

PREPARAÇÃO DE HORMÔNIOS PITUITÁRIOS HUMANOS  
MEDIANTE TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE.

PAULO BARTOLINI

As dificuldades existentes na extração e purificação de hormônios a partir de hipófises (hGH, hPRL, hLH, hFSH, hTSH) são amplamente conhecidas como também conhecidas são as dificuldades de obtenção destas glândulas de autopsia e os perigos relacionados com suas possíveis contaminações virais. Alguns destes hormônios são presentes, na hipófise, em quantidades, sumamente baixas e, além disto, suas propriedades físico-químicas extremamente similares dificultam enormemente sua separação e purificação. Todos estes problemas podem ser resolvidos em grande parte através de utilização de técnicas de DNA recombinante, através das quais quantidades praticamente ilimitadas de proteínas humanas e, mais recentemente, também de glicoproteínas, podem ser obtidas em células procariotas ou eucariotas transformadas.

Para esta finalidade o cDNA de hormônio de crescimento (hGH) e de prolactina (hPRL) humanos foram clonados em bactérias após o "screening" de uma genoteca obtida diretamente a partir de mRNA pituitário.

Hormônio de crescimento recombinante (rec-hGH) foi expressado e secretado no espaço periplásmico de E.coli sendo subsequentemente purificado através de três diferentes etapas cromatográficas. Depois de testar sua pureza, potência e identidade em comparação com hGH pituitários (pit-hGH), o rec-hGH foi usado para a preparação de reagentes para radioimunoensaio (RIA). Foi confirmada sua eficiência de marcação com  $^{125}\text{I}$  e também sua equivalência imunológica com pit-hGH. Sua atividade imunológica relativa foi de  $1,037 \pm 0,063$ , em comparação com uma preparação internacional de referência (NIDDK-hGH-RP-1, Bethesda, EUA).

O gene sintético de prolactina humana (hPRL) foi também obtido a partir da mesma genoteca de cDNA pituitário, sendo demonstrada sua identidade com a sequência publicada que codifica esta proteína. Um vetor de expressão está agora sendo construído que deverá também levar à secreção periplásmica deste hormônio. Três caminhos estão sendo seguidos:

- a) utilização da sequência sinalizadora completa e idêntica ao hormônio natural;
- b) construção de uma sequência sinalizadora na qual

foram suprimidos 5 aminoácidos aparentemente não críticos para sua secreção;

- c) construção de um gene híbrido hGH-hPRL no qual a sequência sinalizadora e os primeiros 15 aminoácidos são do hGH faltando os primeiros 20 aminoácidos da hPRL.

A tireotrofina humana (hTSH), uma glicoproteína constituída de duas cadeias ( $\alpha$  e  $\beta$ ) codificadas por genes localizados em cromosomas diferentes, devido a suas modificações pós-traducionais, não poderá ser clonadas em bactérias onde não existem os apropriados mecanismos de glicosilação. Este hormônio será preparado em colaboração com o laboratório de Endocrinologia Molecular do Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos EUA em células de Ovário de Hamster Chines (CHO) utilizando promotores virais escolhidos entre os seguintes: SV40 (simian virus), P40 (adeno-associated virus), LTR (murine sarcoma virus long terminal repeat). Por causa do diferente tipo de glicosilação realizada por estas células, será feito um estudo comparativo com o produto de extração hipofisária purificado e caracterizado em nosso laboratório.