

# CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, IMUNOLÓGICA E BIOLÓGICA DE PREPARAÇÕES DE TIREOTROFINA HUMANA (hTSH) COM DIFERENÇAS NA PORÇÃO GLICÍDICA

Giseli Silva de Paula e Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

## INTRODUÇÃO

A glicosilação é uma das mais importantes modificações pós-transcricionais de uma glicoproteína e pode afetar tanto a estrutura da proteína quanto a sua função, uma glicosilação inapropriada podendo resultar em atividade reduzida, meia vida na circulação limitada e imunogenecidade não desejada.

A glicoproteína envolvida no presente trabalho é a tireotrofina humana (hTSH), que é um hormônio, produzido na glândula hipofisária anterior, sendo o seu papel fisiológico estimular as funções tireoideanas tais como captação e organificação do iodo, produção e liberação de iodotironinas pela tireóide e promoção do crescimento desta glândula.

Face ao alto interesse clínico desse hormônio, seja em aplicações no campo diagnóstico que terapêutico relacionadas a câncer, o nosso laboratório tem desenvolvido estudos na direção de sintetizar a tireotrofina humana com diferenças na porção glicídica [1,2].

## OBJETIVO

Caracterização físico-química, imunológica e biológica de três preparações de hTSH, sendo duas recombinantes (rhTSH e hlsrhTSH) e uma de origem hipofisária (phTSH). As duas primeiras, embora tenham a mesma origem (células CHO), divergem quanto à configuração do ácido siálico, rhTSH com ácido siálico na configuração  $\alpha_{2,3}$  e hlsrhTSH com este monossacarídeo nas configurações  $\alpha_{2,3}$  e  $\alpha_{2,6}$ .

## METODOLOGIA

● **Avaliação físico-química:** através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), focalização isoelétrica e eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS (SDS-PAGE) [3].

● **Avaliação imunológica:** através de ensaio imunoradiométrico (IRMA) [4].

● **Avaliação biológica:** da determinação de tiroxina total circulante ( $T_4$ ). [5].

## RESULTADOS

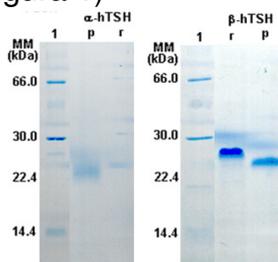
A **hidrofobicidade** das preparações em estudo, avaliada por RP-HPLC, mostrou que as preparações recombinantes apresentam uma menor hidrofobicidade do que a hipofisária, sendo o hlsr-hTSH o menos hidrofóbico das preparações (Tabela 1). Foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,005$ ) entre o tempo de retenção médio ( $t_R$ ) da preparação pituitária ( $t_R = 33,74 \pm 0,051$  min,  $n=3$ ) e os  $t_R$  das preparações recombinantes ( $t_R = 33,36 \pm 0,085$  min,  $n=3$ ).

**Tabela 1** Hidrofobicidade relativa de preparações de hTSH

Preparação	RP-HPLC $t_R$ (min)
rhTSH	33,37
hlsrhTSH	33,27
phTSH	33,75

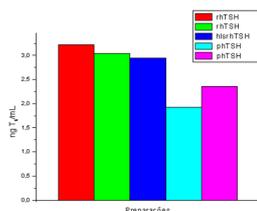
Os **isômeros de carga** das preparações em estudo, analisados por focalização isoelétrica, foram praticamente idênticos para as preparações recombinantes, enquanto a preparação hipofisária apresentou duas ou três isoformas com pHs mais ácidos.

A **mobilidade eletroforética** das preparações recombinantes e de origem hipofisária foram analisadas por SDS-PAGE, em condições redutoras. Nestas condições, os heterodímeros se dissociam em suas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Observou-se diferença de migração entre as preparações hipofisárias e recombinantes, tanto no caso das subunidades  $\alpha$ , quanto das subunidades  $\beta$ , tendo a preparação recombinante uma menor taxa de migração e, portanto, uma maior massa molecular aparente (Figura 1)



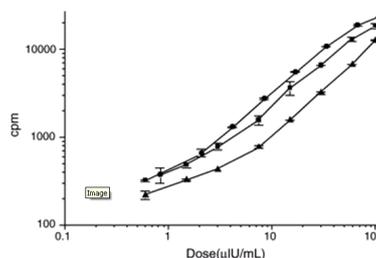
**Figura 1** SDS-PAGE, em condições redutoras, de preparações de hTSH hipofisário (p) e recombinante (r).

A **atividade biológica** das preparações em estudo foi avaliada *in vivo* em camundongos da linhagem BALB/c, em três ensaios independentes. O nível de  $T_4$  obtido para as diferentes preparações mostrou respostas menores para as preparações hipofisárias do que para as preparações recombinantes (Figura 2). Não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a potência do hlsrhTSH e a do rhTSH, podendo-se dizer que ambas as preparações recombinantes são equipotentes. Quando comparadas ao pHtSH, as preparações recombinantes mostraram-se aproximadamente 1,5 vezes mais potentes ( $p < 0,001$ ).



**Figura 2** Nível de  $T_4$  em função da dose de hTSH administrada nos camundongos (n=10)

Uma maior **atividade imunológica** foi observada para as preparações recombinantes, mas com paralelismo significativo entre as regiões lineares das 3 curvas analisadas (Fig. 3).



**Figura 3** Curva padrão dose-resposta obtida por ensaio imunoradiométrico (IRMA). rhTSH (●), hlsrhTSH (■) e pHtSH (▲) Todos os pontos são médias de duplicatas de determinações.

## CONCLUSÕES

As avaliações físico-química, imunológica e biológica das 2 preparações recombinantes com diferenças na porção glicídica, não mostraram diferenças significativas entre elas. Entretanto, com relação ao pHtSH, estas preparações mostraram diferenças quanto à hidrofobicidade, perfil de isoformas, massa molecular aparente, potência imunológica e biológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]Oliveira, J.E.;Damiani, R.; Bartolini, P.; Ribela, M.T.C.P.. **J. Chromatogr. A**, v. 1164, p. 206-211, 2007.
- [2]Damiani, R.; Oliveira, J.E. Vorauer-UHL, K.; Bartolini, P.; Ribela, M.T.C.P.**Protein Expr. Purif.** v. 67, p. 7-14, 2009.
- [3]Oliveira, J.E.; Mendonça, F.; Peroni, C.N.; Bartolini, P.; Ribela, M.T.C.P. **J. Chromatogr. B**, v. 787, p. 345-355, 2003.
- [4]Ribela, MTCP, Bianco, A.C.; Bartolini, P. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**,v.81,p.249-256, 1996.
- [5]East-Palmer J, Szkudlinski MW, Lee J, Thotakura NR, Weintraub BD. **Thyroid**, v.5,p. 55-59, 1995.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq - PIBIC