meio do Teste F. A $\text{Prob} > F$ é o nível de significância com que se rejeita a hipótese de independência ou seja, $p > 0,0001$ para ambas as curvas.

O teste T, com $p > 0,0001$, rejeita a hipótese de nulidade dos parâmetros declividade da reta e ponto de intersecção com a ordenada.

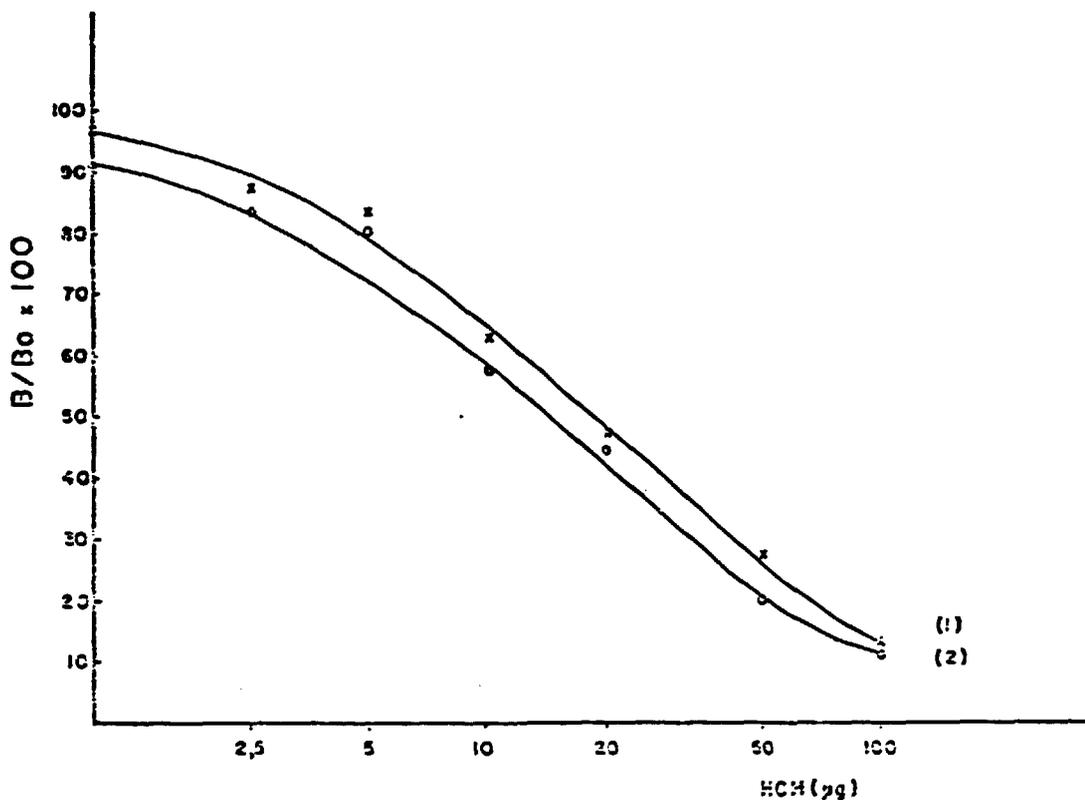


FIGURA 20 - Curva padrão do ensaio radioimunológico para avaliação das atividades das preparações de HCH (curva 1) e variante 22 K (curva 2). Para ambos os hormônios ensaiados foram utilizadas doses entre 2,5 e 100 ng/ml dos antígenos não marcados. A diluição do HCH-¹²⁵I foi 1:200 (25.000 cpm/tubo) e do anti-soro, 1:250.000. A separação das frações livre e ligada foi feita por meio da precipitação do ligado.

TABELA 9 - RIE da preparação total de HCH. Análise de variância do ajuste da curva dose resposta ao modelo: Ligado = A + B Ln(Dose).

FORTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F	PROB.F
MODELO	1	3372,797	3372,797	109,318	0,0001
RESÍDUO	6	185,118	30,853		
TOTAL	7	3557,915			
ERRO PADRÃO DO AJUSTE		5,554	r-QUADRADO	0,9480	
DF-50		55,324			
C.V.		10,040			
VARIÁVEL	G.L.	PARÂMETROS ESTIMADOS	ERRO PADRÃO	T PARA H ₀ : PARÂMETROS=0	PROB> T
INTERSEC.	1	120,512	6,537	18,436	0,0001
DECLIVID.	1	-24,0996	2,305	-10,456	0,0001
DOSE (ug)	LIGADO (Vlr Observ.)	LIGADO (Vlr calc.)	RESÍDUO		
5,0	84,810	81,725	3,085		
	82,220	81,725	0,49407		
10,0	71,300	65,020	6,280		
	54,449	65,020	-10,580		
20,0	50,000	48,316	1,684		
	45,190	48,316	-3,126		
50,0	29,440	26,234	3,206		
	25,190	26,234	-1,044		
SOMA DOS RESÍDUOS			1,40661E-12		
SOMA DO QUADRADO DOS RESÍDUOS			185,1181		

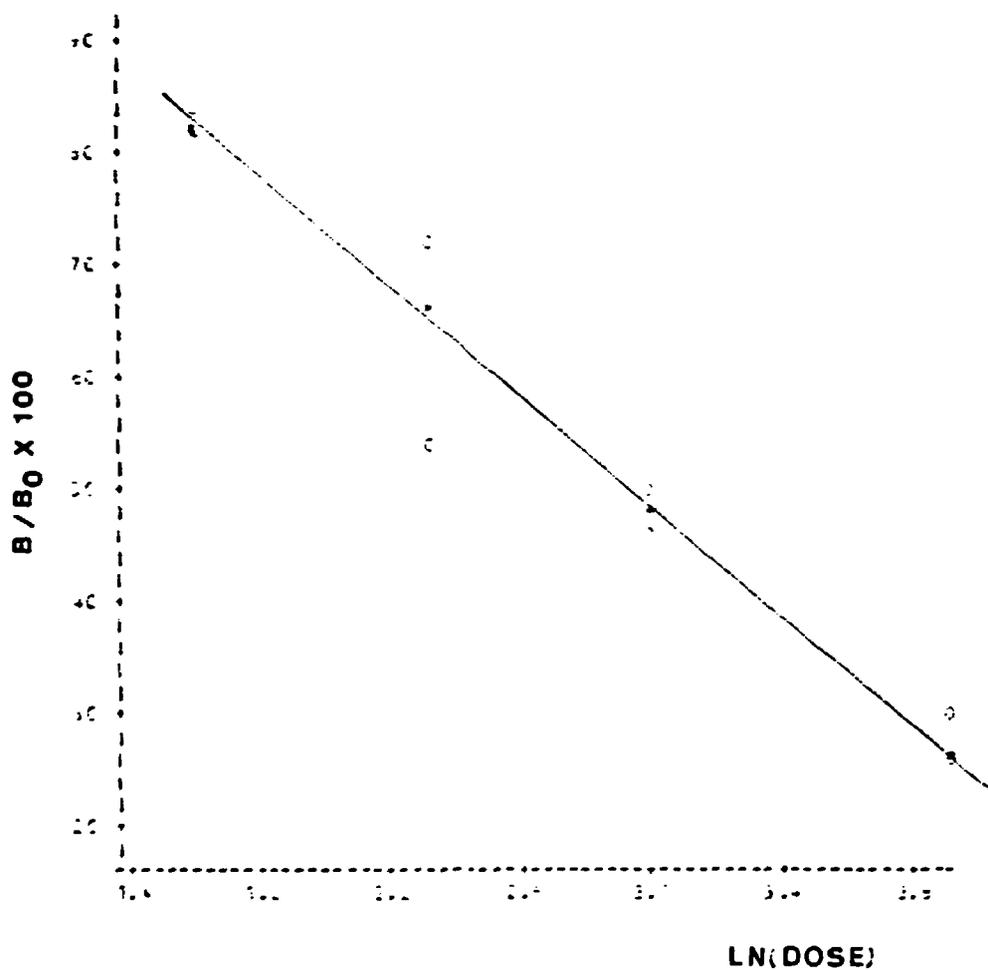


FIGURA 21 - Curva dose resposta, em escala semi-logarítmica, para o RIE da preparação total de HCH. Considerou-se apenas a porção linear da curva compreendida entre as doses entre 5 e 50 ng/ml (ou em Ln 1,609 e 3,912).

0 → valores observados

* → valores calculados

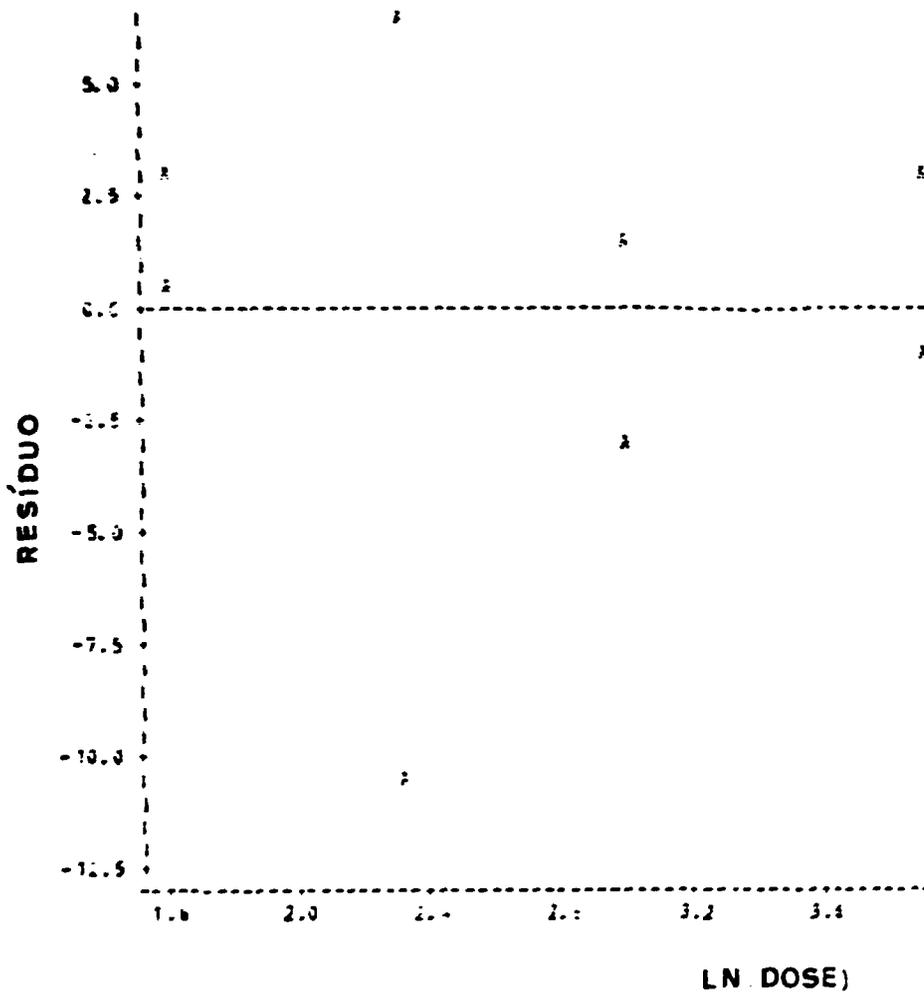


FIGURA 22 - Análise gráfica dos resíduos obtidos para a curva dose resposta do RIE da preparação total de HCH. Observa-se uma dispersão aleatória dos resíduos, sendo que a maior diferença entre o valor observado e o calculado foi obtida na dose 10 ng/ml.

**TABELA 10 - RIE da variante 22 K. Análise estatística do ajuste da curva dose resposta ao modelo:
Ligado = A + B Ln(dose).**

FORTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F	PROB>F
MODELO	1	3759,207	3759,207	362,352	0,0001
RESÍDUO	6	62,247	10,375		
TOTAL	7	3821,454			
ERRO PADRÃO DO AJUSTE		3,2269	r-QUADRADO	0,9937	
DE-50		50,8100			
C.V.		6,3392			
VARIÁVEL	G.L.	PARÂMETROS ESTIMADOS	ERRO PADRÃO	T PARA PA : PARÂMETROS=C	PROB> T
INTERSEC.	1	119,631	3,7905	31,561	0,0001
DECLIVID.	1	-25,4427	1,3365	-19,035	0,0001
DOSE (uc)	LIGADO (Vlr. observ.)	LIGADO (Vlr. calc.)	RESÍDUO		
5,0	82,590 78,990	78,553 78,683	3,907 0,29737		
10,0	55,560 59,260	61,047 61,047	-5,487 -1,787		
20,0	42,530 46,670	43,412 43,412	-0,88153 3,258		
50,0	21,480 19,440	20,099 20,099	1,381 -0,65952		
SOMA DOS RESÍDUOS			2,206647-13		
SOMA DO QUADRADO DOS RESÍDUOS			62,2468		

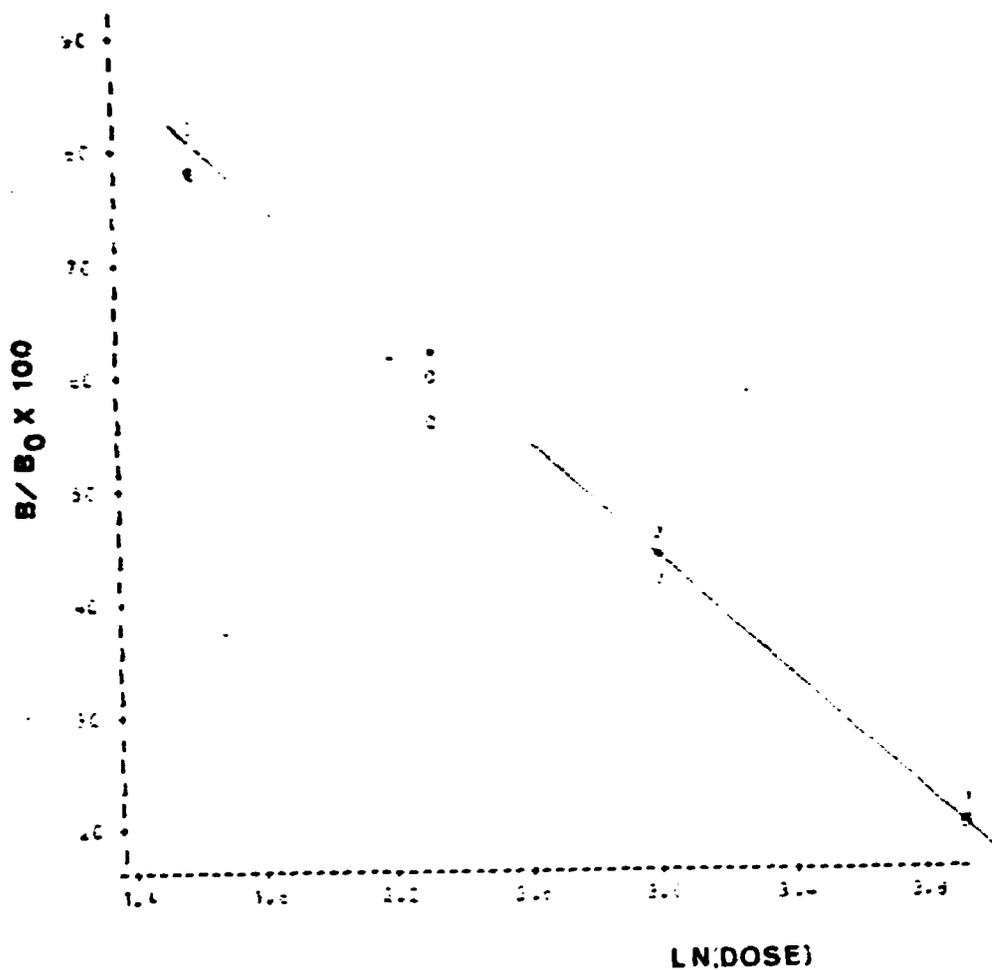


FIGURA 23 - Curva dose resposta, em escala semi-logarítmica, para o RIE da variante 22 K isolada. Considerou-se apenas a porção linear da curva compreendida entre as doses 5 e 50 ng/ml (ou em Ln, 1,609 e 3,912)

* valores calculados O→ valores observados

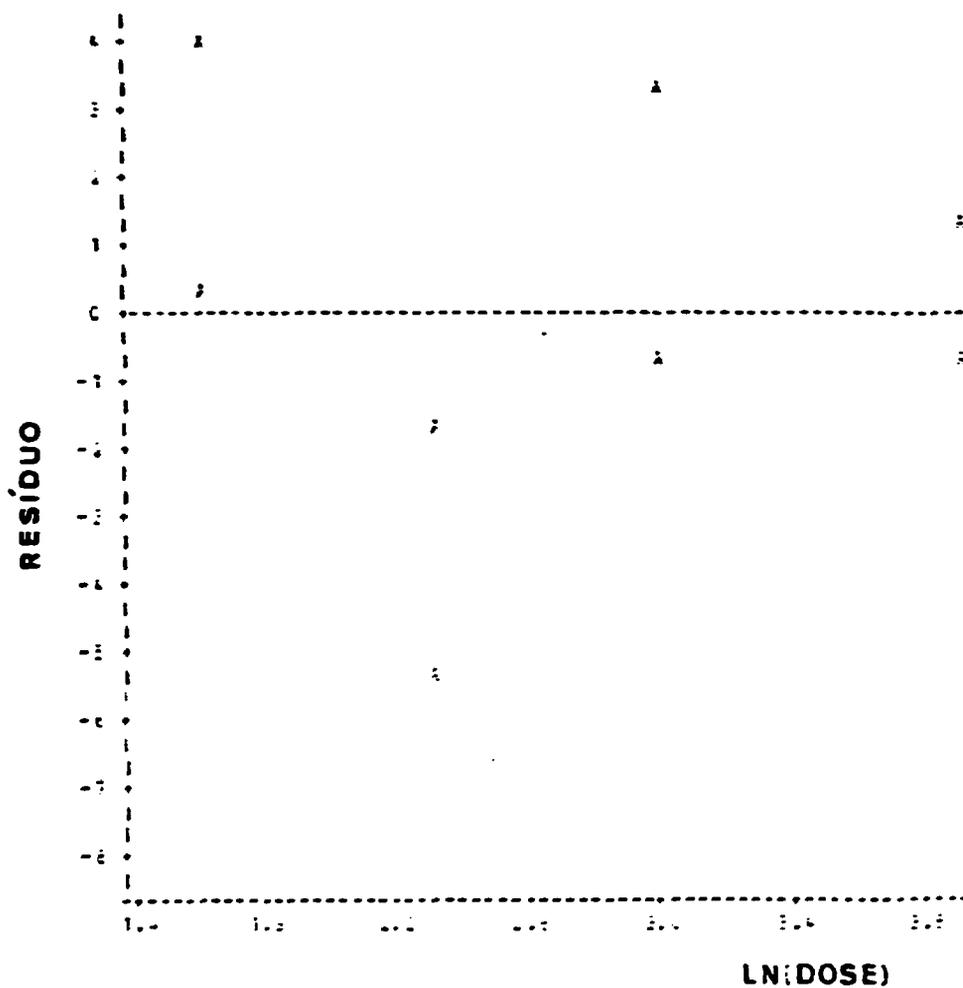


FIGURA 24 - Análise gráfica dos resíduos obtidos para a curva dose resposta do RIE da variante 22 K. Observa-se uma dispersão aleatória dos resíduos.

O quadrado do coeficiente de correlação demonstra em que porcentagem o modelo proposto explica a variação dos dados. No caso da preparação total de HCF explica 94,08% e no caso da variante 22 K, 98,37%.

A análise gráfica dos resíduos (figuras 22 e 24) demonstra a dispersão aleatória deles.

Duas retas são consideradas paralelas quando apresentam o mesmo coeficiente angular, ou seja, quando $B_1 = B_2$ nas respectivas equações $Y = A_1 + B_1 X$ e $Y = A_2 + B_2 X$.

Para verificar o paralelismo das curvas dose resposta, utilizou-se o teste F entre a soma de quadrados dos resíduos dos modelos completo e reduzido. Para o modelo completo (duas retas com os coeficientes A_1 , B_1 e A_2 , B_2) tem-se o quadro de variância seguinte:

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO
Modelo	3	7.213,499	2.404,499
Resíduo	12	247,365	20,614
TOTAL	15	7.460,865	

Para o modelo reduzido (duas retas com os coeficientes A_1 , B e A_2 , B) tem-se o quadro de variância seguinte:

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO
Modelo	2	7.208,262	3.604,131
Resíduo	13	252,603	19,431
TOTAL	15	7.460,865	

O valor de F é obtido pela relação:

$$F = \frac{(SQR_R - SQR_C) / (GL_R - GL_C)}{QMR_C}$$

onde:

SQR_R é a soma de quadrados dos resíduos do modelo reduzido;

SQR_C é a soma de quadrados dos resíduos do modelo completo;

GL_R são os graus de liberdade do modelo reduzido;

GL_C são os graus de liberdade do modelo completo;

QMR_C é o quadrado médio dos resíduos para o modelo completo.

$$F = \frac{(252,603 - 247,365) / (13-12)}{20,614}$$

$$F = 0,254$$

O valor de tabela para $F_{1,12}$ é 11,75, com o nível de significância $p = 0,5\%$. O F calculado é menor do que o F crítico, o que permite aceitar a hipótese de igualdade dos coeficientes angulares. Se $B_1 = B_2$ as duas curvas dose resposta são paralelas.

7.2 - ENSAIO BIOLÓGICO

No ensaio biológico realizado em ratos Wistar, fêmeas, hipofisectomizados, observamos o aumento de peso corpóreo nos grupos tratados com a variante 22 K, enquanto o grupo controle não demonstrou este efeito (tabela 11). As médias das diferenças de peso corpóreo dos

TABELA 11 - Ensaio de aumento de peso corpóreo em ratos hipofisectomizados para a variante 22 K. Os animais foram tratados durante 9 dias com salina ou HCH-22 K 10 e 20 ug, via subcutânea.

CONTROLE					GRUPO 1 (10 ug)					GRUPO 2 (20 ug)				
N	PESO INICIAL	PESO APÓS O TRATAM.	DIFFERENÇA. (X)	X ²	N	PESO INICIAL	PESO APÓS O TRATAM.	DIFFERENÇA. (X)	X ²	N	PESO INICIAL	PESO APÓS O TRATAM.	DIFFERENÇA. (X)	X ²
1	131,5	129,1	-2,4	5,8	1	123,5	127,5	4,0	16,0	1	125,0	141,1	16,4	269,0
2	138,0	138,0	0	0	2	171,0	178,0	7,0	49,0	2	121,0	132,0	11,0	121,0
3	888,0	84,3	-3,7	13,7	3	152,0	159,5	7,5	56,3	3	129,5	145,2	15,7	246,5
4	90,5	90,7	0,2	0,04	4	96,0	101,0	5,0	25,0	4	144,0	157,7	13,7	187,5
5	138,0	140,5	2,5	6,3	5	130,5	137,0	6,5	42,5	5	120,5	131,0	10,5	110,3
6	145,5	140,0	-5,5	30,3	6	132,5	135,2	2,7	7,3	6	127,5	138,0	10,5	110,3
7	137,0	138,5	1,5	2,3	7	80,2	81,5	1,3	1,7	7	131,5	140,5	9,0	81,0
8	85,0	84,0	-1,0	1,0	8	85,2	93,0	7,8	60,8	8	104,0	117,5	13,5	82,3
9	123,0	119,0	-4,0	16,0	9	141,0	147,6	6,6	43,6	9	128,5	143,0	14,5	210,3
10	95,5	94,8	-0,7	0,5	10	144,0	150,0	6,0	36,0	10	126,5	135,7	9,2	84,6
11	99,0	94,5	-4,5	20,3	11	138,0	144,0	6,0	36,0	11	134,0	143,5	9,5	90,3

ratos antes e após o tratamento foram: para o grupo tratado com 10 ug de hormônio $5,49 \pm 2,05$ gramas; para o grupo 20 ug, $12,14 \pm 2,70$ gramas e para o grupo controle que recebeu salina, $-1,60 \pm 2,60$ gramas. (figura 25).

Na análise de variância (tabela 12) determinou-se a variação em cada tratamento e entre os tratamentos, ou seja, a variação total do ensaio. Obteve-se $F = 85,1$, portanto, maior que o $F_{\text{crítico}}$ ($F_{2,30} = 6,35$). Isto indica que as médias diferem ao nível de $p < 0,01$.

O erro padrão calculado foi 0,76. Este valor é o quociente da relação entre a raiz quadrada do quadrado médio calculado para a variação entre os tratamentos e a raiz quadrada do número de observações em cada grupo ($S_{\bar{x}} = \sqrt{QM} / \sqrt{n}$).

Para demonstrar a diferença entre todas as médias utilizou-se o teste de Duncan. Este teste estatístico permite comparar as médias dos três grupos simultaneamente (tabela 13). Cada diferença da tabela é significativa se for maior do que o menor intervalo significativo, portanto, no ensaio de aumento de peso em ratos hipofisectomizados as três doses de hormônio promoveram respostas diferentes entre si ($p < 0,01$).

8. EGPA 7%

Após o isolamento por isceletrofocalização

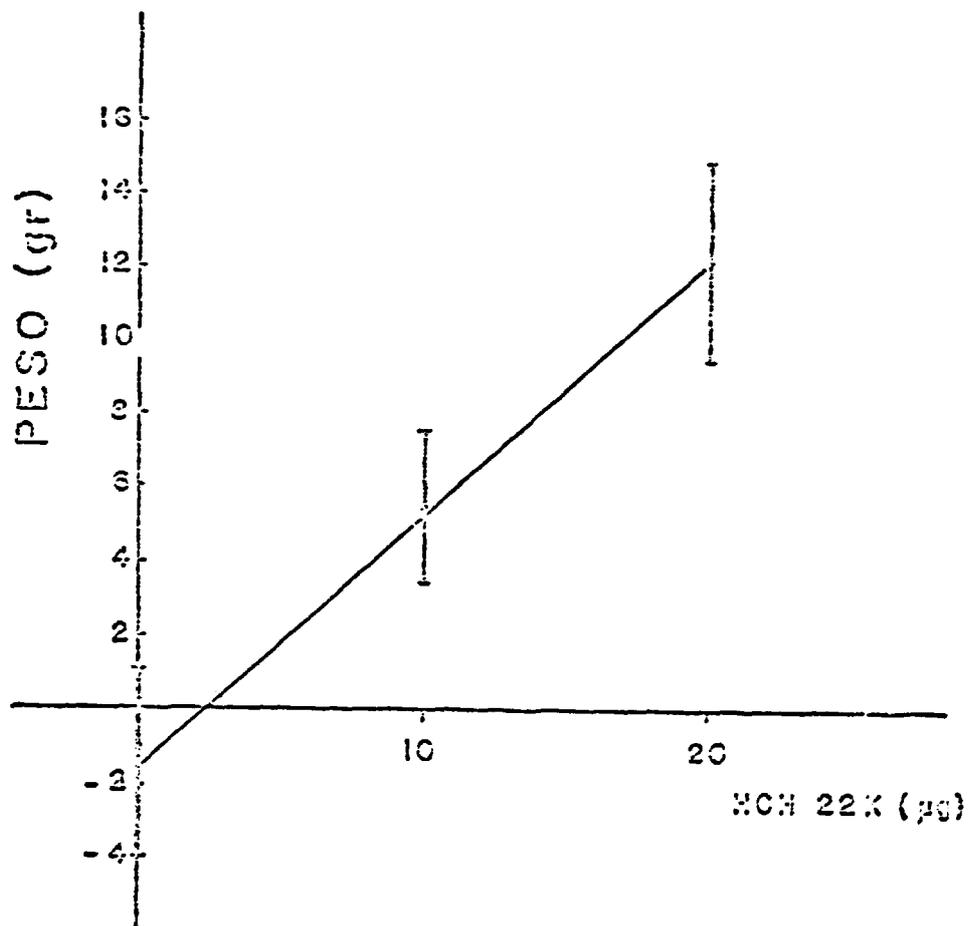


FIGURA 25 - O gráfico demonstra a variação obtida para o incremento de peso em ratos hipofisectomizados, após 9 dias de tratamento com 10 e 20µg da variante 22 K.

TABELA 12

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA K=3 TRATAMENTOS COM N=11 OB
SERVAÇÕES PARA CADA TRATAMENTO.

FO NTE DE VARIACÃO	SOMA DE QUADRADOS	G.L.	QUADRADO MÉDIO	F
TRATAME NTO S	1038,2	2	519,1	85,1
ENTRE OS TRATAME NTO S	183,4	30	6,1	
TOTAL	1221,6	32		

TABELA 13

TESTE DE DUNCAN PARA MÚLTIPLOS INTERVALOS APLICADO PA
RA DIFERENÇA ENTRE K=3 MÉDIAS DE TRATAMENTOS.

	A	B	C	MENOR INTERVALO SIGNIFICATIVO
MÉDIAS	-1,60	5,49	12,14	
A	-1,60	7,09	13,74	$k_2 = 2,96^*$
B	5,49		6,65	$k_3 = 3,09^*$
C	12,14			

* k_2 e k_3 são produtos do valor de tabela com $\alpha=0,01$
e o erro padrão do ensaio (0,76).

e cromatografia em Sephadex G-50 fino, a variante 22 K foi liofilizada e estocada em ampolas à temperatura de -20°C . Para verificar se a homogeneidade da preparação foi mantida após as manipulações referidas atrás e durante o período em que foram realizados os ensaios de caracterização, foram repetidas as análises em gel de poliacrilamida.

Os resultados obtidos com o sistema SDS-EGPA 10% foram apresentados no item III.2.2 e o perfil obtido em EGPA 7% está na figura 20. Observamos que a homogeneidade da variante 22 K isolada foi mantida.

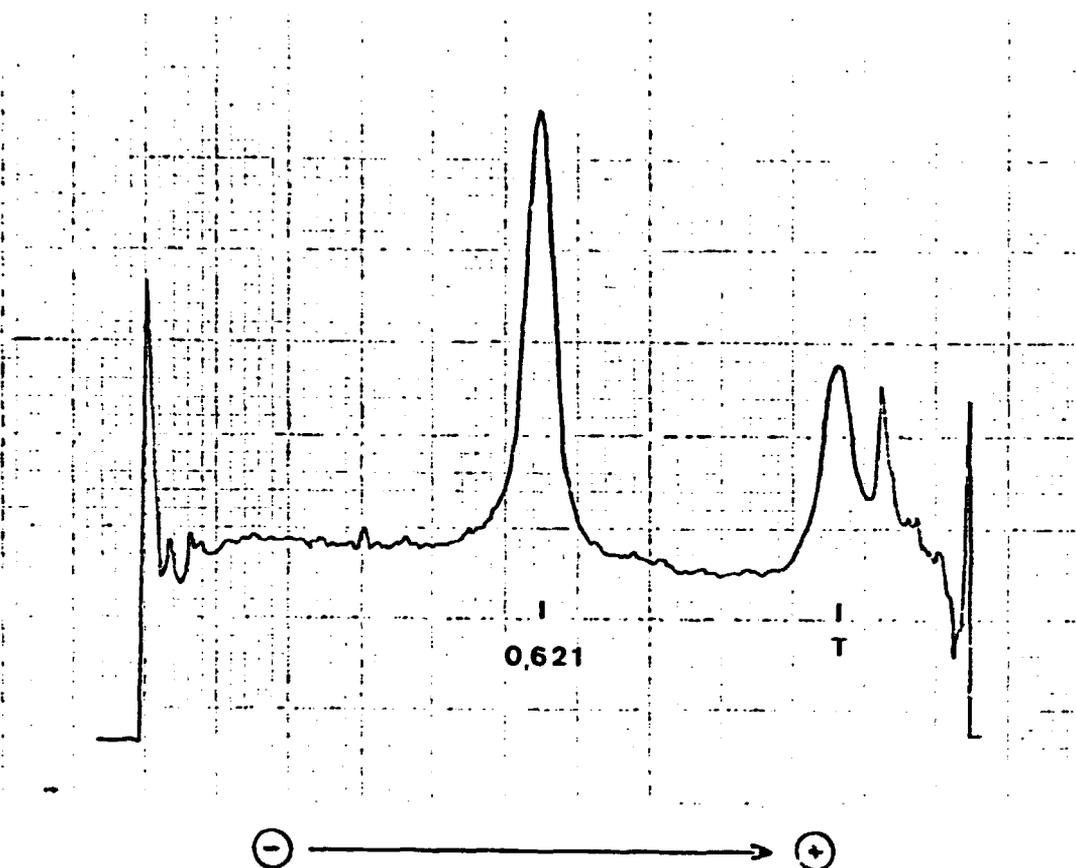


FIGURA 26 - PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO POR ANÁLISE EM EGPA 7% DA VARIANTE 22 K ISOLADA. O perfil foi obtido pela leitura do gel em densitômetro após fixação em TCA 12,5% por 30 minutos. Utilizou-se como traçador a azul de bromofenol (T). O controle de SAB neste ensaio apresentou um R_m de 0,713, logo o fator de correção é 1,0757. Desta forma o R_m calculado para a variante 22 K é 0,621.

IV. DISCUSSÃO

Passaremos a discutir os resultados obtidos nas diferentes fases deste trabalho, ao mesmo tempo que registraremos as observações relevantes em cada comentário.

A preocupação inicial no desenvolvimento deste trabalho foi a obtenção do hormônio de crescimento, a partir de hipófises congeladas, com rendimento bom e com pureza adequada para uso clínico. A avaliação das modificações introduzidas na extração pode ser feita segundo dois aspectos: primeiro, enfocando-se o rendimento e segundo a heterogeneidade da preparação quanto a sua composição em variantes.

Em um processo de extração, para se alcançar um bom rendimento é necessário que se estabeleçam controles adequados a cada passo a fim de assegurar a recuperação desejada. No processo aqui descrito (esquematisado na fig. 3) o acompanhamento foi feito com a determinação da massa de proteína extraída. Observamos que o rendimento depende muito da solubilização do hormônio a partir dos tecidos; assim, se após a 5a. centrifugação, a mistura de todos os sobrenadantes não atinge 1,0 grama de proteína para cada 10 gramas de hipófises processadas, deve-se introduzir lavagens adicionais ao resíduo até que a meta acima seja alcançada.

Encontram-se diversos relatos sobre alterações do produto final de uma extração de HCH por causa da presença de enzimas em extratos pituitários, cuja presença parece ser variável^(40,59). Esta atividade enzimática pode causar inativação do hormônio ou heterogeneidade da preparação. A degradação é acentuada em soluções mantidas a 4°C em pH 7,0 a 8,5 e pode ser evitada pela acidificação dessas soluções ou pelo armazenamento sob a forma liofilizada e a -20°C⁽⁸⁴⁾. Não há uma descrição sobre a caracterização dessas formas degradadas ou quais enzimas seriam as responsáveis por esses efeitos. Adicionalmente, há a possibilidade de degradação do hormônio por enzimas de origem bacteriana⁽³⁸⁾. Quanto à heterogeneidade, observa-se que a transformação das variantes hormonais nestas soluções processa-se lentamente em soluções levemente alcalinas e que permanecem à temperatura de 4°C.

Pelo método de ROOS (1963)⁽⁷⁸⁾, o hormônio não fica exposto em condições de pH alcalino. No nosso método isto ocorre apenas durante a cromatografia, pois substituímos o tampão fosfato de potássio 0,1 M com NaCl 0,5 M pH 6,6 utilizado no método original, pelo tampão fosfato-glicina 0,5 M pH 7,2 utilizado pelos Laboratórios KABI na produção de Crescormon. A maior diferença entre estes dois tampões é dada pela presença de grande quantidade de sal no usado por Roos, resultando em so

luções de força iônica relativamente alta em comparação ao usado pela KABI, respectivamente, 0,676 e 0,265. Esta diferença e a diferença de pH entre os dois tampões, (sendo que o da KABI é levemente alcalino), poderiam ser consideradas importantes no aparecimento de alterações químicas no HCH, transformando-o em moléculas de maior mobilidade eletroforética e conservando sua massa molecular aparente^(75,85). No entanto, esta heterogeneidade não se manifesta no Crescormon, e o tampão fosfatoglicina parece aumentar a estabilidade do hormônio durante a estocagem. Estas observações nos levaram a adotar este tampão para a eluição da preparação por nós feita.

A outra condição, já citada, que parece favorecer as alterações do HCH é a permanência em soluções, a 4°C. Procuramos limitar o tempo em que o extrato permanece nesta condição, congelando as frações que não estejam sendo manipuladas. Por exemplo, os sobrenadantes da primeira fase foram congelados enquanto se processavam as lavagens subsequentes no precipitado. Outra medida que adotamos foi suprimir algumas fases do processo. Originalmente, no método de Roos (1963), após a precipitação com sulfato de amônio eram realizadas diálise, liofilização e uma segunda série de lavagens com tampão fosfato de potássio 0,02 M pH 6,6 com cloreto de sódio 0,1 M. A diálise para eliminação do sulfato de

amônio do extrato durava de 3 a 4 dias, ou seja, até obter-se uma reação negativa para a presença de sulfato na água de diálise, o que era verificado por reação com nitrato de prata. Gastava-se um tempo equivalente para a liofilização e mais uma semana para lavagens do liofilizado e ultrafiltração do extrato solúvel, a fim de se obter a amostra adequada para a cromatografia.

No esquema que estamos propondo a eliminação do sal se dá na própria coluna de purificação. O perfil cromatográfico obtido, assim como a resolução entre os picos são equivalentes aos obtidos por outros autores (1,14,82). Dessa forma diminuimos o tempo de manipulação do extrato, sem prejuízo para o rendimento. Adicionalmente, pela relação porcentual dos picos do cromatograma em Sephadex G-100 grosso verificamos que houve apenas uma pequena formação de agregados (PII) e de peptídeos (PIV), o que pode estar relacionado a uma menor degradação enzimática.

Retomemos as considerações sobre a atividade enzimática no extrato. Nos trabalhos recentes sobre extração observa-se uma preocupação em inibir esta atividade. JONES (1979)⁽³⁸⁾, utilizou fluoreto de fenilmetilsulfonila e EDTA, e tomou uma série de cuidados para eliminar a contaminação bacteriana no processo. Obteve uma preparação final com bom rendimento e livre de pirogênio. De forma semelhante, introduzimos Trasylol

e EDTA para inibir as enzimas; azida sódica e esterilização do tampão fosfato-glicina 0,5 M pH 7,2 para impedir a proliferação de bactérias no meio. O congelamento das frações auxiliou nos dois objetivos. Dedicamos atenção especial à contaminação bacteriana durante a cromatografia. Utilizamos somente água recém-destilada e esterilizamos o tampão de eluição em autoclave. Não se adicionou inibidores enzimáticos e agentes bacteriostáticos nesta fase para evitar a presença desses elementos no HCH final; a eluição e a coleta foram feitas em temperatura baixa.

O hormônio purificado apresenta uma porcentagem alta da forma monomérico (42% PIII), é solúvel em água destilada e homogêneo em SDS-EGTA. Apresenta um PM de 21587 d calculado por esta técnica, portanto, compatível com os dados da literatura, determinados por equilíbrio de sedimentação 21.500 d^(52,83), 22.000d⁽²¹⁾ e 24.000 d⁽³¹⁾; por cromatografia em gel de Sephadex 20.700 d, 24 900 d⁽⁹⁷⁾, 22.000 d^(1,26). O valor calculado com base na sequência de aminoácidos foi 22.100 d⁽³⁷⁾.

O outro critério sugerido, que permite a avaliação da extração foi a heterogeneidade do produto final. Neste caso, avalia-se sua composição em variantes de massa e de carga.

As variantes de massa foram excluídas na extração. O dímero foi separado do monômero durante a

cromatografia em Sephadex G-100 e a região provável de sua eluição (PII)⁽⁸⁶⁾ foi descartada. A variante 20 K tem uma tendência a formar dímeros^(44,86), portanto, deve estar localizada na região do PII tendo sido, possivelmente também descartada. Esta variante foi descon-siderada durante muito tempo, talvez porque este procedimento ocorresse frequentemente na extração de HCH, ou talvez por causa da baixa concentração em que se encontra nas hipófises (por volta de 5 a 10% do HCH da glândula) ou, ainda, porque a análise em SDS-EGPA é a única forma de detectá-la e esta técnica não tem sido ampla-mente utilizada por investigadores que estudam o hormônio de crescimento⁽⁴⁷⁾.

Outra variante de massa é o 24 K que também não está presente na preparação, pois seria diferenciado pelo método citado. Como o 24 K se forma por cli-vagem, provavelmente de uma enzima que mi-metiza a cur-ti-o tripsina⁽³⁵⁾, esta pode ter sido bloqueada pelos inibi-dores enzimáticos adicionados.

A eletroforese em SDS-EGPA também permite a identificação do fator diabetogênico. Após o tra-tamento da amostra com β -mercaptoetanol e uréia há uma dissociação deste peptídeo da molécula do HCH podendo ser localizado na região de 5.000 a 10.000 d. A origem deste fator ainda é controvertida, mas a sua ausência nesta preparação estaria em desacordo com a possibili-da-de

de de estar associado ao HCH por interações fracas. Restam as hipóteses de ele ser um peptídeo contaminante da preparação ou um produto de atividade enzimática⁽⁴⁷⁾ que possivelmente teve a sua formação inibida pelo método de extração aqui utilizado.

O perfil eletroforético da análise em gel de poliacrilamida evidencia a presença de variantes de carga em nossa preparação.

Nos trabalhos mais antigos não havia a preocupação de caracterizar a migração eletroforética (R_m) das variantes por valores numéricos, o que dificulta uma comparação quanto à composição de variantes em preparações analisadas por diferentes autores. Apenas nas publicações de SKYLER, 1977⁽⁸³⁾ e SCHWARZ, 1978⁽⁸⁴⁾ encontrou-se um estudo comparativo entre preparações diferentes de HCH e uma classificação das variantes (isômeros de carga) baseados em seu comportamento eletroforético. Tomamos os valores de R_m determinado por estes autores para compararmos com os obtidos na nossa preparação.

O perfil de variantes que obtivemos apresenta um componente principal, que é 63% da preparação, com R_m 0,612 que indica tratar-se da variante 22 X (R_m 0,616)⁽⁸⁴⁾, ou seja, a forma íntegra do hormônio. O segundo componente menos ácido, por nós obtido, não pode ser identificado com a forma C_1 embora apresentem R_m se

melhantes - 0,672 para a nossa preparação e 0,679 para C_1 ⁽⁸⁴⁾ pois na análise em SDS-EGPA com β -mercaptoetanol não se observou a dissociação em duas cadeias, como é característico para o componente C_1 . Idem para o terceiro componente com Rm 0,763, similar ao C_2 Rm 0,742 ⁽⁸⁴⁾.

As formas C_1 e C_2 , como já citado anteriormente, são produtos de clivagem enzimática. Durante a extração, foram adotadas diligências para diminuir ou mesmo impedir a atividade das enzimas, quer seja de origem hipofisária, quer seja de origem bacteriana. Logo, a ausência de formas clivadas no hormônio final é mais um indicativo de que os cuidados foram adequados.

As formas mais ácidas que o 22 K presentes em nossa preparação poderiam ser o "Fast-GH", a forma desamidada ou uma terceira variante. Para a identificação exata seria necessário o isolamento de cada uma delas, o mapeamento peptídico e a confirmação de atividade biológica semelhante ao HC; o que exigiria mais material e a disponibilidade da metodologia conveniente.

Não foi possível a identificação de todas as variantes presentes mas o componente principal está convenientemente caracterizado. A obtenção de uma preparação com alta porcentagem da variante 22 K é importante pois permite iniciar o isolamento de uma quantidade ponderável dela.

Os conhecimentos sobre os mecanismos f₁

siológicos de atuação do hormônio de crescimento são, ainda, muito escassos. Há algumas indicações de que ocorrem alterações na forma nativa (22 K) que seriam responsáveis pela seleção da ação desejada⁽⁵⁰⁾. As dúvidas são inúmeras e a obtenção de uma preparação pura da variante 22 K é um importante passo para se iniciar estudos neste campo. Para o isolamento da variante 22 K utilizamos a técnica de isoeletrofocalização.

Esta técnica mostrou ser demorada mas factível. Permitiu que quase toda a manipulação fosse automatizada; poderia ser simplificada se as coletas do gradiente da coluna de isoeletrofocalização e da cromatografia em Sephadex G-50 fino fossem acopladas a um monitor ultravioleta, permitindo eliminar a leitura manual de cada fração no espectrofotômetro.

A isoeletrofocalização foi desenvolvida em uma estreita faixa de pH com o intuito de se obter uma boa resolução entre as variantes do HCH. Esta separação é difícil pois há uma forte difusão devido ao baixo peso molecular do hormônio e a diferença de carga entre as variantes ser bem pequena: 1 a 1,5 unidades de valência (prótons por molécula) estimado por CHZAMBACH (1973)⁽¹⁶⁾ e 0,3 a 0,5 unidades de valência por YADLEY (1973)⁽¹⁰⁵⁾ entre cada variante subsequente.

A linearidade obtida para o gradiente de pH foi muito boa, apresentando um coeficiente de corre-

lação de 0,9945 entre o volume do gradiente e o pH (considerando-se apenas o intervalo entre 4 a 6). As maiores imprecisões foram observadas entre as frações 32 a 33, provavelmente por causa da alta concentração de proteínas ali localizadas.

A utilização do gradiente de sacarose como suporte não apresentou interferência na eletroforese, pois é um soluto não iônico, estável à corrente elêtrica e não interage com as anfólinas.

A escolha do tempo adequado de isoeletrofocalização considerou o menor intervalo de tempo que nos fornecesse uma boa resolução para a variante 22 K, o aspecto prático do método e a estabilidade da proteína. Foram suficientes 96 horas para se obter a separação desejada.

Desta forma, desenvolvemos uma metodologia eficiente para o isolamento da variante 22 K. Por análise em EGPA demonstramos que o pico com P.I. 5,12 é homogêneo e possui R_m 0,612, característico desta variante (84,83). As demais não foram totalmente resolvidas, mas observa-se um início de separação, conforme é evidenciado pela análise em EGPA (Fig.16). O método de separação deveria ser modificado caso se desejasse melhorar a resolução para as demais formas. Neste caso, poder-se-ia pensar inicialmente em estreitar o intervalo de pH, alterar a concentração de anfólinas e aumentar o

tempo de eletroforese.

A utilização da isoeletrofocalização como uma técnica preparativa exige um isolamento da proteína de interesse, das anfolinas e sacarose utilizadas. Em nosso caso tentamos, inicialmente, a diálise, mas não obtivemos a separação desejada. Muitos métodos têm sido descritos para esta finalidade, como diálise, ultrafiltração, precipitação múltipla, troca iônica, gel filtração e outras. Mas nem sempre a separação é total. Foi sugerida a possibilidade de ocorrerem ligações irreversíveis entre as proteínas e as anfolinas, mas, posteriormente, foi demonstrado que isto não ocorre⁽⁵⁾. Outra possibilidade sugerida foi a presença de espécies moleculares de peso molecular alto nas preparações de anfolinas. Esta possibilidade parece ser a mais real, pois há variações de 300 a 1.000 d, com algumas citações de até 5.000 d.^(6,76). Levando em consideração esta diversidade de peso molecular, a cromatografia de exclusão molecular nos pareceu a técnica mais adequada, assim, utilizamos a cromatografia em Sephadex G.50 fino para esta separação (fig. 17). Esta resina possui características de exclusão molecular entre 1.500 a 30.000 d e permitiu uma boa separação.

Introduzimos 0,1 M de cloreto de sódio no tampão de eluição (bicarbonato de amônio 0,1 M pH

8,0) com a finalidade de aumentar a força iônica do meio e diminuir a possibilidade de interação entre proteína e anfolina ou mesmo proteína e/ou anfolina com a resina. Apresentou recuperação perfeita. A eluição da coluna ocorreu em 3 horas, aproximadamente, podendo ser considerada um método relativamente rápido.

O aumento da força iônica do meio e a estocagem do hormônio em pH alcalino favorece a desamidação da molécula^(41,77). Por outro lado, força iônica baixa pode facilitar a agregação da proteína e, como já foi dito, permitir interações com as anfolinas e com a resina. Na condição que escolhemos pretendíamos ficar em um meio termo entre todos estes fatores. Concluída a cromatografia, a forma 22 K foi distribuída em ampolas e liofilizada. Em seguida, as ampolas foram lacradas e estocadas à temperatura de -20°C , com a finalidade de reduzir ao mínimo os danos durante a estocagem⁽²⁵⁾.

Com os ensaios de caracterização da variante isolada verificamos inicialmente que o perfil eletroforético do componente 22 K se manteve homogêneo, não havendo formação de variantes de carga, principalmente por desamidação (fig. 26).

Na análise de aminoácido terminal correu a reação com apenas um aminoácido, que foi identificado como fenilalanina. Este resultado inicialmente nos

confirma ser fenilalanina o $-NH_2$ terminal, conforme já descrito para o hormônio de crescimento humano^(67,83). Deste resultado também se verifica que a preparação está pura, pois é um método bem sensível, capaz de detectar 1 nmol de aminoácido dansilado⁽³⁴⁾, logo a presença de outra proteína ou peptídeo com $-NH_2$ terminal de Phe, seria identificado. Uma terceira informação importante é que não há outro grupo de NH_2 terminal livre, o que indica a integridade da cadeia peptídica. Este dado está de acordo com o resultado do SDS-EGPA em que mesmo na presença de uréia e β -mercaptoetanol observamos apenas uma banda protéica.

Pela reação de Ellmann (item II.5) verificamos não haver $-SH$ livre. Neste caso seria interessante ressaltar que para o hGH a ruptura das pontes não traz danos à sua atividade biológica, o que difere da maioria das proteínas. Estudos com a redução e posterior alquilação destas pontes demonstraram que elas não são necessárias para a manifestação da atividade biológica, inclusive no homem, nem para a manutenção da estrutura secundária e terciária da proteína^(54,55). A ausência de $-SH$ livre no HCH obtido, no entanto, demonstra a integridade da molécula como um todo.

No espectro ultravioleta próximo (entre

230 a 300 nm) observa-se o pico de absorção característico dos aminoácidos aromáticos. Pela análise da composição de aminoácidos sabe-se que o HCH possui 8 tirosinas, 13 fenilalaninas, 1 triptofano, 3 histidinas e 2 cistinas. O comprimento de onda de maior absorção, observado para o 22 K foi 277 nm, portanto, coincidente com a preparação total. O valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, 277 nm determinado a partir dos dados obtidos com o espectro é 6,92, e para $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, 280 nm é 6,79. Portanto, valores menores que o determinado por LI (1975)⁽⁵⁴⁾ que foi 9,31 em 277 nm e por STEIN et alii (1983)⁽⁹⁰⁾ que encontrou 8,85 para 280 nm. O valor que encontramos está de acordo com o determinado por CHAPMAN et alii (1981)⁽¹⁴⁾ que relata 6,6 e 6,8 para 280 nm.

A caracterização das atividades imunológica e biológica do hormônio isolado apoiou-se em observações de seu comportamento em RIE e no ensaio de aumento de peso em ratos hipofisectomizados.

NO RIE, teve-se a preocupação de verificar se o ensaio apresentou boa precisão, ou seja, baixa ligação inespecífica, ligação específica adequada e pequena dispersão das duplicatas.

O elemento marcado utilizado como reagente no RIE possui a capacidade de se ligar inespecificamente as substâncias biológicas (por exemplo, elementos do soro) e não biológicas (como as paredes do tubo de ensaio)⁽¹⁰⁶⁾. No ensaio que fizemos, as intera

ções inespecíficas foram quantificadas pela presença de hormônio não marcado em excesso (10 ug/ml). Neste caso, segundo o princípio de competição do RIE (item II.7) todo o anticorpo estará ligado ao hormônio não marcado, logo toda a radioatividade do hormônio marcado deve permanecer no sobrenadante e será descartada com a fração livre. O que for detectado no precipitado será devido às interações inespecíficas.

Durante a primeira precipitação para a separação das frações livre e ligada, pode ocorrer que algumas moléculas de hormônio livre fiquem presas no precipitado ou nele absorvida. A lavagem com PEG a 25% em tampão veronal 0,025 M pH 8,6 e cloreto de sódio 0,4 M visou "soltar" estas moléculas de fração ligada. Desta forma, obteve-se a ligação inespecífica de 3,7% e 3,6% para o HCH-total e o HCH-22 K, respectivamente. Ligações inespecíficas desta ordem são consideradas ótimas, já que em RIE é aceitável ligações inespecíficas até 10%. Este valor foi subtraído da ligação total obtida para cada dose, a fim de se detectar as ligações específicas.

A precisão das medidas de concentração é dependente do nível de inclinação da curva dose x resposta e do erro na medida da radioatividade. O radioensaio se torna mais sensível quando o título do anti-soro a ser usado resulta em uma ligação específica máxima (calcula

da por B/T) igual a 0,5 ou 50% (20,106). A nossa condição de ensaio está próxima a este valor, embora tenham sido estabelecidas seguindo outro caminho de raciocínio. Baseamo-nos no princípio que a concentração dos reagentes é que determina a cinética de reação⁽²⁾. Em diversos ensaios de padronização foram fixadas as diluições do anticorpo e do antígeno marcado. Desta forma, foi possível manter as mesmas condições para diferentes ensaios com diferentes traçadores, estabelecendo-se um controle de reprodutibilidade interessante. Outros parâmetros como B/F e B/T variam com a atividade específica do traçador, e se fixadas automaticamente alteram a concentração do antígeno e do ligante.

A escala de resposta foi ampliada tomando-se a relação $B/B_0 \times 100$. A análise da curva em semi-log apresenta uma porção linear, que no caso por nós examinado foi considerada entre as doses de 5 a 100 ng/ml. A primeira preocupação foi demonstrar que este intervalo de dose considerado obedeceu aos parâmetros de uma regressão linear. Utilizando a análise de variância e o teste F, demonstramos que o modelo é adequado para um nível de significância de $P < 0,0001$, em ambas as preparações.

Para cada dose foram consideradas as duplícatas, não se excluindo nenhum dado. Na análise de resíduos verificou-se que a curva do HCH-total apresen

tou uma dispersão maior que o 22 K. Comparando-se os coeficientes de correlação evidencia-se a dispersão dos pontos entre as duas retas: 0,9480 para o HCH e 0,9837 para a variante 22K. No entanto, ambas estão dentro dos valores aceites para este parâmetro. O gráfico dos resíduos demonstra que há uma dispersão equitativa ao redor do zero, logo os erros das duplicatas são devidos ao acaso, sem nenhuma tendência definida.

A identidade imunoquímica está relacionada às propriedades naturais do antígeno, evidenciadas principalmente na especificidade da interação antígeno anticorpo (item II.7.1). Já foi descrito que certos anti-soros são capazes de detectar diferenças imunoquímicas entre proteínas com 1 a 4 aminoácidos diferentes na seqüência, ou ainda, com a mesma estrutura primária mas secundária e terciária diferentes. Estes casos foram descritos para insulinas de espécies diferentes⁽¹⁰⁶⁾. Estas observações permitiram-nos utilizar a reação do HCH com o seu anticorpo como uma forma qualitativa de verificar se houve alterações estruturais na molécula durante o isolamento ou mesmo se entre a variante 22 K e o HCH-total há alguma diferença estrutural detectável nas condições do nosso ensaio.

Pela análise de variância as declividades obtidas foram -24,099 para o HCH-total e -25,443 para a variante 22K. Verificou-se o paralelismo das duas

curvas dose x resposta através do Teste F. Estas são pa
ralelas a um nível de significância de $P < 0,01$.

Embora haja uma diferença entre os DE_{50} das duas preparações (55,3 e 50,8) não podemos conside
rar este dado como uma diferença de potência, pois no sistema de análise estatística empregado, a diferença não se mostrou significativa, ou seja, pela Análise de Variância e Teste F as duas retas podem ser consideradas coincidentes ($P < 0,05$).

A distinção entre as variantes do HCH por RIE é difícil, por causa da semelhança estrutural. Para as formas clivadas alguns autores chegaram a propor que todas tivessem o mesmo determinante antigênico e que sejam indistinguíveis do hormônio intacto por RIE⁽¹⁵⁾. No entanto, embora o RIE tenha esta série de discussões, ainda é a única técnica disponível que permitiria identi
ficar e quantificar as formas hormonais circulantes, es
tabelecendo o elo entre as observações "*in vitro*" e a fi
siologia humana, possibilitando desvendar os mecanismos que resultam no amplo espectro de ações do hormônio de crescimento. Esta potencialidade resulta de caracterís
ticas intrínsecas ao ensaio, que são justamente a sua es
pecificidade e alta sensibilidade. Soma-se a estas características o amplo conhecimento de condutas para controle de sua exatidão e precisão, que aumentam a confiabilidade das determinações. O desenvolvimento de

um RIE específico poderia significar uma evolução nos diagnósticos clínicos.

O RIE não substitui o ensaio biológico, pois embora em alguns casos ambos possuam a mesma resposta, em outros ensaios observa-se acentuada discrepância. Por exemplo, a variante 20 K possui apenas 1/3 da atividade do 22 K em RIE, no entanto, é biologicamente equipotente no ensaio de aumento de peso, no ensaio de crescimento da tibia e na liberação de somadomedina. Há a descrição de uma forma de HCH que possui atividade imunológica, no entanto é inativa metabolicamente⁽¹⁵⁾. Portanto, a dissociação entre a atividade biológica e imunológica pode ocorrer e não nos permite uma conclusão geral, pois a especificidade deve ser avaliada para cada hormônio, cada sistema biológico e cada anti-soro.

Diante destas considerações sobre a divergência entre o RIE e o ensaio biológico, não nos será possível concluir a avaliação do isolamento e caracterização da variante 22 K sem demonstrar sua atividade *in vivo*. Isto foi verificado pela prova de aumento de peso em ratos hipofisectomizados. A diferença de peso entre o início e o final do tratamento foi avaliada pela Análise de variância e Teste de Duncan.

Este teste permite comparar os três grupos simultaneamente. Observamos que as doses de 10 e 20

µg foram significativamente diferentes entre si e do grupo controle, a um nível de significância de $p < 0,01$. Na figura 25 observamos que o crescimento foi linear com as doses administradas.

Desta forma foi possível demonstrar que a variante 22 K isolada de uma preparação de hormônio de crescimento humano possui, além da atividade imunológica, a atividade biológica experimentada *in vivo*, no ensaio que é reconhecidamente mais indicado para esta determinação.

V. CONCLUSÕES

Considerando-se as condições experimentais em que este trabalho foi realizado e a metodologia empregada, pode-se dizer que:

- a) Para o esquema de extração do HCH a partir de hipófises humanas congeladas, obteve-se
 - . pouca formação de agregados e de produtos de degradação,
 - . uma preparação homogênea em SDS-EGPA 10%, portanto, sem variantes de massa,
 - . uma maior porcentagem da variante íntegra (63%) dentre as variantes de carga observadas em EGPA 7% e
 - . um rendimento ótimo.

Estes fatos sugerem que as modificações introduzidas no processo foram adequadas e permitem sugerir que a padronização desenvolvida seja adotada em extrações futuras.

- b) Para o isolamento da variante 22 K, o método de isoeletrofocalização desenvolvido é executável e permite processar grande quantidade de proteína (50 mc) de uma única vez, com boa resolução.

A cromatografia em Sephadex G-50 fino foi eficiente para a separação da variante 22 K dos reagentes utilizados na isoeletrofocalização e a reação de biureto

mostrou ser um método simples e adequado para visualizar esta separação.

c) Após os ensaios de caracterização, a variante 22 K isolada é

- homogênea em SDS-EGPA 10% na ausência e presença de uréia 6 M,
- é homogênea em EGPA 7% com o R_m 0,621,
- possui 21.587 ± 196 daltons de peso molecular,
- possui fenilalanina como aminoácido terminal $-NH_2$,
- não possui grupos $-SH$ livres,
- possui um espectro de absorção no ultravioleta entre 350 e 230 nm, com o máximo de absorção em 277 nm,
- possui um coeficiente de extinção molar em 277 nm de 14.888 e o coeficiente $E_{277 \text{ nm}}^{1\%}$ 6,92,
- possui identidade imunológica com a preparação total de HCH, demonstrada no RIE e
- é biologicamente ativo no ensaio de aumento de peso corpóreo realizado em ratos hipofisectomizados.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - PARTOLINI, P.; ASSIS, L.M.A.; 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. Clin. Chim. Acta, 79:223-36, 1977.
- 2 - BARTOLINI, P.; CAMILLO, M.A.P.; CAMILLHO, E.I.; MURAMOTO, E.; SCHWARZ, I.. Quality control in the potency determination of hGH extracts: radioimmunoassay and radioreceptorassay with standardized labeling and assay conditions. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: international symposium held in Vienna, 21-25 June, 1982. p.10-11
- 3 - BARTOLINI, P. & CAMILLO, M.A.P.. Human growth hormone radioiodination using different batches of ^{125}I of various ages. Clin. Chim. Acta, 120:353-8, 1983.
- 4 - BARTOLINI, P.. Somatotrofinum humanum. 1985. (A ser publicação na Farmacopéia Brasileira, 4 ed.)
- 5 - BAUMANN, G. & CHEMBACH, A.. Lack of interaction between hormonal proteins and synthetic carrier ampholytes (Ampholine). Anal. Biochem., 64:530-6, 1975.
- 6 - BAUMANN, G. & CHEMBACH, A.. Quantitative removal of carrier ampholytes from protein fractions derived from isoelectric focusing. Anal. Biochem., 60:649-51, 1975.
- 7 - BAUMANN, G. & CHEMBACH, A.. Gram-preparative protein fractionation by isotachopheresis: isolation of human growth hormone isohormones. Proc. Natl. Acad.

Sci.NSA., 73(3):732-6,1976.

- 8 - FAUMANN, G. & NISSELY, S.P.. Somatomedin generation in response to activated and nonactivated isohormones of human growth hormone. J.Clin.Endocrinol. Metab., 48:246-50, 1979.
- 9 - FAUMANN, G.. Metabolic clearance rates of isohormones of human growth in man. J.Clin.Endocrinol. Metab., 49:405-9, 1979.
- 10 - FAUMANN, G.; MACCART, J.G.; AMFURN, K.. The molecular nature of circulating growth hormone in normal and acromegalic man: evidence for a principal and minor monomeric forms. J.Clin.Endocrinol.Metab., 56:946-52, 1983.
- 11 - BERSON, S.A. & YALLOV, R.S.. General methodology. In: YALLOV, R.S. Methods in radioimmunoassay of peptide hormones. Amsterdam, North-Holland, 1976. p.1-36
- 12 - BORNSTEFIN, J.; ARMSTRONG, J.McD.; TAFT, F.P.; NG, F.M.; GOULD, M.Y.. The mechanism of the diabetogenic effects of pituitary growth hormone. Postgrad. Med.J., 49 (Suppl.):1/210-24/242, 1973.
- 13 - CANTOR, C.R. & SCHIMMEL, P.R.. Biophysical chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function. San Francisco, W.F. Freeman, 1980. Cap.12, p.643-85
- 14 - CHAPMAN, G.F.; RENWICK, A.G.C.; LIVESFY, J.F.. The isolation of human pituitary hormones from frozen glands. J.Clin.Endocrinol.Metab., 53:1008-13, 1981.
- 15 - CHAWLA, R.K.; PARKS, J.S.; RUDMAN, D.. Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic and clinical aspects. Annu.Rev.Med., 34:510-47, 1983.
- 16 - CHRAMBACH, A.; YADLEY, R.A.; PENDAVID, M.; RODDARD, D.. Isohormones of human growth hormone. I. Charac -

terization by electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel. Endocrinology, 93:848-57, 1973.

- 17 - DAUGHADAY, W.F.. Background for a rational approach to compendial definitions of somatropins. In: GUERIGIAN, J.L.; BRANSON JR., F.D.; OUTSCHOORN, A.S.. Hormone drugs: proceedings of the FDA-USP workshop on drug and reference standards for insulin, somatropins and thyroid-axis hormones, held in Bethesda, Maryland, May 19-21, 1982. Rockville, M.D., US Pharmacopeial Convention, 1982. p.283-6
- 18 - DAVIS, E.J.. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann.N.Y. Acad.Sci., 121:404-27, 1964.
- 19 - EDWARDS, A.L.. Experimental design in psychological research. New York, Holt, Rinehart and Winston, 1972. Cap.8, p.130-53
- 20 - FIKIN, R.P.. Theoretical aspects of saturation analysis: review paper. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. In vitro procedures with radio isotopes in clinical medicine and research: proceedings of the symposium held in Vienna, 8-12 September, 1970. Vienna, 1970. p.325-53
- 21 - ELLIS, G.J.; MARLER, F.; CHEN, H.C.; WILHELM, A.E.. Molecular weight of bovine, porcine and human growth hormone by sedimentation equilibrium. Fed.Proc., 25:348, 1966
- 22 - FILLMANN, G.E.. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 82:70-77, 1959.
- 23 - FERREI, R.G.; CALICH, V.L.G.; COPPI VAZ, C.A.. In: Imunologia. São Paulo, Edgard Plucher, 1977. p. 54-116

- 24 - EUCHE, R.; JOHANSSON, R.F.; JOHANSSON, M.; FISHEN, S.. General toxicity in rats of biosynthetic and pituitary human growth hormones. In: GUFIRIGIAN, J.L.; FRANSOUE, JR., F.D.; OUTSCHOORN, A.S.. Hormone drugs: proceedings of the FDA-USP workshop on drug and reference standards for insulins, somatropins and thyroid-axis hormones, held in Bethesda, Maryland, May 19-21, 1982. Rockville, MD, US Pharmacopeial Convention, 1982. p.327-34
- 25 - FONSECA, M.L.C.S.. Estudo sobre os processos de decaimento e a estabilidade de duas preparações de hormônio de crescimento humano marcados com ^{125}I (Hormônio de crescimento humano do National Institute of Health e do Instituto de Energia Atômica) São Paulo, 1978. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Energia Atômica). (JFA-DE-092)
- 26 - FOWES-BECH, F. & SCHMIDT, E.D.. Studies on human somatotropin. Preparation and some physico-chemical properties. Int.J.Fert.Protein Res., 1:85-92, 1966.
- 27 - FROWMAN, L.A.; FURFE, L.; STACHURA, M.F.. Characterization of growth hormone different molecular weight in rat, dog and human pituitaries. Endocrinology, 91: 262-9, 1972.
- 28 - FRYKELIN, L.; FRANDE, J.; DYETORP, G.; FRÅLENIAG, Y.; SKOOG, F.; SKOTTFER-LUNDIN, A.; WICKMAN, A.. A comparison of human biosynthetic and pituitary somatropins: purity and potency. In: GUFIRIGIAN, J.L.; FRANSOUE JR., F.D.; OUTSCHOORN, A.S.. Hormone drugs: proceedings of the FDA-USP workshop on drug and reference standards for insulins, somatropins and thyroid-axis hormones, held in Bethesda, Maryland, May 19-21, 1982. Rockville, MD, US Pharmacopeial Convention, 1982. p.319-32

- 29 - GOFDEL, D.V.; FENNECFF, F.L.; HOZUMI, T.; ARENTZEN, R.; ITAKURA, K.; YANISURA, D.G.; ROOS, M.J.; MIOZZARI, G.; CREA, R.; SEFFURG, P.H.. Direct expression in Escherichia Coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. Nature, 281:544-8, 1979.
- 30 - GORDEN, P.; HENDRICKS, C.M.; ROTF, J.. Evidence for "big" and "little" components of human plasma and pituitary growth hormone. J.Clin.Endocrinol. Metab., 36:178-84, 1973.
- 31 - GRAF, L.; SZALONTAI, E.; FÉRAT, F.; ZÁUODSZKY, P.; PORVENDÉG, J.; PERMAN, I.; CSÉF, G.. Studies on the multiplicity of polypeptides hormones. I. Isolation of human pituitary growth hormone and characterization of the aggregates. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 9:309-17, 1974.
- 32 - GRAF, L.; LI, C.F.; JIBSON, M.D.. Human somatropin: selective removal with trypsin of residues 135-140 from the hormone molecule with no loss of biological activities. J.Biol.Chem., 257:2365-9, 1982
- 33 - GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M.; GLOVER, J.S.. The preparation of ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem.J., 89:114-23, 1963.
- 34 - FARTLEY, P.S.. Strategy and tactics in protein chemistry. Biochem.J., 110:205-22, 1970.
- 35 - HIZUKA, N.; HENDRICKS, C.M.; PAVLAKIS, G.W.; HAMER, D.F.; GORDEN, P.. Properties of human growth hormone polypeptides: purified from pituitary extracts and synthesized in monkey kidney cells and bacteria. J.Clin.Endocrinol.Metab., 55:545-50, 1982.
- 36 - HUMMEL, B.C.W.; BROWN, G.M.; HWANG, P.; FRIESSEN, H.G.. Human and monkey prolactin and growth hormone: separation of polymorphic forms by isoelectric focusing. Endocrinology, 97:855-67, 1975.

- 37 - IUPAC-IUP. COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE (CBN). Nomenclature of multiple forms of enzymes - Recommendations (1976). J.Biol.Chem., 252(17):5939-5941,1977.
- 38 - JONES, R.J.; FENKER, G.; SALACINSKI, P.P.; LLOYD, T.J.; LOWRY, P.J.. Large-scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. J.Endocrinol., 82:77-86, 1970.
- 39 - LEVINE, R.; LUFT, R.. The relation between the growth and diabetogenic effects of the so-called growth hormone of the anterior pituitary. Diabetes, 13:651-5, 1964.
- 40 - LEWIS, U.J.. Enzymatic transformation of growth hormone and prolactin. J.Biol.Chem., 237:3141-5, 1962.
- 41 - LEWIS, U.J.; CHEEVER, E.V.; POPKINS, F.C.. Kinetic study of the deamidation of growth hormone and prolactin. Biochim.Biophys.Acta, 214:498-508, 1970.
- 42 - LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; VANDERLAAN, W.P.; TUTTILER, G.F.. Enhancement of the hyperglycemic activity of human growth hormone by enzymic modification. Endocrinology, 101:1587-603, 1977.
- 43 - LEWIS, U.J.; PETERSON, S.M.; BONEWALD, L.F.; SEAVEY, E.K.; VANDERLAAN, W.P.. An interchain disulfide dimer of human growth hormone. J.Biol.Chem., 252(11):3697-702, 1977.
- 44 - LEWIS, U.J.; DUNN, J.T.; BONEWALD, L.F.; SEAVEY, E.K.; VANDERLAAN, W.P.. A naturally occurring structural variants of human growth hormone. J.Biol.Chem., 253(8):2679-87, 1978.
- 45 - LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; BONEWALD, L.F.; LEWIS, L.J.; VANDERLAAN, W.P.. Human growth hormone: additional members of the complex. Endocrinology, 104:1256-

65,1979.

- 46 - LEWIS, U.J.; BONIFALD, L.F.; LEWIS, L.J.. The 20,000 dalton variant of human growth hormone: location of aminoacid deletion. Biochem. Biophys. Res. Commun., 92: 511-16, 1980.
- 47 - LEWIS, U.J.; SINGH, P.N.P.; TUTWILFP, G.F.; SIGEL, M.F.; VANDERLAAN, F.F.; VANDERLAAN, W.P.. Human growth hormone: a complex of proteins. Recent Prog Form. Res., 36: 477-508, 1980.
- 48 - LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; TUTWILFP, G.F.. Hyperglycemic activity of the 20,000 dalton variant of human growth hormone. Endocr. Res. Commun., 8: 155-64, 1981.
- 49 - LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; BONIFALD, L.F.; SEAVEY, P.K.. Altered proteolytic cleavage of human growth hormone as a result of deamidation. J. Biol. Chem., 256(22): 11645-50, 1981.
- 50 - LEWIS, U.J.. Variants of growth hormone and prolactin and their post-translational modifications. Annu. Rev. Physiol., 46: 33-42, 1984.
- 51 - LI, C.F. & PAPKOFF, F., 1956 apud LI, C.F., 1968.
- 52 - LI, C.F.. The chemistry of human pituitary growth hormone: 1956-1966. In: PECILE, A.; MÜLLER, F.F. ed. Growth Hormone: proceedings of the first international symposium, Milan, Italy, Sep. 11-13, 1967. Amsterdam, Excerpta Médica Foundation, 1968. p. 3-28
- 53 - LI, C.F. & DIXON, J.S. Human pituitary growth hormone. XXXII. The primary structure of the hormone: revision. Archs. Biochem. Biophys., 145: 233-6, 1971.
- 54 - LI, C.F.. The chemistry of human pituitary growth hormone: 1967-1973. In: LI, C.F. ed. Hormonal proteins and peptides. London, Academic, 1975. p. 1-40

- 55 - LI, C.F.. Human growth hormone: 1974-1981. Mol. Cel. Biochem., 46:31-41, 1982.
- 56 - MACIAG, T.; FORAND, R.; ILSLEY, S.; CERUNDOLO, J.; GREENLEAF, R.; KELLEY, P.P.; CANALIS, E.. The generation of sulfation factor activity by proteolytic modification of growth hormone. J. Biol. Chem., 255:6064-70, 1980.
- 57 - MEHL, J.F.; PACOVSKA, F.; WINZLER, P.J.. The amount of copper bound by protein in the biuret reaction. J. Biol. Chem., 177:13-21, 1949.
- 58 - MILLER, G.L.. Protein determination for large numbers of samples. Anal. Chem., 31:964, 1959.
- 59 - MILLS, J.P.; ASHWORTH, P.; WILHELM, A.P.; WARTHEF, A.S.. Improved method of the extractions and purification of human growth hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 29:1456-9, 1969.
- 60 - MILS, J.P.; KOSTYO, J.L.; REAGAN, C.E.; WIGNER, S.A.; WOSLEF, M.H.; WILHELM, A.P.. Fragments of human growth hormone produced by digestion with thrombin: chemistry and biological properties. Endocrinology, 107:391-9, 1980.
- 61 - NAKAGAWA, K.; NITSO, N.; HETSCHARDT, M.; ANIKWY, Y.. Biosynthetic 1st-hGH: lack of immunoreactivity for other pituitary hormones. Endocrinol. Jan., 30(5):697-700, 1993.
- 62 - NGUYEN, N.V.; GRINDLAND, P.S.; CHAMBERS, A.. Isolation of human growth hormone isohormones D and F in milligram amounts (II), using isoelectric focusing on polyacrylamide gel. Pren. Biochem., 11(2):173-189, 1981.
- 63 - NIALL, H.D.; FOGAN, M.L.; TRIGGAR, G.W.; SEGRE, G.V.; HUANG, P.; FRIEFEN, F.. The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones. Recent Prog. Form. Res., 29:387-416, 1973.

- 64 - OLINER, F.; GOLD, F.; PAPLOW, A. F.; MORGAN, C. F.; LEPP, A.;
Dependence of hormonal yield on the collection
method for human pituitary glands. II. LH, ACTH
and GH. Endocrinology, 83:1370-4, 1968.
- 65 - OLSON, K. C.; FINNO, J.; LIN, N.; HARKINS, R. M.; SWIDER, C.;
KOPR, W. F.; ROOS, M. J.; FODGE, D.; BRENDER, G.; STEBBING,
N.. Purified human growth hormone from E. Coli
is biologically active. Nature, 293:408-11, 1981.
- 66 - ORNSTEIN, L.. Disc electrophoresis. I. Background
and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:321-49, 1964.
- 67 - PARCELLS, A. J. & LI, C. F.. N-terminal amino acid
analysis of growth hormones from human, monkey,
whale and beef pituitary glands. J. Biol. Chem.,
233(5):1140-5, 1958.
- 68 - PARLOW, A. F.; WILFELMI, A. F.; REICHERT JR, L. F.. Further
studies on the fractionation of human pituitary
glands. Endocrinology, 77:1126-34, 1965.
- 69 - RABEN, M. S.. Treatment of a pituitary dwarf with
human growth hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab.,
901-3, 1958.
- 70 - RABEN, M. S.. Human growth hormone. Recent Prog.
Form. Res., 15:71-114, 1959.
- 71 - RAITI, S.. Clinical studies with human somatropin.
In: BEERS, R. F. & BASSET, F. G. eds. Polypeptides
hormones. New York, Raven, 1980. p.309-19 (Miles
Int. Symp. Series, 12)
- 72 - RAY, A. A. ed. SAS user's guide: statistics. 1982
edition. Cary, North Carolina, SAS Institute,
1982.
- 73 - RYGAN, C. R.; MILLS, J. P.; KOSTYO, J. L.; WILFELMI, A. F..
Isolation and biological characterization of frag-
ments of human growth hormone produced by diges-
tion with plasmin. Endocrinology, 96:625-36, 1975.

- 74 - FIFIELD, R.A.; LEWIS, U.J.; PRINK, M.G.; STEELMAN, S.L.. Human growth hormone: preparation from acetone powder. Endocrinology, 71:559-63, 1962.
- 75 - FRODE, M. & DÖRNER, G.. Immunochemical studies on the heterogeneity of human growth hormone (hGH). Electrophoresis pattern and behavior in gel filtration of hGH in various pituitary extracts. Acta Endocrinol. (Copenhagen), 60:101-11, 1969.
- 76 - RIGHETTI, P.G. & RIGHETTI, A.P.P.. Some optical properties of carrier ampholytes for isoelectric focusing. Anal. Biochem., 63:423-32, 1975.
- 77 - ROBINSON, A.P. & RUDD, C.J.. Deamidation of glutamyl and asparaginyl residues in peptides and proteins. In: FORECKER, P.L. & STADTMAN, E.R. eds. Current topics in cellular regulation. New York, Academic, 1974. p.247-95
- 78 - ROOS, P.; FEVOLD, F.R.; GENZELL, C.A.. Preparation of human growth hormone by gel filtration. Biochem. Biophys. Acta., 74:525-31, 1963.
- 79 - ROOS, M.J.; KOHR, W.J.; HARKINS, R.N.; STEFURG, P.. The human growth hormone gene family. In: GUEFRIGIAN, J.L.; BRANSOME JR., E.D.; OUTSCHOORN, A.S. Hormone drugs: proceedings of the FDA-USP workshop on drug and reference standards for insulins, somatotropins and thyroid-axis hormones, held in Bethesda, Maryland, May 19-21, 1982. Rockville, MD, US Pharmacopoeial Convention, 1982. p.313-8
- 80 - RUDMAN, D.. Potential clinical indications for human growth hormone. In: GUEFRIGIAN, J.L. ed. Insulins, growth hormone and recombinant DNA technology. New York, Raven, 1981. p.161-75
- 81 - RUDMAN, D. & CHAWLA, R.K.. Somatotrophic assays in the rat and in man. In: GUEFRIGIAN, J.L.; BRANSOME JR., E.D.; OUTSCHOORN, A.S. Hormone drugs: proceed-

- ings of the IDR-USF workshop on drug and reference standards for insulins, somatostatins and thyroid-axis hormones, held in Bethesda, Maryland, May 19-21, 1982. Rockville, MD, US Pharmacopeial Convention, 1982. p.287-95
- 82 - SAIPAN, M.R.; CHRISTIAN, V.; LI, C.H.. On the isolation of human pituitary hormones. J.Clin.Endocrinol. Metab., 47:1002-8, 1978.
- 83 - SANTOMÉ, J.A.; DELLACCA, J.M.; PALADINI, A.C.. Chemistry of growth hormone. Pharm. Ther., 2:571-90, 1976.
- 84 - SCHWARTZ, I.. Estudo eletroforético de diferentes preparações de hormônio de crescimento humano: estimativa da massa molecular e caracterização dos isohormônios e outros componentes peptídicos. São Paulo, 1979. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Energia Atômica). (IPA-DM-134).
- 85 - SINGH, B.N.P.; SEARBY, P.K.; RICE, H.D.; LINDSEY, T.F.; LEWIS, H.J.. Modified forms of human growth hormone with increased biological activities. Endocrinology, 92:993-91, 1974.
- 86 - SINGH, B.N.P.; SEARBY, P.K.; LEWIS, H.J.. Heterogeneity of human growth hormone. Endocrinol. Res. Commun., 1:446-64, 1974.
- 87 - SKVLER, J.S.; CHRAMBACH, A.; LI, C.H.. Quantitative polyacrylamide gel electrophoresis and specific activities of human somatostatins and its derivatives. Biochim. Biophys. Acta, 40:566-72, 1977.
- 88 - SKVLER, J.S.; BAUMANN, G.; CHRAMBACH, A.. A catalogue of isohormones of human growth hormone based on quantitative polyacrylamide gel electrophoresis. Acta Endocrinol. (Copenhagen), 25 (Suppl):5-40, 1977.
- 89 - STEPPING, V.; OLSON, K.; LIN, Y.; HARKINS, P.N.; SWIEDE, C.; ROOS, M.J.; FIELDS, F.; MAY, L.; FINKE, J.; FODGE, D.; PRENDER, G.. Biological comparison of natural and

- recombinant DNA derived polypeptides. In: GUR-
RIGIAN, J.L. ed. Insulins, growth hormone and
recombinant DNA technology. New York, Raven,
1981. p.117-31
- 90 - STEIN, J.; LESTER, J.; FOSTER, J.; SHORRHEEN, C.; HARTREE,
A.S.. Studies of a human growth hormone prepara-
tions used for clinical treatment in Great Brit-
ain. J. Endocrinol., 94: 203-10, 1981.
- 91 - STROUD, S.W.; FOGG, J.M.C.; PIELER, F.V.. A simple
method for the extraction and purification of
human growth hormone and its assay by paper
chromatography. J. Clin. Endocrinol. Metab., 37:
860-6, 1973.
- 92 - TAKANO, K.; FIZUKA, N.; SHIZUME, K.; ASAYAMA, K.; KOGAWA, M..
Short-term study of biosynthetic hGH in man.
Endocrinol. Jpn., 30 (1): 79-84, 1983.
- 93 - TALAMANTES, F.; LOPFZ, J.; LEWIS, U.J.; WILSON, C.F..
Multiple forms of growth hormone: detection in
medium from cultured pituitary adenoma explants.
Acta Endocrinol., 98: 8-13, 1981.
- 94 - TANNER, J.M.. Short stature of pituitary origin:
the clinical state of the art. In: GURRIGIAN, J.L.
ed. Insulin, growth hormone and recombinant DNA
technology. New York, Raven, 1981. p.133-59
- 95 - THORNGREN, K.G.; FANSSON, L.I.; MENANDER-SELLMAN, K.;
STENSTRÖM, A.. Effect of dose and administration
period of growth hormone on longitudinal bone
growth in the hypophysectomized rat. Acta
Endocrinol., 74: 1-23, 1973.
- 96 - TRYGSTAD, O. & FOSS, I.. Preparation of purified
human growth hormone and crude human pituitary
gonadotrophin. Acta Endocrinol. (Copenhagen), 66:
478-90, 1971.

- 97 - 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 adinokinetic hyperglycaemic agent. Acta Endocrinol. (Copenhagen), 58:295-317, 1968.
- 98 - VIVIAN, S.R. & LaFELLA, F.. Classic bioassay statistical procedure applied to radioimmunoassay of bovine thyrotropin, growth hormone and prolactin. J.Clin.Endocrinol., 33:225-33, 1971.
- 99 - WALLIS, M.. Growth hormone: deletions in the protein and introns in gene. Nature, 284:512, 1980.
- 100 - WEBER, K. & OSFORN, M.. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem., 244 (16):4406-12, 1969.
- 101 - WILHELM, A.F.. Fractionation of human pituitary glands. Can.Jichen.Physiol., 30:1659-68, 1961.
- 102 - WILHELM, A.F.. Report of the consensus-forming session on somatropin. Second item: proposed analytical and bioassay methods for identification and assay of GH preparations for human use. In: GURPIGIAN, J.L.; FRANSOME JR., F.D.; OUTSCHOORN, P.S. Hormone drugs: proceedings of the FDA-USP workshop on drug and reference standards for insulins, somatotropins and thyroid-axis hormones, held in Bethesda, Maryland, May 19-21, 1982. Rockville, MD, US Pharmacopeial Convention, 1982. p.387-92
- 103 - WINDHOLZ, H. ed. The Merck Index. 9ed. Rahway, New Jersey; Merck, 1976. p.782
- 104 - WOODS, K.R. & YANG, K.T. Separation of dansyl-amino acids by polyamide layer chromatography. Biochim. Biophys.Acta, 133:359-70, 1967.

- 105 - YADLEV, R.A.; ROBFARD, D.; CHEPNEVICU, A.. Isohormones of human growth hormone. III. by preparative polyacrylamide gel electrophoresis and characterization. Endocrinology, 93:866-73, 1973.
- 106 - YALLOU, R.S.. Radioimmunoassay methodology: application to problems of heterogeneity of peptide hormones. Pharmacol.Rev., 25(2):161-78, 1973.