

Otimização da extração de hormônio de crescimento humano a partir de hipófises congeladas.

Maria Aparecida Pires Camillo,
Paolo Bartolini e José Roberto Rogero.
Divisão de Radiobiologia, IPEN-CNEN.

Abstract. *Improvements of the extraction method of Human Growth Hormone from frozen pituitaries.* The present work describes the optimization of an extracting method for human growth hormone (hGH) from frozen human pituitary glands. The variations introduced on the original method allowed an increase of the yield to high as 8,7 mg of hGH for processed gland. The obtained hormone has molecular weight of 21,587 daltons and its integral form (hGH-22k) makes up 68% of the total preparation. Using radioimmunoassay technique, the protein obtained showed to be very active.

Resumo. O presente trabalho descreve a otimização de um método de extração de hormônio de crescimento humano (hGH) a partir de hipófises humanas congeladas. As alterações introduzidas na metodologia permitiram aumentar o rendimento para 8,7 mg de hGH por glândula processada. O hormônio obtido possui 21.587 daltons de peso molecular e a forma íntegra (hGH-22k) constitui 68% da preparação. O hormônio isolado mostrou-se ativo em radioimunoensaio.

O hormônio de crescimento humano (hGH) foi isolado pela primeira vez em 1951¹; desde então inúmeros métodos de purificação desta proteína foram descritos.

Raben², em 1958, foi o primeiro a empregar o hGH em terapia, relatando uma aceleração na velocidade de crescimento estatural do paciente. Assim, durante mais de 25 anos o hGH foi administrado em pacientes com deficiência deste hormônio. Recentemente foram descritos alguns casos de doença de Creutzfeldt-Jacob em pacientes tratados com estas preparações³. Inúmeros ensaios estão sendo feitos para verificar se alguma das preparações de hGH utilizadas em clínica estava contaminada com o vírus causador desta doença. Este tratamento foi suspenso em diversos países, enquanto se aguarda o resultado dos ensaios.

No Brasil, após serem ouvidas entidades especializadas em endocrinologia e metabologia e profissionais com experiência no uso e também na fabricação do hGH, a Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos (Dimed) resolveu liberar a comercialização e o uso dos medicamentos à base de hGH produzido por meio das técnicas atuais de purificação, que garantam a ausência da contaminação viral, desde que para pacientes com deficiência comprovada clínica e laboratorialmente.

Embora o futuro da utilização clínica destas preparações esteja indefinido, o desenvolvimento de um método de extração com alto rendimento continua sendo de grande interesse para a pesquisa, pois pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos de sua atuação.

Neste trabalho relatamos algumas modificações introduzidas no método original, que nos permitiram otimizar o processo, melhorando o rendimento e diminuindo o tempo de manipulação do extrato.

Material e métodos. Dentre os métodos descritos na literatura baseamo-nos no de Roos *et al.*⁴ por

utilizar hipófises congeladas, condições suaves de extração e seguir uma metodologia simples, além de permitir uma posterior obtenção de outros hormônios pituitários como LH, FSH, PRL etc.

As hipófises humanas utilizadas na preparação foram obtidas do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Logo após a coleta as hipófises foram congeladas (-20°C) e mantidas nestas condições até a realização do processo de extração. Vinte e quatro horas antes de iniciarmos a extração elas foram transferidas para a geladeira ($5-8^{\circ}\text{C}$).

Inicialmente foram lavadas com 250 ml de solução salina (cloreto de sódio 0,87% em água destilada) a 5°C . Em seguida, transferidas para o homogeneizador, com o recipiente que mantinha as hipófises mergulhado em banho de gelo. Utilizamos tampão fosfato de sódio 0,03M (pH 6,2) contendo 5mM de EDTA, 0,02% de azida sódica e 50 UK/ml de Trasylol[®].

As fases da extração estão esquematizadas na Fig. 1.

Todas as centrifugações foram realizadas a temperatura entre $4-8^{\circ}\text{C}$, a 11.750 rpm (16.000 g).

A homogeneização das glândulas foi realizada em três etapas: a primeira foi subdividida em duas fases de 2 minutos com, respectivamente, 1,5 e 3,0 ml de tampão por grama de tecido. A segunda foi realizada com 5 ml/g e a terceira com 1/4 deste volume. Ao término de cada homogeneização houve uma centrifugação, nas condições já descritas. O precipitado resultante foi ainda lavado por duas vezes com um volume menor de tampão, ficando sob agitação mecânica por 2 horas em cada caso.

Ao final de cada centrifugação, os sobrenadantes foram coletados separando-se amostras de 1 ml para dosagens protéicas, a fim de se determinar o rendimento da extração. As amostras foram mantidas congeladas enquanto se processavam as demais lavagens.

Terminada esta fase, os sobrenadantes foram misturados e neutralizados com hidróxido de sódio 1 N.

Em seguida, foram centrifugados nas condições já descritas.

O volume total dos sobrenadantes foi medido e um volume igual de solução de sulfato de amônio saturada a 5°C, foi adicionado lentamente por uma bomba peristáltica e sob agitação contínua. Negligenciando-se a pequena contração de volume, esta solução é considerada como tendo 50% de saturação. Terminada a adição da solução salina, o extrato permaneceu sob agitação durante toda a noite.

O precipitado foi coletado por centrifugação e retomado em 50 ml de água destilada, contendo 5 mM EDTA, 50 UK/ml de Trasylol® e 0,02% de azida sódica. Procedeu-se novamente à neutralização do pH com hidróxido de sódio 0,1 N. Finalmente, a suspensão foi agitada (30 minutos) e centrifugada.

Dividiu-se a fração solúvel em alíquotas de 10 ml, sendo posteriormente purificada em Sephadex G-100 grosso.

Em todas as etapas foram coletadas amostras, para determinar o seu teor protéico.

A preparação final foi avaliada quanto ao seu comportamento em radioimunoensaio e quanto à sua composição em variantes de carga e de massa, por meio das técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida a 7%⁵ e na presença de dodecil sulfato de sódio com o gel de poliacrilamida a 10%⁶.

Resultados. Esquematizou-se na figura 1 o conteúdo protéico total extraído durante o processo.

O perfil cromatográfico da purificação em Sephadex G-100 está representado na Fig. 2. Separaram-

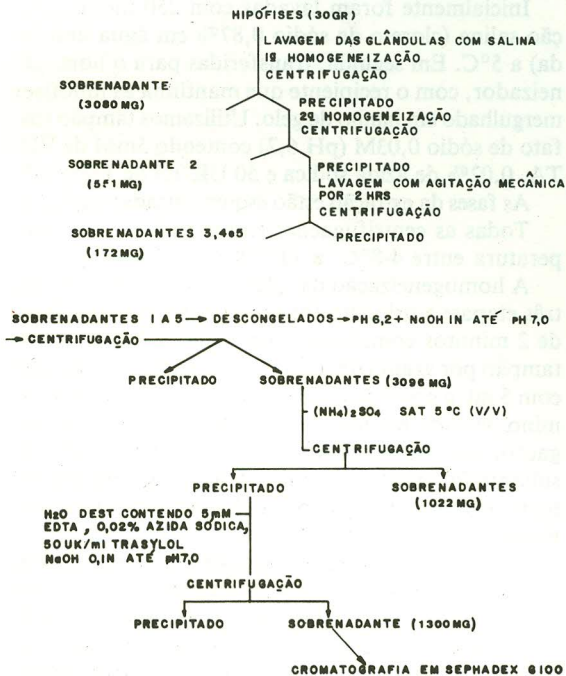


Fig. 1 Esquema da extração do hormônio de crescimento humano a partir de 30 g de hipófises humanas congeladas, indicando-se o conteúdo protéico total extraído em cada passo do processo.

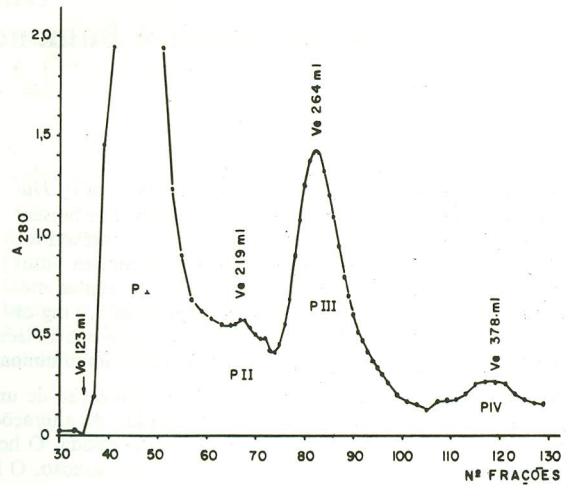


Fig. 2 Perfil cromatográfico da filtração em gel de Sephadex G-100 grosso para isolamento do hormônio de crescimento humano. Utilizou-se uma coluna refrigerada de 2,5 x 80 cm. O volume de amostra foi de 10 ml e foram coletadas frações de 3,5 ml nos tubos 1 a 35 e 3,0 ml a partir do tubo 36, com o fluxo de 4,6 ml/hora do eluente (tampão fosfato-glicina 0,5 M pH 7,2, esterilizado).

se quatro regiões protéicas da seguinte maneira: PI do tubo 36 ao 59 (72 ml, 416 mg); PII do tubo 60 ao 71 (36 ml, 263 mg); PIII do tubo 72 ao 95 (72 ml, 524 mg); PIV do tubo 96 ao 130 (105 ml, 56 mg).

O hormônio purificado apresenta uma porcentagem alta da forma monomérica (PIII = 42%), é solúvel em água destilada e homogêneo em SDS-EGPA (Fig. 3). Apresenta um PM de 21587d calculado por esta técnica, sendo compatível com dados da literatura⁷.

A análise em EGPA 7% demonstra que 68% do hormônio está na forma íntegra ou na forma hGH-22K (Fig. 4).

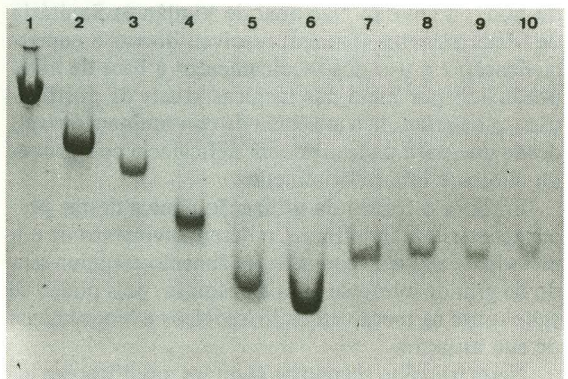


Fig. 3 Padrão eletroforético em SDS-EGPA 10%. As amostras 1 a 6 são marcadores de peso molecular: 1. soro albumina bovina PM 66 kd; 2. ovoalbumina-PM 45 kd; 3. pepsina-PM 34,7; 4. Tripsina-PM 24 kd; 5. lactoglobulina-PM 18,4 kd; 6. lisosina-PM 14,3 kd. As amostras 7 a 10 são análises em duplicatas da preparação de hGH, sendo que 8 e 10 foram tratadas com uréia 8 M.

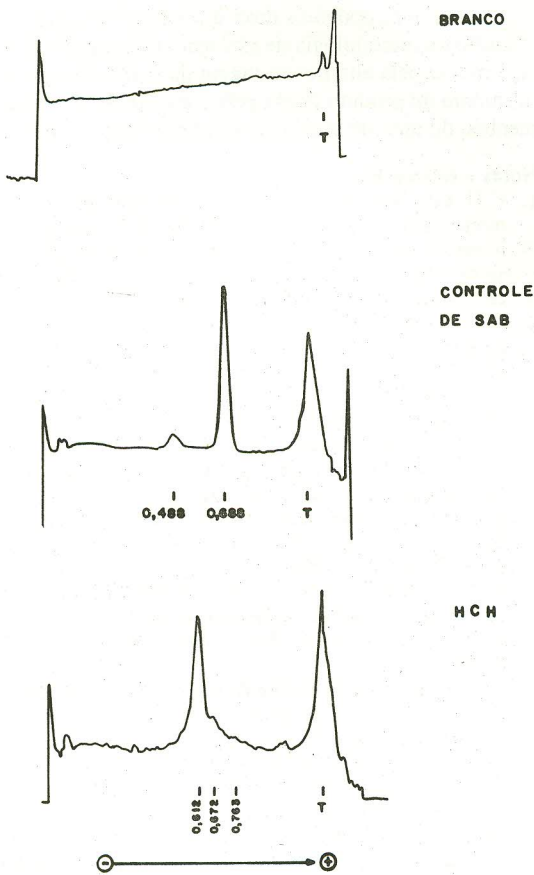


Fig. 4 Perfil eletroforético da análise em EGPA 7% do monômero de hGH. Os gráficos foram obtidos por leitura em densitômetro (UV 220 a 310 nm) após fixação de amostra em ácido tricloroacético 12,5% por 30 minutos. Utilizou-se como traçador (T) azul de bromofenol. Os fatores de migração relativa (Rm) dos componentes da amostra de hGH foram "normalizados" utilizando-se o monômero de soro albumina bovina como controle. O fator de correção neste ensaio foi 1,1156.

A curva de deslocamento obtida no ensaio radioimunológico, originada da competitividade entre o hormônio marcado e o não marcado pelo anti-soro específico, está na Fig. 5.

A Tabela 1 relaciona o rendimento obtido para diversas extrações, sendo que apenas na experiência "E.3011" é que foram introduzidas as alterações detalhadas no texto.

Discussão. A avaliação das modificações introduzidas na extração pode ser feita segundo dois aspectos: primeiro enfocando-se o rendimento e segundo, a heterogeneidade da preparação quanto à sua composição em variantes⁷.

Do ponto de vista do rendimento, a etapa de homogeneização é muito importante, pois é a responsável pela solubilização da proteína do tecido hipofisário. Neste procedimento, 81% da proteína obtida na

primeira fase já são solubilizados. Pela Tabela 1 observamos que o total de proteínas solubilizadas a cada 100 gramas de hipófises processadas varia muito. Assim sendo, propomos que, se após a 5.^a centrifugação, a mistura de todos os sobrenadantes não atingir 1,0 grama de proteína para cada 10 gramas de hipófises processadas, devem-se introduzir lavagens adicionais ao resíduo até que a meta acima seja alcançada.

Procuramos limitar o tempo em que o extrato permanece em solução a 4°C, congelando as frações que não estejam sendo manipuladas, pois esta estocagem é prejudicial para o rendimento. Outra medida foi suprimir algumas fases do processo. No método original, após a precipitação com sulfato de amônio eram realizadas diálise, liofilização e uma segunda série de lavagens com tampão fosfato de potássio 0,02 M pH 6,6 e cloreto de sódio 0,1 M. A diálise para eliminação do sulfato de amônio do extrato durava de 3 a 4 dias, ou seja, até obter-se uma reação negativa para a presença de sulfato na água de diálise (o que era verificado por reação com nitrato de prata). Gastava-se um tempo equivalente para a liofilização e mais uma semana para lavagens do precipitado e ultrafiltração do extrato solúvel, a fim de obter a amostra adequada para a cromatografia. No esquema que estamos propondo, a eliminação do sal se dá na própria coluna de purificação. O perfil cromatográfico obtido, assim como a resolução entre os picos, são equivalentes aos obtidos anteriormente e por outros autores^{4, 8, 9}. Desta forma diminuímos o tempo de manipulação do extrato sem prejuízo para o rendimento e grau de pureza obtido. Adicionalmente verificamos que houve uma menor presença de agregados (PII) e de peptídeos (PIV) na amostra.

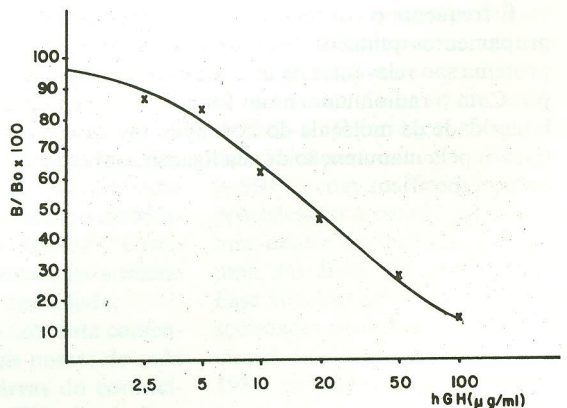


Fig. 5 Curva padrão de radioimunoensaio da preparação de hGH. O hormônio foi ensaiado em doses entre 2,5 a 100 ng/ml. A diluição do hGH 125₁ foi 1:200 (25.000 cpm/tubo) e do anti-soro específico 1:250.000, em tampão veronal 0,025 M pH 8,6 contendo 0,25% de soro albumina bovina. A separação das frações livre e ligada foi feita por centrifugação após a precipitação da fração ligada com PEG 6000. A ligação inespecífica foi 3,7% e a ligação específica máxima (B₀) foi 54%. No gráfico a fração ligada está expressa com B/B₀ x 100.

Tabela 1 A tabela relaciona o conteúdo protéico das amostras coletadas nas diferentes etapas do processo e o rendimento final obtido (expresso em miligramas de hGH por glândula processada). Estão representados valores de 4 extrações comparadas para cada 100 gramas de hipófises, sendo que as alterações descritas no texto foram introduzidas em E.3011.

Amostras	E.0608	E.0303	Número da extração	
			E.2806	E.3011
AM.1	7,10	12,10	2,90	10,30
AM.2	1,10	2,00	0,85	1,80
AM.3	0,19	1,10	0,10	0,34
AM.4	0,16	0,21	0,15	0,13
AM.5	0,09	0,21	0,04	0,11
Total (AM.1 a 5)	7,60	12,80	7,30	10,40
Fração solúvel hGH	6,20	6,50	6,00	4,30
purificado	0,46	0,59	0,67	1,70
Rendimento	2,30	2,90	3,30	8,70

A eletroforese em SDS-EGPA 10% é um bom indicativo da pureza da preparação; e a observação de apenas uma banda protéica após o tratamento com uréia indica que a molécula está íntegra, ou seja com uma única cadeia polipeptídica.

A heterogeneidade observada em EGPA 7% deve-se, provavelmente, à presença de variantes de carga. Apresenta um componente principal⁸ que é 68% da preparação, com RM 0,612, o que permite identificá-lo como sendo a forma íntegra do hormônio, chamada hGH-22K ou variante B. Para identificação dos demais componentes da amostra, seriam necessários outros ensaios que não foram realizados.

É freqüente o conceito de que a distribuição dos grupamentos químicos, bem como a conformação da proteína são relevantes na interação com seu anticorpo. Com o radioimunoensaio foi possível observar a integridade da molécula do hormônio (no caso o antígeno) pela manutenção de sua ligação com seu anticorpo específico.

Concluindo, podemos dizer que obtivemos uma otimização da metodologia de extração, evidenciada principalmente pela alta porcentagem da forma íntegra do hormônio no produto final e pela comparação dos rendimentos, do método atual com os obtidos anteriormente.

Notas e referências

1. C.H. Li — The chemistry of human pituitary growth hormone: 1956-1966, *In*: Pecile, A; Müller, E.E. eds. Growth hormone: proceedings of the first international symposium, Milan, Italy, Sep. 11-13, 1967. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, p. 3-28 (1968).
2. M.S. Raben — Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **18**, 901-3. (1958)
3. J.P. Jackson — Creutzfeldt-Jacob after administration of human growth hormone. *Lancet*, **8449**:244-246 (1985).
4. P. Roos, H.R. Fevold e C.A. Gemzell — Preparation of human growth hormone by gel filtration. *Biochem. Biophys. Acta*, **74**:525-31 (1963).
5. B.J. Davis — Disc electrophoresis. II Method and applications to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**:404-27. (1964).
6. K. Weber e M. Osborn — The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**(16):4406-12. (1969).
7. J.S. Skyler, G. Baumann e A. Chrambach — A catalogue of isohormones of human growth hormone based on quantitative polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Endocrinol.* (Kobenhaven) **85** (suppl):5-40 (1977).
8. G.E. Champam, A.G.C. Renwick e J.H. Livesey — The isolation of human pituitary hormones from frozen glands. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **53**:1008-13 (1981).
9. M.R. Safram, M. Chrétien e C.H. Li — On the isolation of human pituitary hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **47**:1002-1008 (1978).

Agradecimentos. À Srta. Rosemeire Lopes da Cruz pelo trabalho de datilografia.

Artigo recebido em 15/10/86.

Aceito para publicação em 21/11/86.

Autores

Maria Aparecida Pires Camillo, Paolo Bartolini e José Roberto Rogero — pesquisadores, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Divisão de Radiobiologia. Caixa Postal 11049 — 01058 São Paulo, SP.