

BR77010 80



**OBTENÇÃO DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) HUMANO
MARCADO COM ^{125}I , PARA RADIOIMUNOENSAIO**

**Heidi Pinto, Rubens Schmidt Werner, Antonio Carlos Lerário,
Iracélia Torres de Toledo e Souza, Bernardo Léo Wejchenberg e
Rômulo Ribeiro Pieroni**

**PUBLICAÇÃO IEA 431
CARRM 2**

SETEMBRO/1976

**OBTENÇÃO DE HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) HUMANO
MARCADO COM ^{125}I , PARA RADIOIMUNOENSAIO**

**Heidi Pinto, Rubens Schmidt Werner, Antonio Carlos Lerário,
Iracélia Torres de Toledo e Souza, Bernardo Léo Wajchenberg e
Rômulo Ribeiro Pieroni**

**COORDENADORIA DE APLICAÇÕES DE RADIOISÓTOPOS E
RADIAÇÕES À MEDICINA
(CARRM)**

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

APROVADO PARA PUBLICAÇÃO EM ABRIL/1976

SUPERINTENDENTE

Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal 11.049 (Pinheiros)
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
SÃO PAULO - BRASIL

OBTENÇÃO DE HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) HUMANO MARCADO COM ^{125}I , PARA RADIOIMUNOENSAIO*

Heidi Pinto, Rubens Schmidt Werner, Antonio Carlos Lerário,
Iracélia Torres de Toledo e Souza, Bernardo Léo Wajchenberg e
Rômulo Ribeiro Pieroni

RESUMO

As etapas fundamentais de marcação, purificação e controle são apresentadas, consistindo de:

- a) Marcação do Hormônio Folículo Estimulante pelo método de Hunter e Greenwood, modificado;
- b) Purificação do hormônio marcado por cromatografia em coluna de exclusão molecular, Sephadex G-75 previamente equilibrado em PBS (tampão fosfato 0,05 M pH 7,6 contendo NaCl 0,14 M). O hormônio purificado é eluído logo após as frações danificadas, mas antes do ^{125}I livre.

Assim obtemos FSH- ^{125}I , sem iodação excessiva, para que a imunorreatividade não fique comprometida. Sempre optamos por frações de FSH- ^{125}I com pureza igual ou superior a 75%.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos radioimunológicos para os hormônios glicoproteicos, FSH, LH, TSH e HCG, teve por finalidade sua caracterização imunológica e a investigação do mecanismo de sua secreção em condições normais e patológicas.

O radioimunoensaio de hormônios glicoproteicos segue os princípios gerais descritos por Yalow e Berson⁽⁸⁾. Entretanto, numerosos problemas tiveram que ser resolvidos e entre eles está a qualidade do traçador, pois uma superiodação influi diretamente na qualidade imunológica.

O fenômeno químico que pode ocorrer durante a iodação tem sido amplamente estudado; o iodo pode ser envolvido em reações de substituição no anel benzênico dos resíduos tirosil, nos grupos imidazólicos da histidina e nos grupos indólicos do triptofano⁽⁷⁾ ou também pode oxidar resíduos de cistina e cisteína⁽¹⁾.

Outras reações de oxidação e substituição podem acontecer devido a outros grupos de amino-ácidos, normalmente presentes nas proteínas^(7,1). Para se obter proteínas marcadas com ^{125}I não modificadas biologicamente, é necessário evitar alterações na estrutura devido a processos oxidativos, mas também introduzir o mínimo possível de átomos de iodo na molécula proteica⁽⁴⁾.

De fato, estudos recentes^(3,6) têm reconhecido que o comportamento imunológico das gama globulinas, iodadas nos resíduos tirosil, mudam progressivamente com o aumento do conteúdo de iodo, o que torna essencial um controle para obter uma boa marcação.

As etapas fundamentais das técnicas de marcação e purificação são as seguintes:

- Para marcação do hormônio pelo método de oxidação pela Cloramina T de Hunter e

(*) Trabalho realizado na Coordenadoria de Aplicações de Radioisótopos e Radiações à Medicina, Setor Radioimunoensaio do Instituto de Energia Atômica de São Paulo SP — Brasil.

Greenwood⁽⁵⁾ modificado por Yalow e Berson⁽⁸⁾, devemos considerar que o FSH hipofisário humano tem PM de 35000 e 6 resíduos tirosil, e a atividade específica é calculada para uma média de um átomo de iodo por molécula de hormônio. Para o FSH usamos atividade específica de 40 a 70 mCi/mg.

O radioelemento usado é o ^{125}I , associando as vantagens de uma emissão radioativa de baixa energia com uma meia vida relativamente longa (60 dias).

A marcação deve ser efetuada em meio neutro ou levemente alcalino pois o potencial de oxidação do iodo diminui com o aumento do pH.

Apesar dos cuidados utilizados no processo de marcação é impossível impedir a presença de frações marcadas danificadas e iodo livre⁽⁹⁾.

É pois necessário, proceder-se a uma purificação prévia antes de empregar o hormônio marcado, para livrá-lo de componentes danificados e do iodo livre.

— Na purificação, utilizamos filtração em coluna de Sephadex G-75 e as frações são eluídas com PBS (tampão fosfato 0,05 M pH 7,5 contendo NaCl 0,14 M) e as frações danificadas são eluídas no início, o hormônio indene logo a seguir, sendo o iodo (átomo não reativo retido por mais tempo, em consequência de seu tamanho^(2,5)).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL RADIOATIVO

O ^{125}I foi obtido da Union Carbide Corporation, sob a forma de iodeto de sódio, preparado especialmente para iodação de proteínas. O $\text{Na-}^{125}\text{I}$ se apresenta em meio ligeiramente alcalino e totalmente livre de agentes redutores com uma atividade específica variando entre 200 e 566 mCi/ml.

FSH PARA IODAÇÃO

LER-1575 C, obtido de hipófises humanas, por gentileza da National Pituitary Agency, Bethesda, Maryland.

REAGENTES

Utilizamos Cloramina T (Merck) na concentração de 1 mg/ml em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,5; Metabissulfito de sódio (Carlo Erba) como agente redutor na concentração de 2,5 mg/ml, no mesmo tampão

MÉTODO DE MARCAÇÃO

O método utilizado foi o preconizado por Hunter e Greenwood⁽⁸⁾, com modificações. A principal modificação consiste em desenvolver o ensaio a 4°C usando 2 µg de Cloramina T por µg do hormônio e reduzindo o tempo de exposição para 20 segundos, até a adição de metabissulfito de sódio.

As quantidades de hormônio proteico, iodo radioativo e agente oxidante (Tabela I) são calculadas para que haja o mínimo de substituição inespecífica (no máximo 1 átomo de iodo para uma molécula de hormônio proteico), pois, um excesso de iodação prejudica a imunorreatividade do hormônio (Tabela II).

Tabela I

Marcação do FSH Hipofisário Humano (LER-1575 C) com ^{125}I .

25 μl de FSH (2,5 μg /25 μl em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4)
25 μl de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4
0,25 mCi de ^{125}I sob a forma de Na^{125}I (1 a 3 μl)
5 μl de Cloramina T (10 mg/10 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4)
Agitar por poucos segundos
50 μl de Metabissulfito de sódio (25 mg/10 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4)
Agitar
100 μl de tampão fosfato 0,05 M pH 7,5 com 10% de plasma de banco de sangue corado com azul de bromophenol).
Homogenizar
Transferir para o topo da coluna de purificação.

* Esta reação foi realizada a 4°C, para evitar maior quantidade de degradação da molécula.

Tabela II

Diferenças no Comportamento Imunorreativo do FSH- ^{125}I , marcado com Diferentes Quantidades de Cloramina T.

Data Iodação	Cloramina* T	Ativ esp da marcação	% de ligação Ag-Ab
18.02.74	20 μg	45 mCi/mg	18
07.03.74	15 μg	55 mCi/mg	28
16.04.74	30 μg	42 mCi/mg	10
03.05.74	10 μg	41 mCi/mg	38
13.05.74	5 μg	50 mCi/mg	52

* A quantidade de FSH usada foi sempre constante (2,5 μg)

PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO MARCADO

O preparado iodado foi submetido à purificação em coluna de Sephadex G75. O Sephadex foi previamente entumescido com PBS (tampão fosfato 0,05 M pH 7,5 contendo NaCl 0,14 M) por vários dias em geladeira, com agitação constante. Após extração das bolhas, a vácuo, foi preparada uma coluna de 1 x 50 cm, usando-se o coletor de frações refrigerado LKB. Após empacotamento, passamos 2,5 ml de BSA-PBS 5% (PBS contendo 5% de soro albumina-bovina) para evitar adsorções do hormônio ao vidro e ao

Sephadex e lavamos exaustivamente com PBS mantendo-a refrigerada por 24 horas. Após este tempo, a coluna está pronta a receber o FSH marcado que será eluído com PBS, coletando-se frações de 1 ml, sendo o fluxo regulado por uma bomba peristáltica a fim de conseguirmos 5 gotas por minuto.

Os tubos têm suas atividades determinadas em contador Gama de poço (Searle) e os picos de atividade são identificados (Figura 1). A marcação é considerada boa quando temos 50% de incorporação de ^{125}I .

O grau de pureza (percentagem de FSH- ^{125}I indene) de cada tubo foi testado usando-se talco (Gold Leaf Co.) na quantidade de 200 mg recoberto com 0,1 ml de plasma humano, como adsorvente do hormônio marcado indene. Identificados assim, os tubos contendo maior percentagem de FSH- ^{125}I indene, são então separados.

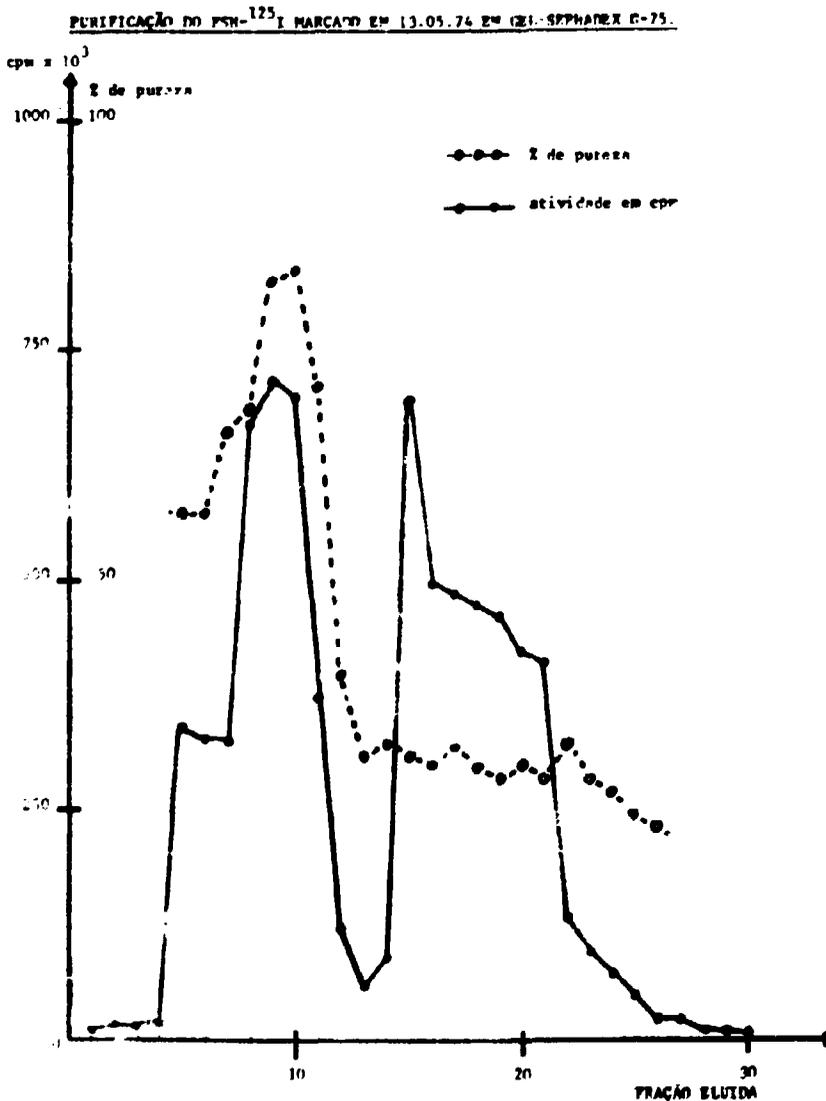


Figura 1

ATIVIDADE IMUNOLÓGICA

Após marcação e purificação, a fração mais pura eluída do Sephadex G-75 é incubada com o antisoro específico, preparado em coelhos imunizados contra hormônio folículo estimulante humano adsorvido com HCG, que nos foi fornecido também pela National Pituitary Agency. Após incubação, o FSH-¹²⁵I ligado ao anticorpo deve ser separado do FSH-¹²⁵I não reativo o que foi feito usando-se um segundo anticorpo, anti-gama globulina de coelho, preparado em carneiros. Após incubação com o segundo anticorpo, centrifugamos o precipitado contendo o complexo antígeno marcado-anticorpo é contado em contador gama de poço (Searle Nuclear). Para que o hormônio marcado seja considerado imunologicamente reativo devemos ter 50% da radioatividade total no precipitado (Tabela III).

Tabela III

Incubação Prévia de Frações de FSH-¹²⁵I, Eluídas do Sephadex G-75,
com mais de 75% de Pureza

Nº Tubo	BSA-PBS 1%	FSH- ¹²⁵ I 2 x 10 ⁵ cpm	Anti-FSH* 1 : 1000	Anti-globul.** 1 : 2	% ligação***
1	0,4 ml	0,1 ml	—	—	—
2	0,4 ml	0,1 ml	—	—	—
3	0,4 ml	0,1 ml	—	—	—
4	0,2 ml	0,1 ml	—	0,1 ml	10%
5	0,2 ml	0,1 ml	—	0,1 ml	11%
6	0,2 ml	0,1 ml	—	0,1 ml	9%
7	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	34%
8	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	37%
9	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	33%

* Incubar 5 dias a 4°C

** Incubar 24 horas a 4°C

*** Centrifugar 30' a 3500 rpm

RESULTADOS

Damos a seguir, tabelas demonstrativas dos resultados obtidos nas diferentes fases de nosso trabalho.

— Marcação do FSH com ¹²⁵I.

A Tabela I reúne os passos principais do método de marcação.

— Comportamento imunorreativo do FSH-¹²⁵I usando quantidades crescentes de Cloramina T.

A Tabela II consigna as percentagens de ligação em diferentes ensaios (complexo Ag-Ab formando o precipitado do tubo de incubação).

- Atividade imunológica do hormônio marcado.

A Tabela III reúne os dados percentuais de radioatividade, portanto do complexo Ag-Ab, nos precipitados

- Purificação do FSH-¹²⁵I

A figura 1 apresenta os picos de radioatividade e pureza obtidos na purificação do hormônio foliculo estimulante marcado com iodo radioativo, em Sephadex G-75.

DISCUSSÃO

Discutiremos, agora, os resultados obtidos nas diversas fases de nosso trabalho.

A radioiodação pelo método de Hunter e Greenwood, usando a Cloramina T normalmente empregado para substituição de iodo na molécula proteica, pode induzir uma iodação não somente nos radicais tirosila mas também fenômenos oxidativos, que podem modificar extremamente a estrutura e as propriedades imunológicas da proteína

Por outro lado, devemos considerar a característica do método que é a reação efetuada em pequenos volumes e concentrações altas, uma vez que trabalhamos com hormônios hipofisários de difícil obtenção. Outra vantagem, é que podemos efetuar a reação de substituição em poucos minutos e sem necessidade de aparelhagem sofisticada.

A purificação do hormônio proteico marcado é condição primordial para que possamos tê-lo indene, livre de resíduos degradados e iodo não reativo e o Sephadex G-75 foi o que apresentou melhor resolução para o FSH

Podemos associar dois sistemas de purificação, usando dois géis diferentes, tais como, gel de amido e gel sephadex, ou gel sephadex e gel de poliacrilamida e com isto obtemos hormônios puríssimos, mas com pouquíssima radioatividade

O teste de pureza é feito usando talco em tableres (Gold Leaf Co.), como adsorvente do FSH-¹²⁵I indene, na quantidade de 200 mg que é o que melhor substituiu o método clássico da cromatoelektroforese em papel Whatmann nº 3 MC

AGRADECIMENTOS

Ao National Pituitary Agency (Baltimore, Md, U.S.A.) por nos ter fornecido o FSH hipofisário humano (LER 1575), antisoro anti FSH e FSH padrão (LER 907)

ABSTRACT

An efficient labeling of human Follicle Stimulant Hormone, is essential to development of sensitive radioimmunoassays. Iodination by Chloramine T method frequently is subject to severe iodination damage and some preparations are unacceptable for radioimmunoassays. Modifications to the Hunter method, changing incubation time, reaction temperature and reducing Chloramine T amount used in the reaction, were performed in obtaining a more effective labeling FSH-¹²⁵I fraction obtained from Sephadex G-75 column purification presented excellent immunoreactivity and quality control of the steps of the reaction demonstrated a high percentage (90%) of intact Follicle Stimulant Hormone

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, H. & STRAUSS, E. Beiträge zur Kenntnis substituierter Protein. 3.Mitteilung: über die Jodierung des Nitroglobins. *Biochem Z.*, Berlin, 284:231-7, 1936.
2. GREENWOOD, F. C. et alii. The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J.*, Liverpool, 89:114-23, 1963.
3. HELKAMP, R. W. et alii. High specific activity iodination of γ -globulin with iodine-131 monochloride. *Cancer. Res.*, Baltimore, 20:1495-500, 1960.
4. HUGHES, JR., W. R. & STRASSLE, R. Preparation and properties of serum and plasma protein 24. Iodination of human serum albumin. *J. Am. chem. Soc.*, Easton, Pa. 72:452-7, 1950.
5. HUNTER, W. M. & GREENWOOD, F. C. Preparation of iodine 131-labelled human growth hormone of high specific activity. *Natura, Lond.*, 194:495-6, 1962.
6. JOHNSON, A. et alii. The effect of iodination on antibody activity. *J. Immun.*, Baltimore, 84:213-20, 1960.
7. RAMACHANDRAN, L. R. Protein iodine interaction. *Chem. Rev.*, Baltimore, 56:199-218, 1956.
8. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. clin. Invest.*, Baltimore, 39:1157-75, 1960.
9. _____ & BERSON, S. A. Labeling of proteins; proteins and practices. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 28:1033-44, 1966.

