

BR8818762

ISSN 0101-3084

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

**PURIFICAÇÃO DE HORMÔNIO TIREOTRÓFICO HUMANO:
PREPARAÇÃO PRELIMINAR**

Vânia Caira Borghi, Lin Hui Lin e Paolo Bertolini

PUBLICAÇÃO IPEN 162

JULHO/1988

SÃO PAULO

**PURIFICAÇÃO DE HORMÔNIO TIREOTRÓFICO HUMANO:
PREPARAÇÃO PRELIMINAR**

Vânia Caira Borghi, Lin Hui Lin e Paolo Bartolini

DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C 45.00

**CHROMATOGRAPHY
PURIFICATION
RADIOMMUNOASSAY
TSH**

IPEN - Doc - 3021

Aprovado para publicação em 10.03.88.

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

PURIFICAÇÃO DE HORMÔNIO TIREOTRÓFICO HUMANO:

PREPARAÇÃO PRELIMINAR

Vânia Caira Borgni, Lin Hui Lin & Paolo Bartolini

RESUMO

O emprego de preparações cruas estocadas para o isolamento de tireotrofina (TSH) humana foi avaliado de acordo com Roos e cols. a partir de uma fração colateral obtida durante a purificação de hormônio de crescimento de hipófises congeladas (SOMATORMON). Seis preparações cruas de TSH foram estocadas a -20°C durante alguns anos para posterior purificação. Uma delas foi purificada por cromatografias sucessivas em Sephadex G-100, hidroxilapatita e SP-Sephadex C50. O conteúdo de TSH presente nas frações cromatográficas isoladas e reunidas em uma mistura foi ensaiado por radioimunoensaio específico desenvolvido em nossos laboratórios. A determinação proteica das frações e misturas foi realizada por medida da absorbância a 280 nm e pelo método de Lowry e Cols., respectivamente. A atividade do TSH aumentou oito vezes durante a purificação tendo o TSH purificado a metade da potência radioimunológica daquela descrita por Roos e cols. Os resultados sugerem a adequação de preparações estocadas por longo tempo na obtenção de TSH puro.

PURIFICATION OF THYROTROPIN FROM HUMAN HYPOPHYSIS:

PRELIMINARY PREPARATION

ABSTRACT

The adequacy of stored crude preparations for isolation of human thyrotropin (TSH) was evaluated according to Roos et al from a side-fraction obtained during the purification of growth hormone from frozen pituitaries (SOMATORMON). Six crude TSH preparations were stored at -20°C during several years for further purification. One of these preparations was purified by successive chromatographies on Sephadex G-100, hydroxylapatite and SP-Sephadex C50. The TSH content present in the chromatographic fractions and in the pools was assayed by specific radioimmunoassay developed at our labora-

tory. The protein determination of the fractions and pools was performed by absorbance measurement at 280 nm and by the method of Lowry et al, respectively. The TSH activity increased eight times during the purification and the TSH purified had a radioimmunological potency around half that described by Roos et al. The results suggest the fitness of long time stored preparations in the attainment of pure TSH.

INTRODUÇÃO

A introdução de celulosas de troca iônica, na década de 50, para a cromatografia de proteínas resultou no isolamento de preparações de TSH de potência elevada. O TSH bovino foi o primeiro a ser purificado, seguido do hormônio humano, ovino, de baleia e porcino (1). Condliffe em 1963 (2) purificava o TSH humano empregando frações colaterais, obtidas no isolamento do hormônio de crescimento. À partir de então vários experimentos foram conduzidos para a obtenção deste hormônio humano, empregando diferentes técnicas cromatográficas (3-10).

Desde o início da década de 70 que pesquisadores desta Divisão de Medicina estão empenhados na extração e purificação de hormônios adeno-hipofisários humanos (11), tendo já extraído, purificado e caracterizado o hormônio de crescimento (hGH), para fins terapêuticos e de diagnóstico por radioimunoensaio (12,13).

O presente estudo tem por objetivo testar a viabilidade do emprego de diferentes preparações cruas para o isolamento de hTSH provenientes de extrações de hGH no IPEN-CNEN/SP (SOMATORMON), que permaneceram estocadas desde o período de 1981 a 1982.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados a 4°C.

A técnica de extração do hTSH empregada foi a descrita por Roos e colaboradores (7), a qual parte de produtos colaterais obtidos durante a extração do hGH. O procedimento envolve homogeneização das glândulas, extração do homogeneizado, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-100. Quando do preparo do hGH em nossos laboratórios, foram separadas seis preparações de extratos crus de hTSH, referentes ao segundo pico (pico II) obtido na cromatografia em Sephadex G-100 do extrato hipofisário (Figura 1). Essas preparações foram armazenadas a -20°C desde o período compreendido entre 1981 e 1982, na forma liofilizada (Tabela I).

Amostras dessas preparações (20 mg) foram dissolvidas em dois milili-

tros de água e dialisadas em tampão fosfato de potássio 0.1 M, pH 7.0, contendo NaCl 0.3 M. Depois de devidamente diluídas nesse mesmo tampão, foram determinadas suas concentrações protéica e tireotrófica, a fim de se estimar a atividade de TSH das mesmas.

O teor protéico total foi estimado indiretamente por leitura espectrofotométrica a 280 nm, assumindo que o valor de absorbância igual a 1.0 corresponde a uma solução com concentração de 1 mg/ml (7).

Para a determinação do hTSH desenvolveu-se método radioimunológico empregando-se hTSH altamente purificado para radioiodação e seu anti-soro específico, obtidos por doação do "National Institute of Arthritis, Diabetes & Digestive & Kidney Diseases" (14). O padrão de hTSH utilizado foi o padrão "63/14 MRC Research Standard A", também conhecido como "MRC A" e "International Reference Substance A (INRSA)". Este padrão foi estabelecido em 1966 com relação ao TSH bovino pelo "National Institute for Medical Research", Mill Hill, Londres (15). A atividade do hTSH foi expressa em unidades por miligrama (u/mg), sendo 0.05 U a atividade do conteúdo de uma ampola do "MRC A" contendo 33 ug.

À partir da preparação de extrato cru de hTSH de potência similar à descrita por Roos e cols. (7), realizou-se uma purificação preliminar a fim de se testar a viabilidade do emprego desses extratos na obtenção de hTSH altamente purificado, através de cromatografias sucessivas.

Uma pequena amostra (1.5g) do extrato referente a preparação C (Tabela I) foi dissolvida em seis mililitros de água e dialisada em tampão fosfato de potássio 0.1 M, pH 7.0, contendo NaCl 0.3 M. Após diálise o extrato foi recromatografado em coluna de gel Sephadex G-100 (2.5 x 45 cm), equilibrada e eluída com este mesmo tampão, coletando-se frações de dois mililitros, com fluxo de 12 ml/h. O conteúdo de proteína e de TSH dessas frações foi determinado por leitura a 280 nm e radioimunoensaio, respectivamente. As frações com maior atividade específica de hTSH foram reunidas, concentradas por ultrafiltração, dialisadas em tampão fosfato de potássio 0.03 M, pH 7.0 e submetidas à subsequente purificação.

A determinação protéica das frações reunidas foi realizada pela reação de Folin-Ciocalteu modificada por Lowry e colaboradores (16), empregando soro albumina bovina (SAB), fração V (Sigma), como a proteína de referência.

A etapa seguinte de purificação foi uma cromatografia de adsorção em coluna de hidroxilapatita (2.5 x 3.7 cm), equilibrada com o tampão fosfato de potássio 0.03 M, pH 7.0, havendo uma pequena perda durante a aplicação

da amostra na coluna.

A hidroxilapatita (fosfato de cálcio) foi preparada em nossos laboratórios segundo o método de Tiselius e colaboradores (17), precipitando cloreto de cálcio 0.5 M com fosfato di-sódico 0.5 M a temperatura ambiente; sendo o precipitado constituído principalmente por brushita que é convertida a hidroxilapatita.

A coluna foi eluída com o mesmo tampão fosfato de potássio em concentrações crescentes (0.03, 0.05, 0.2 e 0.5 M) e pH constante; com fluxo de 8.8 ml/h, coletando-se frações de dois mililitros. As frações com maior atividade específica de TSH foram reunidas, dialisadas em tampão fosfato de potássio 0.005 M, pH 7.0 e submetidas a etapa final de purificação.

A purificação final foi uma cromatografia de troca iônica em coluna de SP-Sephadex G-50 (1.6 x 20 cm), equilibrada com o mesmo tampão de diálise. A coluna foi eluída com concentrações crescentes do mesmo tampão fosfato de potássio (0.005, 0.02, 0.06 e 0.5 M) a pH constante; com fluxo de 8 ml/h, coletando-se frações de dois mililitros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 exhibe um cromatograma típico de uma das purificações do hGH em gel Sephadex G-100. As frações correspondentes ao pico II (área hachurada) foram reunidas para posterior obtenção do hTSH, sendo as frações correspondentes ao pico III referentes ao hGH purificado.

A Tabela I apresenta as características das seis preparações de extratos crus de hTSH provenientes da extração de hGH. Essas preparações referem-se às frações de pico II que foram reunidas, concentradas e liofilizadas sem prévia diálise; incluindo portanto no seu peso a glicina e o fosfato presentes no tampão de eluição das mesmas. A preparação C, estocada a -20°C desde 1981, foi utilizada na purificação preliminar, apresentando atividade específica de TSH de 0.29 U/mg, similar à descrita por Roos e cols. (0.24 U/mg), (7).

A Figura 2 apresenta o perfil cromatográfico da repurificação da preparação C (39.11 mg de proteína) em gel Sephadex G-100; o qual foi empregado em substituição ao Bio-gel P-150 (7) por possuírem intervalos de fracionamento correspondentes. As frações de maior atividade específica do hTSH (de números 30 a 55) foram reunidas e apresentaram após concentração e diálise 9.85 mg de proteína em 15 ml. A atividade de hTSH aumentou 1.5 vezes, a metade do aumento apresentado por Roos e cols. (7) e o rendimento foi de 37%, similar ao de Roos e cols. (40%), (7).

A Figura 3 demonstra o cromatograma da purificação em hidroxilapatita -

ta. No preparo deste fosfato de cálcio obteve-se em duas preparações 410 ml de precipitado, rendimento este similar ao da literatura que prevê rendimento de 400 a 500 ml de precipitado para a mistura de duas preparações (18). A hidroxilapatita apresentou valor de adsorção de 16 mg de SAB por grama seco e taxa de fluxo mínimo da ordem de 7 ml/h. Estes mesmos valores apresentados pelo produto comercial empregado por Roos e cols. (7), são 10 mg/g e 62 ml/h, respectivamente.

Pela análise do perfil cromatográfico exibido na Figura 3, pode-se observar que ao contrário da cromatografia realizada por Roos e cols. (7), muito pouca proteína foi eluída da coluna com o tampão fosfato de potássio 0.05 M. Foram reunidas as frações eluídas com o tampão na concentração 0.2 M (de números 130 a 150), que apresentaram maior atividade específica de hTSH. Após diálise, a mistura contendo 2.26 mg de proteína teve sua atividade de hTSH aumentada apenas 1.3 vezes; enquanto que o incremento obtido por Roos e cols. (7) nessa mesma etapa foi de 4.7 vezes. Este fato pode ser explicado pela falta de resolução na separação do material protéico eluído com o tampão nas concentrações 0.05 e 0.2 M. A recuperação não pode ser comparada à partir desta etapa, devido a perda ocorrida durante a aplicação da amostra.

Na Figura 4 está representado o cromatograma da purificação final do hTSH em SP-Sephadex C-50. As frações de números 137 a 143, eluídas com o tampão fosfato de potássio 0.06 M e com maior atividade específica de hTSH foram reunidas e apresentaram 42 ug de proteína em 12 ml de solução final. Nesta última etapa de purificação, ocorreu o maior aumento na atividade específica do hTSH, de 4.1 vezes, um pouco maior do que o descrito na literatura (7), de 3.1 vezes.

A Tabela II apresenta os valores das atividades e recuperações das sucessivas purificações do hTSH. As recuperações se referem ao material que é submetido a ultrafiltração e diálise, ocorrendo perdas inerentes a essas operações.

Pode-se observar pela análise da Tabela II que a atividade do hTSH aumentou oito vezes, cerca de seis vezes menos que o aumento obtido por Roos e cols. (7).

Porém, apesar das perdas ocorridas e do baixo rendimento, a potência do hTSH obtido foi cerca da metade (19) e um quarto (17) daquelas determinadas por radioimunoensaio em outras preparações, empregando o mesmo padrão "MRC A".

Pode-se concluir portanto que apesar do longo período de estocagem a

-20°C, esses extratos crus de hTSH podem ser utilizados para a purificação deste hormônio hipofisário.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CNEN, FINLP (PADCT convênio nº 43.86.03.51.00), IAEA* (contrato nº 4299) e ao CNPq (processo nº 405-557/86) os recursos e auxílios recebidos para a realização deste trabalho, bem como à FAPESP a bolsa de mestrado concedida.

Agradecem também ao "National Hormone & Pituitary Program" os reagentes imunológicos empregados no radioensaio e às senhoritas Rosângela ' do Rocio Arkaten e Vanda Donizetti R. Silveira o auxílio técnico prestado.

*"International Atomic Energy Agency" (Viena, Áustria).

Para a determinação do hTSH desenvolveu-se método radioimunológico empregando-se hTSH altamente purificado para radioiodação e seu anti-soro específico, obtidos por doação do "National Institute of Arthritis, Diabetes & Digestive & Kidney Diseases" (14). O padrão de hTSH utilizado foi o padrão "63/14 MRC Research Standard A", também conhecido como "MRC A" e "International Reference Substance A (INRSA)". Este padrão foi estabelecido em 1966 com relação ao TSH bovino pelo "National Institute for Medical Research", Mill Hill, Londres (15). A atividade do hTSH foi expressa em unidades por miligrama (U/mg), sendo 0.05 U a atividade do conteúdo de uma ampola do "MRC A" contendo 33 μ g.

À partir da preparação de extrato cru de hTSH de potência similar à descrita por Roos e Cols. (7), realizou-se uma purificação preliminar a fim de se testar a viabilidade do emprego desses extratos na obtenção de hTSH altamente purificado, através de cromatografias sucessivas.

Uma pequena amostra (1.5g) do extrato referente a preparação C (Tabela I) foi dissolvida em seis mililitros de água e dialisada em tampão fosfato de potássio 0.1 M, pH 7.0, contendo NaCl 0.3 M. Após diálise o extrato foi recromatografado em coluna de gel Sephadex G-100 (2.5 x 45 cm), equilibrada e eluída com este mesmo tampão, coletando-se frações de dois mililitros, com fluxo de 12 ml/h. O conteúdo de proteína e de TSH dessas frações foi determinado por leitura a 280 nm e radioimunoensaio, respectivamente. As frações com maior atividade específica de hTSH foram reunidas, concentradas por ultrafiltração, dialisadas em tampão fosfato de potássio 0.03 M, pH 7.0 e submetidas à subsequente purificação.

A determinação protéica das frações reunidas foi realizada pela reação de Folin-Ciocalteu modificada por Lowry e colaboradores (16), empregando o soro albumina bovina (SAB), fração V (Sigma), como a proteína de referência.

A etapa seguinte de purificação foi uma cromatografia de adsorção em coluna de hidroxilapatita (2.5 x 3.7 cm), equilibrada com o tampão fosfato de potássio 0.03 M, pH 7.0, havendo uma pequena perda durante a aplicação da amostra na coluna.

A hidroxilapatita (fosfato de cálcio) foi preparada em nossos laboratórios segundo o método de Tiselius e colaboradores (17), precipitando cloreto de cálcio 0.5 M com fosfato di-sódico 0.5 M à temperatura ambiente; sendo o precipitado constituído principalmente por brusnita que é convertida a hidroxilapatita.

A coluna foi eluída com o mesmo tampão fosfato de potássio em concentração crescente (0.03, 0.05, 0.2 e 0.5 M) e pH constante; com fluxo de 8.8ml/

h, coletando-se frações de dois mililitros. As frações com maior atividade específica de TSH foram reunidas, dialisadas em tampão fosfato de potássio 0.005 M, pH 7.0 e submetidas a etapa final de purificação.

A purificação final foi uma cromatografia de troca iônica em coluna de SP-Sephadex C-50 (1.6 x 20 cm), equilibrada com o mesmo tampão de diálise. A coluna foi eluída com concentrações crescentes do mesmo tampão fosfato de potássio (0.005, 0.02, 0.06 e 0.5 M) a pH constante; com fluxo de 8 ml/h, coletando-se frações de dois mililitros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 exibe um cromatograma típico de uma das purificações do hGH em gel Sephadex G-100. As frações correspondentes ao pico II (área hachurada) foram reunidas para posterior obtenção do hTSH, sendo as frações correspondentes ao pico III referentes ao hGH purificado.

A Tabela I apresenta as características das seis preparações de extratos crus de hTSH provenientes da extração de hGH. Essas preparações referem-se às frações do pico II que foram reunidas, concentradas e liofilizadas sem prévia diálise; incluindo portanto no seu peso a glicina e o fosfato presentes no tampão de eluição das mesmas. A preparação C, estocada a -20°C desde 1981, foi utilizada na purificação preliminar, apresentando atividade específica de TSH de 0.29 U/mg, similar à descrita por Roos e cols. (0.24 U/mg), (7).

A figura 2 apresenta o perfil cromatográfico da repurificação da preparação C (39.11 mg de proteína) em gel Sephadex G-100; o qual foi empregado em substituição ao Bio-gel P-150 (7) por possuírem intervalos de fracionamento correspondentes. As frações de maior atividade específica de hTSH (de números 30 a 55) foram reunidas e apresentaram após concentração e diálise 9.85 mg de proteína em 15 ml. A atividade do hTSH aumentou 1.5 vezes, a metade do aumento apresentado por Roos e cols. (7) e o rendimento foi de 37%, similar ao de Roos e cols. (40%), (7).

A figura 3 demonstra o cromatograma da purificação em hidroxilapatita. No preparo deste fosfato de cálcio obteve-se em duas preparações 410 ml de precipitado, rendimento este similar ao da literatura que prevê rendimento de 400 a 500 ml de precipitado para a mistura de duas preparações (18). A hidroxilapatita apresentou valor de adsorção de 16 mg de SAB por grama seco e taxa de fluxo mínimo da ordem de 7 ml/h. Estes mesmos valores apresentados pelo produto comercial empregado por Roos e cols. (7), são 10 mg/g e 62 ml/h, respectivamente.

Pela análise do perfil cromatográfico exibido na Figura 3, pode-se ob

servar que o contrário da cromatografia realizada por Roos e cols. (7), muito pouca proteína foi eluída da coluna com o tampão fosfato de potássio 0.05 M. Foram reunidas as frações eluídas com o tampão na concentração 0.2 M (de números 130 a 150), que apresentaram maior atividade específica de hTSH. Após diálise, a mistura contendo 2.26 mg de proteína teve sua atividade de hTSH aumentada apenas 1.3 vezes; enquanto que o incremento obtido por Roos e cols. (7) nessa mesma etapa foi de 4.7 vezes. Este fato pode ser explicado pela falta de resolução na separação do material proteico eluído com o tampão nas concentrações 0.05 e 0.2 M. A recuperação não pode ser comparada a partir desta etapa, devido a perda ocorrida durante a aplicação da amostra.

Na Figura 4 está representado o cromatograma da purificação final do hTSH em SP-Sephadex C-50. As frações de números 137 a 143, eluídas com o tampão fosfato de potássio 0.06 M e com maior atividade específica de hTSH foram reunidas e apresentaram 42 ug de proteína em 12 ml de solução final. Nesta última etapa de purificação, ocorreu o maior aumento na atividade específica do hTSH, de 4.1 vezes, um pouco maior do que o descrito na literatura (7), de 3.1 vezes.

A Tabela II apresenta os valores das atividades e recuperações ao material que é submetido a ultrafiltração e diálise, ocorrendo perdas inerentes a essas operações.

Pode-se observar pela análise da Tabela II que a atividade do hTSH aumentou oito vezes, cerca de seis vezes menos que o aumento obtido por Roos e cols. (7).

Porém, apesar das perdas ocorridas e do baixo rendimento, a potência do hTSH obtido foi cerca de metade (19) e um quarto (17) daquelas determinadas por radioimunoensaio em outras preparações, empregando o mesmo padrão "MRC A".

Pode-se concluir portanto que apesar do longo período de estacagem a -20°C, esses extratos crus de hTSH podem ser utilizados para a purificação deste hormônio hipofisário.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CNEN, FINEP (PADCT convênio nº 43.86.03.51.00), IAEA* (contrato nº 4299) e ao CNPq (processo nº 405-557/86) os recursos e auxílios recebidos para a realização deste trabalho, bem como à FAPESP a bolsa de mestrado concedida.

Agradecem também ao "National Hormone & Pituitary Program" os reagentes imunológicos empregados no radioimunoensaio e às senhoritas Rosângela do Rocio Arkaten e Vanda Donizetti R. Silveira o auxílio técnico prestado.

Preparação (data)	Peso total do liofilizado (g)	Proteínas totais*	
		(mg/100mg de liofilizado)	(mg)
A (1981)	29.80	1.68	500.64
B (1981)	13.70	2.55	349.35
C (1981)	11.40	2.47	281.58
D (1982)	6.30	2.18	137.34
E (1982)	22.15	1.12	248.08
F (1982)	33.55	1.19	382.91

Tabela I

Preparações cruas de hTSH obtidas a partir da preparação de hGH.

* Medida de absorvância a 280 nm, assumindo que $E^{0.1\%} = 1.0$.

Etapa de Purificação	TSH atividade específica (u/mg)	TSH atividade recuperada	
		U	%
Sephadex G-100 (M1)	0.29 [±] 0.09(3)	11.5	100
Sephadex G-100 (M2)	0.43 [±] 0.12(6)	4.2	37
Hidroxilapatita	0.55 [±] 0.05(3)	1.2	11*
SP-Sephadex C-50	2.29 [±] 0.00(2)	0.1	1

Tabela II

Purificação da tireotrofina humana hipofisária.

Atividades específicas expressas como médias [±] desvios Padrão, como o número de determinações em parênteses.

* Perda ocorrida durante a aplicação da amostra.

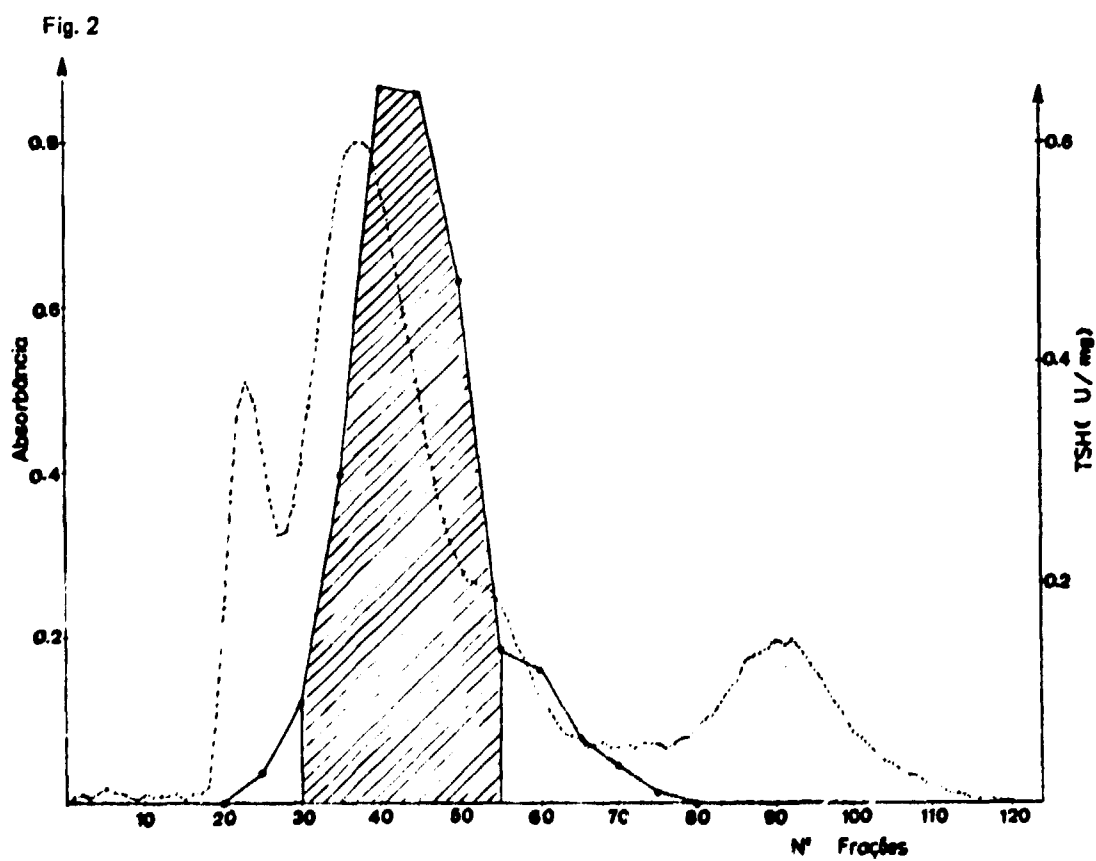
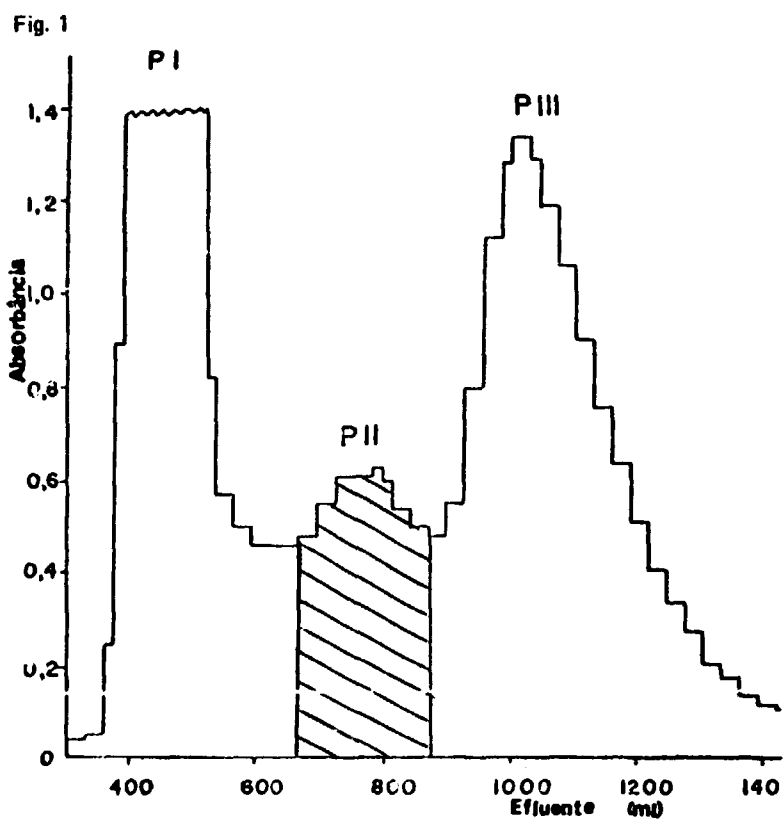


Fig. 3

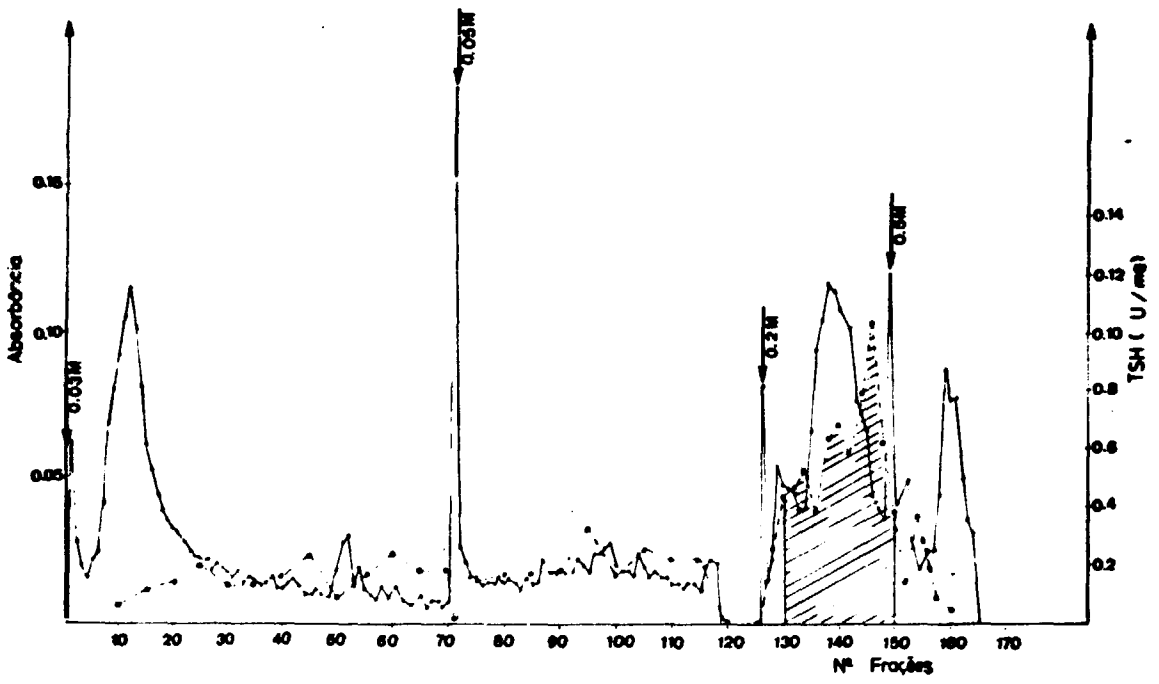
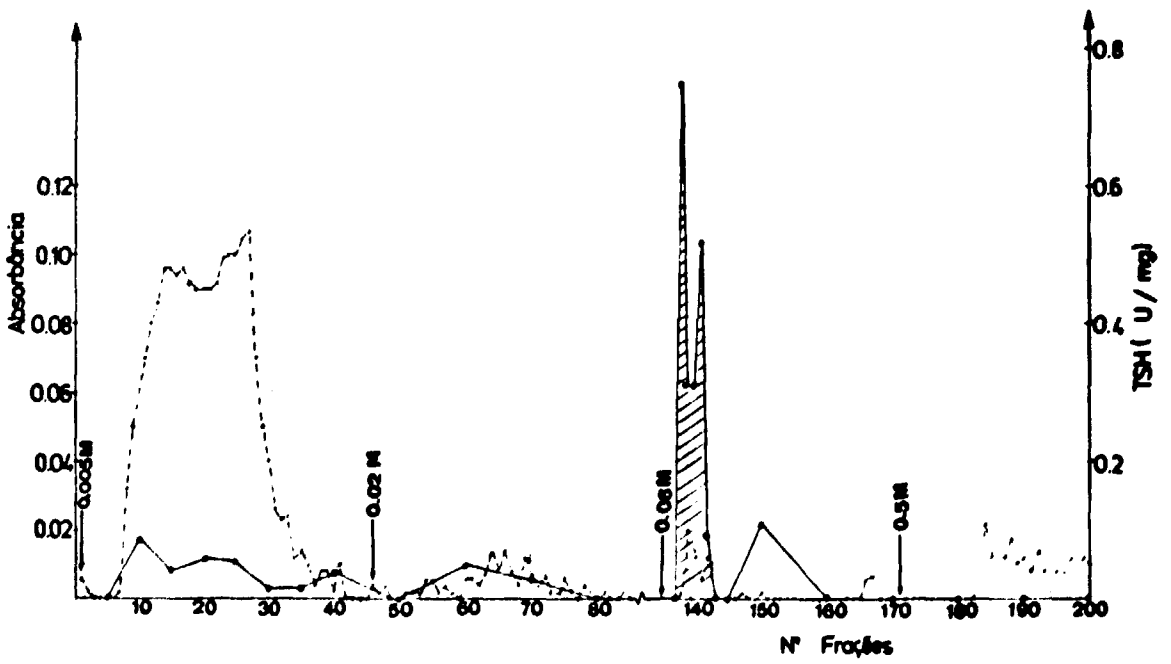


Fig. 4



LEGENDA DAS FIGURAS

- Fig. 1: Representação gráfica da absorbância a 280 nm das frações eluídas pela cromatografia em gel Sephadex G-100 do hormônio de crescimento humano.
- Fig. 2: Purificação da preparação de TSH humano por cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-100. ● ----- ● , absorbância a 280 nm; ● ----- ● , atividade de TSh.
- Fig. 3: Cromatografia em hidroxilapatita da preparação de hTSH após a filtração em gel Sephadex G-100. ● ----- ● , absorbância a 280 nm, ● ----- ● , atividade de TSH.
- Fig. 4: Cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex G-50 das frações de TSh provenientes da cromatografia em hidroxilapatita. ● ----- ● , absorbância a 280 nm; ● ----- ● , atividade de TSh.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. CONDLIFFE, P.G. & WEINTRAUB, B.D. In: GRAY, C.H. & BACHARACH, A.L.eds. Hormones in blood. New York, Academic, 1980. p.499-574 apud PIERCE, J.G. & PARSONS, T.F. Glycoproteins hormones: structures and function. Annu. Rev. Biochem., 50: 465-95, 1981
02. CONDLIFFE, P.G. Purification of human thyrotrophin. Endocrinology, 72: 893 - 6, 1963.
03. HARTREE, A.S.; BUTT, W.R.; KIRKHAM, K.E. The separation and purification of human luteinizing and thyrotrophic hormones. J. Endocrinol., 29: 61-9, 1964.
04. PARLOW, A.F.; CONDLIFFE, P.G.; REICHERT, JR, L.E.; WILHELMI, A.E. Recovery and partial purification of FSH and LH during the purification of TSH from human pituitary glands. Endocrinology, 76: 27-34, 1965.
05. HARTREE, A.S.; THOMAS, M.; FURNIVAL, B.E.; BURNS, T.W.; LANGLEY, P. Thyroid-stimulating and lipolytic activities of purified preparations of human thyroid-stimulating hormone. J. Endocrinol., 53: 95-100, 1972.
- 06- TORJENSEN, P.A.; SAND, T.; NORMAN, N.; TRYGSTAD, O.; FOSS, I. Isolation of LH, FSH and TSH from human pituitaries after the removal of HGH. Acta Endocrinol., 77: 485-97, 1974.
- 07- ROOS, P.; JACOBSON, G.; WIDE, L. Isolation of five active thyrotropin components from human pituitary gland. Biochim. Biophys. Acta, 379: 247-61, 1975.
- 08- SAIRAM, M.R.; CHRÉTIEN, M.; LI, C.H. On the isolation of human pituitary hormones. J. Clin. Endocrinol. Metab., 47: 1002-8, 1978.
- 09- PEKONEN, F.; WILLIAMS, D.M.; WEINTRAUB, B.D. Purification of thyrotropin and other glycoprotein hormones by immunoaffinity chromatography. Endocrinology, 106: 1327-32, 1980.
- 10- CHAPMAN, G.E.; RENWICK, A.G.C.; LIVESLEY, J.H. The isolation of human

- pituitary hormones from frozen glands. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53: 1008-13, 1981.
- 11- ASSIS, L.M.; NICOLAU, W.; HIRATA, I.A.D.; MORAMOTO, E.; PIERONI, R.R. ; SHIBATA, H. Estudo do método de preparação de hormônio de crescimento humano pelo fracionamento em sulfato de amônio e gel-filtração em Sephadex G-100. Revta. Ass. Méd. Bras., 19: 293-304, 1972.
- 12- BARTOLINI, P., ASSIS, L.M.; SCHWARTZ, I., PIERONI, R.R. An accurate determination of human growth hormone content in different pituitary extracts, using a radioimmunoassay with polyacrylamide gel electrophoresis as a bound-free separation system. Clin. Chim. Acta, 79: 223-36, 1977.
- 13- BARTOLINI, P.; ASSIS, L.M.; FONSECA, M.L.C.Q. Radioiodination of human growth hormone with characterization and minimization of the commonly defined "damage products". Clin. Chim. Acta, 110: 177-85, 1981.
- 14- BORGHI, V.C. & BARTOLINI, P. Desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio para dosagem de tireotrofina (TSH) em extratos hipofisários humanos. In: ENDOCRINOLOGIA e metabologia: 17º congresso brasileiro, realizado em Recife/Olinda, 7-12 setembro de 1986. p.59, (abstrats).
- 15- BANGHAM, D.R.; COTES, P.M. Reference standards for radioimmunoassays. In: KIRKHAM, K.E.; HUNTER, W.M., eds. Radioimmunoassay methods. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971, p.345-68.
- 16- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-74, 1951.
- 17- TISELIUS, A.; HJERTÉN, S.; LEVIN, O. Protein chromatography in calcium phosphate columns. Arch. Biochem. Biophys., 65: 135-55, 1965.
- 18- BERNARDI, G. Chromatography of proteins on hydroxyapatite. In: JAKOBY, W.B. ed. Methods in Enzymology. New York, Academic 1971. v.22, p.325-39.
- 19- HUNTER, W.M. & BENNIE, J.G. Structure-activity relationships of protein and polypeptide hormones. In: Excerpta Medica, Leyden, 1972, p. 132-8 apud ROOS, P.; JACOBSON, G.; WIDE, L. Isolation of five active thyrotropin components from human pituitary gland. Biochim. Biophys. Acta. 379: 247-61, 1975.