

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

**MINIEXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROLACTINA
HUMANA PARA PREPARAÇÃO DE REAGENTES
USADOS EM RADIOIMUNOENSAIO**

LIGIA ELY MORGANTI FERREIRA DIAS

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

**Orientador:
Dr. Paolo Bartolini**

**São Paulo
1989**

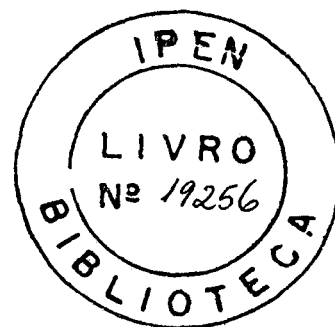
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

MINIEXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROLACTINA
HUMANA PARA PREPARAÇÃO DE REAGENTES
USADOS EM RADIOIMUNOENSAIO

LIGIA ELY MORGANTI FERREIRA DIAS

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Tecnologia Nuclear.

Orientador: *Dr. Paolo Bartolini.*



SÃO PAULO
1989

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP - IPEN

Dissertação realizada nos laboratórios
da Divisão de Medicina (TBM) do Insti-
tuto de Pesquisas Energéticas e Nucle-
ares (IPEN) de São Paulo.

Ao Nelson

Ao Henrique

Ao Dr. Paolo Bartolini pela segura
orientação e constante apoio,

meu especial agradecimento

AGRADECIMENTOS

À Irene Schwarz, MSc.,

À Maria Teresa Carvalho Pinto Ribela, MSc.,

Ao Dr. José Roberto Rogero

Ao Dr. Roberto Fulfaro,

Ao Dr. Cláudio Rodrigues,

pela orientação, participação e apoio na realização deste trabalho.

À Srta. Rosângela R. Arkaten pela ajuda técnica,

Aos colegas da Divisão de Medicina pela colaboração e estímulo,

À CAPES, que me concedeu Bolsa de Mestrado,

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

- hPr1 - Prolactina humana
- RIE - Radioimunoensaio
- EGPA - Eletroforese em gel de poliacrilamida
- Rm - Migração eletroforética relativa
- Kd - Coeficiente de distribuição
- TCA - Ácido tricloroacético
- SAB - Soroalbumina bovina
- cpm - Contagens por minuto
- rpm - Rotações por minuto
- mCi - Millicurie = $3,7 \times 10^7$ desintegrações por segundo
- C.V. - Coeficiente de variação
- $\bar{X} \pm DP$ - Média \pm desvio padrão
- ED₅₀ - Dose que produz 50% de queda na resposta relativa à dose zero
- A₂₈₀ - Absorbância medida em espectrofotômetro em luz de comprimento de onda 280 nm.

RESUMO

A purificação de prolactina humana a partir de hipófises foi desenvolvida em nosso laboratório com o objetivo de obtermos um reagente puro para uso em radioimunoensaio. O procedimento de extração e purificação foi adaptado do método de McLean et al., o qual envolve as seguintes etapas:

1. Extração de hipófises congeladas em tampão fosfocitrato 0,14M, pH 4,0 e tampão acetato de amônio 50 mM em pH 10,0.
2. Purificação por cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose CL-4B na presença de acetonitrila.
3. Purificação por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose CL-6B.

Todo o processo, desde a primeira homogenização até o início da liofilização pode ser realizado em aproximadamente 10 dias.

Na fase de extração foi introduzida uma etapa utilizando-se tampão acetato de amônio 50 mM em pH 7,0, com o qual se obteve um enriquecimento significativo do conteúdo de hPr1 no extrato. O hormônio prolactina foi recuperado de 30-70 hipófises com recuperação total de aproximadamente 7 μ g/hipófise.

A pureza do hormônio foi analisada em eletroforese em gel de poliácridamida a 7%. A hPr1-IPEN apresentou banda única com $R_m=0,505$, praticamente coincidente ao R_m de 0,503 obtido com a NIADDK-hPr1-RP-I-7.

No radioimunoensaio de hPr1, as curvas padrão obtidas com a hPr1-IPEN e NIADDK hPr1-RP-1 mostraram paralelismo significativo ($P < 0,05$). A hPr1-IPEN mais pura apresentou somente 0,7% de contaminação por hGH imunoreativo. Foi realizado o controle de qualidade interno para o RIE de hPr1. Primeiramente se utilizou a hPr1 NIADDK para estudo de reprodutibilidade de radioiodação, bem como estudo da sensibilidade, precisão e exatidão dos ensaios. Uma vez tendo sido obtida a hPr1-IPEN purificada, foi também realizado o controle de qualidade do padrão ampolizado.

O conteúdo de hPr1 imunoreativa foi de 492,0 ng/ampola (CV inter ensaio, inter ampola=13,2%). A estabilidade deste material foi controlada por cinco meses, não apresentando diminuição significativa da atividade imunológica, enquanto a precisão do ensaio foi da mesma ordem daquela obtida com a hPr1 NIADDK.

O método de purificação foi considerado eficaz para obtenção de hPr1 com a pureza necessária para a preparação de reagentes usados em radioimunoensaios, possuindo a vantagem de ser rápido e relativamente simples.

ABSTRACT

Purification of human prolactin from pituitaries was carried out in our laboratory to obtain a pure reagent for use in RIA.

The extraction and purification procedure was adapted from the method of Mc. Lean et al., and it involves the following steps:

1. Extraction of frozen pituitaries in buffers 0.14M phosphate/citrate pH 4.0 and 0.05M ammonium acetate pH 10.0.
2. Purification by hydrophobic interaction chromatography on Phenyl-Sepharose CL-4B in the presence of acetonitrile.
3. Purification by anion exchange chromatography on DEAE-Sepharose CL-6B.

The whole process from the first homogenization step to the starting of the lyophilization can be performed in about 10 days. In the extraction phase an extra step was added using buffer 50mM ammonium acetate pH 7.0, which allowed a significant enrichment in the hPr1 content of the extract. Prolactin was recovered from 30-70 pituitaries with an overall yield of approximately 7 μ g/pituitarie.

The purity of the hormone was analyzed on 7% polyacrilamide gel electrophoresis. hPr1-IPEN presented a single band with $R_m=0.505$, practically coincident with the $R_m=0.503$ of NIADDK-hPr1-I-7. In the hPr1 RIA, the standard curves obtained with hPr1-IPEN and NIADDK-hPr1-I-7 showed a significant parallelism ($P<0.05$). By specific RIA, the purest hPr1-IPEN presented only

0.7% of immunoreactive hGH.

A work was carried out also on internal quality control of hPr1-RIA. First, using hPr1 from NIADDK, a study was performed on radioiodination reproducibility, as well as sensitivity, precision and accuracy of the assays. Then, once obtained the hPr1-IPEN standard preparation, the same type of quality control was carried out on this ampolized reference material. The hPr1 immunoreactive content was of 492.0 ug/ampoule (CV inter assay, inter ampoule=13.2%), its stability was controlled for five months, not showing any significant decrease, while the precision of the assay was of the same order of that obtained with hPr1 NIADDK.

The purification method is considered effective for obtaining a hPr1 of the purity needed for radioassay purposes, having the advantage of rapidity and relative simplicity.

ÍNDICE

Pag.

I-INTRODUÇÃO.....	1
II-MATERIAIS.....	12
2.1.Materiais e Equipamentos.....	12
2.2.Reagentes e Soluções.....	13
III.MÉTODOS.....	22
3.1.Métodos de Quantificação Protéica.....	22
3.1.1.Método de Lowry.....	22
3.1.2.Método baseado na A_{280} nm.....	24
3.2.Técnica de Marcação.....	24
3.2.1.Marcação pelo método clássico da Cloramina T.....	25
3.2.2.Marcação pelo método estequiométrico da Cloramina T, modificado.....	26
3.2.3.Marcação pelo método da Lactoperoxidase.....	27
3.2.4.Teste de precipitação pelo TCA a 20%.....	28
3.2.5.Purificação da hPr1 marcada.....	28
3.2.6.Cálculo da Recuperação.....	29
3.2.7.Cálculo do Rendimento de Marcação.....	31
3.2.8.Cálculo do Coeficiente de Distribuição (Kd).....	31
3.3.Radioimunoensaio da Prolactina e do hormônio de crescimento com reagentes NIADDK e seu controle de qualidade.....	32

3.3.1. Radioimunoensaio de hPr1.....	32
3.3.2. Determinação da ótica diluição do anti-soro.....	35
3.3.3. Preparo das soluções utilizadas nas curvas padrão....	35
3.3.4. Controle de qualidade do radioimunoensaio de hPr1....	38
3.3.4.1. Sensibilidade.....	38
3.3.4.2. Reprodutibilidade intra-ensaio e interensaio....	38
3.3.4.3. Exatidão.....	39
3.3.5. Radioimunoensaio de Hormônio de Crescimento.....	40
3.4. Determinação do conteúdo de hPr1 em hipófises humanas congeladas.....	40
3.5. Homogenização e extração das hipófises.....	43
3.5.1. Condições alternativas de extração.....	45
3.5.1.1. Extração adicional em pH 7,0.....	45
3.5.1.2. Extração por liofilização e reextração.....	45
3.5.1.3. Extração por precipitação com solventes orgânicos.....	46
3.6. Purificação.....	47
3.6.1. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em Phenyl- Sephrose CL-4B.....	47
3.6.2. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephrose CL-6B.....	49
3.7. Eletroforese.....	51
3.7.1. Eletroforese da hPr1 "fria".....	51
3.7.2. Eletroforese do ¹²⁵ I-hPr1.....	55
3.8. Preparação de padrões de hPr1 IPEN.....	55
3.9. Teste de paralelismo entre os padrões de hPr1 IPEN e NIADDK.....	56

IV.RESULTADOS.....	58
4.1.Marcação e purificação do ^{125}I -hPr1.....	58
4.2.Escolha das melhores condições para o RIE de hPr1.....	58
4.3.Determinação da ótima diluição do anti-soro.....	61
4.4.Controle de qualidade do RIE de hPr1.....	64
4.4.1.Sensibilidade.....	64
4.4.2.Reprodutibilidade intra-ensaio e interensaio.....	66
4.4.3.Exatidão.....	66
4.5.Estudo da reação cruzada entre os RIE de hPr1 e de hGH..	68
4.6.Determinação do conteúdo de hPr1 em hipófises humanas congeladas.....	69
4.7.Estudo de condições alternativas de extração.....	72
4.7.1.Extração adicional em pH 7,0.....	72
4.7.2.Extração por liofilização reextração.....	72
4.7.3.Extração com solventes orgânicos.....	72
4.8.Homogenização e extração das hipófises.....	74
4.9.Purificação.....	77
4.9.1.Cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl- Sepharose CL-4B.....	77
4.9.2.Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose CL-6B.....	80
4.10.Análise qualitativa e quantitativa de hPr1 IPEN mediante eletroforese e densitometria UV.....	82
4.11.Estudo das melhores condições de estocagem da hPr1 purificada.....	86

4.12. Estudo da reprodutibilidade e estabilidade do 1º padrão de hPr1 IPEN.....	88
4.13. Teste de paralelismo entre os padrões de hPr1 IPEN e NIADDK.....	89
4.14. Determinação de outros hormônios hipofisários contaminantes.....	94
V. DISCUSSÃO.....	95
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

I. INTRODUÇÃO

A prolactina (Pr1), o hormônio de crescimento (GH) e o hormônio lactogênio placentário (PL) são considerados membros de uma mesma família hormonal devido à sua semelhança estrutural, como também por várias propriedades biológicas e imunológicas comuns (52,53). Segundo alguns autores, a Pr1 e o GH divergiram de um único gene ancestral há aproximadamente 400 milhões de anos e o gene de PL divergiu do gene de GH há menos tempo, de 10 a 20 milhões de anos (12,49,74).

A sequência de aminoácidos da prolactina humana (hPr1) foi determinada primeiramente por Shome & Parlow, em 1977, e quando comparada com a do hormônio de crescimento (hGH), pôde-se verificar que existem 32 resíduos (16%) que possuem posição sequencial idêntica à molécula de hGH. Em comparação com o hPL, a hPr1 possui identidade sequencial de 13%. Muitos dos resíduos idênticos entre hPr1 e hGH residem na porção NH₂-terminal da molécula e no terço próximo ao carboxiterminal da molécula. Shome & Parlow acharam surpreendente verificar que a estrutura da hPr1 possui tão pouca identidade com o hGH, em vista da atividade prolactínica intrínseca do hGH (67).

Existem evidências de que o GH possui atividade lactogênica muito alta em primatas (30,31), enquanto que a Pr1 possui, além da ação lactogênica, também uma atividade em promover o crescimento em ratos (15).

A primeira evidência da existência do hormônio hipofisário prolactina foi obtida por Stricker e Greuter, quando descobriram

sua ação lactogênica (69).

Antes da década de 1970, quando se deram os primeiros isolamentos da hPr1 (26,36), ainda existiam dúvidas se a hipófise humana realmente secretava uma molécula de hPr1 distinta do hGH. Isto se deve principalmente às dificuldades na separação dos dois hormônios na hipófise humana. Em quase todas as espécies, com exceção dos primatas (homem e macaco) era relativamente fácil purificar GH e Pr1 utilizando ensaios biológicos para sua identificação. O ensaio biológico clássico para o GH depende do aumento do peso corporal de ratos hipofisectomizados (47), enquanto a Pr1 era detectada pela sua capacidade em estimular o crescimento da mucosa de papo de pombo (51). No caso do homem e macaco, as preparações de hGH e de hPr1 obtidas em extratos hipofisários invariavelmente produziam respostas positivas para ambos os ensaios, embora existissem variações de resposta entre as diferentes preparações (52). Esta dificuldade em se isolar a hPr1 levou alguns investigadores a acreditar que o hGH tivesse atividade intrínseca de hPr1 e que a Pr1 não existiria como entidade separada no homem. Entretanto, observações clínicas e experimentais sugeriam que uma molécula de Pr1 deveria estar presente no homem, como em outras espécies. .

A prolactina humana é um hormônio polipeptídico produzido pelo lobo anterior da hipófise e durante a gravidez, pela placenta (13), com peso molecular de 24.000 daltons (67). É constituída de cadeia única de 199 aminoácidos, sendo rica em resíduos ácidos e hidrofóbicos e possuindo a leucina e cisteína como aminoácidos

terminais (12). Apresenta 3 pontes disulfeto (67) e o seu ponto isoelétrico é de 6,0 (24,43)(Fig. 1).

A hPr1 circulante no sangue se apresenta em 3 formas distintas: a "little", de peso molecular 24.000 daltons que representa 70 a 90% da imunorreatividade total de hPr1; a "big", com peso molecular de 50.000-56.000 daltons com 9 a 20% da imunorreatividade e a "big-big" que possui peso molecular de 170.000 a 200.000 e constitui de 0 a 5% da imunorreatividade prolactínica no soro humano normal (1,11,19,20,29,32,70,75). A heterogeneidade da hPr1 parece ser originada na hipófise e não como resultado de modificações periféricas do produto secretado (16,19,20,29,70).

Alguns autores acharam maior porcentagem de formas "big" e "big-big" em determinados casos: mulheres grávidas, mulheres com hiperprolactinemia e funções ovarianas normais e alguns casos de tumores hipofisários (1,19,29,63,70).

Segundo alguns autores, congelamentos e descongelamentos sucessivos podem levar a conversão da forma "big" a "little" (1,19,70) e a "big-big" (19). Acredita-se que a forma "big" é a forma "little" ligada não covalentemente à outra proteína. Ainda existe controvérsia quanto à diminuição da atividade biológica da forma "big", quando comparada com a forma "little" (16,19,20,70,75). Alguns autores acreditam que a forma "big-big" é um artefato de congelamento ou estocagem, sendo uma forma agregada da "little" (1,19,70).

Além disso, a forma "little" pode ser separada por meio de

```

1          10          20          30
leu pro ile cys pro gly gly ala ala arg cys gln val thr leu arg asp leu phe asp arg ala val val leu ser his tyr ile his
UUG CCC AUC UGU CCC GGC GGG GCU GCC CGA UGC CAG GUG ACC CUU CGA GAC CUG UUU GAC CGC GCC GUC GUC CUG UCC CAC UAC AUC CAU

asn leu ser ser glu met phe ser glu phe asp lys arg tyr thr his gly arg gly phe ile thr lys ala ile asn ser cys his thr
AAC CUC UCC UCA GAA AUG UUC AGC GAA UUC GAU AAA CGG UAU ACC CAU GGC CGG GGG UUC AUU ACC AAG GCC AUC AAC AGC UGC CAC ACU

ser ser leu ala thr pro glu asp lys glu gln ala gln gln met asn gln lys asp phe leu ser leu ile val ser ile leu arg ser
UCU UCC CUU GCC ACC CCC GAA GAC AAG GAG CAA GCC CAA CAG AUG AAU CAA AAA GAC UUU CUG AGC CUG AUA GUC AGC AUA UUG CGA UCC

trp asn glu pro leu tyr his leu val thr glu val arg gly met gln glu ala pro glu ala ile leu ser lys ala val glu ile glu
UGG AAU GAG CCU CUG UAU CAU CUG GUC ACG GAA GUA CGU GGU AUG CAA GAA GCC CCG CAG CCU AUC CUA UCC AAA CCU GUA CAG AUU CAG

glu gln thr lys arg leu leu glu gly met glu leu ile val ser gln val his pro glu thr lys glu asn glu ile tyr pro val trp
GAG CAA ACC AAA CGG CUU CUA GAG GGC AUG GAG CUG AUA GUC AGC CAG GUU CAU CCU GAA ACC AAA GAA AAU GAG AUC UAC CCU GUC UGG

ser gly leu pro ser leu gln met ala asp glu glu ser arg leu ser ala tyr tyr asn leu leu his cys leu arg arg asp ser his
UUG GGA CUU CCA UCC CUG CAG AUG GCU GAU GAA GAG UCU CGC CUU UCU GCU UAU UAU AAC CUG CUC CAC UGC CUA CCC AGG GAU UCA CAU

lys ile asp asn tyr leu lys leu leu lys cys arg ile ile his asn asn asn cys
AAA AUC GAC AAU UAU CUC AAG CUC CUG AAG UGC CGA AUC AUC CAC AAC AAC AAC UGC

```

Figura 1: Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da Prolactina humana (12).

eletroforese em pH alcalino em pelo menos três componentes com características físicas e biológicas ligeiramente diferentes (54,55).

Existem ainda formas clivadas de hPr1 na hipófise humana (16K e 18K) que somente aparecem no plasma em certas condições fisiológicas, principalmente na gravidez (50,68).

Em hipófises, líquido amniótico e decidua humano foi também descrita uma forma glicosilada de hPr1 (GhPr1) com peso molecular de 25.000 daltons (33,40,45,57) constituindo de 10 a 15% do total de hPr1 presente no soro, diminuindo durante a evolução da gravidez e tornando a aumentar em mulheres que não amamentam (33,40,45). A GPr1 contém uma unidade de carboidrato ligada à asparagina 31 e que possui o efeito de diminuir sua atividade biológica (46,57).

A prolactina atua diretamente sobre os tecidos-alvo que são as glândulas mamárias; é o mais importante, mas não o único hormônio envolvido no processo de lactação. Durante a gravidez, os efeitos combinados dos hormônios hipofisários Pr1 e GH, dos hormônios placentários PL e Pr1, estrógenos e progesterona preparam o tecido das glândulas mamárias. A lactação é suprimida por uma inibição direta da atividade secretória das mamas pelos altos níveis de estrógenos e progesterona. Após o parto, os níveis de estrógenos e progesterona caem rapidamente e a ação lactogênica da Pr1 deixa de ser impedida (13).

Sabe-se que a mama, principalmente o bico e a auréola, é ricamente envolta por terminações nervosas especializadas. Estes

receptores sensoriais iniciam impulsos que atingem a área do hipotálamo, a qual regula a secreção de Prl, resultando na elevação dos níveis séricos de Prl e na secreção de leite pelas mamas (13).

O efeito predominante do hipotálamo sobre a secreção de Prl é inibir a função basal. Em condições normais, a Prl em excesso age diretamente sobre o hipotálamo, o qual libera o Fator inibidor da Prolactina (PIF) que possui ação de inibir a secreção de Prl (73). Entretanto, diversos estímulos ocasionam a liberação de Prl, não só por desinibição dos efeitos do PIF, mas por causarem liberação do fator liberador da Prl (PRF), também produzido pelo hipotálamo (13).

Muitas funções foram sugeridas para a Prl, por exemplo: controle de fluidos e excreção de eletrólitos, mas para o homem estas funções não são confirmadas. As únicas funções realmente confirmadas para o homem são a lactação e o efeito sobre as funções das gônadas (18,27).

No recém-nascido, os níveis plasmáticos de hPrl são bastante elevados (em média 150 ng/ml) e estes níveis vão baixando até chegar aos níveis de adultos normais por volta do terceiro ao sexto mês de vida. Os níveis plasmáticos de hPrl são menores nos homens (média de 7 ng/ml) do que nas mulheres (em média 10-11 ng/ml) e nestas parecem ocorrer pequenas variações durante o ciclo menstrual (18). Durante a gravidez, os níveis de hPrl no soro vão aos poucos se elevando até o parto (média de 200ng/ml) e se mantém altos enquanto existir o estímulo da amamentação (18,73). No líquido amniótico os níveis de hPrl são muito elevados no pri-

meiro semestre (10 ug/ml), baixando durante a evolução da gravidez (1 ug/ml) (18).

A deficiência de hPr1 é rara, somente ocorre em necrose, infartação da hipófise, hipofisectomia, em síndrome de Sheehan e quando da administração de bromocriptina (73).

A hiperprolactinemia é, provavelmente, a desordem hipotálamo-hipofisária mais comum observada na prática clínica (73). Existem muitos casos diferentes de hiperprolactinemia devido à presença de tumores hipofisários. Ensaio dinâmico de secreção de hPr1 não parecem ser úteis para a confirmação de microadenomas em pacientes com hiperprolactinemia. A investigação mais útil é a dosagem de hPr1 basal que, se estiver acima de 200 ng/ml, indica que provavelmente o paciente esteja desenvolvendo um microadenoma (17,73). Menos frequentemente, desordens hipotalâmicas ou hipotireoidismo podem ser a causa da hiperprolactinemia. O hipertireoidismo pode causar uma elevação muito grande dos níveis séricos de hPr1. (73).

A hiperprolactinemia pode ocorrer como efeito de terapia por drogas bloqueadoras de receptores dopaminérgicos, drogas depletoras de dopamina e com estrógenos ou TRH (73). A hiperprolactinemia é também muito frequentemente associada ao hipogonadismo. Os níveis plasmáticos de hPr1 podem estar elevados em mulheres com ovários policísticos, em pacientes com amenorréia após o uso de contraceptivos orais e em mulheres com amenorréia. A hiperprolactinemia é menos comum em homens (73).

A hPr1 tem um volume de distribuição que se aproxima do fluido extracelular. Após administração exógena ou supressão de

secreção endógena, o nível de hPr1 no plasma cai rapidamente, possuindo meia-vida de 20 a 30 minutos (13).

Resulta evidente, por quanto exposto acima, que a dosagem de hPr1 é de muita utilidade para a realização de testes diagnósticos. O imunoensaio de prolactina é utilizado especialmente para o diagnóstico de adenomas pituitários e relativo controle e avaliação da funcionalidade hipotalâmica, de galactorréa, amenorréia como também na detecção de esterilidade e em casos de impotência e ginecomastia masculina. Por isso este ensaio se constitui num dos mais frequentemente realizados nos laboratórios de Análises Clínicas.

Muitas explicações podem ser dadas sobre a dificuldade em se purificar a hPr1. Uma das principais razões é que o hGH constitui de 5 a 10% do peso seco da hipófise, enquanto que o conteúdo de hPr1 está por volta de 0,1% , o que significa 50 a 100 vezes menos que o hGH (18). Outro problema importante é a instabilidade da hPr1 durante a estocagem das hipófises e o isolamento, principalmente devido a enzimas proteolíticas presentes nesta glândula (35,36,38,54) e também devido ao fato deste hormônio ser reconhecidamente lábil, principalmente quando em baixa concentração proteica e/ou alta força iônica (54).

O primeiro trabalho sobre a purificação da hPr1 que obteve êxito foi o de Lewis, em 1971 (37) após obtenção pelo mesmo autor de evidência eletroforética da existência de hPr1 na hipófise de

uma mulher que morreu durante o 5º mês de gravidez (39). Depois disso, outros trabalhos foram realizados sobre o mesmo assunto, obtendo a hPr1 a partir de hipófises (10,21,22,28,58,65) e de líquido amniótico (9).

Os métodos de extração de hPr1 utilizam normalmente uma extração prévia em pH ácido ou neutro a fim de remover proteínas interferentes e parte do hGH, seguida de extração em pH alcalino (8,5 a 10,0) onde a hPr1 é solubilizada em solução aquosa (37,65) ou etanólica, com concentração de álcool etílico de 25 a 50% (28,38,58), sendo que no último caso, a hPr1 é precipitada após adição de álcool etílico em concentração de 85% e depois ressolubilizada em pH alcalino.

As fases de purificação mais utilizadas são: cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 ou G-150 (27,28,37,38,58,65), cromatografia de troca aniônica em DEAE-cellulose (27,28,37,38,58) ou DEAE-Sepharose CL-6B (22,65). Alguns métodos utilizam ainda a cromatografia de troca catiônica CM-cellulose (27,28) ou a separação por focalização isoeletrica (9,58), que não parecem apresentar bons rendimentos.

Os métodos mais recentes utilizam a purificação por cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose CL-4B. Ao que parece, a hPr1 é uma proteína que apresenta alta hidrofobicidade e, portanto, se utilizam desta propriedade para a sua purificação junto dos outros hormônios hipofisários e do hGH e utilizam também a cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose CL-6B, podendo ou não apresentar purificações intermediárias por

exclusão molecular (21,22,65).

É sabido que um antígeno purificado ou altamente purificado é a matéria prima fundamental para a obtenção dos reagentes necessários para montar um imunensaio e, mais especificamente no caso presente, um radioimunensaio. Prolactina purificada será necessária para a produção de anticorpos específicos (mono e policlonais) como também para a preparação de soluções padrão ampolizadas, calibradas contra o padrão primário internacional da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Prolactina altamente purificada será necessária para a marcação, no caso em discussão, com ^{125}I . De fato, pelo que é de conhecimento do autor, este hormônio não é produzido no Brasil e, especialmente devido à sua escassez na hipófise, às dificuldades já mencionadas relativas à sua extração e purificação, o seu custo é exorbitante, chegando a aproximadamente US\$ 12.000 por miligrama de hormônio purificado, o mais caro dos hormônios hipofisários. Além disso, ao preço devem ser adicionadas as dificuldades de importação e de suprimento regular deste produto altamente lábil.

A todas estas razões se devem os objetivos deste trabalho cuja meta é a padronização de uma técnica suficientemente rápida de extração e purificação de hPrl, a partir de um número relativamente pequeno de hipófises humanas. Devido às dificuldades próprias do processo de extração e aos problemas surgidos na obtenção de glândulas humanas, optou-se por esta escala reduzida para depois, somente num segundo tempo e além dos objetivos do presente trabalho, realizar extrações em escalas semi-industriais. Será dada ênfase particular à obtenção de um produto suficientemente

puro, e à obtenção de rendimentos finais que apresentem valores de acordo com os dados da literatura. A proteína purificada será caracterizada eletroforética e imunologicamente em comparação com o produto altamente purificado, cedido pelo "National Institute of Health" dos EUA.

II. MATERIAIS

2.1. Materiais e Equipamentos:

- Agitador magnético modelo 257, marca Fanem, São Paulo, Brasil.
- Agitador mecânico do tipo "Vortex" modelo AT-56, marca Phoenix, São Paulo, Brasil
- Balança analítica com precisão de 0,001 mg, marca Mettler, Zurique Suíça.
- Balança semi-analítica com precisão de 0,1 g modelo P1000N, Mettler, Zurique, Suíça.
- Bomba peristáltica modelo 4912A, marca LKB, Estocolmo, Suécia.
- Coletor de frações automático modelo Ultrorac 7000, marca LKB, Estocolmo, Suécia.
- Contador gama, tipo poço com dectetor de NaI(Tl), modelo 4000, marca Beckman, Fullerton, USA.
- Contador gama, tipo poço com dectetor de NaI(Tl), modelo 1185, marca Nuclear Chicago, Illinois, USA.
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super Speed RC-2B, marca Sorvall, Connecticut, USA.
- Colunas cromatográficas de vidro de vários tamanhos, construídas no IPEN-CNEN/São Paulo, Brasil.
- Cuba eletroforética de acrílico, Técnica Permatron, São Paulo, Brasil.
- Densitômetro modelo Scan 400, marca Joyce Loebel, Londres, Inglaterra com Registrador marca Bryans, modelo 28000, Londres, Inglaterra.

- Espectrofotômetro modelo PMQII, marca Carl-Zeiss, Oberkochen, República Federal da Alemanha.
- Homogenizador modelo 60K, marca Virtis, Nova York USA.
- Liofilizador marca Edwards, São Paulo, Brasil.
- Peagâmetro modelo B371, marca Micronal, São Paulo, Brasil.
- Pipetas automáticas de vários volumes, marca Oxford, Foster City, USA.
- Pipetas reguláveis automáticas de vários volumes, marca Eppendorf, Hamburgo, República Federal da Alemanha.
- Repipetador automático, marca Eppendorf, Hamburgo, República Federal da Alemanha.
- Seringas de 10 µl marca Hamilton, Reno, USA.

2.2. Reagentes e Soluções:

Reagentes:

- Acetato de Amônio P.A., Merck, São Paulo.
- Acetonitrila para cromatografia, Merck, Darmstadt, República Federal da Alemanha.
- Ácido cítrico, J.T.Baker, São Paulo.
- Ácido clorídrico concentrado P.A., Merck, São Paulo.
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), Carlo Erba, São Paulo.
- Ácido ortofosfórico, B. Herzog, São Paulo.
- Ácido tricloroacético (TCA), J.T.Baker, São Paulo.
- Acrilamida, Bio Rad, São Paulo.
- Álcool etílico P.A., Merck, São Paulo.

- Amônia líquida P.A., U.C., São Paulo.
- Azida sódica P.A., Merck, São Paulo.
- Azul de bromofenol, Merck, São Paulo.
- Azul dextran 2000, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Bacitracina, Inlab, São Paulo.
- Benzoato de p-hidroximercúrio N^o PM0752, Sigma Chemical Company, St Louis, EUA.
- Carbonato de sódio, P.A., J.T.Baker, São Paulo.
- Cloramina T., P.A., Merck, São Paulo.
- DEAE-Sepharose CL-6B, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Fluoreto de p-metil sulfonil, N^o P-7626, Sigma Chemical Company, St Louis, EUA.
- Fosfato de sódio monobásico e dibásico, P.A., Carlo Erba, São Paulo.
- Glicina P.A. Merck, São Paulo.
- Iodeto de potássio P.A., Merck, São Paulo.
- Metabissulfito de sódio P.A., Merck, São Paulo.
- N,N'-metileno bisacrilamida (BIS), Bio Rad, São Paulo.
- N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED), Bio Rad, São Paulo.
- Na¹²⁵I em hidróxido de sódio 0,1N, New England Nuclear Boston, EUA.
- N-etilmaleimida, Fluka, São Paulo.
- Pentóxido de di-fósforo P.A., Merck, São Paulo.
- Polietilenoglicol 6000 (PEG), Atlas, São Paulo.
- Phenyl-Sepharose CL-4B, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.

- Reativo de Folin-Ciocalteu 1,75N, QUEEL, São Paulo.
- Riboflavina, Roche, São Paulo.
- Sephadex G-100, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Sacarose cristais P.A., Merck, São Paulo.
- Sulfato de cobre pentahidratado, P.A., Reagen, São Paulo.
- Tartarato de potássio P.A., Merck, São Paulo.
- Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) P.A., Merck, São Paulo.

Materials Biológicos:

- Lactoperoxidase N^o L8257, Sigma Chemical Company, St Louis, EUA.
- Soroalbumina bovina, fração V, N^o A4503, Sigma Chemical Company, St Louis, EUA.
- Soroalbumina bovina, RIA grade, N^o A7888, Sigma Chemical Company, St Louis, EUA.
- Prolactina empregada para radioiodação NIADDK-hPr1-I-7 (AFP-9900), obtida por doação do National Institute of Arthritis, Diabetes Digestive & Kidney Diseases (NIADDK).
- Prolactina utilizada como padrão: NIADDK-hPr1 RP-1, obtida do NIADDK por doação.
- Anticorpo anti hPr1: NIADDK-anti-hPr1-3 (AFP-C 11580) produzido em coelhos, obtido do NIADDK, por doação.
- Hormônio de Crescimento empregado para radioiodação: Extraído e purificado no IPEN, segundo a técnica de Roos et al (97), modificado por Assis et al (3).

- hGH utilizado como padrão: NIAMDD-hGH-RP-1 (AFP 4793B), obtido do NIADDK, por doação.
- Anticorpo anti-hGH: NIAMDD-anti-hGH-1 (AFP-97720133), obtido do NIADDK, por doação.

Hipófises:

As hipófises foram gentilmente doadas pelo Dr. Sigmar Horst Cardoso do Serviço de Verificação de óbitos do Hospital São Paulo; retiradas até 24 horas após o óbito e congeladas a -20°C antes de serem processadas.

Soluções:

Soluções utilizadas para extração:

- Tampão fosfocitrato 0,14M, pH 4,0:

Ácido cítrico.....	12,8 g
Fosfato de sódio dibásico.....	11,2 g
Azida sódica.....	0,65 g
Água destilada qsp.....	1000 ml

- Tampão acetato de amônio 50 mM, nos pH 7.0, 8.5 e 10.0:

Acetato de amônio.....	3,85 g
Azida sódica.....	0,065 g (1mM)
	0,65 g (10mM)
Água destilada qsp.....	1000 ml

O pH foi acertado com uma solução de amônia a 20% .

- Solução de N-etilmaleimida: 250 mg em 10 ml de água destilada.
- Solução de benzoato de p-hidroximercúrio: 720 mg em 10 ml de NaOH 0,1 N.
- Solução de bacitracina: 25 X 10⁶ UI em 10 ml de água destilada.
- Solução de ácido etilenodiaminotetracético: 740 mg em 10 ml de água destilada.
- Solução de fluoreto de p-hidroximetil: 350 mg em 10 ml de etanol.

Soluções utilizadas para Cromatografia em Phenyl-Sepharose CL-4B:

- Tampão acetato de amônio 50 mM, pH 8,5: Já citado para extração.
- Tampão acetato de amônio 10 mM, contendo 35% de acetonitrila, pH 8,5:

Acetato de amônio.....0,771 g.
 Acetonitrila.....350 ml
 Azida sódica.....0.065 g
 Água destilada qsp.....1000 ml

O pH foi acertado com uma solução de amônia a 20% .

**Soluções utilizadas para Cromatografia em DEAE-
Sepharose CL-6B:**

- Tampão acetato de amônio 20mM contendo 20% de acetonitrila,
pH 8,5:

Acetato de amônio.....1,54 g
Acetonitrila.....200 ml
Água destilada qsp.....1000 ml

O pH foi acertado com uma solução de amônia a 20% .

- Tampão acetato de amônio 250 mM contendo 20% de acetonitrila,
pH 8,5:

Acetato de amônio.....19,27 g
Acetonitrila.....200 ml
Água destilada qsp.....1000 ml

O pH foi ajustado com uma solução de amônia a 20% .

**Soluções utilizadas para a determinação protéica
pelo método de Lowry:**

- Solução A:

Carbonato de sódio.....20 g
NaOH 0,1 N qsp.....1000 ml

- Solução B:

Sulfato de cobre pentahidratado.....10 g
Água destilada qsp.....1000 ml

- Solução C:

Tartarato de potássio.....20 g
 Água destilada qsp.....1000 ml

- Solução Reagente:

Solução A.....100 ml
 Solução B.....1 ml
 Solução C.....1 ml
 Preparada imediatamente antes do uso.

Reativo de Folin foi diluído a 1 N antes do uso.

Solução utilizada para a radioiodação e purificação do produto marcado:

- Tampão fosfato de sódio 0,5M, pH 7,4:

Fosfato de sódio monobásico x H₂O.....8,97 g
 Fosfato de sódio dibásico x 12 H₂O..157,97 g
 Água destilada qsp.....1000 ml

Este tampão foi diluído para obter o tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4. Para a purificação em coluna de Sephadex G-100, foram adicionados 0,1% de Soroalbumina bovina (SAB) e 0,02% de azida sódica.

Solução utilizada para incubação do Radioensaio de hPr1 e de hGH:

Tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 8,6:

Fosfato de sódio dibásico x 7 H₂O....7,09 g

Fosfato de sódio monobásico x H₂O....0,27 g

Água destilada qsp.....1000 ml

Foram adicionados 0,25% de SAB à solução antes do uso.

Soluções utilizadas para Eletroforese em gel de Poliacrilamida:

Solução A (pH 8,9):

TRIS.....36,60 g

TEMED.....0.23 ml

Ácido clorídrico 1N.....48,0 ml

Água destilada qsp.....100 ml

Solução C:

Acrilamida.....28,0 g

Bisacrilamida.....0,74 g

Água destilada qsp.....100 ml

Solução E:

Riboflavina.....4,00 g

Água destilada qsp.....100 ml

Solução F:

Sacarose.....40,0 g
 Água destilada qsp.....100 ml

Solução para polimerização a 7% :

Solução A.....1,0 ml
 Solução C.....2,0 ml
 Solução E.....1,0 ml
 Água destilada.....4,0 ml

Solução de Azul de Bromofenol (ABF):

Azul de bromofenol.....0,1 g
 Água destilada qsp.....100 ml

Tampão estoque: Tris glicina 0,4M, pH 8,3:

Tris..... 6,0 g
 Glicina.....28,8 g
 Água destilada qsp.....100 ml
 Diluído a 1:10 antes do uso

III. MÉTODOS:

3.1. Métodos de Quantificação Protéica:

3.1.1. Método de Lowry:

Com a finalidade de dosar as proteínas nos "pools" das diferentes fases da purificação de hPr1, houve a necessidade de introduzir-se um método preciso de quantificação de proteínas em solução. O método escolhido foi o de Lowry e cols (41). As soluções reagentes foram usadas num volume 3 vezes maior do que o originalmente descrito, para que se tivesse um volume adequado às cubetas de leitura espectrofotométrica de maior caminho óptico (2 cm).

Preparo da Curva de Padrão Protéico:

O padrão protéico utilizado foi a Soroalbumina bovina, fração V (SAB), SIGMA N^oA4503.

Prepararam-se 3 soluções aquosas idênticas de SAB, pesando-se 5 mg em balança analítica e dissolvidos em 10 ml de água destilada e misturadas. A partir desta, 7 diluições foram obtidas: 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/200 µl. Cada uma destas soluções foi processada em duplicata no ensaio.

Preparo das Amostras Desconhecidas para dosagem:

De cada amostra foram feitas várias diluições, tomando por base a experiência adquirida, de maneira que uma ou mais dessas diluições pudessem ser lidas na curva padrão. Toda solução cuja concentração proteica não se enquadrasse na zona de linearidade da reta padrão era refeita, utilizando-se a diluição mais conveniente.

Protocolo de Ensaio:

Todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente e cada ensaio seguiu o protocolo abaixo:

Nº do tubo	Identificação	Sol. protéica (μ l)	Reagente A (ml)	Reativo Fo lin-Ciocal teu 1N (ml)
1	Controle	*	3	0,3
2	Padrão 5 μ g	200	3	0,3
3	Padrão 10 μ g	200	3	0,3
4	Padrão 20 μ g	200	3	0,3
5	Padrão 30 μ g	200	3	0,3
6	Padrão 40 μ g	200	3	0,3
7	Padrão 50 μ g	200	3	0,3
8	Padrão 60 μ g	200	3	0,3
9	Solução desc.	200	3	0,3

* = 200 μ l de água destilada.

Cada ponto foi feito em triplicata. O controle serviu para calibrar o ponto zero da leitura espectrofotométrica.

A adição do reagente A foi seguida de homogenização em agitador tipo "Vortex" e o tempo de reação foi de 30 minutos

A leitura espectrofotométrica foi sempre realizada dentro de duas horas no máximo após a adição do último reativo. Os parâmetros fixos de leitura foram:

- Cubetas de quartzo com caminho óptico de 2 cm,
- Leitura da absorbância em comprimento de 750 nm,
- Fenda 0,1.

Para a análise dos resultados, foi estabelecida uma curva padrão calculando-se uma reta por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Como variável independente (X), consideraram-se os valores de quantidade de proteína e como variável dependente (Y), as respectivas médias das três leituras espectrofotométricas. Os valores obtidos foram multiplicados pelos valores de diluição utilizada.

3.1.2. Método baseado na A 280 nm:

Admitiu-se um valor de $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 9,5$ em 280 nm (22), lido em espectrofotômetro Carl Zeiss PMQII, com cubetas de quartzo de 1 cm. Este tipo de determinação protéica foi utilizada para obter valores aproximativos nas frações eluídas dos cromatogramas em Phenyl-Sepharose CL-4B e DEAE-Sepharose CL-6B.

3.2. Técnica de Marcação:

A radioiodação, isto é, a ligação covalente de ^{125}I ou ^{131}I

a um radical de tirosina de cadeia polipeptídica é uma maneira de marcar proteínas para que possam ser usadas como traçadores em um sistema de radioimunoensaio.

Tendo em vista que a hPr1 é um hormônio reconhecidamente lábil, procuramos analisar três condições de marcação a fim de obtermos um bom traçador.

As marcações foram realizadas em capela, devido à volatilidade do ^{125}I . As reações foram realizadas em tubos de ensaio (12 x 75 mm) de fundo cônico, sob agitação moderada e contínua com o auxílio de um microimã e sobre agitador magnético. A quantidade de ^{125}I variou de acordo com a atividade específica de cada partida, sendo utilizados aproximadamente 800 μCi de ^{125}I .

3.2.1. Marcação pelo Método Clássico da Cloramina T:

O método clássico de marcação, de Hunter & Greenwood (25) utiliza quantidades fixas de agente oxidante (cloramina T) e de um agente redutor relativamente forte (metabissulfito de sódio). No presente trabalho, utilizamos metade das quantidades de cloramina T e de Metabissulfito de sódio que as descritas por Hunter & Greenwood.

A 40 μl de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 foram adicionados 5 μg de hPr1 NIADDK para marcação (em 10 μl de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4) e 800 μCi de ^{125}I . A seguir, adicionaram-se 25 μg de cloramina T em 10 μl do mesmo tampão e, após 30 segundos, 100 μg de metabissulfito de sódio em 20 μl do mesmo tampão. Foram adicionados, logo após, 200 μg de iodeto de

potássio em 200 μ l e 1 mg de azul dextrano em 1 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 contendo 0,1% de SAB.

3.2.2. Marcação pelo método estequiométrico da cloramina T, modificado:

Adotamos especialmente o método de Roth (66), com algumas modificações introduzidas em nosso laboratório (7). Por este método, a cloramina T é adicionada em quantidades limitadas, adicionando-se pequenas quantidades por vez, sendo o grau de iodação medido pela precipitação com TCA a 20%. Para cessar a reação é suficiente diluir a solução de marcação com tampão contendo 0,1% de SAB, que funciona como redutor mais suave que o metabissulfito de sódio.

A 40 μ l de tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,4 foram adicionados 800 μ Ci de 125 I e 5 μ g de hPr1 NIADDK para marcação (em 10 μ l de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4). Foram usadas alíquotas para controle do teste de precipitação pelo TCA e a seguir foram adicionados 1,5 μ g de cloramina T (em 5 μ l do tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4). Esperamos 2 minutos e a seguir, fizemos a prova de precipitação pelo TCA. Quando a porcentagem de incorporação de 125 I ao hormônio medida pelo teste de precipitação pelo TCA, se encontrava por abaixo de 40%, adicionamos o dobro da quantidade de cloramina T colocada da última vez até atingir um nível satisfatório de incorporação medido pelo teste do TCA. A reação foi encerrada, adicionando-se 200 μ g de iodeto de

potássio em 200 μ l de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4, contendo 0,1% de SAB e 1 mg de azul dextrano em 1 ml do mesmo tampão.

3.2.3. Marcação pelo Método da Lactoperoxidase:

Este é um método de marcação mais suave, no qual utiliza-se uma enzima como agente oxidante e H_2O_2 como catalizador; a reação é encerrada diluindo-se o produto da marcação (19)

Seguimos o método de Thorell (72), introduzindo algumas modificações:

A 5 μ g de hPr1 NIADDK para marcação (em 10 μ l de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4), adicionamos 800 μ Ci de ^{125}I . Desta solução foram utilizadas alíquotas para o controle da porcentagem de incorporação de ^{125}I pelo teste do TCA a 20%. Foram então adicionados 10 μ g de lactoperoxidase (em 10 μ l do mesmo tampão) e 0,03 μ g de H_2O_2 (em 2 μ l do mesmo tampão). Da mistura de marcação foram pegas alíquotas para o teste de precipitação pelo TCA. Conforme o resultado obtido no teste do TCA a 20%, ou seja, a porcentagem de incorporação de ^{125}I ao hormônio, foram adicionados mais H_2O_2 (0,03 μ g) e novamente realizado o teste do TCA. Quando a porcentagem de incorporação de ^{125}I ao hormônio se apresentou satisfatória (por volta de 40%), foram adicionados 200 μ g de iodeto de potássio em 200 μ l de tampão fosfato de sódio, 0,05 M, contendo 0,1% de SAB, em pH 7,4 e mais 1 mg de azul dextrano em um ml do mesmo tampão.

3.2.4. Teste de Precipitação pelo TCA a 20% :

Por meio deste teste podemos fazer uma avaliação da porcentagem de ^{125}I que foi incorporado ao hormônio durante a marcação.

Foram pegas alíquotas com capilares de vidro cujas pontas em forma de bulbo foram mergulhados na mistura de marcação antes (controle) e após a adição do agente oxidante. Cada capilar foi então mergulhado em um tubo contendo 200 μl de tampão fosfato de sódio 0,05 M e 0,1% de SAB, pH 7,4. Aos tubos se adicionaram 800 μl de TCA a 20%. Depois de agitados, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado e as duas frações foram contadas em contador gama. As amostras e também o controle foram feitos em duplicata.

$$\% \text{ de Incorporação de } ^{125}\text{I} = \frac{\text{contagens do precipitado} \times 100}{\text{cont. do precipitado} + \text{cont. do sobren.}}$$

Quando a porcentagem de incorporação de ^{125}I pelo teste do TCA chegou a aproximadamente 40%, foi interrompida a reação.

3.2.5. Purificação da hPr1 Marcada:

A hPr1 radioiodada foi purificada por cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-100 médio. Para montar a coluna de 2,3 x 43 cm, o pó seco foi previamente intumescido com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 por 24 horas e lavado várias vezes com o mesmo tampão. A coluna foi preenchida com a resina e lavada 3 vezes o seu volume com tampão fosfato de sódio

0,05M, contendo 0,1% de SAB e 0,02% de azida sódica. Após aplicação da mistura de reação à coluna, a eluição foi realizada com o mesmo tampão de lavagem da coluna e aplicado um fluxo de 12 ml/hora. Coletamos 110 frações de 2 ml cada uma. De cada fração foi retirada uma alíquota de 20 μ l, colocada em um cone de papel alumínio e contadas em contador gama (Nuclear Chicago). A partir dos dados obtidos, foi feito um cromatograma da purificação em cpm \times n^o da fração de eluição. Das frações correspondentes ao pico da hPr1 marcada, reconhecidas pelo seu coeficiente de distribuição (Kd) característico, foi feito um "pool" aliquotado em volumes de até 0,5 ml e congelado a -20°C.

3.2.6. Cálculo da Recuperação:

Da mistura de marcação foram retiradas três alíquotas de 20 μ l e adicionadas a três tubos de ensaio (tubos 1,2 e 3), contendo 980 μ l do tampão utilizado para lavar a coluna (Item 3.2.5.). De cada um dos tubinhos retiramos 20 μ l e contamos em contador gama, juntamente com as seis ponteiras utilizadas, o tubo onde foi realizada a marcação e a ponteira utilizada para aplicar o marcado à coluna. A porcentagem de recuperação é obtida por:

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

onde:

A = atividade total aplicada à coluna,

T = atividade total recuperada nas frações.

Calcula-se A utilizando a fórmula seguinte:

$$A = \frac{S \times 1000 \times V}{20 \times 20} - \frac{3S \times 1000}{20} - X$$

onde:

S = valor médio (cpm) das alíquotas de 20 µl retiradas dos tubos 1, 2 e 3,

V = volume da mistura de reação,

1000 = volume em µl dos tubos 1, 2 e 3,

20 = volume retirado da mistura de marcação e também volume das alíquotas dos tubos 1, 2 e 3,

X = soma da radioatividade (em cpm) perdidas nas ponteiras e tubo cônico utilizados para marcação.

Calcula-se T pela fórmula:

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

onde:

Y = radioatividade (em cpm) presente em 20 µl de cada fração de eluato da coluna, descontada a radiação de fundo,

n = número de frações,

f = fator de diluição, dado pela relação volume da fração/volume da alíquota.

3.2.7. Cálculo do Rendimento da Marcação:

A partir do perfil cromatográfico obtido na Fig. 6, foi levado em consideração para os cálculos do rendimento da marcação, a radioatividade total do pico de ^{125}I -hPr1.

A porcentagem do rendimento de marcação %H* é dada por:

$$\%H^* = \frac{H^*}{T} \times 100$$

onde:

H* = Hormônio radioiodado

3.2.8. Cálculo do Coeficiente de Distribuição (Kd):

O cálculo do coeficiente de distribuição (Kd) é dado pela equação:

$$Kd = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

onde:

V_e = volume de eluição do pico a ser examinado,

V_o = volume de exclusão molecular, medido pelo volume de eluição do azul dextrano,

V_t = volume total da fase líquida da coluna, medido pelo volume de eluição do ^{125}I .

3.3. Radioimunoensaio da Prolactina e do Hormônio de Crescimento com reagentes NIADDK e seu Controle de Qualidade:

3.3.1. Radioimunoensaio de hPr1:

Seleção das Condições para o Ensaio de hPr1:

A quantidade de hPr1, assim como a de hGH nos extratos hipofisários é relativamente grande se comparadas com as quantidades normalmente dosadas em soro e plasma. Assim sendo, montou-se uma técnica de RIE de hPr1 de modo a obtermos maior precisão, em sacrifício da sensibilidade. Desse modo, evitaram-se diluições excessivas das amostras, fator que acarretaria maiores erros na estimativa de concentração final do hormônio. A técnica de RIE para o hGH já existia no laboratório do IPEN (59) e não foi modificada.

Fizemos testes com diferentes tampões para estabelecermos as condições para o ensaio de hPr1:

Tampões de ensaio:

- a. Tampão fosfato de sódio 0,01 M, + 0,25% SAB, pH 7,4
- b. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, + 0,25% SAB, pH 7,4
- c. Tampão fosfato de sódio 0,01 M, + 0,25% SAB, pH 8,6
- d. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, + 0,25% SAB, pH 8,6

O protocolo de ensaio foi o seguinte:

Amostras	Tampão de ensaio	Anti-soro	hPr1* (20000 cpm)
1.zero	900 μ l	-	100 μ l
2.NSB	100 μ l	800 μ l	100 μ l

Incubação por 24 horas a 4°C.

O método de separação das frações livre e ligada foi o que utiliza PEG 6000, para precipitação da fração ligada (8). Fizemos a separação em diferentes concentrações de PEG 6000:

Soluções de PEG:

- PEG a 17% em tampão fosfato de sódio 0,04 M, pH 7,4
- PEG a 25% em tampão fosfato de sódio 0,04 M, pH 7,4
- PEG a 17% em tampão fosfato de sódio 0,04 M, pH 8,6
- PEG a 25% em tampão fosfato de sódio 0,04 M, pH 8,6

O protocolo de separação utilizado foi o seguinte:

Solução de incubação: 200 μ l

Soro humano normal: 30 μ l

Solução de PEG: 500 μ l

Os tubos foram agitados em "vórtex" e centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. As amostras foram dosadas em duplicata.

Protocolo de incubação utilizado para o RIE de hPr1:

O protocolo de incubação utilizado para as determinações de hPr1 foi o seguinte:

	Tampão de ensaio	Amostra (hPr1 fria)	Pr1* (50000cpm)	Anti-soro na diluuição adequada
1.NSB	450 µl	-	50 µl	-
2.B0	50 µl	-	50 µl	400 µl
3.Padrões	-	50 µl	50 µl	400 µl
4.Amostras	-	50 µl	50 µl	400 µl
5.Controles	-	50 µl	50 µl	400 µl

Cada tubo foi feito em duplicata.

As incubações foram efetuadas a 4°C por 24 horas.

Para a separação das frações livre e ligada foram utilizados 200 µl de cada tubo, sendo adicionados 30 µl de soro humano normal e 500 µl de PEG. Os tubos foram agitados em vortex e centrifugados à temperatura de 4°C em 4000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi aspirado e do precipitado foi medida a radioatividade em contador de radiação gama. Cada separação foi feita em duplicata, sendo que cada amostra foi dosada em quadruplicata (duplicata de incubação e duplicata de separação).

A Figura 2 apresenta um exemplo típico de curva padrão de radioimunoensaio de hPr1.

3.3.2. Determinação da Ótima Diluição do Anti-soro:

A ótima diluição do anti-soro a ser empregada no ensaio foi determinada para cada traçador. Para este fim, incubaram-se durante 24 horas a 4°C, 100 µl de tampão de ensaio, 100 µl da ¹²⁵I-hPr1 contendo aproximadamente 20000cpm e 800 µl de anti-soro nas seguintes diluições: 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000, 1:320000, 1:640000, 1:1280000 e 1:2560000. Foram também incubados dois tubos com ausência de anticorpo com o intuito de determinar a ligação inespecífica do ensaio. Os ensaios foram realizados em quadruplicata (duplicata de incubação e duplicata de separação). O método de separação utilizado foi o mesmo descrito no Item 3.3.1. .

3.3.3. Preparo das Soluções utilizadas nas Curvas Padrão:

A cada frasco de hPr1 padrão contendo 10 ug de hPr1, foi adicionado 1 ml de água destilada, obtendo-se assim uma concentração final de 10000 ng/1000 µl. Esta solução foi separada em alíquotas de 100 µl e a partir delas, foram preparadas as curvas padrão com as seguintes concentrações: 400, 200, 100, 50 e 25 ng

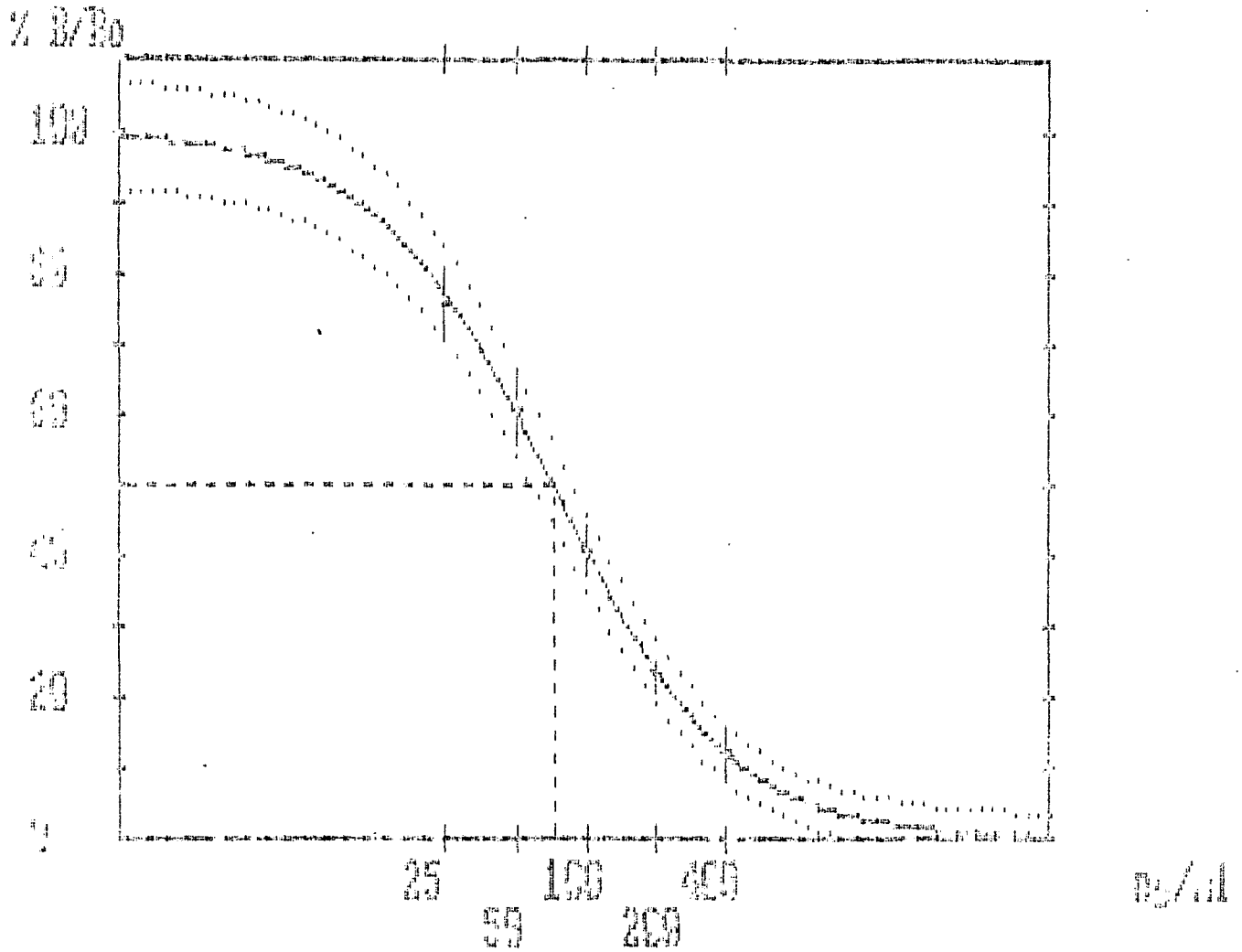


Figura 2: Curva padrão do radioimunoensaio de hPr1 utilizando-se reagentes NIADDK.
Diluição do anti-soro: 1:100.000.

de hPr1/ml.

Em um frasco de padrão de hGH adicionou-se 1 ml de água destilada, obtendo-se uma solução com 10000 ng hGH/1000 μ l. Esta solução foi separada em alíquotas de 50 μ l e a partir destas alíquotas, preparou-se a curva padrão com as seguintes concentrações: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 ng hGH/ml.

A curva padrão foi traçada em gráfico semi-log (log das concentrações dos padrões $\times B/B_0 \times 100$). As amostras desconhecidas foram lidas na curva padrão por interpolação gráfica.

3.3.4. Controle de Qualidade do Radioimunoensaio de Prolactina:

Os parâmetros avaliados do RIE de prolactina foram a sensibilidade, a reprodutibilidade (interensaio e intra-ensaio) e a exatidão.

3.3.4.1. Sensibilidade:

A dose mínima detectável, que é definida como a menor quantidade significativamente diferente do ponto de dose zero, ao nível de confiança de $P=0,05$, foi calculada segundo a definição de Rodbard (61,62) para 15 ensaios.

3.3.4.2. Reprodutibilidade intra-ensaio e interensaio:

A reprodutibilidade interensaio foi avaliada pela dosagem de amostras controle de qualidade contendo valores de hPr1 que apresentavam aproximadamente 80, 60 e 20% da ligação máxima obtida nos respectivos ensaios, já descontadas as ligações inespecíficas. Estas determinações foram realizadas em quadruplicata em 15 ensaios diferentes com três diferentes traçadores.

Foram também calculados os valores de ED20, ED50 e ED80 de 15 ensaios distintos. O valor médio para cada nível bem como seu desvio padrão foi calculado, permitindo a determinação do coeficiente de variação.

A precisão intra-ensaio foi avaliada pela dispersão dos resultados encontrados nas quadruplicatas dos pontos utilizados na curva padrão (perfil de precisão) através do programa RIAKALK (62) adaptado ao microcomputador PC ITAUTEC, presente no laboratório do IPEN.

3.3.4.3. Exatidão

A exatidão do RIE de hPr1 foi verificada pela análise da recuperação do método. A uma amostra de hPr1 purificado no IPEN, com teor conhecido de hPr1 (22,5 ng hPr1/ml), foram adicionadas quantidades crescentes de hormônio padrão (12,5, 50 e 100 ng/ml). Estas amostras tiveram seu teor de hPr1 estimado em decuplicata.

A recuperação das diferentes amostras foi determinada pela diferença entre o valor médio determinado a partir da curva padrão e o valor teórico. Calculou-se também a recuperação porcen-

tual média para cada amostra e seu desvio-padrão. Determinou-se o coeficiente de correlação entre os valores de hPr1 adicionados e aqueles recuperados, examinando-se sua significância.

3.3.5. Radioimunoensaio de Hormônio de Crescimento:

O protocolo utilizado para o Radioimunoensaio do Hormônio de Crescimento foi o mesmo que para o Radioimunoensaio de Prolactina, inclusive o tampão utilizado para o ensaio e o sistema de separação das frações livre e ligada.

A Figura 3 exibe uma curva padrão de Radioimunoensaio de Hormônio de Crescimento e a Figura 4, o perfil de precisão de um radioimunoensaio de hGH.

3.4. Determinação do conteúdo de hPr1 em hipófises humanas congeladas:

Para este estudo utilizamos 7 hipófises, sendo que o peso úmido total foi de 2,7 g de hipófises. Seguimos o método descrito no Item 3.5., fazendo somente as extrações em pH 4,0 e 10,0. O precipitado obtido após a extração foi homogenizado em Virtis e dissolvido com 15 ml de NaOH 1N. Logo após foram feitas incuba

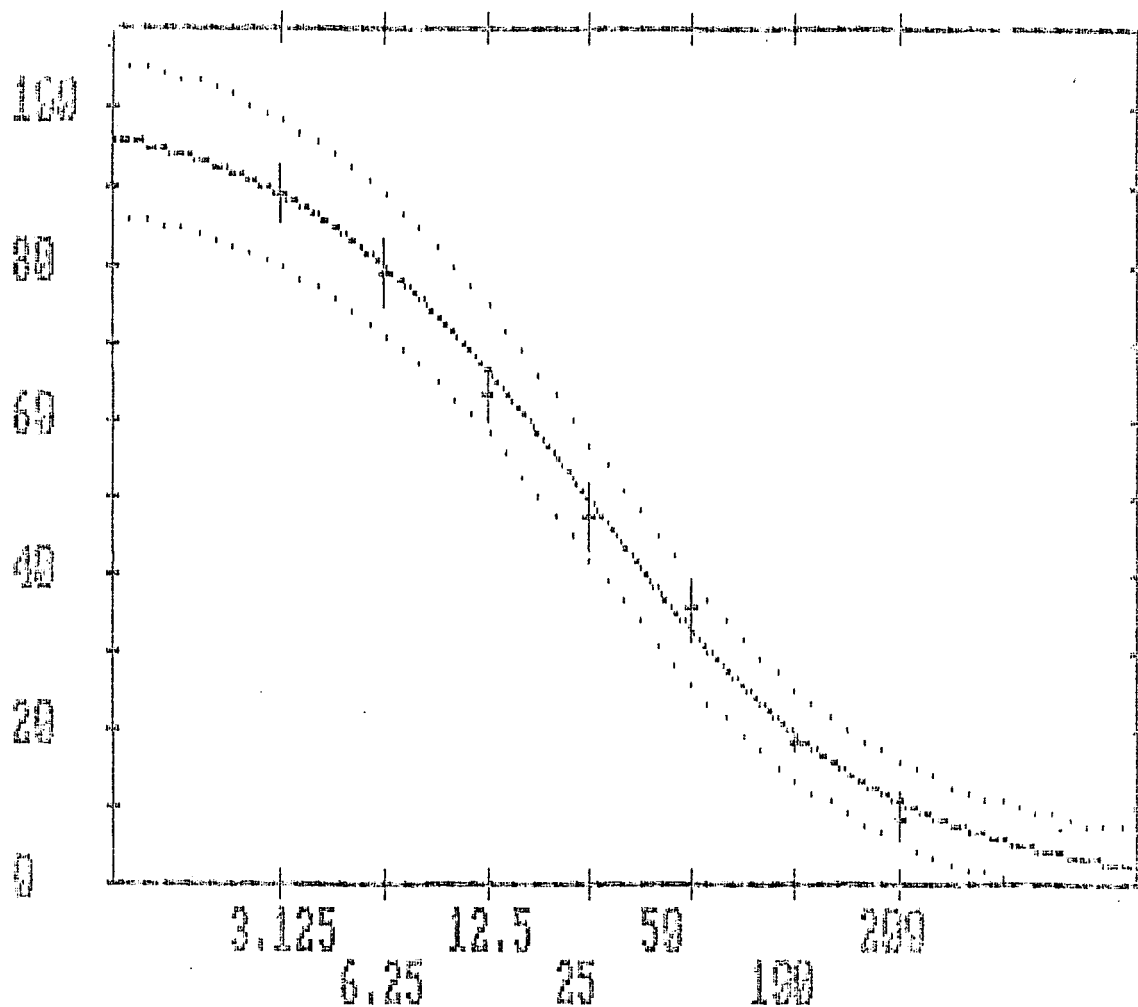


Figura 3: Curva padrão do radioimunoensaio de hGH utilizando-se reagentes NIADOK (anti-soro) e IPEN (traçador e padrão) Diluição do anti-soro: 1:400.000.

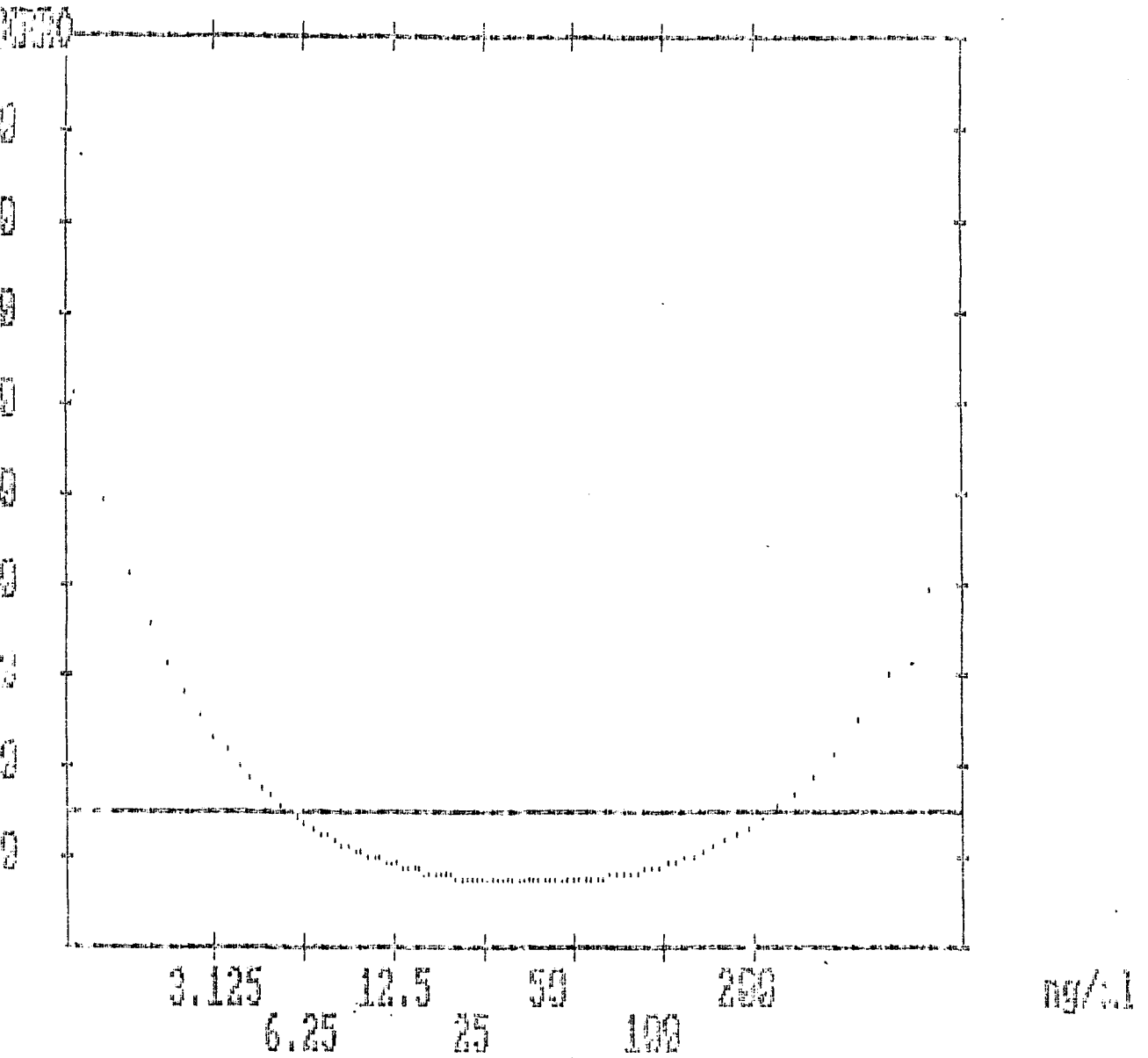


Figura 4: Perfil de precisão intra-ensaio da curva padrão de hGH com anti-soro NIADDK, traçador e padrão IPEN.

ções de radioimunoensaio para dosagens de hPr1 e de hGH e diluições para a determinação proteica pelo método de Lowry dos extratos obtidos.

Consideramos como sendo o conteúdo de prolactina na hipófise a soma das dosagens de hPr1 para os cinco extratos (dois extratos em pH 4,0, dois em pH 10,0 e um extraído com NaOH 1N), dividido pelo número de hipófises.

3.5. Homogenização e Extração das Hipófises:

Para a homogenização e extração das hipófises, seguimos o método de McLean (48), que utiliza extrações em pH 4,0 que serviriam para solubilizar parte do hGH, glicoproteínas e outras proteínas interferentes e em pH 10,0 para a solubilização da hPr1.

1) As hipófises foram descongeladas, lavadas com solução fisiológica gelada e pesadas após secagem em papel de filtro. Para cada grama de hipófises foram utilizados 6 ml de tampão fosfocitrato 0,14M pH 4,0 e a este tampão foram adicionadas as soluções de bacitracina, EDTA e os inibidores enzimáticos n-etilmaleimide e benzoato de p-hidroximetil (1ml para cada 250 ml de tampão).

2) As hipófises já com o tampão gelado foram colocadas em frasco apropriado e homogenizadas no Virtis 45 a 45.000 rpm por um minuto. No frasco de homogenização adicionaram-se 1ml da solução de fluoreto de p-metilsulfonil para cada 250 ml de tampão e homogenizados novamente na mesma rotação por mais 2 minutos.

3) O homogenato foi então diluído para 14 ml por grama de hipó-

fises e colocado para extrair em agitador magnético por 30 minutos a temperatura de 4°C.

4) Em seguida o homogenato foi centrifugado a 18.000g por 30 minutos também a 4°C.

5) O processo todo foi novamente repetido com o mesmo tampão e por último mais duas vezes com o tampão acetato de amônio 50 mM, pH 10,0 com a única diferença que com o tampão em pH alcalino, a agitação em agitador magnético foi realizada por uma hora de cada vez.

6) Os extratos obtidos em pH ácido foram guardados para posterior purificação de hormônios glicoprotéicos (LH e FSH) e os extratos obtidos em pH alcalino foram reunidos e foram denominados de P1.

Os inibidores enzimáticos benzoato de p-hidroximercúrio, N-etilmaleimida, fluoreto de p-metilsulfonil e o EDTA foram utilizados para evitar ao máximo a ação proteolítica das enzimas presentes nos extratos, por sabermos que a hPr1 é um hormônio reconhecidamente lábil. O sulfoneto de p-metilsulfonil foi adicionado ao homogenato após prévia homogenização pois, segundo McLean (48) é logo degradado no extrato e é um inibidor enzimático essencial para a obtenção de hPr1 (22). A Bacitracina foi utilizada para inibir o crescimento bacteriano.

As determinações de hPr1 foram realizadas por radioimunoensaio para os cálculos de atividade específica de hPr1 presente nos extratos em diferentes pH. Como o hGH é o contaminante mais importante com relação à purificação da hPr1, este hormônio também foi dosado por radioimunoensaio nas diferentes fases de ex-

tração.

3.5.1. Condições Alternativas de Extração:

Realizou-se um estudo sobre as condições alternativas de extração, desse modo tentamos obter a maior quantidade possível de hPr1 com menor contaminação por hGH e outras proteínas hipofisárias.

3.5.1.1.Extração adicional em pH 7,0:

Utilizamos para este estudo, 30 hipófises. Ao método de McLean (48), já descrito no item 3.5., foi adicionada uma extração em tampão acetato de amônio 50 mM, pH 7,0, após as extrações em pH ácido, com o intuito de solubilizar maior quantidade de hGH e outras proteínas interferentes e assim obter um extrato mais rico em hPr1. Alíquotas do extrato alcalino (pH 10,0) obtido nesta extração foram utilizadas nos itens 3.5.1.2. e 3.5.1.3. para estudo de outras condições alternativas de extração.

3.5.1.2. Extração por liofilização e reextração:

35 ml de extrato (item 3.5.1.1) foram liofilizados em uma placa de petri e depois recompostos com 35 ml de tampão fosfocitrato pH 4,0, homogenizados a 45.000 rpm em Virtis 45 por um minuto e depois 30 minutos em agitador magnético, sob agitação mo-

derada. O extrato foi então centrifugado a 18.000 g por 30 minutos. Com o precipitado obtido foi repetido o procedimento de extração, agora em pH alcalino (10,0). De cada fase da extração foram guardadas alíquotas para posterior determinação de proteínas pelo método de Lowry e de hGH e de hPr1 por radioimunoensaio.

3.5.1.3. Extração por precipitação com solventes orgânicos:

Foram realizadas precipitações do extrato alcalino com 25% e 70% de solvente orgânico. A hPr1 deveria ser precipitada com 70% de solvente orgânico, enquanto que a precipitação a 25% serviria para precipitar outras proteínas interferentes, insolúveis nesta condição.

Aos 35 ml de extrato (item 3.5.1.1.), adicionaram-se 3,5 ml de Tris 1 M e o pH foi ajustado para 8,5. Foram então adicionados 13,5 ml de etanol gelado sob agitação e centrifugado a 17.300 g por 45 minutos a 4°C. Aos 49 ml de sobrenadante foram adicionados 77 ml de etanol gelado, sob agitação e novamente centrifugado a 17.300 g por 15 minutos a 4°C. Os dois precipitados foram agitados por 45 minutos com tampão acetato de amônio 50 mM, pH 10,0 e centrifugados. Ao precipitado adicionaram-se 8 ml de NaOH 0,1 M, agitados por 30 minutos em agitador magnético e novamente centrifugados. Não houve a formação de precipitado. De cada fase de extração foram guardadas alíquotas para posterior determinação de hGH, hPr1 e de proteínas.

3.6. Purificação:

3.6.1. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em Phenyl-Sepharose CL-6B:

A maioria dos resíduos de aminoácidos não polares se situam no interior da molécula das proteínas e ajudam a manter a estrutura tridimensional. Existem, entretanto, alguns resíduos não polares que se situam na superfície das moléculas. Interações intermoleculares entre estes grupos não-polares contribuem para as ligações proteína-proteína.

Na cromatografia de interação hidrofóbica, interações semelhantes ocorrem entre as proteínas a serem separadas e um grupo hidrofóbico ligado à matriz. A eluição poderá ser realizada por uma substância que diminua este tipo de interação (56, 71).

A hPr1 por apresentar um caráter hidrofóbico, se liga não covalentemente à matriz da resina Phenyl-Sepharose CL-4B e é parcialmente purificada após eluição com gradiente crescente de acetoneitrila (agente que reduz a polaridade) e decrescente de acetato de amônio (age diminuindo a força iônica dificultando as ligações hidrofóbicas entre as proteínas e a resina). Escolhemos o método de McLean e col (48) por ser o mais simples, não necessitando de prévia concentração da amostra antes de aplicação à coluna.

Hodgkinson e col (22) fizeram um estudo com a finalidade de otimizar as condições de aplicação e eluição da hPr1 em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B. Segundo os autores, a força iônica do

tampão para aplicação não deve ser alta (0,01-0,1), de modo que a hPr1, que tem alta hidrofobicidade, seja adsorvida e grande quantidade de proteínas interferentes seja eluída da coluna. Segundo Hodgkinson e col, é importante também a relação proteínas totais/adsorvente e a melhor relação encontrada por eles foi entre 10-100 mg de proteínas/g de Phenyl-Sepharose CL-4B. Desse modo, seria possível saturar os sítios disponíveis do adsorvente e na presença de excesso de proteínas, somente as moléculas mais hidrofóbicas, entre elas a hPr1, seriam adsorvidas.

Foram realizadas três purificações em Phenyl-Sepharose CL-6B. A solução P1 obtida no item 3.5. foi levada a pH 8,5 com ácido clorídrico concentrado. Desta solução foi medida a condutividade e diluída com água destilada e desionizada gelada até se igualar a condutividade do tampão acetato de amônio 50 mM

A coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B foi previamente montada e o seu volume dependeu do número de hipófises utilizado na extração. A coluna foi preequilibrada com tampão acetato de amônio 50 mM, pH 8,5. Foi aplicada a solução P1 (aproximadamente 37 mg de proteína extraída para cada ml de resina) logo após a sua obtenção por extração. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão acetato de amônio 50 mM, pH 8,5 até que a absorbância das frações coletadas, medida em espectrofotômetro a 280 nm não ultrapassasse 0,050. O seguinte gradiente linear foi então aplicado: acetonitrila de 0 a 35% e acetato de amônio de 50 a 10 mM.

Tampão inicial: acetato de amônio 50 mM, pH 8,5

Tampão final: acetato de amônio 10 mM contendo 35% de acetonitrila, pH 8,5.

O volume total do gradiente variou de 30 a 40 vezes o volume da coluna. Todo o processo foi realizado a 4°C. Foram colhidas frações de 0,5 a 1% do volume do gradiente e de cada fração foi lida a absorbância a 280 nm com relação ao controle de tampão acetato de amônio 50 mM. De cada fração foi retirada uma alíquota e diluída a 1:40 em tampão de ensaio para posterior dosagem por radioensaio de hPr1 e de hGH. As frações foram congeladas e as dosagens foram realizadas de quatro em quatro, de três em três ou de duas em duas frações, dependendo da posição do gradiente. Pelos resultados obtidos no ensaio, escolhemos as frações que possuíam maior atividade imunológica de hPr1 e que não apresentavam grande contaminação por hGH. As frações correspondentes foram descongeladas e com elas feito um "pool". Estes "pools" foram denominados de P2-1, P2-2 e P2-3, respectivamente da 1ª, 2ª e 3ª purificações realizadas em Phenyl-Sepharose CL-4B.

3.6.2. Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Sepharose CL-6B:

Seguimos o método de McLean (48) para alcançar o último passo na purificação da hPr1.

A separação por cromatografia de troca iônica é obtida pela adsorção reversível de substâncias à matriz insolúvel carregada. As substâncias com diferentes cargas devem ser separadas pois são

eluidas em diferentes fases quando é aplicado um gradiente com elevação de força iônica que diminui a adsorção das proteínas à matriz.

Segundo Hodgkinson e col (22), a acetonitrila adicionada ao tampão aquoso serviria para minimizar as interações não iônicas entre a hPr1 e a matriz, o que melhora o rendimento da hPr1 na purificação.

Foram realizadas duas purificações por cromatografia de troca iônica utilizando os "pools" P2-1, P2-2 e P2-3 (Item 3.6.1). A resina DEAE-Sepharose CL-6B foi lavada com tampão contendo excesso de acetato de amônio (1M), que foi utilizado para trocar o íon da resina de cloreto para acetato. A resina foi lavada várias vezes com tampão acetato de amônio 20 mM, pH 8,5 e montada na coluna adequada. O volume da coluna dependeu do número de hipófises utilizado. Após a montagem da coluna, a mesma foi lavada duas a três vezes o seu volume com tampão acetato de amônio 20 mM contendo 20% de acetonitrila, pH 8,5. Utilizou-se uma relação de aproximadamente 1,2 mg de proteína aplicada para cada ml de resina.

Após a aplicação do "pool" P2, a coluna foi lavada com o tampão acetato de amônio 20 mM contendo 20% de acetonitrila, em pH 8,5 até que a absorbância medida em espectrofotômetro a 280 nm não excedesse 0,050. Aplicou-se o seguinte gradiente linear: acetato de amônio de 20 a 250 mM sempre contendo 20% de acetonitrila e em pH 8,5. O fluxo aplicado foi de 13 ml/hora nas duas purificações nesta resina e o volume de gradiente foi de 13 vezes o volume da coluna na 1ª purificação e de 20 vezes o volume da

coluna na 2ª purificação nesta resina. Todo o processo foi realizado a 4°C.

Foram colhidas frações de 0,5 a 1,0% do volume do gradiente e de cada fração retirou-se uma alíquota de 50 µl e diluiu-se a 1:20 em tampão de radioensaio, para dosagem posterior. Realizamos o radioensaio para prolactina e para hormônio de crescimento de uma cada duas ou tres frações, dependendo da posição da fração no gradiente, as frações foram congeladas. A partir dos resultados, escolhemos as frações adequadas com maior teor em hPr1 e menor quantidade relativa de hGH. Chamaram-se de P3-A1 e P3-B1 os "pools" obtidos na 1ª purificação e de P3-A3, P3-B3 e P3-C3 os "pools" obtidos na 2ª purificação feita em resina de DEAE-Sepharose CL-6B.

A Figura 5 mostra o esquema de extração e purificação da hPr1 a partir de hipófises.

3.7. Eletroforese:

3.7.1. Eletroforese da hPr1 "Fria":

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para caracterização da hPr1 produzida no IPEN e comparação com a hPr1 do NIADDK.

A hPr1-IPEN utilizada para eletroforese foi a P3-A3 (25 ml) liofilizada.

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA HPRL

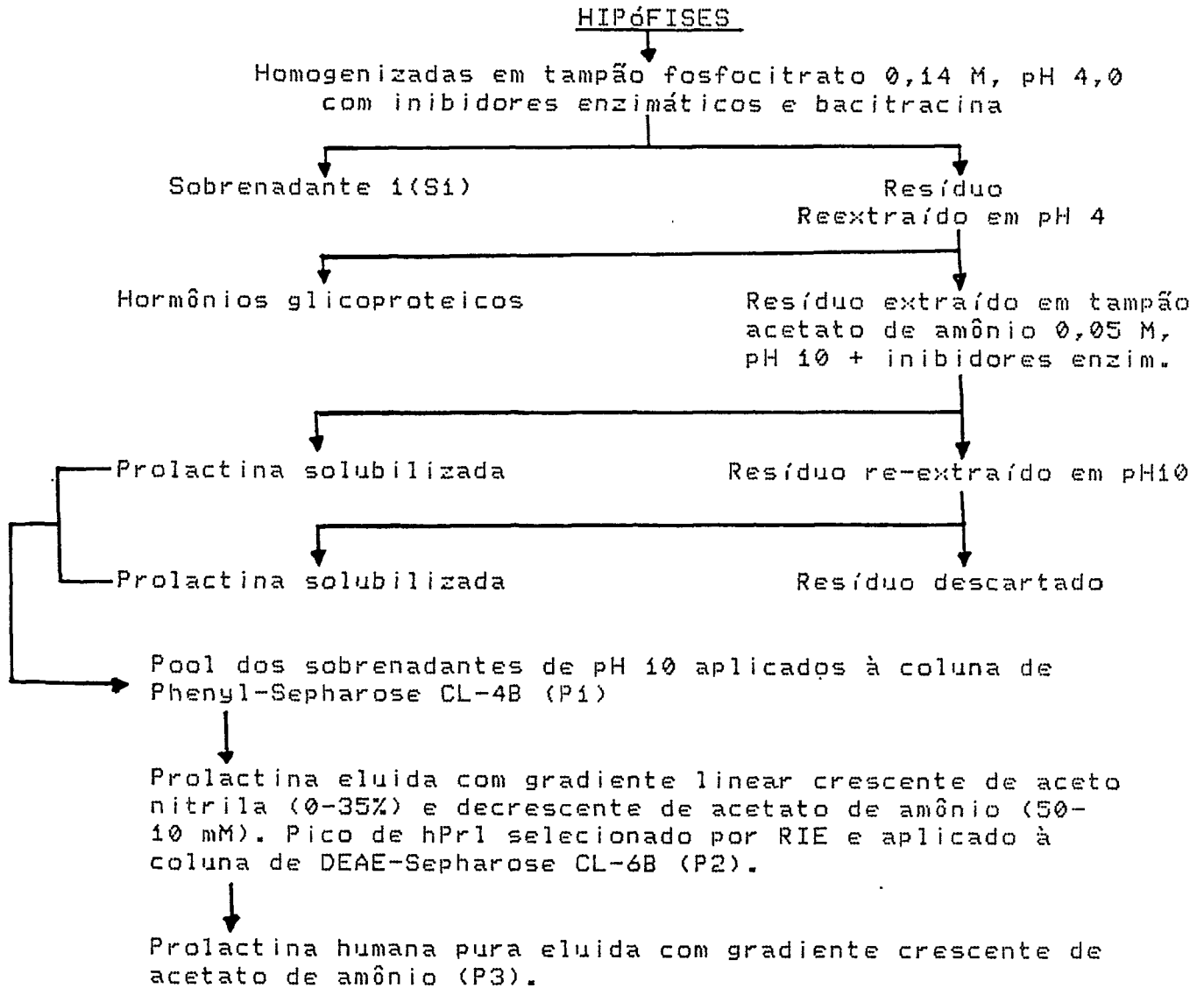


Figura 5: Esquema de extração e purificação de hPrl a partir de

hipófises humanas congeladas

A EGPA foi desenvolvida de acordo com o método de Davis (14). A técnica densitométrica foi realizada de acordo com o método previamente padronizado para outras proteínas (5).

Polimerização do Gel:

Utilizaram-se tubos de 4 x 110 mm, vedando-se as extremidades inferiores com uma membrana adesiva tipo "Parafilm".

A solução de polimerização (gel a 7%) previamente preparada foi transferida cuidadosamente com pipeta pasteur para os cilindros até uma altura uniforme de 10 cm. Para assegurar uma superfície perfeitamente horizontal no gel e permitir bandas regulares de separação, foram cuidadosamente colocados sobre a superfície da solução 100 μ l de água destilada a fim de evitar formação de menisco na extremidade superior.

Obteve-se a polimerização do gel deixando-se os cilindros em um suporte que os mantinha em posição vertical, a cerca de 7 cm de uma lâmpada fluorescente durante 45 minutos à temperatura de 4°C. Retirou-se a água com ajuda de um papel absorvente.

Aplicação da Amostra e Eletroforese:

A corrida eletroforética do hormônio frio foi acompanhada por 3 controles:

A. Um "controle", sendo aplicados 250 μ l de água destilada.

B. Um gel de referência onde corremos 100 μg de SAB em 250 μl de água destilada. A SAB quando analisada em EGPA apresenta três bandas distintas, correspondentes às formas monomérica (banda maior), dimérica e trimérica. Como referência qualitativa para o bom desempenho da corrida eletroforética, adotou-se a banda monomérica, indicadora das condições eletroforéticas

C. Um padrão de hPr1 (NIADDK) com 25 μg de hPr1/250 μl de água destilada.

A amostra de hPr1 P3-A3 (item 3.6.2.) foi ressuspensa em 250 μl de água destilada.

A cada gel foram adicionados 50 μl da solução F (sacarose a 40%) e 10 μl do corante traçador ABF. Foram retirados os "Parafilm" dos tubos os mesmos foram colocados em cuba eletroforética onde foi adicionado tampão de corrida.

A corrida eletroforética efetuou-se em corrente anódica de 2 mA/gel e 200V a 4°C, interrompida quando o corante traçador se encontrava a cerca de 1 cm da extremidade inferior do tubo.

Os géis foram removidos com injeção contínua de água com ajuda de uma seringa plástica com agulha de aço inoxidável, de modo a desprender toda a superfície do gel do tubo de vidro. Subsequentemente os geis foram lidos diretamente no densitômetro em região de luz ultravioleta (feixe de luz no intervalo 220-310 nm) com a velocidade do registrador estabelecida em 0,5 mm/s e 2,5 mV de amplificação, sendo a velocidade do gel frente ao feixe de luz de 25 mm/minuto.

Obtivemos assim o perfil de absorvância em relação ao comprimento do gel a partir do qual calculamos os valores de migra-

ção relativa (R_m). O "controle" por sua vez definiu a linha base do perfil de absorvância obtido, constituindo-se o controle da qualidade de polimerização e da presença de reagentes e artefatos indesejáveis.

3.7.2. Eletroforese da ^{125}I -hPr1:

O hormônio doado pelo NIADDK, marcado pelo método da cloramina T e purificado em Sephadex G-100 também foi submetido à EGPA, para sua caracterização.

O procedimento para polimerização do gel e eletroforese foi o mesmo que o utilizado para as amostras não radioativas. Após a corrida, os geis foram retirados e cortados em fragmentos de 3 mm com ajuda de um "gel-slicer". Cada segmento foi envolto em papel alumínio e contado em contador gama para a determinação da radioatividade. Os perfis eletroforéticos foram traçados em $\text{cpm} \times \text{N}^\circ$ do fragmento. A taxa de migração (R_m) foi calculada em relação à migração do corante traçador ABF de acordo com a relação:

$$R_m = \frac{\text{migração banda em exame}}{\text{migração ABF}}$$

3.8. Preparação de Padrões de hPr1-IPEN:

Os padrões de hPr1 por nós purificada, foram preparados com o intuito de serem comparados a um padrão controle e analisados quanto à estabilidade, reprodutibilidade e paralelismo ao padrão

de referência (NIADDK).

Foram preparados 2 padrões:

1. A partir do "pool" P3-A3 (item 3.6.2.): Padrão PP3-A3:
18 ml do "pool" + 14 mg SAB RIA grade + 69 mg lactose.

2. A partir do "pool" P3-B3: Padrão PP3-B3:
6 ml do "pool" + 7,2 mg SAB RIA grade + 36 mg lactose.

Foram colocados em cada ampola 500 e 300 μ l respectivamente das soluções P3-A3 e P3-B3, congeladas e liofilizadas durante 48 horas. As ampolas foram deixadas por 24 horas em dessecador contendo placas de petri com pentóxido de difósforo e fechadas em seguida.

3.9. Teste de paralelismo entre os Padrões de hPr1 IPEN e NIADDK

O teste de paralelismo utilizado para a comparação entre as preparações de hPr1 IPEN e o NIADDK RP-1 foi o de Rodbard (62), que aplica um teste t de Student em uma regressão linear entre o logaritmo do volume de amostra desconhecida colocada nos tubos x logaritmo da concentração determinada, lida na reta padrão de referência. Se a pendência da reta for estatisticamente igual a um, o paralelismo entre as curvas será confirmado.

Para realizarmos o teste de paralelismo entre os padrões, foram comparados no intra-ensaio 9 ampolas de padrão PP3-A3 em quatro a cinco diluições diferentes e uma curva do padrão NIADDK hPr1 RP-1. No mesmo teste foi também calculada a potência relativa do padrão PP3-A3. Um teste análogo foi realizado com 5 ampolas de P3-B3.

IV. RESULTADOS:

4.1. Marcação e Purificação da ^{125}I -hPr1:

Os valores de atividade específica, recuperação, rendimento e coeficiente de distribuição obtidos nas 14 marcações, assim como as respectivas média, desvio-padrão e coeficiente de variação para cada método de marcação acham-se representados na Tabela 1. Podemos verificar que as marcações realizadas pelo método clássico da cloramina T apresentam, de modo geral, atividades específicas e rendimentos maiores que nos outros dois métodos de marcação. Por isto, este foi o método escolhido para as marcações posteriores.

A recuperação foi geralmente total em todas as purificações. A única marcação que foi feita utilizando-se a lactoperoxidase e que teve ligação ao anticorpo apresentou o título maior, fato que mereceria maiores estudos.

Os coeficientes de distribuição da ^{125}I -hPr1 foram calculados em todas as marcações em que houve radioiodação significativa da hPr1.

A Figura 6 apresenta um cromatograma típico de purificação da ^{125}I -hPr1 em coluna de Sephadex G-100.

4.2. Escolha das melhores condições para o Radioimunoensaio de hPr1:

Na Tabela 2 encontram-se os valores de ligação especí

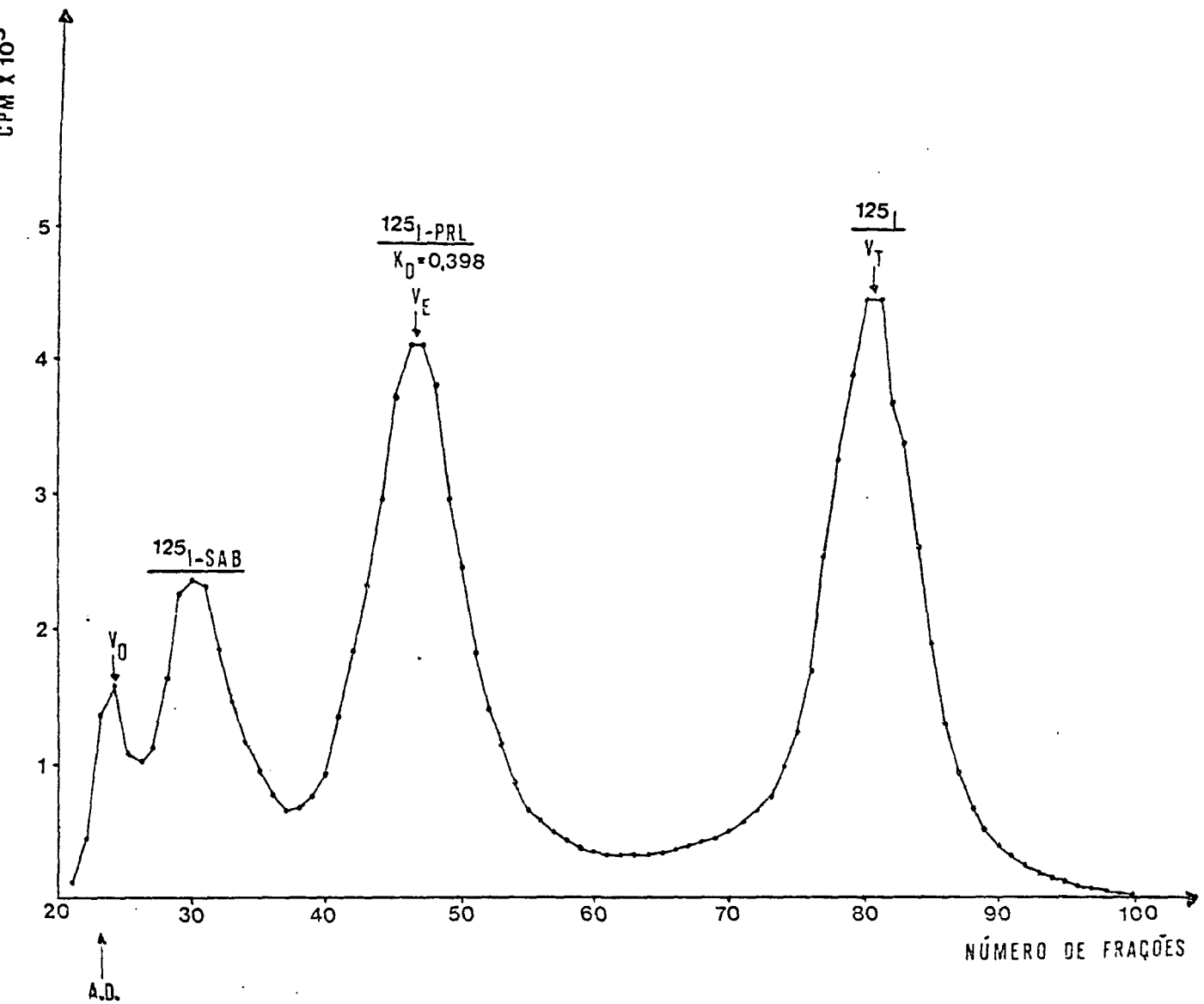


Figura 6: Radiocromatograma de purificação em Sephadex G-100 da hPrl marcada com ^{125}I pelo método clássico da Cloramina T.

Tabela 1 - Marcações realizadas pelo método estequiométrico de Roth, método da lactoperoxidase (LP) e método clássico da cloramina T. (CT) e purificadas em Sephadex G-100.

Marcação (N ^o)	Método	Atividade específica ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	Rendimento (%)	Recuperação (%)	Kd	Título do AS
1.	Roth	10,9	9,2	-	0,510	-
2.	Roth	-	-	116,3	-	-
3.	Roth	31,8	23,0	99,5	0,490	1:300000
$\bar{X} \pm \text{DP}$		21,3 \pm 14,8	16,1 \pm 9,8	107,9 \pm 11,9	0,500 \pm 0,014	
C.V.		34,9%	60,6%	11,0%	2,8%	
4.	LP	9,8	11,8	122,3	0,377	-
5.	LP	11,6	7,1	95,8	0,491	1:950000
6.	LP	5,5	2,6	93,9	0,400	-
$\bar{X} \pm \text{DP}$		9,0 \pm 3,1	7,1 \pm 4,6	104,0 \pm 15,9	0,423 \pm 0,060	
C.V.		34,9%	64,2%	15,3%	14,3%	
7.	C.T.	25,2	22,9	97,0	0,382	1:350000
8.	C.T.	47,0	37,9	97,6	0,398	1:550000
9.	C.T.	44,6	33,0	96,1	0,403	1:375000
10.	C.T.	26,6	16,3	88,8	0,508	1:425000
11.	C.T.	25,7	27,1	94,3	0,474	1:375000
12.	C.T.	44,5	33,6	98,0	0,483	1:225000
13.	C.T.	30,8	41,9	97,0	0,473	-
14.	C.T.	40,8	29,4	99,1	0,529	1:300000
$\bar{X} \pm \text{DP}$		35,7 \pm 9,5	30,3 \pm 8,2	96,0 \pm 3,2	0,456 \pm 0,055	*
C.V.		26,5%	27,1%	3,3%	12,0%	

*: \bar{X} = 1:371000 \pm 1:101000
C.V. = 27,3%

fica e de ligação inespecífica de cada condição de ensaio realizado.

Escolhemos para os nossos próximos ensaios, a condição que apresentou menor valor de ligação inespecífica, ainda mantendo uma ligação específica aceitável:

Tampão de ensaio: Tampão fosfato de sódio 0,05 M + 0,25% de SAB, em pH 8,6.

Solução de PEG: PEG a 17% em tampão fosfato de sódio 0,04 M, em pH 8,6.

Separação B/F: 200 μ l da solução de incubação, 30 μ l de soro humano normal e 500 μ l de PEG a 17%. Centrifugação a 4000 por 20 minutos.

4.3. Determinação da ótima diluição do anti-soro:

Na Figura 7, pode-se observar a curva de porcentagem de ligação x log da diluição do anti-soro determinada para um traçador radioiodado no IPEN. A diluição do anti-soro escolhida foi de 1:80.000, que nos fornece uma diluição final no ensaio de 1:100.000. Esta diluição foi escolhida de modo a termos um radioensaio com baixa sensibilidade e maior precisão em nosso intervalo de determinações, útil para as dosagens de hPrl em extratos hipofisários, onde as quantidades do hormônio são, de modo geral altas, se comparadas com as quantidades presentes em soro.

Denominou-se de título do anti-soro, a diluição do mesmo que nos fornece metade do valor de ligação máxima obtida na curva % de ligação x log da diluição do anti-soro. No caso da curva

Tabela 2: Seleção das melhores condições para o RIE de hPr1

Tampão	PEG (%)	NSB (%)	Ligação específica (%)
Fosfato de sódio 0,01M+0,25% SAB pH 7,4	17 25	10,4 13,7	22,8 23,8
Fosfato de sódio 0,05M+0,25% SAB pH 7,4	17 25	9,8 13,3	20,6 21,2
Fosfato de sódio 0,01M+0,25% SAB pH 8,6	17 25	9,5 10,7	18,0 20,8
Fosfato de sódio 0,05M+0,25% SAB pH 8,6	17 25	8,4 11,5	18,8 21,6

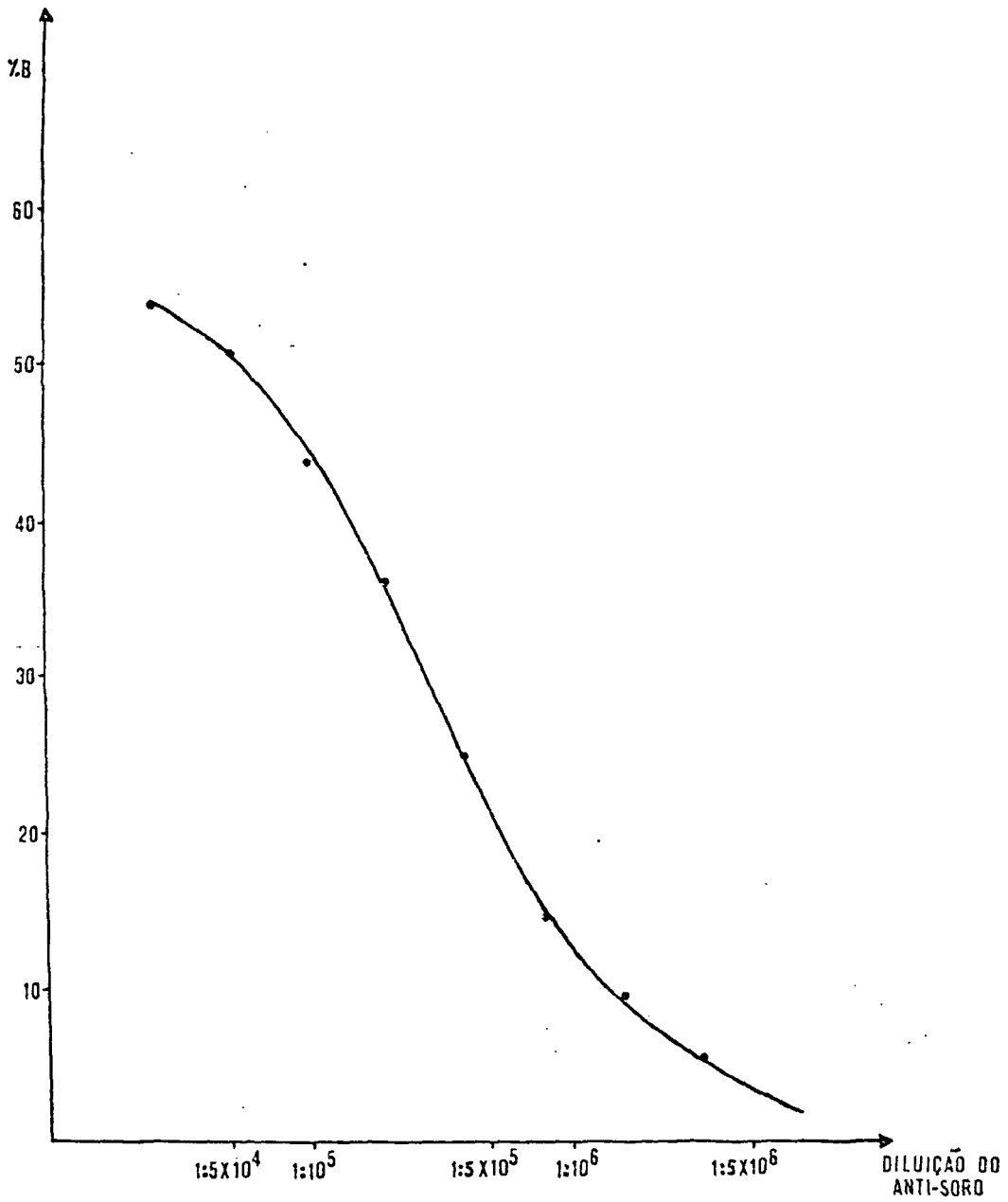


Figura 7: Curva de ótima diluição do anti-soro

Anti-soro: NIADK

Diluição escolhida: 1:100.000.

apresentada na Figura 7, o título do anti-soro seria de 1:425.000. Podemos também observar que para uma diluição final do anti-soro de 1:200.000 ainda temos um valor útil de ligação específica (36%), comparável àquela declarada pelo NIADDK, o que confirma a qualidade dos nossos traçadores. Lembramos que este tipo de teste não é feito somente para a escolha da diluição útil do anti-soro, mas também para controlar a qualidade dos nossos hormônios marcados. Os valores dos títulos de anti-soro obtidos para os vários traçadores estão representados na Tabela 1, assim como a média, desvio-padrão e coeficiente de variação obtidos para o método clássico de marcação com cloramina T.

4.4. Controle de Qualidade do Radioensaio de hPr1:

4.4.1. Sensibilidade:

As sensibilidades calculadas para 15 ensaios de hPr1 estão apresentadas na Tabela 3, assim como as respectivas médias e desvios-padrão. Lembramos que os nossos ensaios não foram padronizados com o objetivo de obter altas sensibilidades, sendo todo o nosso trabalho dirigido à determinação de hPr1 em extratos.

Tabela 3: Análise da sensibilidade, B₀, NSB, ED₂₀, ED₅₀, ED₈₀ e controles intra-ensaios de hPr1.

N ^o ensaio	Sensib.	NSB	B ₀	ED ₂₀	ED ₅₀	ED ₈₀	CA	CM	CB
	(ng/ml)	(%)	(%)	----- (ng/ml) -----					
1.	6,37	7,6	22,2	275,0	72,0	18,0	215,0	44,0	18,0
2.	3,63	10,0	16,2	213,0	67,4	21,3	205,0	37,0	16,0
3.	3,43	7,9	46,2	310,0	85,0	23,0	275,0	41,0	16,3
4.	6,85	9,1	13,5	261,0	77,4	22,9	261,0	41,8	16,2
5.	4,53	8,8	47,5	314,0	73,3	17,1	314,0	35,3	11,4
6.	4,54	8,3	47,0	308,0	85,6	23,8	308,0	44,9	16,6
7.	2,63	6,0	55,3	243,0	62,6	16,1	245,0	32,9	13,7
8.	5,02	9,3	51,3	241,0	71,6	21,2	208,0	30,1	13,2
9.	3,34	9,3	52,4	252,0	69,1	18,9	334,0	49,7	20,2
10.	4,35	8,6	50,2	336,0	78,3	18,3	472,0	40,9	12,9
11.	5,97	7,6	49,5	261,0	76,5	22,3	397,0	48,0	19,2
12.	6,11	8,5	49,5	236,0	71,1	21,5	295,0	42,9	15,0
13.	4,91	9,1	56,3	286,0	78,3	21,4	265,0	43,9	11,0
14.	4,80	11,0	56,9	312,0	89,7	25,8	375,0	56,9	12,1
15.	3,90	11,4	58,9	239,0	66,8	18,6	300,0	41,0	18,7
$\bar{X} \pm$	4,69	8,8	44,9	272,0	74,9	20,7	298,0	42,0	15,4
DP	1,22	1,3	14,8	36,0	7,6	2,7	74,2	6,7	2,9
CV(%)		15,3	33,1	13,4	10,1	13,2	24,9	15,9	18,8

4.4.2. Reprodutibilidade intra-ensaio e inter-ensaio:

Na Figura 8, apresentamos o perfil de precisão calculado pelo programa RIAKALK para a curva padrão de um típico radioimunoensaio de hPr1. Podemos observar um coeficiente de variação menor do que 15% no intervalo de 12,5 a 900 ng/ml e um CV menor do que 10% no intervalo de 20 a 700 ng/ml.

Os valores dos controles interensaio com teores de hPr1 alto, médio e baixo, dosados em quadruplicata estão apresentados na Tabela 3. Na Tabela 3 são também mostrados os valores de ED₂₀, ED₅₀ e ED₈₀ em 15 ensaios diferentes, assim como os NSB e B₀ para cada ensaio. Foram calculadas também as respectivas médias, desvios-padrão e coeficientes de variação. Observamos que com uma média de ligação (B₀) bastante elevada ($\bar{X}=44,9$), obtivemos ligações inespecífica suficientemente baixas ($\bar{X}=8,8$), especialmente considerando a técnica de separação utilizada (PEG-6000).

4.4.3. Exatidão

As recuperações obtidas quando da adição de quantidades crescentes de hPr1 padrão a uma solução com teor conhecido de hPr1 estão representados na Tabela 4.

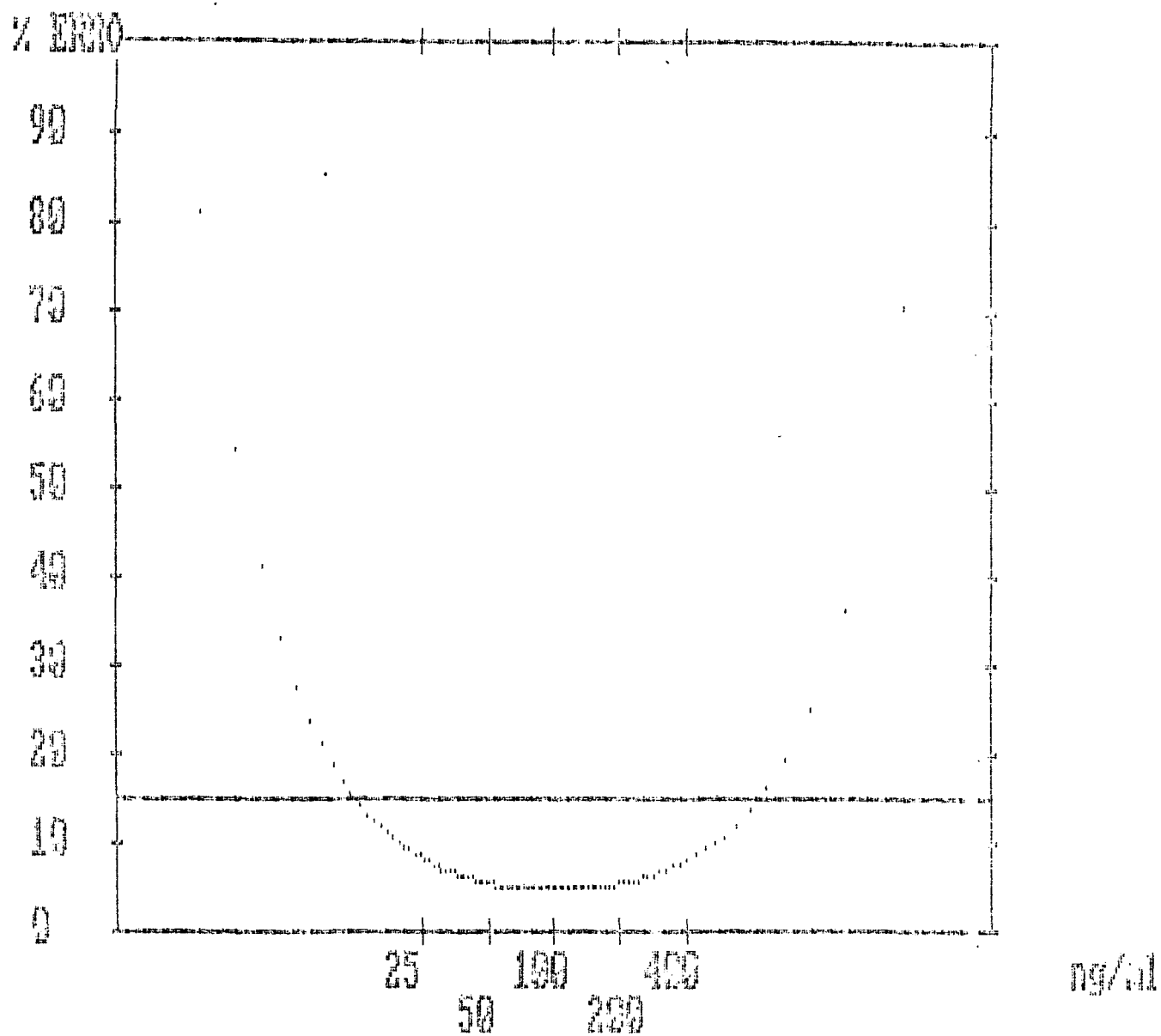


Figura 8: Perfil de precisão intra-ensaio da curva-padrão de hPr1

com reagentes NIADDK.

O coeficiente de correlação determinado entre as concentrações de hPrl padrão adicionadas e aquelas de hormônio recuperado foi de 0,9989, sendo significativo para $0,01 > P > 0,001$. A reta que melhor se ajusta é definida pela equação $Y = 0,9303X + 1,913$

Tabela 4: Concentrações obtidas na prova de recuperação da prolactina.

Prolactina adicionada (ng/ml)	Prl determinada	Prl recuperada	
	(ng/ml) $\bar{X} \pm DP$	(ng/ml) $\bar{X} \pm DP$	(porcentual)
0	21,1 \pm 2,7	-	-
12,5	39,7 \pm 3,2	18,7 \pm 3,2	149,5 \pm 25,8
50	75,6 \pm 5,5	54,6 \pm 5,5	109,2 \pm 11,1
100	130,6 \pm 8,7	109,6 \pm 8,7	109,6 \pm 8,7

4.5. Estudo da Reação Cruzada entre os RIE de hPrl e de hGH:

Fizemos, juntamente com uma curva padrão de hPrl NIADDK, em um radioimunoensaio para a determinação de hPrl, a dosagem de amostras de hGH NIADDK para marcação nas seguintes concentrações: 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 μ g hGH/ml. Desse modo, pudemos determinar a porcentagem de reação cruzada que o hGH apresenta sobre o RIE de prolactina.

Do mesmo modo, fizemos determinações de hPrl NIADDK para marcação em um sistema de RIE para dosagem de hGH. As concentra-

ções de hPr1 determinadas foram: 2,5, 5, 10 e 20 µg hPr1/ml. Podemos assim determinar, experimentalmente, a influência da presença de hPr1 no RIE de hGH.

Este estudo foi realizado com a finalidade de determinar o quanto as dosagens de hPr1 e de hGH que fizemos eram confiáveis, visto que nos nossos extratos e mesmo durante as purificações, os dois hormônios se encontravam juntos, sendo o hGH em grandes quantidades.

A determinação da potência relativa do hGH quando determinado no RIE da prolactina está indicada na Tabela 5. Na Tabela 6 podem ser vistos os valores de potência relativa que a hPr1 apresentou no RIE de hGH.

As porcentagens de reação cruzada são pequenas (da ordem de 0,1-0,5%) e não devem afetar as determinações dos dois hormônios nos extratos de modo significativo, especialmente nas fases de purificação cromatográfica.

4.6. Determinação do conteúdo de hPr1 em hipófises humanas congeladas:

Este estudo foi realizado com o objetivo de determinarmos a média de hPr1 presente em uma hipófise humana normal mantida nas nossas condições e dosada com o sistema de ensaio por nós adotado. Foram feitas as extrações em pH ácido e alcalino. Como podemos observar na Tabela 7, o conteúdo total de hPr1 foi de 59,1

Tabela 5: Determinações de hGH em um radioimunoensaio de hPr1 e determinação da sua potência relativa.

hGH (ng/ml)	Resposta (ng hPr1/ml)	Potência relativa
6.250	12,4	0,00198
12.500	16,9	0,00135
25.000	24,2	0,00097
50.000	46,6	0,00093
100.000	90,0	0,00090
200.000	160,8	0,00080
		$\bar{X}=0,00116 \pm 0,00044$
		CV=38,6%

Tabela 6: Determinações de hPr1 em um radioimunoensaio de hGH e determinação da sua potência relativa.

hPr1 (ng/ml)	Resposta (ng hGH/ml)	Potência Relativa
2.500	9,0	0,0036
5.000	24,7	0,0049
10.000	55,2	0,0055
20.000	126,5	0,0063
		$\bar{X}=0,0051 \pm 0,0011$
		CV=22,4%

Tabela 7: Média dos conteúdos de hPr1, hGH e proteínas presentes em 7 hipófises humanas normais, mantidas congeladas.

Extração	hPr1 ($\mu\text{g}/\text{hip.}$)	hGH ($\mu\text{g}/\text{hip.}$)	Proteínas ($\text{mg}/\text{hip.}$)
1 ^o Extração pH 4,0	0,30	717,71	9,9
2 ^o Extração pH 4,0	0,07	291,43	1,7
1 ^o Extração pH 10,0	29,04	2255,28	11,2
2 ^o Extração pH 10,0	23,80	5184,00	6,0
Extração NaOH 0,1N	5,90	754,29	20,8
Total	59,11	9202,71	49,6

ug/hipófise. Podemos também verificar que o conteúdo de hGH (9,2 mg/hipófise) está de acordo com os níveis mais elevados encontrados na literatura (13).

4.7. Estudo de condições alternativas de extração:

4.7.1. Extração adicional em pH 7,0:

Podemos observar na Tabela 8 que adicionando uma extração neste pH houve uma maior purificação da hPr1, principalmente com relação ao conteúdo de hGH, que foi parcialmente solubilizado, sem solubilização importante da hPr1.

4.7.2. Extração por liofilização e reextração:

Podemos observar na Tabela 8, que a purificação de hPr1 com relação ao hGH e às proteínas interferentes piorou, se compararmos com o extrato original.

4.7.3. Extração com solventes orgânicos:

Na mesma Tabela 8, podemos verificar que, apesar de obtermos uma maior pureza de hPr1 com relação ao hGH, a recuperação de hPr1 foi muito menor neste método com relação ao conteúdo de hPr1 presente no extrato inicial.

Tabela 8: Determinações de hPr1, hGH, proteínas totais e hGH/hPr1 obtidas por extração com técnicas alternativas.

	hPr1 -($\mu\text{g}/\text{hip.}$)-	hGH	Proteínas ($\text{mg}/\text{hip.}$)	hGH/hPr1	Ativ. esp. ($\mu\text{gPr1}/$ mg prot)

Extração adicional em pH 7,0					

1ª Extração em pH 4,0	0,9	547,7	13,1	608,6	0,07
2ª Extração em pH 4,0	0,6	140,1	1,5	233,5	0,40
Extração em pH 7,0	0,9	328,2	0,6	364,7	1,50
1ª Extração em pH 10,0	86,7	5973,3	14,4	68,9	6,02
2ª Extração em pH 10,0	15,4	433,3	2,8	28,1	5,50

Liofilização e reextração					

Sobrenadante em pH 4,0	3,5	900,9	1,3	257,4	2,69
Sobrenadante em pH 10,0	27,8	3200,0	9,5	115,1	2,92

Precipitação com etanol					

Precipitado etanol 25%	4,9	49,7	5,4	10,1	0,91
Sobrenadante etanol 70%	15,4	597,3	6,7	38,8	2,29
Precipitado etanol 70%	10,0	126,7	2,0	12,7	5,00
Precipitado etanol 25%	2,5	2,9	10,6	1,2	0,23
+ 0,1N NaOH					
Precipitado etanol 70%	1,4	2,4	2,0	1,7	0,70
+ 0,1N NaOH					

4.8. Homogenização e extração das hipófises:

Na média das três extrações realizadas em pH 4,0, 19,6% de hGH, 0,8% de hPr1 e 44,4% de proteínas totais foram solubilizadas. Estas porcentagens foram calculadas em relação aos totais solubilizados com os vários tampões. Podemos observar na Tabela 9 os resultados das determinações de hGH, hPr1, proteínas totais, hGH/hPr1 e atividade específica da hPr1 nas extrações em pH 4,0.

0,7% de hPr1, 7,8% de hGH e 3,3% de proteínas foram solubilizadas na média das duas extrações em pH 7,0. Observar, na Tabela 10, os resultados das determinações de hGH, hPr1, proteínas totais, hGH/hPr1 e atividades específicas da hPr1 nas extrações em pH 7,0.

Em pH 10,0, na média das 3 extrações, foram solubilizados 98,5% de hPr1, 73,0% de hGH e 52,2% de proteínas. Observar na Tabela 11 os resultados das determinações.

O conteúdo total de hPr1 foi, na média das três extrações, de $89,3 \pm 31,4$ $\mu\text{g}/\text{hipófise}$ e de hGH, foi de $8450,4 \pm 2352$ $\mu\text{g}/\text{hipófise}$.

A Tabela 12 apresenta as atividades específicas (hPr1/proteínas) nos três extratos hipofisários obtidos nas duas extrações em pH alcalino.

Tabelas 9,10 e 11: A: hPr1 ($\mu\text{g}/\text{hipófise}$)
 B: hGH ($\mu\text{g}/\text{hipófise}$)
 C: Proteínas ($\text{mg}/\text{hipófise}$)
 D: hGH/hPr1

Tabela 9: Determinações de hPr1, hGH, proteínas e hGH/hPr1 obtidas nas 3 extrações de hipófises humanas realizadas em pH 4,0.

	1ª solubilização pH4,0				2ª solubilização pH4,0			
Nº extração Nº hipófises utilizadas	A	B	C	D	A	B	C	D
1ª 70 hip.	0,03	763,9	16,7	25463,0	0,15	541,7	3,4	3611,1
2ª 30 hip.	0,95	547,7	13,1	576,5	0,67	140,1	1,5	209,0
3ª 45 hip.	0,29	2370,1	15,2	8172,4	0,16	213,5	2,5	1334,3

Tabela 10: Determinações de hPr1, hGH, proteínas e hGH/hPr1 obtidas nas duas extrações de hipófises humanas realizadas em pH 7,0.

Nº extração Nº hipófises utilizadas	A	B	C	D
2ª 30 hip.	0,95	328,2	0,6	3455,0
3ª 45 hip.	0,30	765,6	1,8	2552,0

Tabela 11: Determinações de hPr1, hGH, proteínas e hGH/hPr1 obtidas nas 3 extrações de hipófises humanas realizadas em pH 10,0.

N ^o extração N ^o hipófises utilizadas	1 ^o solubilização pH 10				2 ^o solubilização pH 10			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1 ^o 70 hipófises	101,6	9020,4	23,3	88,8	8,4	815,2	3,3	97,6
2 ^o 30 hipófises	86,7	5973,3	14,5	68,9	15,4	433,3	2,8	28,1
3 ^o 45 hipófises	45,4	3245,0	17,0	71,5	7,0	193,3	1,4	27,7

Tabela 12: Atividades específicas (μg hPr1/mg proteínas) obtidas nos extratos hipofisários em pH alcalino.

N ^o da extração	Atividade específica (μg hPr1/mg proteínas)
1 ^o	4,13
2 ^o	5,90
3 ^o	2,85

4.9. Purificação:

4.9.1. Cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose CL-4B:

A Figura 9 exhibe o perfil cromatográfico de uma típica cromatografia de extrato hipofisário em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B. Podemos observar, pelo cromatograma, que parte do hGH foi eluído da coluna durante a aplicação da amostra e lavagem da coluna e parte foi eluído após o pico de hPr1. A segunda forma pode ser uma forma fortemente hidrofóbica de hGH. Considerando a média das últimas duas purificações, a recuperação de hPr1 nesta coluna foi de 24%. Na mesma figura são indicadas as frações relativas ao "pool" P2 que foram utilizadas na etapa subsequente.

Os resultados obtidos nas três purificações realizadas em cromatografia de interação hidrofóbica são apresentados na Tabela 13. Na primeira purificação realizada em Phenyl-Sepharose CL-4B, pudemos observar que a pureza da hPr1, com relação às outras proteínas em geral (incluindo hGH), foi maior do que nas outras duas purificações e que o rendimento, no entanto, foi menor. Isto se deve ao fato de que as frações escolhidas para o "pool" foram somente as do pico principal de hPr1, sendo rejeitadas as frações com maior contaminação por hGH. Na 2ª e 3ª purificações, a pureza da hPr1 com relação ao hGH e às proteínas totais é menor, no entanto, o rendimento obtido é bem maior, pois foi escolhido maior número de frações apresentando valores mais elevados de hGH.

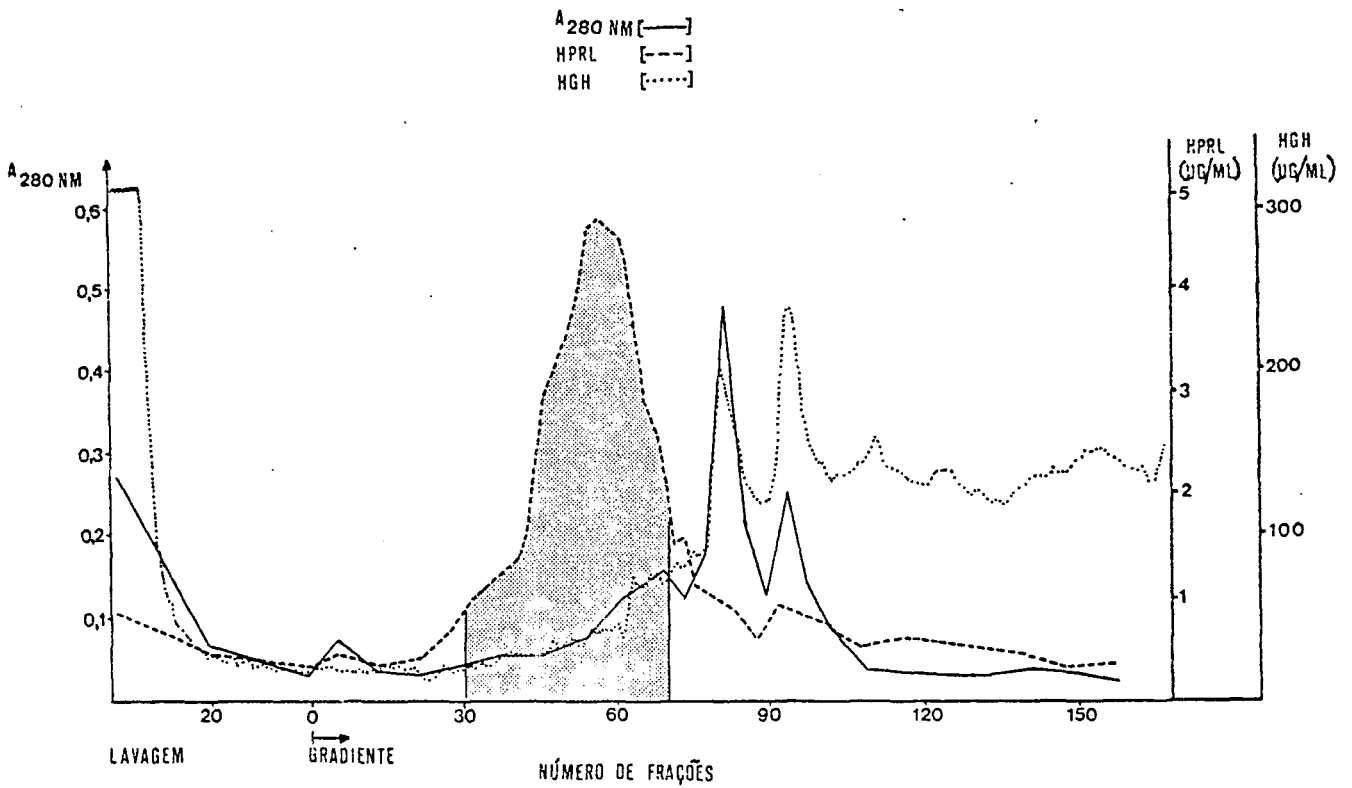


Figura 9: Cromatografia de purificação em Phenyl-Sepharose CL-4B

Coluna: 10,5 x 2,2 cm

Fluxo: 30 ml/hora

Frações: 9,0 ml

Lavagem: 360 ml de tampão

Gradiente total: 1600 ml de tampão

Área hachurada: Frações escolhidas para o P2

Tabela 13: Determinações de hPr1, hGH, proteínas e hGH/hPr1 obtidos nas 3 purificações de extratos hipofisários realizados em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B.

Nº purif. Nº hipófises	Alíquota	hPr1 -(µg/hip.)-	hGH	Proteína (mg/hip.)	At.esp. (µg hPr1/ mg prot.)	hGH/hPr1
1º 38 hipófises	P1-1 aplicado à coluna	86,3	9835,6	26,7	3,2	114,0
	"pool" P2-1	6,1	37,9	0,5	12,2	6,2
	% recup. no "pool"	7,0	0,4	1,9	-	-
2º 7 hipófises	P1-2 aplicado à coluna	52,8	7439,6	17,2	3,1	140,9
	"pool" P2-2	10,0	401,1	0,5	20,0	40,1
	% recup. no "pool"	18,9	5,4	2,9	-	-
3º 58 hipófises	P1-3 aplicado à coluna	61,6	5295,6	22,2	2,8	86,0
	"pool" P2-3	18,2	217,2	0,8	22,8	11,9
	% recup. no "pool"	29,5	4,1	3,6	-	-

4.9.2. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose CL-6B:

O cromatograma obtido na segunda purificação em DEAE-Sepharose CL-6B está esquematizado na Figura 10.

Fizemos duas cromatografias em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B em duas diferentes extrações. Os resultados das determinações de hGH, hPr1, de proteínas totais, hGH/hPr1 e atividade específica da hPr1, encontram-se na Tabela 14.

O volume do gradiente aplicado na primeira purificação em DEAE-Sepharose CL-6B foi de 13 vezes o volume da coluna e na segunda purificação, de 20 vezes o volume da coluna. Podemos verificar, na Tabela 14, que a pureza da hPr1 obtida na segunda cromatografia foi maior do que na primeira. Acreditamos que esta melhora na resolução entre os picos de hPr1 e hGH se deve ao aumento de volume do gradiente aplicado.

O pico de hPr1 obtido na primeira purificação em DEAE-Sepharose CL-6B foi separado em dois "pools", de acordo com a pureza:

P3-A1, que é o "pool" mais puro, com somente 2% de contaminação e o P3-B1, com 82,5% de contaminação por hGH. Na segunda cromatografia de troca iônica, separou-se o pico de hPr1 em três "pools" denominados: P3-A3, que é a hPr1 mais pura, com somente 0,7% de contaminação por hGH, P3-B3, com 3,6% de contaminação por hGH e P3-C3, com 50% de contaminação pelo mesmo hormônio (observar Figura 10).

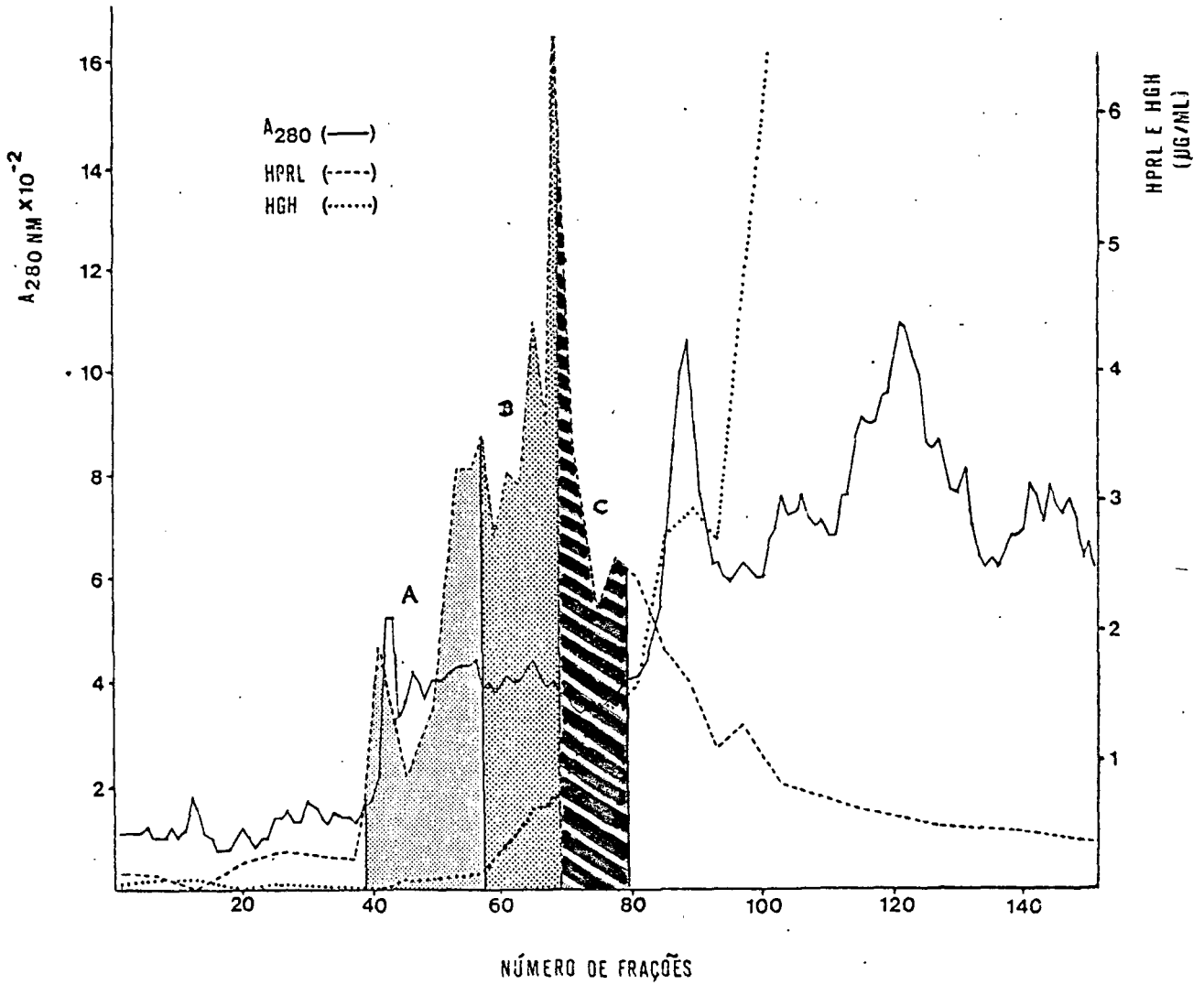


Figura 10: Cromatograma de purificação em DEAE-Sepharose CL-6B

Coluna: 1,3 x 10 cm

Fluxo: 13 ml/hora

Frações: 3,0 ml

Lavagem: 57 ml de tampão

Gradiente total: 500 ml de tampão

A: P3-A3

B: P3-B3

C: P3-C3

O rendimento de hPr1 para o P3-A1, se considerado em relação ao extrato obtido em pH alcalino P1-1 (observar Tabela 13), foi de 0,6% . Também em relação à quantidade presente no extrato alcalino P1-3 (Tabela 13), o rendimento de P3-A3 + P3-B3 + P3-C3 foi de 11,2% .

O rendimento total em μg de hPr1 por hipófise, passou de 1,32 para 7,02 e a recuperação de hPr1, de 21% para 37% da primeira para a segunda cromatografia nesta resina específica.

4.10. Análise qualitativa e quantitativa da hPr1 IPEN mediante eletroforese e densitometria UV:

As Figuras 12 A e 12 B apresentam os perfis densitométricos das amostras de hPr1 P3-A3 (35 μg) e hPr1 NIADDK (25 μg) respectivamente, submetidas à EGPA a 7% em gel de 0,4 cm de diâmetro por 11 cm de comprimento. As Figuras 11 A e 11 B correspondem respectivamente, aos perfis dos dois géis utilizados como controles: o gel-branco e o gel de referência (SAB).

Os valores das taxas de migração relativa obtidos foram de 0,505 para a P3-A3, de 0,503 para a hPr1 NIADDK e de 0,699 para a SAB, quando lidas em densitômetro a uma velocidade de 0,5 mm/s a 2,5 mV de amplificação. Pela análise quantitativa, realizada com o método densitométrico, a amostra de P3-A3 apresentou um pico com conteúdo protéico de 52 μg , quando comparada com a amostra de hPr1 NIADDK. A razão desta discrepância com relação ao valor de 35 μg determinado pelo radioimunoensaio, pode ter diversas origens que necessitariam de melhores determinações e estudos.

Tabela 14: Determinações de hPr1, hGH, proteínas, hGH/hPr1 e atividade específica da hPr1 obtidos nas cromatografias em DEAE-Sepharose CL-6B.

Nº purif. Nº hipófises	Alíquota	hPr1 -(µg/hip.)-	hGH	Proteínas (µg/hip.)	At. esp. (µg hPr1/ mg prot.)	hGH/hPr1
	P2-1 aplicado à coluna	6,13	37,9	457,5	13	6,184
	"pool" P3-A1	0,49	0,018	0,61	803	0,036
19 38 hipó- fises	"pool" P3-B1	0,83	0,685	*	-	0,825
	Total recuperado	1,32	0,703	-	-	0,53
	% recup. nos "pools"	21,5	1,85	-	-	-
	P2-2 aplicado à coluna	18,24	217,2	787,9	23,15	11,9
	"pool" P3-A3	1,74	0,012	6,95	250,4	0,007
29 58 hipó- fises	"pool" P3-B3	3,20	0,115	3,18	1006,3	0,036
	"pool" P3-C3	1,98	1,980	3,79	522,4	1,000
	Total recuperado	6,92	2,107	13,92	497,1	0,300
	% recup. nos "pools"	37,9	1,00	1,76	-	-

* Não foi determinado

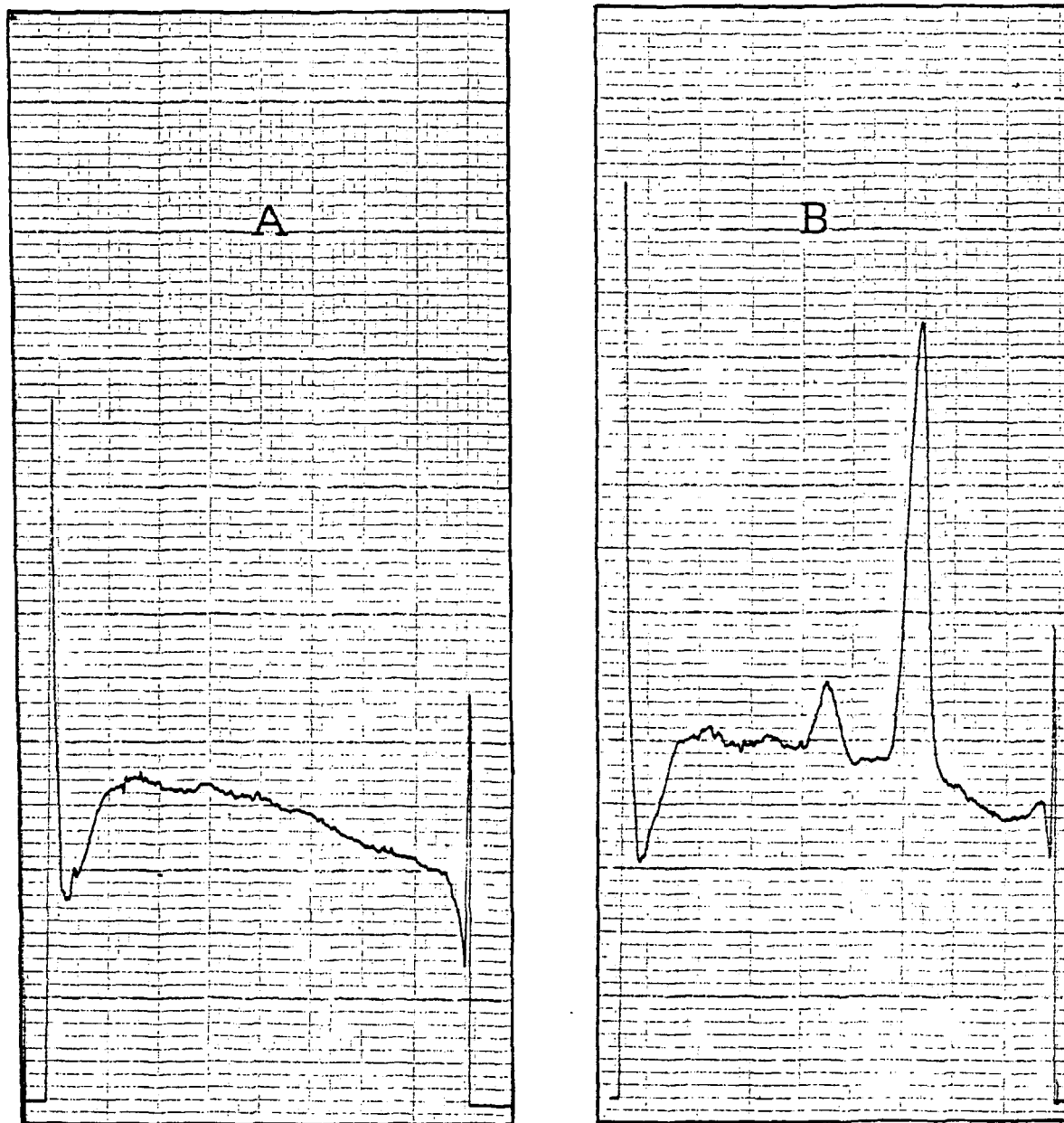


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% :
controle de qualidade das condições de corrida
e densitometria
A: Branco
B: SAB

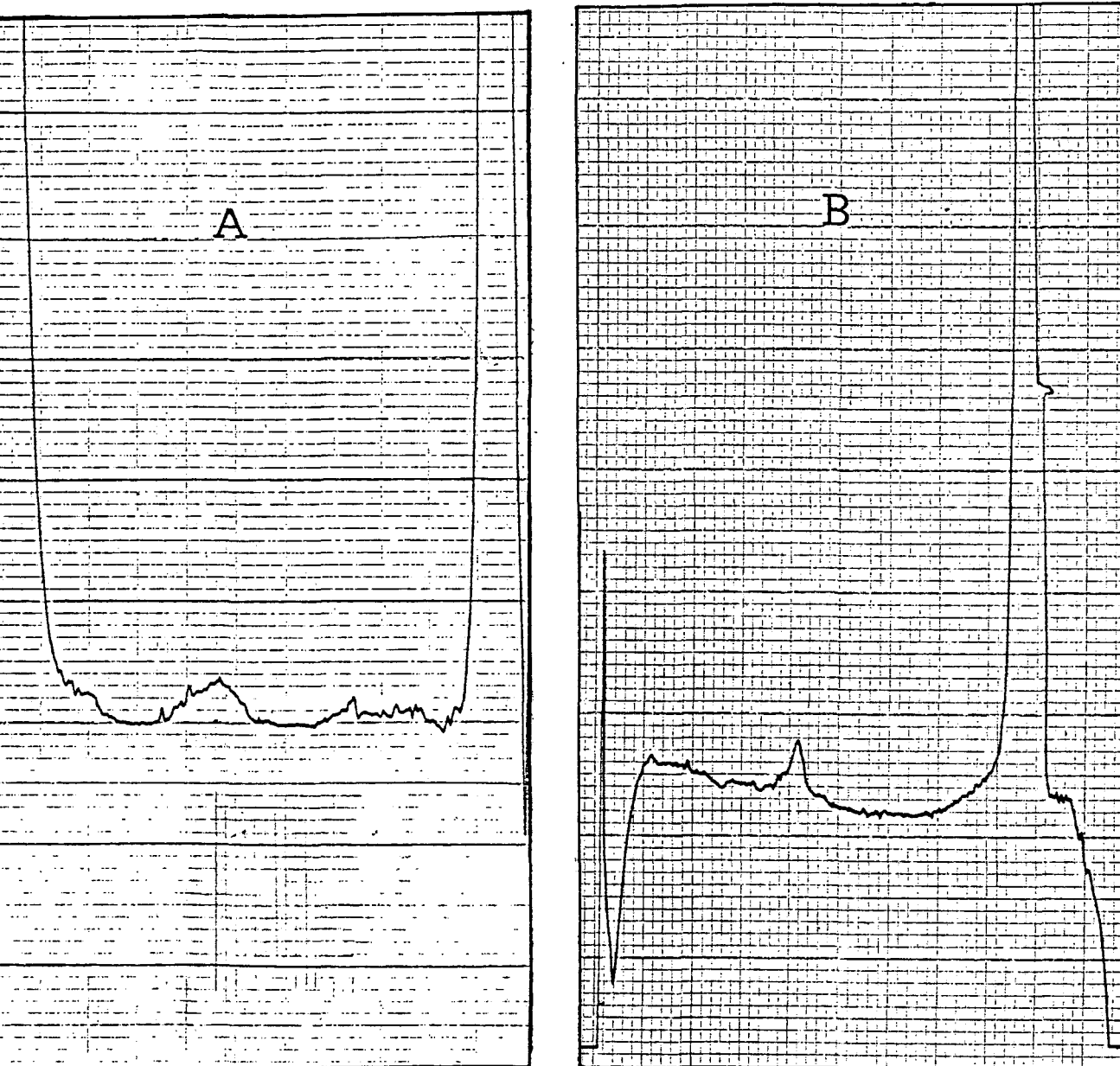


Figura 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% :

controle da qualidade da hPr1 IPEN

A: hPr1 P3-A3 (IPEN) - 35 ug

B: hPr1 NIADDK RP-1 - 25 ug

A Figura 13 exibe o perfil eletroforético da ^{125}I -hPr1 (NIADDK) em gel de poliacrilamida a 7% após purificação em Sephadex G-100. O RM obtido para o pico de ^{125}I -hPr1 foi de 0,800.

4.11. Estudo das melhores condições de estocagem da hPr1 purificada:

No mesmo dia em que foram descongeladas as frações da purificação em coluna DEAE-Sepharose CL-6B para ser preparado o "pool" P3-A1 (ver item 3.6.2.), separaram-se quatro alíquotas para estudo das melhores condições de estocagem:

A1.: 0,5 ml foram utilizados para as determinações de hPr1 e de hGH por RIE, no mesmo dia,

A2.: 2 ml foram dializados em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 e liofilizados,

A3.: 12 alíquotas de 1 ml foram congeladas a -30°C ,

A4.: 6 ml foram dializados contra água destilada, com o pH ajustado para 7,0:

A4.1.: Duas alíquotas de 400 μl foram congeladas,

A4.2.: Duas alíquotas de 400 μl foram liofilizadas com 4 mg de SAB,

A4.3.: Duas alíquotas de 400 μl foram liofilizadas sem SAB.

Após 2 dias, foram feitas as dosagens de hPr1 e de hGH das alíquotas em várias diluições. As alíquotas que haviam sido liofilizadas foram ressuspensas no mesmo volume que possuíam anteriormente, com água destilada. Os cálculos das determinações de hPr1 e hGH foram feitos em ng/volume total da solução original.

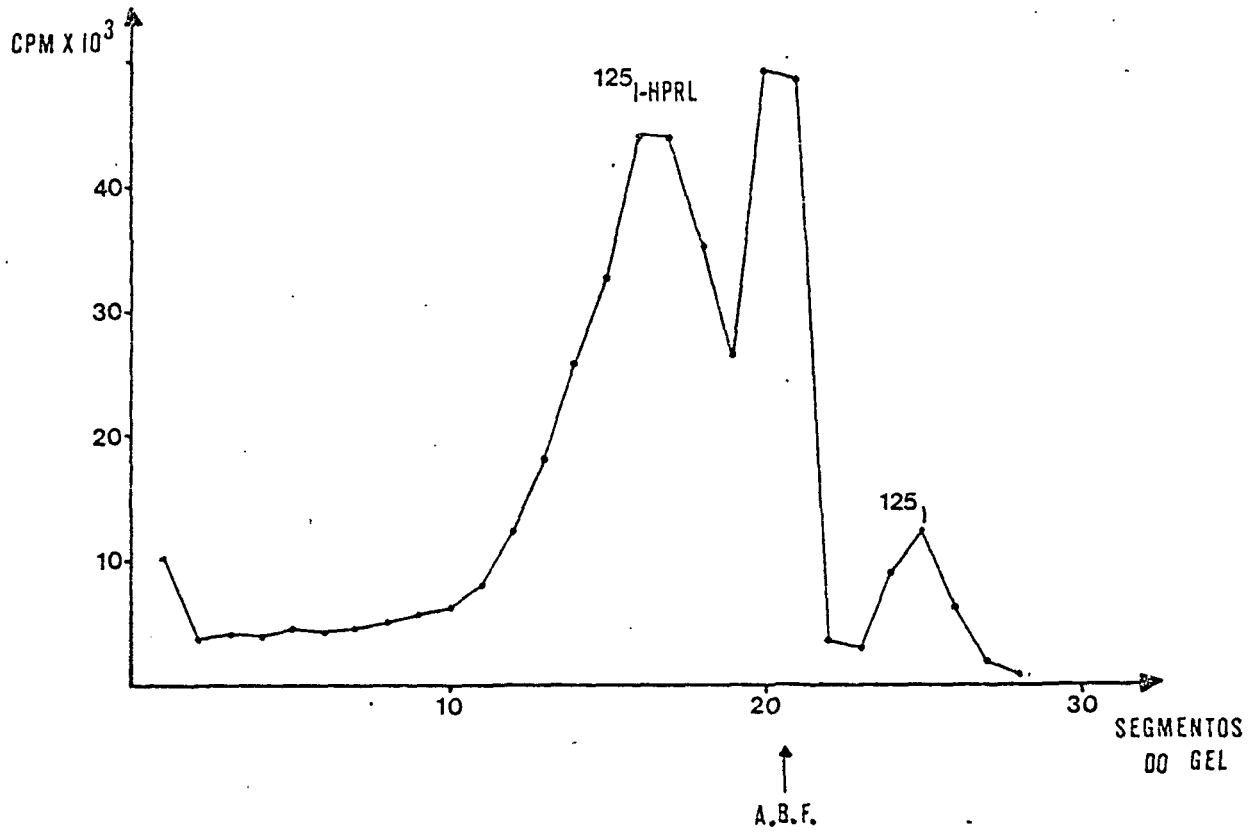


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% da ¹²⁵I-HPRL

Na Tabela 15 são apresentados os valores das determinações de hPr1 e hGH das alíquotas sob diferentes condições de estocagem. A condição que melhor manteve a atividade imunológica da hPr1 foi a diálise contra água neutralizada a pH 7,0 e posterior liofilização com 1% de SAB RIA grade. Isto se deve à proteção que a SAB apresenta sobre a hPr1 e que chegou a fornecer uma atividade maior do que aquela do controle, provavelmente devido às rápidas perdas que se verificam durante a pipetagem da solução não protegida com SAB. Observamos que a liofilização sem SAB sempre foi muito perigosa e que a diálise contra água não parece acarretar perdas substanciais. A diálise contra tampão de alta força iônica parece resultar em maiores perdas com relação à diálise contra água. Lembramos porém que a amostra A2 foi liofilizada em condições de geometria diferente por causa de seu pequeno volume.

4.12. Estudo da reprodutibilidade e estabilidade do 1º padrão de hPr1 IPEN:

Para o teste de reprodutibilidade intra-ensaio, foram realizadas nove curvas do padrão PP3-A3, juntamente com uma curva utilizando o padrão NIADDK, RP-1 (item 3.9). Pelos resultados mostrados na Tabela 16, onde é apresentado o conteúdo de hPr1 nas ampolas de padrão PP3-A3, podemos confirmar a reprodutibilidade do conteúdo de hPr1 nas ampolas de padrão PP3-A3, sendo que as quantidades de hPr1/ampola apresentaram um CV de somente 13,1%, valor que inclui também a variação intra-ensaio em si.

A fim de confirmarmos a estabilidade dos padrões, executamos sete curvas utilizando o padrão PP3-A3 de duas em duas semanas até 5 meses após ampolização. A partir dos resultados obtidos, foi calculado o conteúdo de hPr1 nas ampolas do padrão. Na Tabela 17 estão expressos os valores das determinações de hPr1 nas ampolas do padrão PP3-A3. O CV é semelhante àquele apresentado na Tabela 16, demonstrando que não houve variação significativa no conteúdo de hPr1 durante o período de cinco meses. A Figura 14 mostra a quantidade de hPr1 presente nas ampolas de PP3-A3 e sua variação em função do tempo.

4.13 Teste de Paralelismo entre os Padrões de hPr1 IPEN e NIADDK:

Das nove curvas do padrão PP3-A3, sete foram significativamente paralelas ao padrão NIADDK RP-1 a nível de significância $P=0,05$, validando portanto a avaliação correta da potência imunológica da hPr1 determinada no extrato. Na Tabela 18, estão expressos os parâmetros avaliados pelo teste de Rodbard para o paralelismo entre as curvas. Na Figura 15 podemos observar uma curva de RIE do padrão de hPr1 PP3-A3 e uma do padrão NIADDK RP-1 em log da concentração de hPr1 x logito %B/B0.

Um teste análogo, realizado com o "pool" PP3-B3 não apresentou paralelismo significativo em três das cinco curvas analisadas. Isto poderia significar uma diferença qualitativa entre estas preparação e os padrões IPEN e NIADDK.

Tabela 15: Determinações de hPr1 e de hGH de amostras mantidas sob diferentes condições de estocagem.

Condições de estocagem	hPr1 ($\mu\text{g}/\text{hip.}$)	hGH ($\mu\text{g}/\text{hip.}$)
A.1 Controle: nenhuma reação realizada e determinação imediata	25,9 \pm 1,2	*
A.2 Diálise com tampão fosfato de sódio, pH7,4 e liofilização	8,1 \pm 1,3	1,2 \pm 0,5
A.3 Congelamento a -30°C	30,7 \pm 1,6	0,7 \pm 0,2
A.4.1 Diálise contra água pH 7,0 e congelamento	28,8 \pm 0,6	0,8 \pm 0,3
A.4.2 Diálise contra água pH 7,0 e liofilização com 1% de SAB	34,4 \pm 2,0	1,3 \pm 0,3
A.4.3 Diálise contra água pH 7,0 e liofilização	17,7 \pm 2,9	1,2 \pm 0,1

* Não foi determinado

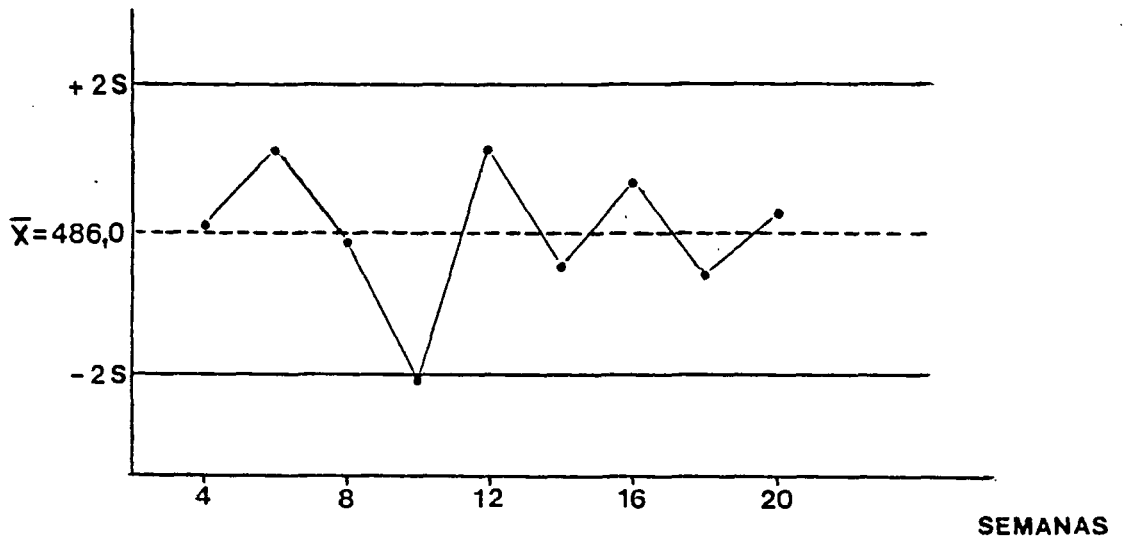
Tabela 16: Reprodutibilidade intra-ensaio do conteúdo de hPr1 nas ampolas de padrão PP3-A3.

Nº ampola	hPr1 (ng/ampola)
1.	433,0
2.	616,0
3.	527,2
4.	421,0
5.	500,0
6.	521,0
7.	412,0
8.	521,0
9.	474,0
$\bar{X}=492,0 \pm 65,0$ CV=13,2%	

Tabela 17: Concentração de hPr1 por ampola de PP3-A3 em função do tempo.

Semanas	hPr1 (ng/ampola)
4	492,0
6	553,0
8	477,0
10	362,0
12	556,0
14	458,0
16	526,0
18	452,0
20	503,0
$\bar{X}=486,0 \pm 60,0$ CV=12,3%	

NG PRL/ML



.Figura 14: Determinação de hPrl/ampola em função do tempo.

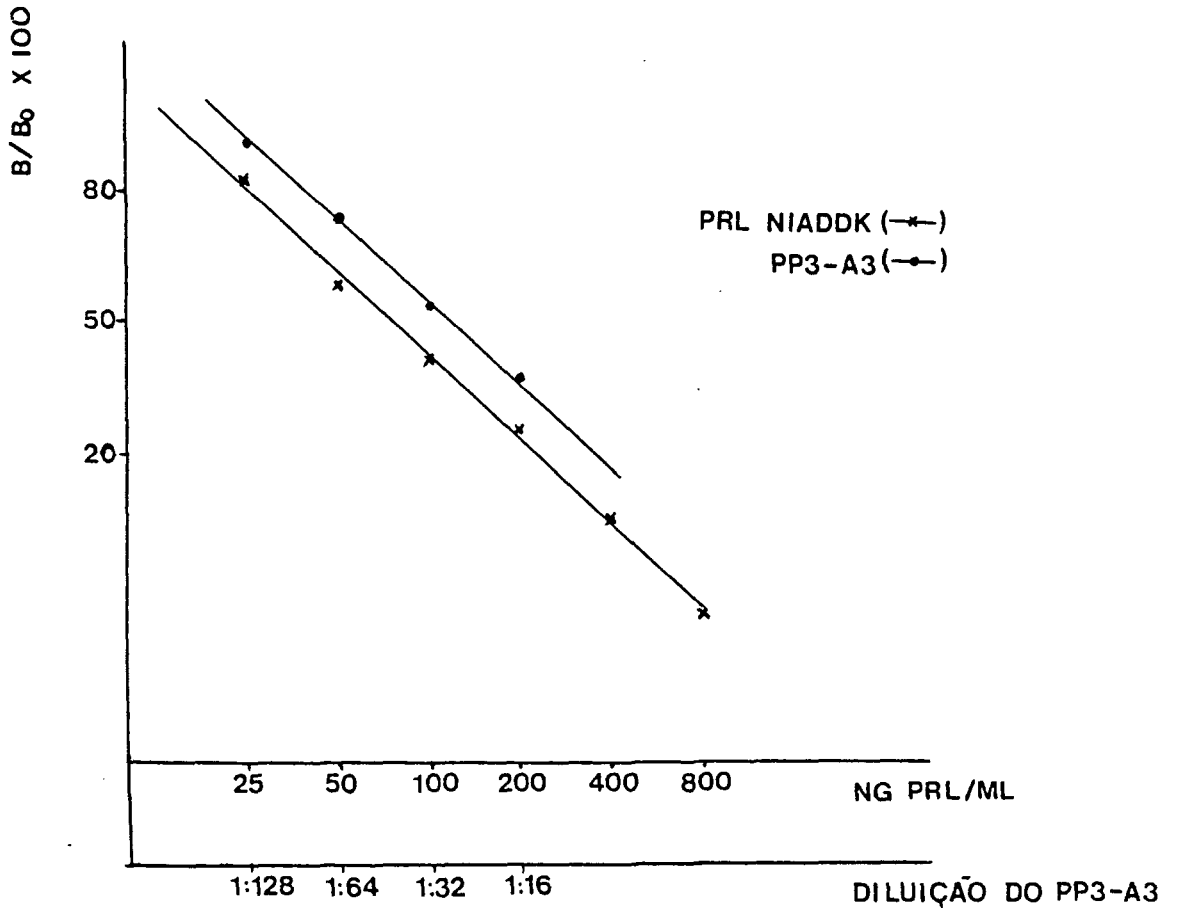


Figura 15: Curvas padrão de hPrl NIADDK e IPEN.

Tabela 18: Parâmetros avaliados pelo teste de Paralelismo de Rodbard para as curvas de hPrl PP3-A3 e NIADDK RP-1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
N	4	4	4	5	5	5	4	4	4
Pendência	1,062	0,999	0,985	1,068	1,170	1,073	0,913	1,051	0,902
r	0,971	0,997	0,992	0,992	0,998	0,977	0,948	0,991	0,992
CORRELAÇÃO	s	s	s	s	s	s	ns	s	s
A	385,6	493,0	485,6	387,1	404,5	473,7	398,4	468,2	455,3
t calc.	0,337	0,029	0,171	0,839	3,602	0,537	0,404	0,498	1,197
PARALELISMO	s	s	s	s	ns	s	s	s	s

N = Nº de diluições do padrão

r = Coeficiente de correlação da reta

A = Conteúdo de hPrl em ng/ampola determinado na curva NIADDK-hPrl-RP-1 ($\bar{X}=439,0 \pm 44,4$; CV=10,1%)

s = significativo

ns = não significativo

4.14 Determinação de outros hormônios hipofisários contaminantes:

Foram determinados por RIE as concentrações de hLH, hFSH e hTSH nas ampolas PP3-A3 e PP3-B3 e determinadas as porcentagens de contaminação da hPr1.

PP3-A3: hLH: 4,7%
hFSH: <0,2%
hTSH: 3,9%

PP3-B3: hLH: 2,1%
hFSH: <0,2%
hTSH: 2,9%

Podemos observar que o nosso produto, com relação à presença dos hormônios hLH e hTSH não é tão puro como o padrão internacional de referência, porém a interferência do hLH e hTSH altamente purificados no RIE de hPr1 são, respectivamente, de 0,0032 e 0,0015%. Consideramos, portanto, desprezível a interferência causada por estas quantidades de hormônios contaminantes.

V. DISCUSSÃO:

A pesquisa que realizamos permitiu a obtenção de prolactina humana (hPr1) altamente purificada, com conteúdo de hGH inferior a 1% e atividade imunológica comparável ao produto internacional de referência. Isto permite que o referido produto possa ser usado para preparação de padrões, traçadores e anti-soros que representam os reagentes de base nas técnicas diagnósticas radioimunológicas ou imunológicas em geral.

A atividade específica, relativa ao produto altamente purificado fornecido pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (hPr1-NIADDK) chegou a valores da ordem de 80-90%, enquanto o valor mínimo de concentração de hGH, o contaminante cuja presença representa a maior dificuldade de todo o processo de purificação, foi da ordem de 0,7%. Este valor, mesmo sendo ainda longe dos valores de 0,1% declarado por outros autores (Hodgkinson, 1981) (22), WHO, (1988) (76) indica uma purificação superior à declarada nos trabalhos clássicos de Lewis (1972) (38) e Roos (1979) (65), onde a contaminação por este hormônio foi, respectivamente, de 2,0 e 1,6%. De fato, foi também por nós demonstrado na Tabela 5, que uma contaminação por hGH de 1% em nossos reagentes, significaria uma interferência completamente desprezível no RIE de hPr1.

Considerando que no caso da hPr1 e dos hormônios para uso diagnóstico em geral, a pureza é um fator muito mais limitante do que a quantidade obtida, não se deu caráter prioritário ao rendimento da extração. Este parâmetro porém foi estudado amplamente, com a finalidade de que nossos rendimentos fossem compatíveis com

àqueles (muito variáveis, por sinal) declarados pelos principais autores. Assim, enquanto Hodgkinson e cols (1981)⁽²²⁾, declaram uma recuperação de 87 μg de hPr1/glândula, Lewis e cols (1973)⁽³⁶⁾, o primeiro grupo que conseguiu purificar este hormônio, apresentam um rendimento variável de 5 a 15 μg /hipófise, Hwang e cols (1973)⁽²⁸⁾ de 40-50 μg /hipófise, Roos e cols (1979)⁽⁶⁵⁾ de 31 μg /hipófise, Chapman e cols (1981)⁽¹⁰⁾ de 5 μg /hipófise e McLean⁽⁴⁸⁾ de 19 μg /hipófise. Dentro desta enorme flutuação de valores, provavelmente ligada não somente à técnica de extração, mas também aos diversos materiais biológicos coletados e estocados em condições diferentes, os resultados que encontramos se enquadram na região dos rendimentos baixos. É significativo porém que os cuidados por nós tomados e os estudos realizados a este respeito tenham levado o rendimento de 1,32 μg /hipófise na primeira extração para o valor de 7 μg /hipófise na segunda.

Durante a pesquisa que realizamos, procuramos identificar as origens desse baixo rendimento ou destas supostas perdas. Claramente o ponto inicial de partida para toda consideração subsequente foi chegar a uma definição sobre o conteúdo real de hPr1 por hipófise. O acordo existente na literatura, sobre este dado é da mesma ordem daquele, já mencionado, relativo aos rendimentos obtidos. De um valor de 20 μg /glândula (Lewis, 1971)⁽³⁷⁾, passamos a valores de 78 μg (Roos, 1979)⁽⁶⁵⁾, 100 μg (Daughaday, Williams, 1985)⁽¹³⁾ e até de 220 μg (Hodgkinson, 1981)⁽²²⁾. Uma parte do nosso trabalho experimental foi, portanto, determinar o conteúdo de hPr1 nas hipófises; ou seja, colhidas, estocadas e

analisadas nas nossas condições. Os valores da Tabela 10, juntamente com o experimento apresentado na Tabela 6 levam a um valor médio de $80,2 \pm 31,5 \mu\text{g hPr1/hipófise}$, que reflete um pouco a média dos valores interlaboratoriais existentes na literatura. Usando este valor de base, que pode até ser discutível, mas que é o único operativo em nossas condições de trabalho, e considerando as perdas menores (2ª extração) de 24 e 37% por nós obtidas nas duas etapas cromatográficas, chegamos exatamente ao nosso valor final de $7 \mu\text{g/hipófise}$. Esta racionalização nos permite especular que parte da hPr1 perdida durante o processo pode estar:

- a) Retida nas colunas cromatográficas;
- b) Eluída durante a aplicação da amostra ou a primeira lavagem;
- c) Junto com o hGH ou outras frações protéicas eliminadas propositalmente durante a escolha dos "pools".

é nossa opinião, portanto, com relação ao rendimento em hPr1 nas extrações, que deveríamos investigar melhor e aprimorar especialmente as duas técnicas cromatográficas, baseando-nos especialmente nos dados realísticos e de alta qualidade e confiabilidade de Roos e cols⁽⁶⁵⁾, onde a recuperação em cada uma das quatro etapas cromatográficas por eles realizadas, foi de 85-95%. Neste contexto, achamos útil indicar pelo menos duas incongruências presentes nos dados de Hodgkinson e cols⁽²²⁾. Primeiramente, o extrato inicial não poderia ter, como declarado no referido trabalho, um conteúdo de $0,5 \mu\text{g}$ de hPr1/mg de proteína, fornecendo depois $191 \mu\text{g}$ de hPr1/hipófise. Isto representaria um conteúdo proteico de 382 mg/hipófise , que é 4-5 vezes superior ao possível. Secundariamente, o conteúdo declarado de $220 \mu\text{g}$ de

hPr1/hipófise representaria, mesmo considerando um valor medianamente alto de 80 mg de proteína/hipófise, um conteúdo de 2,75 µg de hPr1/mg de proteína. É este um valor muito alto, quando comparamos com os dados da literatura e até com aqueles fornecidos pelos mesmos autores do trabalho. Estes, como já mencionado, partem de um extrato inicial de 0,5 µg de hPr1/mg de proteína que, a nosso ver, deveria ser enriquecido e não mais diluído em relação ao conteúdo hipofisário.

Como mencionado no título deste trabalho, a técnica padronizada foi definida "miniextração". É esta outra característica que queremos salientar, sendo que todas as nossas extrações foram realizadas a partir de um máximo de 70 hipófises. Isso, a nosso ver, proporciona várias vantagens:

- a) Maior facilidade e flexibilidade na coleta destas glândulas, cujas dificuldades de obtenção são largamente conhecidas;
- b) Extrema rapidez de processamento: tendo já pronta e operativa a técnica analítica (RIE), o produto final congelado para a liofilização pode ser obtido em 10 dias;
- c) Máxima eliminação dos processos de degradação e alteração ligadas à estocagem deste hormônio em solução;
- d) Grande facilidade na elaboração e introdução de técnicas alternativas nas próprias fases de extração e purificação.

É fácil observar que todas estas vantagens, talvez insignificantes nas condições de trabalho dos autores mencionados acima, são muito significativas nas condições em que trabalhamos, onde a coleta e o processamento de um lote de, por exemplo, 500 hipófises,

pudesse exigir tempos demasiadamente grandes.

Em síntese, portanto, miniextração significa: rapidez, flexibilidade, economia e menor alteração do produto. Por outro lado significa também maiores dificuldades técnicas, especialmente na detecção e muito provavelmente obtenção de menores rendimentos que seriam obtidos com maior número de hipófises.

Para chegar aos resultados já mencionados foi necessária toda uma padronização de técnicas básicas e o estudo de condições alternativas que estão relacionadas aos primeiros sete capítulos do ítem "Resultados". A marcação de hPr1 doada pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA, a purificação da ^{125}I -hPr1, a escolha das melhores condições de radioensaio, e relativo controle de qualidade, tanto para a hPr1, quanto para o hGH, o estudo das reações cruzadas, das melhores condições de extração e do conteúdo de hPr1 em hipófises humanas, apresentam um trabalho aparentemente rotineiro, mas que na prática é o verdadeiro instrumento sem o qual o trabalho de extração e purificação não teria sido possível.

Neste contexto lembramos portanto a reprodutibilidade obtida nas marcações de hPr1 (um dos hormônios mais lábeis frente à oxidação e radioiodação), seja nas atividades específicas (CV=26%), nos rendimentos (CV=27%), nos coeficientes de distribuição (Kd) que estão relacionados com o raio molecular (CV=12%), sempre com recuperações quase teóricas (R maior que 90%). Foram utilizadas três técnicas diferentes de iodação, cujos resultados e características comparativas, especialmente com relação à imu-

norreatividade do produto marcado, não foi possível analisar e investigar de maneira mais profunda, por ser este aspecto, além dos objetivos do presente trabalho.

O estudo das reações cruzadas nos RIE de hGH e hPr1 confirmaram em nossas condições de ensaio, os dados fornecidos pelo NIADDK. As potências relativas de hGH no RIE de hPr1 obtidas pelo NIADDK e por nós foram respectivamente de 0,0002 e de 0,0012, enquanto para o RIE de hGH, as potências relativas referentes à hPr1 foram de 0,0073 para o NIADDK e de 0,0051 para nós. A precisão (CV intra-ensaio menor do que 10% e interensaio entre 16 e 25%) foi da mesma ordem daquela geralmente apresentada na literatura para a determinação deste hormônio protéico, e o mesmo podemos dizer com relação à exatidão. A sensibilidade por nós propositamente mantida em níveis relativamente baixos (da ordem de 5 ng/ml) foi mais que suficiente para este tipo de estudo.

Na padronização destas técnicas fundamentais, necessárias para o desenvolvimento da extração e purificação, uma ênfase particular merecem dois resultados que consideramos válidos numa comparação interlaboratorial. O primeiro, que confere originalidade ao nosso método de extração, se refere à introdução da etapa de extração em pH 7,0, a qual permitiu uma maior eliminação de hGH (da ordem de 8%), sem perda significativa de hPr1 (0,7%). O segundo resultado, já mencionado anteriormente foi a definição do conteúdo em hPr1 das hipófises humanas ($80 \pm 30 \mu\text{g}$) que confirma, com uma certa aproximação, o valor fornecido por W. Daughaday (Williams, 1988)⁽¹³⁾ o qual a nosso ver, já considera os vários dados da literatura. Esta determinação do conteúdo hipofisário em

hPr1 representa para nós também a prova mais direta da exatidão da nossa técnica e condições de ensaio.

Com relação à utilização da hPr1-IPEN purificada e aos testes realizados sobre este produto além da já mencionada determinação de pureza e atividade específica, lembramos as características eletroforéticas, determinadas mediante técnica não destrutiva por densitometria na luz ultravioleta. Os valores da taxa de migração relativa (R_m) da hPr1-IPEN ($R_m=0,505$) foram perfeitamente comparáveis aos valores obtidos para a hPr1 NIADDK doada pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA apresentando também um acordo interlaboratorial satisfatório raramente observado. Lembramos de fato o valor de $R_m=0,55$ obtido por Lewis e cols (37) e de $0,44$ obtido por Hodgkinson e cols (22), ambos em condições experimentais muito próximas às nossas. Isto confirma a qualidade do nosso produto final provando que não houve alteração significativa em suas propriedades físico-químicas. A diferença de R_m obtido entre o hormônio "frio" e o radioiodado se deve provavelmente à presença de iodo na molécula do marcado e conseqüente aumento na eletronegatividade ou, alternativamente, a alterações estruturais provocadas em todas as moléculas de hPr1 pelos reagentes e/ou pelas condições de marcação. Estudos e considerações análogos já foram realizadas neste laboratório com relação à molécula de $^{125}\text{I-hGH}$ (6). Interessante também é a aplicabilidade da mesma técnica eletroforética com leitura densitométrica não destrutiva para fins analíticos quantitativos que poderão ter desenvolvimentos futuros especialmente com relação a testes de pureza de extrema praticidade e rapidez. Ênfase especial merecem também os resulta-

dos obtidos com relação às melhores condições de estocagem da hPr1 purificada, que enfrentam um dos problemas principais a serem resolvidos juntamente com a purificação deste hormônio. Neste estudo foi confirmado que a liofilização, em certas condições, pode ser a operação que leva a maiores perdas em atividade hormonal; que a diálise contra água não afeta particularmente a atividade imunológica deste hormônio; que a presença de SAB (quando possível) é sempre o fator de maior garantia de estabilidade e que altas forças iônicas também podem levar a grandes perdas de hPr1. Estas duas últimas considerações confirmam exatamente dados análogos apresentados num estudo interessante realizado por Nyberg, Roos e cols (54).

Podemos concluir o presente estudo lembrando os dados preliminares já obtidos, relativos à preparação e estudo de reprodutibilidade e estabilidade do nosso primeiro padrão de hPr1-IPEN.

No que diz respeito à reprodutibilidade na ampolização, fator de importância primária na preparação de um padrão, foi obtido um valor de ng $491,7 \pm 64,7$ (CV= 13,1%) de hPr1 por ampola (N=9). Observamos outrossim que este fator inclui também a reprodutibilidade interensaio das determinações radioimunológicas.

O estudo sobre a estabilidade do produto em ampolas não apresentou perda significativa de atividade até pelo menos 20 semanas e as primeiras curvas de RIE, realizadas utilizando a hPr1-IPEN como padrão se comparam perfeitamente, quanto aos parâmetros controle de qualidade, aos já realizados com a hPr1-NIADDK. Res-

saltamos também que testes de paralelismo relativos às curvas obtidas com os dois padrões (IPEN e NIADDK) apresentaram divergência não significativa em oito dos nove ensaios realizados até agora.

Concluindo, podemos afirmar que a hPr1 extraída e purificada no IPEN pode substituir perfeitamente os padrões de grande pureza preparados nos melhores laboratórios. Sua utilização na preparação de produtos marcados do mesmo nível qualitativo está em fase de realização e poderá ser estendida também, em colaboração com outros laboratórios, à preparação de anticorpos específicos mono e policlonais.

VI. Referências Bibliográficas:

1. ALLOLIO, B.; HOEPPNER, A.; LEONHARDT, U.; DEUB, U. & WINKELMANN, W. Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in patients with prolactinoma. Acta Endocrinol. 114:475-82, 1987.
2. ARMEANU, M., FROLICH, M.; LEQUIM, R.M. Circadian rhythm of prolactin during the menstrual cycle. Fert. Steril. 46(2):315-16, 1986.
3. ASSIS, L.M.; NICOLAU, W.; HIRATA, I.A.D.; MURAMOTO, E.; PIERONI, R.R. & SHIBATA, H. Estudo do método de preparação do hormônio de crescimento humano pelo fracionamento em sulfato de amônio e gel-filtração em Sephadex G-100. Revta. Ass. Med. Bras., 18(8):299-304, 1972.
4. ASTON, R. and IVANYI, J. Monoclonal antibodies to growth hormone and prolactin. Pharmac. Ther., 27:403-24, 1985.
5. BARTOLINI, P.; ARKATEN, R.; RIBELA, M.T. Ultraviolet scanning densitometry for detection, quantitation and preparative elution of protein bands from unstained gels. Anal. Biochem., 176:400-405, 1989.

6. BARTOLINI, P. Efeitos da radioiodação sobre as atividades biológica, imunológica, de ligação a receptores e propriedades físico-químicas do hormônio de crescimento humano. São Paulo, 1984 (Tese de doutoramento, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

7. BARTOLINI, P.; BORGHI, V.C.; RIBELA, M.T.C.P.; SCHWARZ, I.; GIMBO, E.K.; MORGANTI, L.E.; ARAUJO, E.A. Evaluation of the Chloramine T stoichiometric iodination of hGH, hLH, hPr1, hTSH, hCT and BSA reference preparation. Arg. Biol. Technol., 30:36, 1987.

8. BARTOLINI, P.; CAMILLO, M.A.P.; CARVALHO, E.I.; MURAMOTO, E.; SCHWARZ, I. Quality control in the potency determination of hGH extracts: radioimmunoassay and radio receptor assay with standardized labelling and assay conditions. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine, held in Viena, 21 to 25 June, 1982. p.540-3.

9. BEN-DAVID, M. & CHRAMBACH, A. Preparation of bio and immunoactive human prolactin in milligrams amounts from amniotic fluid in 60 % yield. Endocrinology, 101:250-61, 1977.

10. CHAPMAN, G.E.; RENWICK, A.G.C.; LIVESEY, J.H. The isolation of human pituitary hormones from frozen glands. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53(5):1008-13, 1981.
11. CHEEVER, E.V. & LEWIS, U.J. Estimation of the molecular weights of the multiple components of growth hormone and prolactin. Endocrinology, 85:465-73, 1969.
12. COOKE, N.E.; COIT, D.; SHINE, J.; BAXTER, J.D.; MARTIAL J.A. Human prolactin-cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. J. Biol. Chem., 256(8):4007-16, 1981.
13. DAUGHADAY, W.H. A hipófise anterior. In: WILLIAMS, R.H. ed. Tratado de endocrinología. São Paulo, Manole, 1988. p.643-4,722-4,752-4.
14. DAVIS, B.J. Disc electrophoresis II Method and applications to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 101:404-27, 1964.
15. ESQUIFINO, A.I.; VILLANÚA, M.A. and AGRASAL, C. Possible role of prolactin in growth regulation. Rev. Esp. Fisiol. 43(4):455-62, 1987.

16. FARKOUH, N.H.; PACKER, M.G.; FRANZ, A.G. Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum. High proportion in basal state and reduction after Thyrotropin-Releasing Hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 48(6):1026-32, 1979.
17. FRANTZ, A.G.; HABIF, B.G.; HYMAN, G.A.; SUH, H.K.; SASSIN, J.F.; ZIMMERMAN, E.A.; NOEL, G.L. & KEINBERG, D.L. Physiological and pharmacological factors affecting prolactin secretion including its suppression by L-dopa in the treatment of breast cancer. In: PASTEELS, J. & ROBIN, C. Human Prolactin. Amsterdam, Excerpta Medica, 1973. p.273-90.
18. FRIESEN, H.M.D. & HWANG, P. Human Prolactin. Annu. Rev. Med., 24:251-70, 1973.
19. GARNIER, P.E.; AUBERT, M.L.; KAPLAN, S.L.; GRUMBACH, M.M. Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: Decreased activity of big prolactin in a radioreceptor assay and evidence for its secretion. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47(6):1273-81, 1978.
20. GUYDA, H.J. Heterogeneity of human growth hormone and prolactin secreted in vitro: Immunoassay and radio receptor assay correlations. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41:953-67, 1975.

- 21.HODGKINSON, S. & LOWRY, P.J. Novel two step purification of human prolactin. J. Endocrinol. 87:26, 1980.
- 22.HODGKINSON, S.C. & LOWRY, P.J. Hydrophobic-interaction chromatography in the presence of acetonitrile. A two-step purification method for human prolactin. Biochem. J., 199:619-27, 1981.
- 23.HUGHES, J.P.; TANAKA, T.; GOUT, P.W.; BEER, C.T.; NOBLE, R.L. & FRIESEN, H.G. Effect of iodination on human growth hormone and prolactin characterized by bioassay, radio-immunoassay, radioreceptor assay and electrophoresis. Endocrinology, 111(3):827-32, 1982.
- 24.HUMMEL, L.B.C.W.; BROWN, G.M.; HWANG, P.; FRIESEN, G.H. Human and monkey prolactin and growth hormone: Separation of polymorphic forms by isoelectric focusing. Endocrinology, 97:855-67, 1975.
- 25.HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 194:495-6, 1962.
- 26.HWANG, P.; GUYDA, H.; FRIESEN, H. Purification of human prolactin. J. Biol. Chem., 247(7):1955-8, 1971.
- 27.HWANG, P.; GUYDA, H.; FRIESEN, H. Purification of human

- prolactin. Methods Enzimol., 37:389-402, 1975.
- 28.HWANG, P.; ROBERTSON, M.; GUYDA, H.; FRIESEN, H. The purification of human prolactin from frozen pituitary glands. J. Clin. Endocrinol. Metab., 36:1110-8, 1973.
- 29.JORDAN, R.M.; TRESP, N.M.; KOHLER, P.O. Human prolactin heterogeneity in pituitary effluent blood. Horm. Metab. Res., 17:598-601, 1985.
- 30.KLEINBERG, D.L. & FRANTZ, A.G. Human prolactin: Measurement in plasma by in vitro bioassay. J. Clin. Invest., 50:1557-68, 1971.
- 31.KLEINBERG, D.L. & TODD, J. Evidence that human growth hormone is a potent lactogen in primates. J. Clin. Endocrinol. Metab. 51(5):1009-13, 1980.
- 32.LARREA, F.; ESCORZA, A.; GRANADOS, J.; VALENCIA, X.; VALERO, A.; GRAVIOTO, M.C.; PEREZ-PALACIOS, G. Familial occurrence of big-big prolactin as the predominant immuno reactive human prolactin species in blood. Fert.Steril. 47(6):956-63, 1987.

- 33.LEE, D.W. & MARKOFF, E. Synthesis and release of glycosiled prolactin by human decidua in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab., 62(8):990-4, 1986.
- 34.LEWIS, U.J. Chemistry of prolactin. Adv. Exp. Med. Biol. 80:19-35, 1977.
- 35.LEWIS, U.J. Enzimatic transformations of growth hormone and prolactin. J. Biol. Chem., 237(10)-3141-5, 1962.
- 36.LEWIS, U.J. & SINGH, R.N.P. Recovery of prolactin from human pituitary glands. In: PASTEELS, J. & ROBIN, C. eds. Human prolactin. Amsterdam, Excerpta Medica, 1973, pp. 1-10.
- 37.LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; SEAVEY, B.K. Human prolactin Isolation and some properties. Biochem. Biophys. Res. Comm., 44(5):1169-76, 1971.
- 38.LEWIS, U.J.; SINGH R.N.P.; SEAVEY, B.K. Problems in the purification of human prolactin. In: BOYNS, A.R. & GRIFFITHS, K. eds. Prolactin and carcinogenesis. Cardiff Wallles, Alpha Omega Alpha, 1972. p.4-12.
- 39.LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; SINHA, Y.N.; VANDERLAAN, W.P. Electrophoretic evidence for human prolactin. J. Clin. Endocrinol. Metab., 33:153-6, 1971.

40. LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; SINHA, Y.N.; VANDERLAAN, W.P.
Glycosiled human prolactin. Endocrinology, 116:359-63,
1971.
41. LOWRY, O.H.; ROSGBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.
Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol.
Chem., 193:265-75, 1951.
42. MAIZEL, J.V. Polyacrilamide gel electrophoresis of viral
proteins In: MARAMOROSCH, K.S. & KOPROWSKY, H. eds.
Methods in virology. London, Academic Press, 1972.
p.179-245
43. MALAMUD, J. & DRYSDALE, J.W. Isoelectric points of proteins:
A table. Anal. Biochem., 86:620-47, 1978.
44. MARCHALONIS, J. J. An enzymic method for the trace
iodination of immunoglobulins and other proteins.
Biochem. J., 113:229-305, 1969.
45. MARKOFF, E.; LEE, D.W. & HOLLINGSWORTH, D.R. Glycosiled
and nonglycosiled prolactin in serum during pregnancy.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 67(3):519-23, 1988.

46. MARKOFF, E.; SIGEL, M.B.; LACOUR, N.; SEAVEY, B.K.; FRIESEN, H.G.; LEWIS, U.J. Glicosilation seletively alters the biological activity of prolactin. Endocrinology, 123: 1303-6, 1988.
47. MARX, W.; SIMPSON, M.E.; EVANS, H.M. Bioassay of the growth hormone of anterior pituitary. Endocrinology, 30:1-10, 1942.
48. McLEAN, C. Department of protein hormones and recombinant DNA unit. St Bartholomew's Centre for Clinical Research. Comunicação Pessoal.
49. MILLER, W.L. Structure and evolution of the growth hormone gene family. Endocr. Rev., 4:97-130, 1983.
50. MITTRA, J. A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part I biosynthesis, characterization and regulatory control. Biochem. Biophys. Res. Comm., 95(4): 1750-59, 1980.
51. NICOLL, C.S. Bio-assay of prolactin. Analysis of the pigeon crop-sac response to local prolactin injection by an objective and quantitative method. Endocrinology, 80: 641-55, 1967.

52. NICOLL, C.S. Prolactin and growth hormone: Specialists on one hand and mutual mimics on other. Perspectives in Biology and Medicine, 25(3):369-81, 1982.
53. NICOLL, C.S.; TARPEY, J.F.; MAYER, G.L.; RUSSEL, S.M. Similarities and differences among prolactins and growth hormone and their receptors. Amer. Zool., 26:965-83, 1986.
54. NYBERG, F.; BERGMAN, P.; WIDE, L.; ROOS, P. Stability studies on human pituitary prolactin. Uppsala J. Med. Sci. 90:265-77, 1985.
55. NYBERG, F.; ROOS, P.; WIDE, L. Human pituitary prolactin Isolation and characterization of three isohormones with different bioassay and radioimmunoassay activities. Biochem. Biophys. Acta, 625:256-65, 1980.
56. PAHLMAN, S.; ROSENGREN, J.; HJERTÉN, S. Hydrophobic interaction chromatography on uncharged sepharose derivatives. Effects of neutral salts on the adsorption of proteins. J. Chromatography, 131:99-108, 1977.

57. PELLEGRINI, I.; GUNZ, G.; RONIN, C.; TEQUILLET, E.; PEYRAT, J.P.; DELDRI, P.; JAQUET, P. Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells. Immunological, receptor binding and biological properties of the glycosiled and nonglycosiled forms. Endocrinology, 122(6):2667-75, 1988.
58. RATHNAN, P. & SAXENA, B.B. Recovery of prolactin from acetone-dried human pituitary glands. Endocrinology, 100:1403-08, 1977.
59. RIBELA, M.T.; CAMILLO, M.A.P.; BARTOLINI, P. Resultados de um ano de contrôle de qualidade inter-ensaio na determinação da imunorreatividade de extratos de hGH. In: Endocrinologia e metabolismo: 15º Congresso Brasileiro, realizado em São Paulo, 24 a 28 de outubro de 1982.
60. RODBARD, D. Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assays. Anal. Biochem., 90:1-12, 1978.
61. RODBARD, D. & FRAGIER, G.R. Statistical analyse of radioligand assay data. Methods Enzimol. 37:3-22, 1986.

- 62.RODBARD, D.; MUNSON, P.J.; DELEA, A. Improved curve fitting parallelism testing characterization of sensitivity and specificity. Validation and optimization of radioligand assay. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: Proceedings of the international symposium on... , held in Berlin, Oct. 31-Nov 4, 1977. Vienna, 1978. v.1., p.469-514.
- 63.ROGOL, A.D. & ROSEN, S.W. Prolactin of apparent large size: The major immunoreactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumor. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38:714:17, 1974.
- 64.ROOS, P.; FEVOLD, H.R.; GEMZELL, C.A. Preparation of human growth hormone by gel filtration. Biochem. Biophys. Acta, 74:525-31, 1963.
- 65.ROOS, P.; NYBERG, F.; WIDE, L. Isolation of human pituitary prolactin. Biochim. Biophys. Acta, 588:368-79, 1979.
- 66.ROTH, J. Methods for assessing immunologic and biologic properties of iodinated peptide hormones. Methods Enzimol., 37:223-33, 1975.

67. SHOME, B. & PARLOW, A.F. Human pituitary prolactin (hPr1):
The entire aminoacid sequence. J. Clin. Endocrinol. Metab., 45:1112-5, 1977.
68. SINHA, Y.N.; GILLIGAN, T.A.; LEE, D.W.; HOLLINGSWORTH, D.;
MARKOFF, E. Cleaved prolactin: Evidence of its
occurrence in human pituitary gland and plasma. J. Clin. Endocrinol. Metab., 60:239-43, 1985.
69. STRICKER, P. Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la
montée laiteuse. C.R. Soc. Biol., 99:1978-80, 1928.
70. SUH, H.K. & FRANTZ, A.G. Size heterogeneity of human
prolactin in plasma and pituitary extracts. J. Clin. Endocrinol. Metab., 39:928-35, 1974.
71. SZEPESEY, L. & HORVATH, C. Specific salt effects in
hydrophobic-interaction chromatography of proteins.
Chromatographia, 26:13-8, 1988.
72. THORELL, J.I. & JOHANSSON, B.G. Enzymatic iodination of
polypeptides with ^{125}I to high specific activity.
Biochim. Biophys. Acta, 251:363-9, 1971.
73. THORNER, M.O. Prolactin. Clin. Endocrinol. Metab., 6(1):
201-22, 1977.

74. WALLIS, M. The molecular evolution of pituitary growth hormone, prolactin and placental lactogen: A protein family showing variable rates of evolution. J. Mol. Evol. 17:10-8, 1981.
75. WHITAKER, M. D.; KLEE, G. G.; KAO, P. C.; RANDALL, R. V.; HESER, D. W. Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera. J. Clin. Endocrinol. Metab., 58(5):826-30, 1983.
76. WORLD HEALTH ORGANIZATION Proposed guidelines for the preparation and establishment of reference materials for biological substances. 1977.