

IZA ATOMI DOBASHI HERATA

FRACIONAMENTO DE EXTRATO HIPOFISÁRIO HUMANO,
EM SEPHADEX G-100, PARA SEPARAÇÃO DO
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de "Mestre em Ciências"

Orientador: Prof. Dr. Lício Marques de Assis



A

Francisco

Ricardo

Renato

A

Prof. Dr. Lício Marques de Assis
Orientador

Prof. Dr. Metry Bacila
Coordenador

Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni
Diretor do Instituto de Energia Atômica e
Chefe da Divisão de Radiobiologia (IEA)

Prof. Dr. Willian Nicolau
Chefe de pesquisa na Divisão de Radiobiologia (IEA)

Prof. Dr. José Carlos Barbério
Chefe do Setor de Radiofarmácia da Divisão
de Radiobiologia (IEA)

Emiko Muramoto
Farmacêutica-química - Divisão de Radiobiologia (IEA)

Dr. Harry Shibata
Médico legista - Instituto Médico Legal do Estado de São Paulo

o meu sincero agradecimento.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
Propósito do trabalho.	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1 - Material biológico	9
2.2 - Método	9
2.3 - Cromatografia ascendente em Sephadex G-100	10
2.4 - Absorção no Ultra-violeta	12
2.5 - Imuno-reação segundo Ouchterlony	14
2.6 - Iodação com ¹²⁵ I	14
2.7 - Critérios de pureza	14
2.7.1 - Radioimunoensaio	14
2.7.2 - Eletroforese	14
2.8 - Reagentes	15
2.9 - Aparelhos	15
3. RESULTADOS	16
3.1 - Concentração proteica do produto precipitado	16
3.2 - Cromatografia em gel de Sephadex G-100	16
3.3 - Contrôles imunológico das frações obtidas por filtração em gel de Sephadex	16
3.4 - Recromatografia das proteínas das frações I e III	16
3.5 - Determinação quantitativa do HGH pela técnica da difusão em gel de ágar	19

	<u>Página</u>
3.6 - Iodação do HGH com ^{125}I	19
3.7 - Rendimento da extração	23
3.8 - Rendimento da iodação	28
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÕES	34
6. SUMÁRIO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

A associação entre hipertrofia da glândula hipofisária e acromegalia e gigantismo, levou HUTCHINSON⁽¹³⁾, em 1900, à idéia de que a pituitária seria um centro regulador do crescimento.

Anos de observação e experiência confirmaram que o lobo anterior da glândula hipofisária manifestava forte contrôle sobre o crescimento em muitas espécies de animal.

Por outro lado, vários autores, dentre eles LI⁽¹⁷⁾, observaram que a hipofisectomia em animais jovens determinava a cessação de crescimento. Esse fato levou EVANS⁽⁵⁾ a pensar na existência de um hormônio secretado pelo lobo anterior da hipófise, responsável pelo crescimento. Isso foi posteriormente confirmado e, em 1944, LI e EVANS⁽¹⁶⁾ conseguiram isolar uma substância em forma homogênea, de pituitária bovina, o hormônio de crescimento (GH). Partindo da mesma fonte, WILHELMI, FISHMAN e RUSSEL⁽³⁵⁾, em 1948, descreveram um método de preparação de GH em forma cristalina.

Dessa data em diante, vários autores procuraram obter métodos de preparação de GH da pituitária de várias espécies animais. Verificaram que o produto, quando injetado em animais, normais ou hipofisectomizados, exercia ação de aumentar o peso corporal.

* O presente trabalho foi realizado na Divisão de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica de São Paulo.

Abreviaturas

GH - Growth Hormone (Hormônio de crescimento). HGH - Human Growth Hormone.

Animais jovens hipofisectomizados deixaram de apresentar aumento da espessura da cartilagem epifisária da tíbia e quando tratados com o hormônio, o crescimento ocorreu normalmente.

Esse hormônio influencia o metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras e por isso foi denominado de "hormônio metabólico" por LI ⁽¹⁷⁾, em 1956. Produz, por exemplo, retenção de nitrogênio, fósforo e cálcio, determinando balanços positivos, inclusive no homem. Exerce, também, ação diabetogênica em cães, gatos e ratos intactos.

Foi, pois, inevitável que esses fatos estimulassem os clínicos a estudar o efeito desse hormônio em seres humanos.

Em 1951, ESCAMILLA E BENNETT ⁽⁴⁾ verificaram que o hormônio bovino se mostrava inativo quando aplicado no homem. KINSELL e col. ⁽¹⁴⁾, em 1954, do mesmo modo, demonstraram que o hormônio suíno exercia ação positiva sobre o rato, enquanto que no homem nenhuma ação se manifestava.

Estes e outros estudos comprovaram a especificidade dos hormônios de crescimento e em fins de 1956, LI e PAPKOFF ⁽¹⁸⁾, EHRENBERG e HEIJENSKJOLD ⁽³⁾ e, em 1957, RABEN ⁽²⁷⁾ conseguiram isolar o hormônio de crescimento de hipófises humanas (HGH - Human Growth Hormone) em forma homogênea.

Esse fato estimulou vários autores a estudar e aperfeiçoar processos de extração, e LEWIS e BRINK ⁽¹⁵⁾, em 1958, descreveram a obtenção do hormônio em forma cristalina pelo processo de

fracionamento com etanol e purificação em coluna de dietilaminoetilcelulose; RABEN (28), em 1959, parte de hipófises conservadas em acetona e faz extrações com ácido acético glacial; WILHELMI (36), em 1960, e REISFELD e col. (29) também usam hipófises conservadas em acetona; ROOS e col. (30) em 1963, introduzem o método de cromatografia em gel de Sephadex.

Do ponto de vista bioquímico, os hormônios de crescimento diferem-se conforme a espécie animal de onde procedem. O peso molecular também varia de animal para animal. Para o HGH é de 21.000 a 22.500 (1)(19).

Como os efeitos biológicos produzidos pelo HGH são múltiplos e sobre vários tecidos, muitos autores (26)(34) preferem denominá-lo de somatotropina, hormônio somatotrópico, e STH na literatura em inglês.

Quanto ao teor médio de HGH por glândula, segundo GEMZELL e HEIJKENSKJOLD (6), é de 3,7 a 6,0 mg. Em 1958, GEMZELL e LI (7), com o mesmo objetivo trabalharam com glândulas isoladas e encontraram valores de 0 a 15,4 mg. Em 1957, GERSHBERG (8) informou que o conteúdo em HGH da glândula pituitária não varia com a idade.

O estudo adequado das propriedades biológicas, fisiológicas e farmacológicas de qualquer substância que presume estar presente ou ser sintetizada em um tecido, exige o seu isolamento, e, tanto quanto possível, a sua purificação. No caso particular de extratos hipofisários brutos com atividade biológica múltipla e multiseccional onde se conhece a possibilidade de pelo menos sete princípios

hormonais, a importância de métodos capazes de obtenção de determinado hormônio, com somente mínima contaminação pelos demais, a fim de estudar os seus efeitos "in vivo", é de indiscutível interesse científico.

Na posse de métodos de isolamento e purificação, o produto estará em disponibilidade para ser administrado a animais e possivelmente ao próprio homem e nas mais variadas condições experimentais para estudo dos seus efeitos morfológicos e metabólicos.

Embora ainda não exista processo de obtenção de hormônio de crescimento humano que permita a sua comercialização (infelizmente, por serem estruturalmente diferentes, os hormônios de crescimento dos animais de abate não têm ação no homem), o seu emprêgo para evitar ou corrigir total ou parcialmente o nanismo hipofisário é altamente auspicioso, especialmente quando for possível a sua síntese no laboratório.

No momento, desde que se tenha boa disponibilidade de hipófises humanas, como tem ocorrido em São Paulo, graças à colaboração do Instituto Médico-Legal, será possível o seu emprêgo e o estudo dos seus efeitos terapêuticos, em casos isolados, tema que entrará, certamente, em plano para futuros trabalhos de pesquisa.

Já foi descrita uma condição clínica caracterizada por deficiência isolada de hormônio de crescimento - o nanismo hipofisário. Em outras doenças hipofisárias (ou hipotalâmicas) além da falta de hormônio de crescimento, também existem manifestações de deficiência de outros hormônios hipofisários, e se tal condição ocorrer

no período de crescimento, o nanismo é um dos sintomas importantes.

Muitas das alterações metabólicas e morfológicas de que se tinham conhecimento pela experiência em animais e pela observação clínica puderam ser melhor discriminadas e esclarecidas a partir do momento em que os pesquisadores passaram a dispor de preparações hormonais suficientemente purificadas, inclusive do fator somatotrópico, para os estudos de seus efeitos fisiológicos e farmacológicos.

Em propedêutica, a disponibilidade de HGH puro é indispensável para a dosagem do HGH plasmático, através do radioimunoensaio.

PROPÓSITO DO TRABALHO

No presente trabalho procurou-se desenvolver um processo rápido e simples para a obtenção de HGH usando somente soluções aquosas e de pH próximo da neutralidade.

Tomou-se como base o método de ROOS e col. (30) que procuraram, com o uso de Sephadex G-100, separar o HGH de outros hormônios hipofisários. Visa a obtenção de HGH de suficiente grau de pureza, procurando atender às suas aplicações nos campos da fisiologia, da clínica e da propedêutica.

Procurou-se introduzir modificações originais no método citado visando, sobretudo, maior comodidade e tentando pelo menos

parcial automatização em algumas de suas etapas de execução. Essas modificações foram permitidas graças ao uso de aparelhos especiais como o Uviscan III, o coletor automático de frações, o tubo K 50/100, adequado para a montagem de coluna de Sephadex. Além disso, a fim de evitar trabalhar em câmara fria, e tendo em vista as vantagens do tubo K 50/100, adaptou-se ao conjunto um refrigerador e circulador de fluido (Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA) que permitiu a circulação de água por toda a superfície externa (paredes duplas) da coluna de Sephadex mantendo-a a temperatura inferior a 5°C.

ROOS e col. (30) determinaram a concentração proteica das frações eluídas em espectrofotômetro "Zeiss - model PMQ-II", etapa trabalhosa e demorada, para verificação da situação dos picos de proteína (frações de 5 ml colhidas em cerca de 380 tubos). Essas modificações foram naturalmente sugeridas após as primeiras tentativas de padronização feitas seguindo rigorosamente a técnica de ROOS e col. Estes mesmos autores empregaram a cromatografia descendente, o que traz o problema da "compactação" da coluna, diminuindo sensivelmente a velocidade de fluxo da eluição. No presente método foi usada a cromatografia ascendente que eliminou por completo o referido problema.

Em complemento à obtenção de material com provável atividade somatotrófica, procurou-se caracterizar a presença de HGH por meio de ensaios imunológico e radioativo.

a) Ensaio imunológico. Os hormônios proteicos têm a capacidade de induzir o aparecimento de anticorpos específicos, com os quais reagem formando precipitina, como verificaram HAYASHIDA e LI (11) em 1958.

Baseados nos estudos de OUDIN⁽²²⁾⁽²³⁾ sobre imunodifusão em gel, onde a precipitação antígeno-anticorpo se faz em meio formado por gel, o no método da micro-imunodifusão adaptada por CROWLE⁽²⁾, foi feito imunoensaio quantitativo do produto obtido e do HGH padrão (National Pituitary Agency - USA). Para tal, usou-se a técnica modificada segundo OUCHTERLONY⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾, de dupla difusão em gel de ágar. O processo consiste em determinar a menor concentração de HGH detectável pela reação antígeno-anticorpo, fazendo-se diluições sucessivas do antígeno e mantendo constante a concentração do sêro anti-HGH (Schwarz Bloresearch - New York)

b) Ensaio radioativo. Os hormônios "marcados" com elemento radioativo competem, com os hormônios não "marcados", na formação de anticorpos. Com fundamento nessa propriedade, UTIGER, PARKER e DAUGHADAY⁽³³⁾ em 1962 relataram um ensaio em que se obtém precipitado do complexo antígeno-anticorpo para o GH.

Esse ensaio, realizado nos laboratórios de Radiofarmácia da Divisão de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica, foi de grande utilidade pois permitiu a identificação do produto obtido quando, simultaneamente foi "marcado" com ¹²⁵I um padrão de HGH e frações do referido produto. Posteriormente esse ensaio foi confirmado nas provas de imuno-reação.

Há muitas técnicas para iodação do GH, dependendo da finalidade a que se destina o hormônio "marcado". As técnicas de STAUB, SPRINGS e ELRICK⁽³¹⁾ e YALOW e BERSON⁽³⁷⁾ fornecem proteínas com atividade específica de 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, com cerca de 0,25 a 2 átomos de

iôdo total por molécula, usando 10 a 20 mCi de ^{125}I , livre de carregador, e 0,2 a 1,0 mg de HGH. Esse nível de radioatividade específica se mostra adequado para métodos baseados na precipitação, mas não para a técnica imunoeletroforética.

GREENWOOD e col. (10) relatam preparação de HGH^{131}I , com atividade específica de 250-590 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ (com eficiência de 60 a 75%); partem de 2 a 4 mCi de ^{131}I livre de carregador, e 5 μg de HGH, e, como oxidante, usam Cloramina T.

HUNTER e GREENWOOD (12) demonstraram pelo método imunoeletroforético que quando as preparações apresentam atividade específica de 300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ são quantitativamente idênticas a do hormônio não "marcado" quanto à afinidade pelo sêro anti-HGH.

Tomando como referência a técnica de iodação segundo GREENWOOD e col. (10) o hormônio obtido foi "marcado" e submetido aos contrôles comuns aos produtos "marcados" (eletroforese, cromatografia (32)) e imuno-reação comparativamente com HGH padrão submetido a êsses mesmos processos, a fim de confirmar a identidade do produto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Material biológico. Hipófises humanas (adenohipófises) coletadas por necrópsia, no Instituto Médico-Legal de São Paulo, e mantidas congeladas.

2.2 - Método. As hipófises, em número de aproximadamente 300 para cada prova, são descongeladas, limpas e secas em papel de filtro. Pesa-se. Homogeniza-se (em liquidificador) por 2 minutos usando tampão fosfato de sódio 0,03M pH 6,2 na proporção de 5ml por grama de glândula. A temperatura de trabalho é de 4-5°C para todas as etapas. Agita-se ininterruptamente por 1 hora (em agitador magnético) e centrifuga-se em Ultracentrífuga (Beckman - Model L-2, Type 30 Rotor) a 16.000g (pode-se usar centrífuga refrigerada MSE "High Speed 17"). Decanta-se o sobrenadante.

Faz-se nova extração do resíduo, usando-se 1/4 do volume original do mesmo tampão, agita-se e centrifuga-se novamente, nas mesmas condições. Combina-se o sobrenadante obtido ao sobrenadante anterior. Lava-se o resíduo com cerca de 1/8 do volume original do mesmo tampão; agita-se e centrifuga-se.

Aos sobrenadantes combinados, junta-se NaOH 0,1N até obter pH 7. Mede-se o volume total obtido e adiciona-se lentamente e mediante agitação contínua, igual volume de solução saturada de sulfato de amônio (não neutralizada) preparada também a 4-5°C (esta solução, desprezando a pequena concentração de volume, pode ser considera

da como sendo a 50%.

Após a adição de sulfato de amônio, continua-se a agitação por mais uma hora em agitador magnético. Nota-se a formação de denso precipitado. Centrifuga-se rapidamente a 3.000 rpm (também a 4-5°C). Dissolve-se o precipitado em pequena quantidade de tampão fosfato (o suficiente para transferi-lo a tubo de diálise) e dialisa-se contra água destilada por cerca de 10 horas. A concentração de proteínas nesse material foi medida segundo método de GORNALL, BARDAWILL e DAVID (9). Liofiliza-se. O material branco-amarelado resultante, representa o conjunto das proteínas hormonais e não hormonais extraídas da glândula.

O HGH existente no liofilizado é extraído com solução tampão fosfato 0,1M pH 6,6 contendo NaCl 0,5M na proporção de 1:5, usando-se 5 ml por grama de proteína, até que a reação de Ouchterlony realizada nos extratos sucessivos resulte negativa. Tal é feito sobre lâmina de vidro recoberta por ágar a 1% em solução fisiológica. A intensidade de precipitação diminui com o número de extrações, como se pode ver na Fig. 1.

A fim de diminuir o volume obtido das extrações, concentra-se (por liofilização parcial) até obter um volume de 5 a 6 ml.

2.3 - Cromatografia ascendente em Sephadex G-100

O concentrado obtido na etapa anterior é dividido em 3 partes iguais, que são aplicadas separadamente a uma coluna de Sephadex G-100 equili

Determinação qualitativa de GH em extrato de
pituitária humana



Fig. 1. Imuno-reação segundo Ouchterlony em lâmina de vidro 2,5 x 7,5 cm recoberta por 3 ml de ágar a 1% em solução fisiológica. 1: orifício de sementeira do extrato no início das extrações. 2: ponto de sementeira da sexta extração. AS: sôro anti-HGH. A reação se evidencia dentro de 24 horas a 4-5 °C. Observe-se a diminuição da intensidade das faixas de precipitação quando se passa da primeira para a sexta extração. Obteve-se arco ainda visível até a décima extração.

brada com tampão fosfato 0,1M pH 6,6. Essa coluna, (Pharmacia, Uppsala) apresenta paredes duplas que permitem circulação de fluido. A temperatura na coluna foi mantida a 4-5°C pela circulação de água refrigerada e propulsionada por um aparelho refrigerador (Forma Scientific Inc. Marietta - Ohio - USA).

A cromatografia ascendente foi a escolhida por não apresentar a inconveniência do fenômeno da "compactação" o qual faz diminuir a velocidade do fluxo da eluição. A eluição é feita com o mesmo tampão (tampão fosfato 0,1M pH 6,6).

2.4 - Absorção no Ultra-violeta. O eluído passa por um sistema ultra-violeta, no comprimento de onda 280 m μ , modelo Uviscan III, que detecta compostos proteicos que absorvem na região ultra-violeta de espectro entre os comprimentos de onda 230 e 300 m μ ; esse aparelho é acoplado a coletor automático, Fractometre-200, e a registrador Recti-ríter (Buchler Instrument), Fig. 2.

2.5 - Imuno-reação segundo Ouchterlony (24)(25)

É uma reação antígeno-anticorpo que quando positiva apresenta uma faixa de precipitação, evidenciável em meio de ágar. Cora-se pelo Amidoschwarz-10B. O ensaio se baseia na capacidade de os hormônios proteicos induzirem a formação de anticorpos específicos, com os quais reagem.

Esse teste foi aplicado durante as diferentes fases de

Conjunto para fracionamento, coleta e registro das frações proteicas eluídas

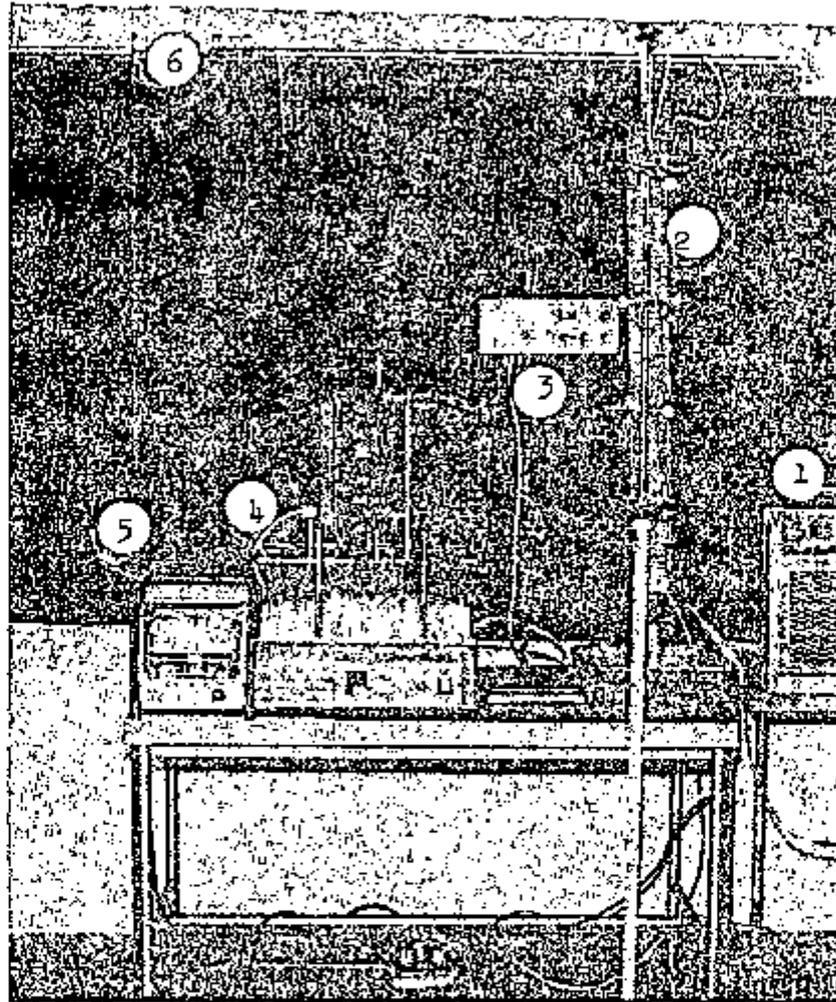


Fig. 2. 1: Refrigerador e propulsor de água refrigerada; 2: Coluna de Sephadex de paredes duplas para circulação de fluido modelo X 50/100 (Pharmacia, Uppsala); 3: Monitor Ultravioleta, Omiscan III, que detecta compostos que absorvem 230 e 300 m μ ; 4: Coletor automático de frações (fractometer:200) 5: Registrador (Reco-rítter) ; 6: Frasco para eluente. A água do refrigerador circula pelas paredes duplas da coluna de Sephadex mantendo-a a temperatura inferior a 5°C. durante todo o decurso da cromatografia. As frações colhidas pelo coletor automático são periodicamente transferidas para geladeira

extração (determinação qualitativa) e no produto obtido (determinação quantitativa), sendo esta última em comparação com HGH tomado como padrão (*)

2.6 - Iodação com ^{125}I . Baseada nos métodos de GREENWOOD e col. (10), ioda-se o produto obtido paralelamente com HGH padrão (**). Em seguida, os produtos iodados são submetidos aos controles de eletroforese, cromatografia e imuno-reação.

2.7 - Critérios de pureza.

2.7.1 - Radioimunoensaio. Fornece a porcentagem de HGH no material obtido em comparação a padrão de HGH. Esse ensaio foi realizado nos laboratórios de radioimunoensaio do Hospital das Clínicas de São Paulo (***).

2.7.2 - Eletroforese. A técnica eletroforética permite separar diferentes proteínas, baseada na diferença de velocidade de migração das micelas proteicas quando submetidas a campo elétrico.

(*) HGH padrão, obtido da National Pituitary Agency através de Dra. R. Yalow e gentilmente cedido por Dr. Bernardo Leo Wejchenberg.

(**) O padrão de HGH foi iodado com ^{125}I nos laboratórios da Divisão de Radiobiologia (ISA) e gentilmente cedido pela farmacêutica: bioquímica Atsuko K. Nakazono.

(***) Determinação feita pelo Prof. Dr. Armando Pupo.

extração (determinação qualitativa) e no produto obtido (determinação quantitativa), sendo esta última em comparação com HGH tomado como padrão (*)

2.6 - Iodação com ^{125}I . Baseada nos métodos de GREENWOOD e col. (10), ioda-se o produto obtido paralelamente com HGH padrão (**). Em seguida, os produtos iodados são submetidos aos controles de eletroforese, cromatografia e imuno-reação.

2.7 - Critérios de pureza.

2.7.1 - Radioimunoensaio. Fornece a porcentagem de HGH no material obtido em comparação a padrão de HGH. Esse ensaio foi realizado nos laboratórios de radioimunoensaio do Hospital das Clínicas de São Paulo (***).

2.7.2 - Eletroforese. A técnica eletroforética permite separar diferentes proteínas, baseada na diferença de velocidade de migração das micelas proteicas quando submetidas a campo elétrico.

(*) HGH padrão, obtido da National Pituitary Agency através de Dra. R. Yalow e gentilmente cedido por Dr. Bernardo Leo Wejchenberg.

(**) O padrão de HGH foi iodado com ^{125}I nos laboratórios da Divisão de Radiobiologia (ISA) e gentilmente cedido pela farmacêutica: bioquímica Atsuko K. Nakazono.

(***) Determinação feita pelo Prof. Dr. Armando Pupo.

2.8 - Reagentes

2.8.1 - Para preparação de HGH foi utilizado Sephadex G-100 - Pharmacia Uppsala, Suécia.

2.8.2 - Para os ensaios, foram utilizadas as seguintes substâncias :

a) Iodação. ^{125}I na forma de iodeto de sódio, livre de carregador e de redutor - The Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra. Padrão de HGH - National Pituitary Agency, USA. Cloramina T - E. Merck AG-Darmstadt. Metabissulfito de sódio - The British Drug Houses Ltd, Inglaterra. Sephadex G-50 médio - Pharmacia Uppsala, Suécia. Albumina bovina, fração V - Sigma, Chemical Company, USA. Metanol P.A. - Baker Analysed Reagente, S. Paulo.

b) Imunoensaio. Bacto-agar - Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA. Soro anti-HGH (de cabra) - Schwarz Bioresearch, New York. Amidoschwarz-10B - E. Merck AG-Darmstadt.

2.9 - Aparelhos

Ultracentrífuga - Beckman, Model L-2, 30 Rotor. Tobor - Large Sample Counting Systems 4350 and 4351, Nuclear Chicago. Uviscan III , Fractometete-200 e Recti-riter - Buchler Instrument. Coluna de Sephadex com paredes duplas para refrigeração - Pharmacia Uppsala, Suécia. Liofilizador - Edwards High Vacuum Ltd, Inglaterra.

3. RESULTADOS

3.1 - Concentração proteica do produto precipitado.

Pelo método de Gornal, Bardawill e David modificado ⁽⁹⁾ obteve-se 3,6 gramas de proteína total.

3.2 - Cromatografia em gel de Sephadex G-100

A cromatografia citada em 2.3 foi feita em coluna de Sephadex G-100 equilibrada com tampão fosfato 0,1M pH 6,6. Obteve-se nítida separação de 3 picos, como mostra a Fig. 3.

3.3 - Contrôle imunológico das frações obtidas por filtração em gel de Sephadex.

Os eluídos correspondentes a cada pico foram, após concentração do volume (por liofilização parcial), dialisados contra água destilada a 4-5°C e liofilizados. Cada uma dessas três frações liofilizadas foi submetida a imunoreação, a fim de verificar a possível existência de HGH nos diferentes picos. Considerando que a proteína originária do pico II não revelou reação imunológica, esse pico não foi mais considerado nos últimos processamentos. (Fig. 4)

3.4 - Recromatografia das proteínas das frações I e III.

Os produtos correspondentes aos picos I e III foram redissolvidos em solução tampão fosfato 0,1M pH 6,6 e NaCl 0,5M, na proporção de 1:5 e repassados em coluna de Sephadex G-100 equilibrada com tampão fosfato

CRONATOGRAMA DA GEL-FILTRAÇÃO EM SEPHADEX G-100

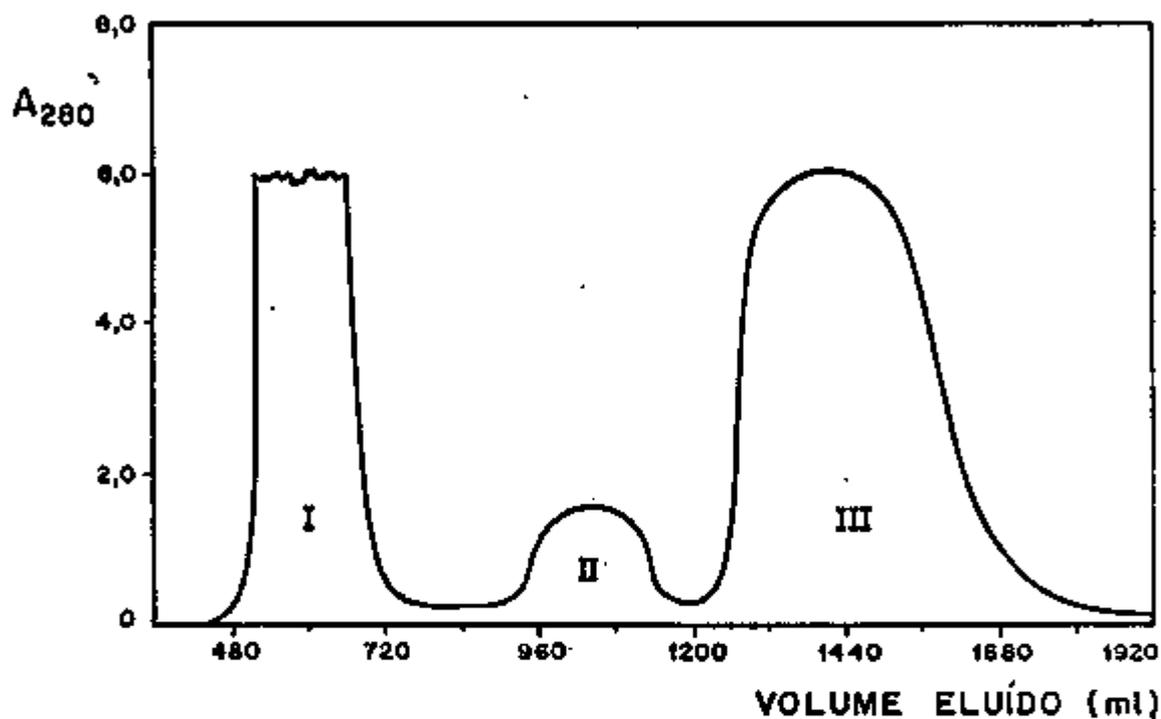


Fig. 3. Gel-filtração de extrato de pituitária humana precipitado com sulfato de amônio a 50%. Coluna de Sephadex G-100 equilibrada com tampão fosfato 0,1M pH 6,6. Coluna 5 cm por 90 cm, refrigerada (K 50/100 - Pharmacia Uppsala, Suécia). Velocidade do fluxo: 60ml por hora. 1,2g de extrato bruto aplicadas em 2 ml. Cromatografia ascendente; eluente tampão fosfato 0,1M pH 6,6. Frações de 5 ml, colhidas por coletor automático de frações (Fractonette-200). Figura obtida por um registrador automático (Recti-citer). Absorbância 280 m μ (do Uviscan III). O pico I foi eluído entre 500 e 700 ml; o pico II entre 960 e 1.100 ml; o pico III entre 1.250 e 1.700 ml.

Identificação de HGH nos picos I, II, e III



Fig. 4. Imuno-reação segundo Ouchterlony. Lâmina de vidro 2,5 x 7,5 cm recoberta por 3 ml de ágar a 1% em solução fisiológica. 1, 2, 3 : eluídos correspondentes aos picos I, II e III respectivamente. AS: sêro anti-HGH. A reação se evidencia dentro de 24 horas a 4-5° C. Os picos I e III responderam positivamente à imuno-reação, isto é, apresentaram atividade imunológica.

0,1M pH 6,6. A cromatografia, tanto do material proveniente do pico I como do pico III, mostrou um único pico (Fig. 5 e 6).

3.5 Determinação quantitativa do HGH pela técnica da difusão em gel de ágar.

Os eluídos correspondentes às Fig. 5 e 6 foram concentrados, dialisados e liofilizados. As proteínas assim obtidas totalizaram 576 mg e 397,3 mg respectivamente para os picos I e III.

Para a determinação quantitativa de HGH nesses picos I e III, usou-se o processo da difusão em gel de ágar, segundo técnica de Ouchterlony adaptado para o presente trabalho. (Fig. 7). Para determinar a menor concentração de HGH detectável por êsse processo, outra lâmina foi feita, modificando apenas as concentrações (Fig. 8). A mesma técnica, empregada para o padrão, demonstrou positividade até 20 microgramas por mililitro (Fig. 9). Isso significa que a atividade imunológica do produto obtido, representa 1/5 da do HGH tomado como padrão.

3.6 - Iodação do HGH com ^{125}I .

Os produtos correspondentes aos picos I e III foram "marcados" com ^{125}I segundo a técnica de GREENWOOD e col. (10). A fim de confirmar a "marcação", e também para determinar a quantidade de iodo livre, fizeram-se controles eletroforéticos, cromatográficos e imuno-reação dos produtos "marcados".

Na eletroforese dos picos I e III, pode-se notar que

CROMATOGRAMA DA GEL-FILTRAÇÃO DO PICO I

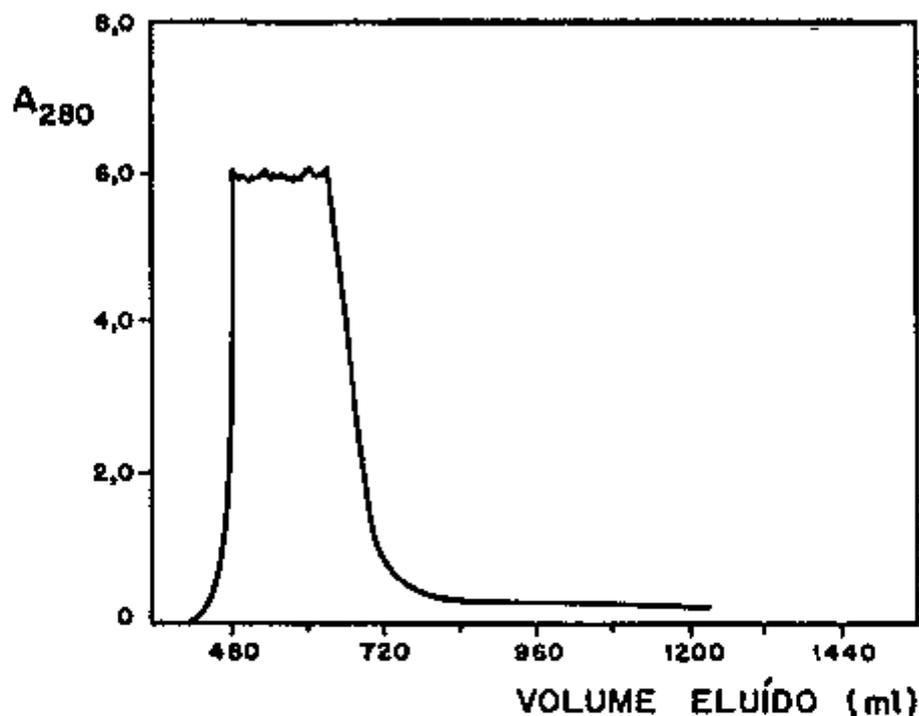


Fig. 5. Recromatografia do eluído correspondente ao pico I, após concentração do volume. Coluna de Sephadex G-100 equilibrada com tampão fosfato 0,1M pH 6,6. Eluição com o mesmo tampão fosfato, a 4-5 °C., ascendente. Frações de 5 ml, colhidas por coletor automático. Tamanho da coluna, 5 x 90 cm. Velocidade do fluxo, 60ml/h. Absorbância (Uviscon III), 280 mμ. Nota-se que, apesar da existência de HGH imunologicamente ativo no pico I não houve dobramento do pico. O teste de Ouchterlony realizado para o produto obtido da recromatografia continua com resultado positivo.

CROMATOGRAMA DA GEL-FILTRAÇÃO DO PICO III

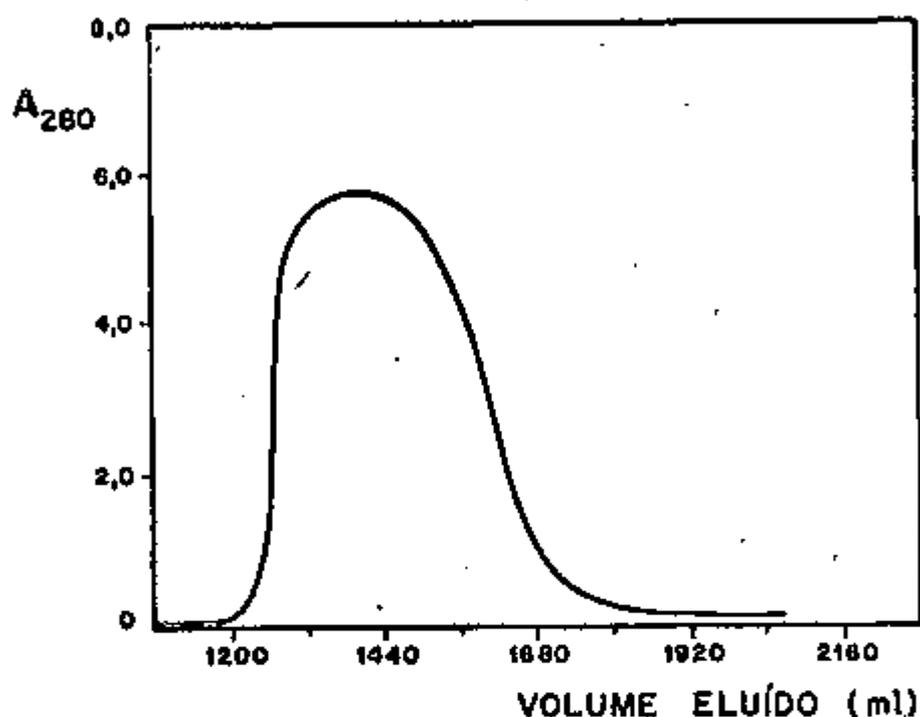


Fig. 6. Recromatografia do eluído correspondente ao pico III, após concentração do volume. Coluna de Sephadex G-100 equilibrada com tampão fosfato 0,1M pH 6,6. Eluição ascendente, com o mesmo tampão a 4-5°C. Frações de 5 ml colhidas automaticamente. Tamanho da coluna, 5 x 90 cm. Velocidade de fluxo, 60 ml/h. Absorbância (Uviaten III), 280 mμ. O pico III se mantém inalterado, isto é, não houve desdobramento do pico. O teste de Ouchterlony realizado para o produto obtido da recromatografia continua com resultado positivo.

Determinação quantitativa de HGH

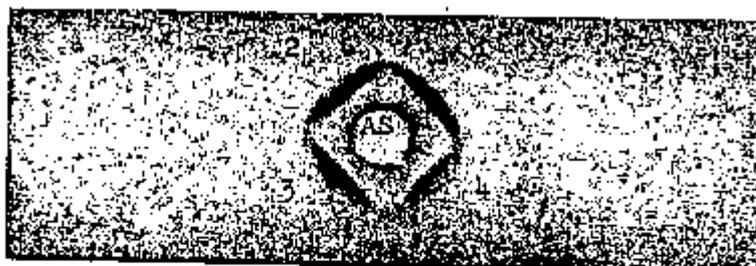


Fig. 7 Imuno-reação em gel de ágar segundo Ouchterlony, em lâmina de vidro 2,5 x 7,5 cm recoberta por 3 ml de ágar a 1% em solução fisiológica. 1, 2, 3, 4 : HGH nas concentrações de 1.000, 600, 400 e 200 microgramas por mililitro respectivamente, em tampão fosfato 0,1M pH 6,6. AS: sôro anti-HGH. Dessas diluições foram aplicadas aproximadamente 0,025 ml. A reação se evidencia dentro de 24 horas a 4- 5 °C. Com a diminuição da concentração da amostra, nota-se progressiva diminuição da faixa de precipitação.

Determinação quantitativa de HGH

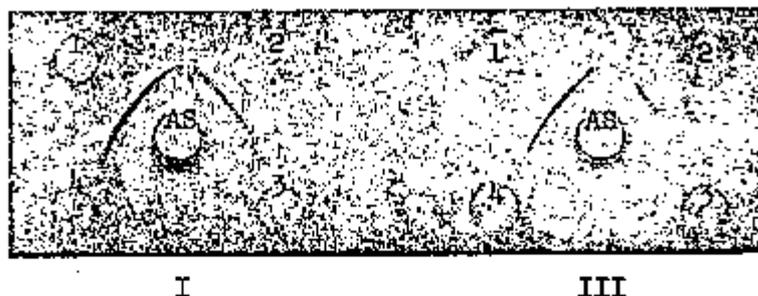


Fig. 8. Imuno-reação segundo Ouchterlony. I: pico I; III: pico III. 1, 2, 3, 4 : HGH nas concentrações de 200, 100, 75 e 50 microgramas por mililitro, em solução tampão fosfato 0,1M, pH 6,6. AS: sôro anti-HGH. Quantidade aplicada, 0,025 ml. A última concentração onde a reação se mostrou positiva foi de 100 microgramas por mililitro. Esta reação foi feita em lâmina de vidro 2,5 x 7,5 cm, recoberta por 3 ml de ágar a 1% em solução fisiológica.

Imuno-reação segundo Ouchterlony

HGH padrão



Fig. 9 Lâmina de vidro 2,5 x 7,5 cm recoberta por 3 ml de ágar a 1% em solução fisiológica .
 1, 2, 3, 4 : amostras de HGH padrão nas concentrações de 200, 100, 75 e 50 microgramas por mililitro respectivamente. 5, 6, 7, 8: 50, 20, 10 e 5 microgramas respectivamente. A menor concentração detectada foi de 20 microgramas por mililitro. Aplicou-se aproximadamente 25 microlitros de cada amostra. A reação se evidenciou dentro de 24 horas a 4-5 °C.

tôda a atividade se mantém, tal como ocorre com o HGH natural em baixa concentração, na região da sementeira (origem). As figuras 10a e 10b mostram eletroforetograma dos picos I e III "marcados" com ^{125}I .

Paralelamente foi feita eletroforese do padrão de HGH "marcado" com ^{125}I . O seu eletroforetograma pode ser visto na Fig. 10c

Fêz-se também cromatografia dos picos I e III "marcados" com ^{125}I , paralelamente com a do padrão de HGH ^{125}I . (Fig. 11a, 11b e 11c).

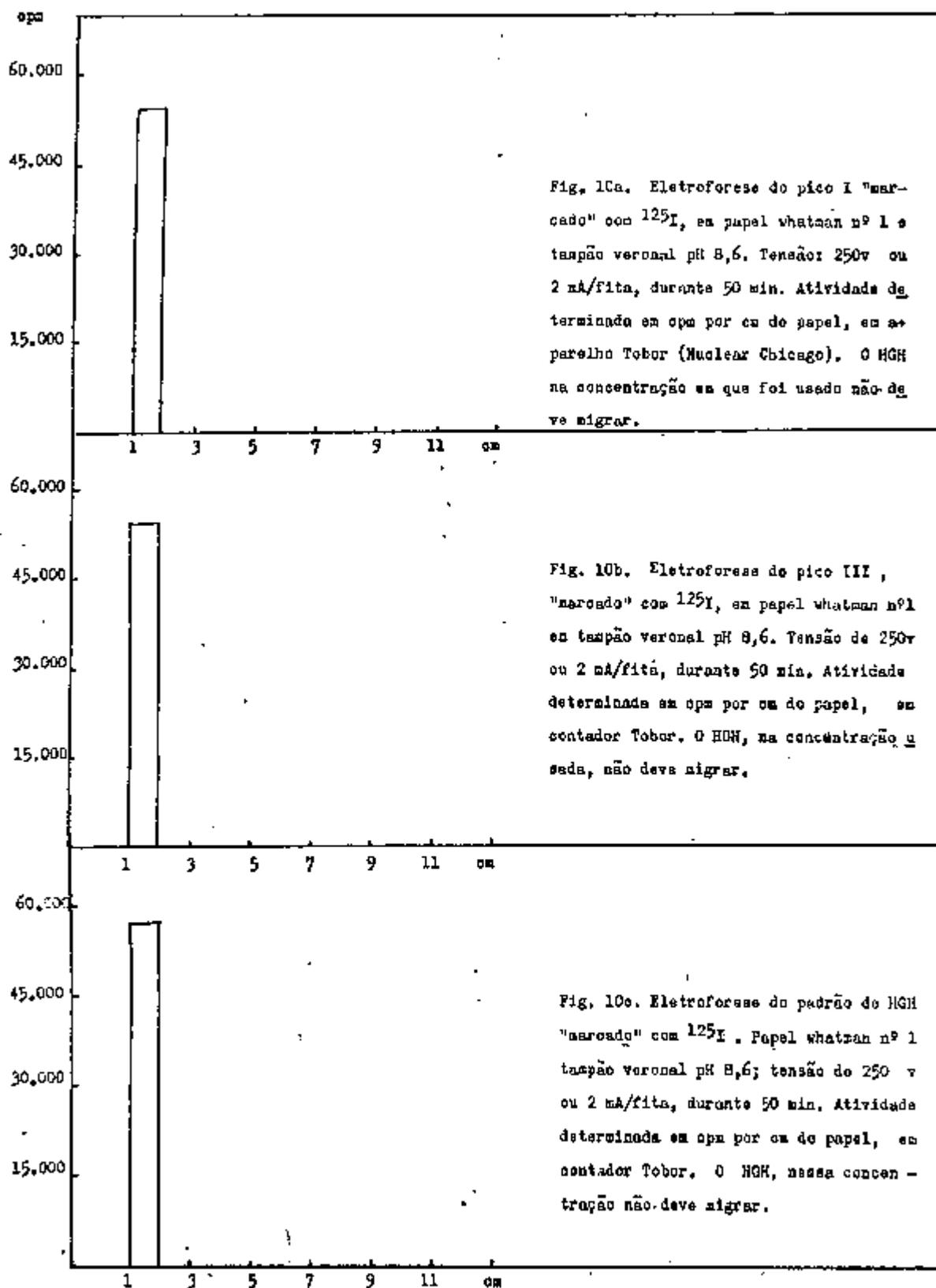
Pelo exame dos eletroforetogramas e cromatogramas, verificou-se que o comportamento eletroforético e cromatográfico das amostras não se distinguiu daquele do padrão.

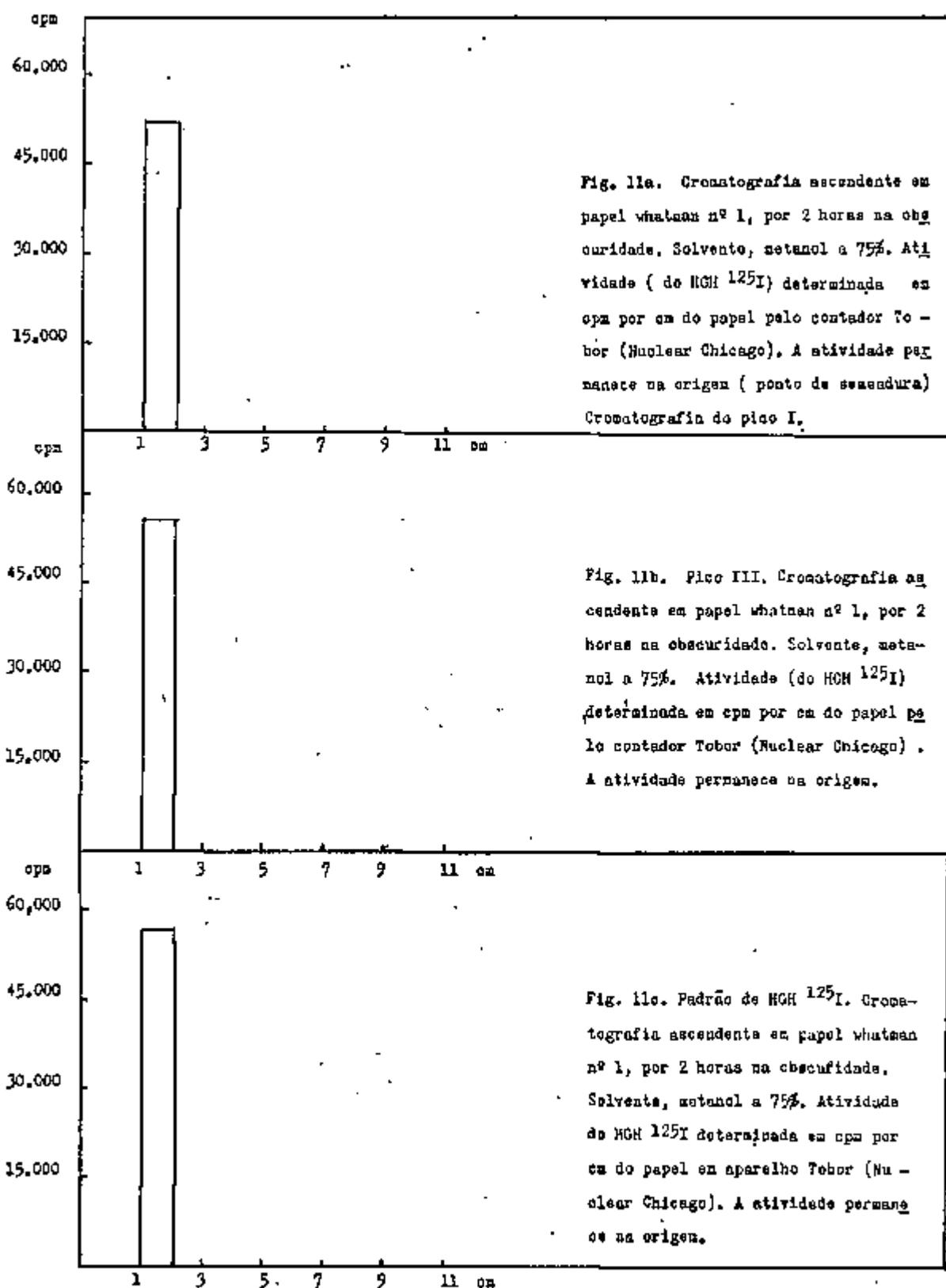
Por outro lado, sabendo-se que os hormônios "marcados" competem com os não "marcados" na formação de anticorpos, realizou-se o teste de imuno-reação com o HGH ^{125}I obtido pela técnica aqui apresentada. De um lado da lâmina, colocou-se anticorpo puro e no outro lado semeou-se uma mistura de HGH "marcado" e não "marcado"; como se pode notar, na Fig. 12, houve aparecimento de uma única faixa de precipitação, onde se pôde constatar radioatividade.

3.7 - Rendimento da extração

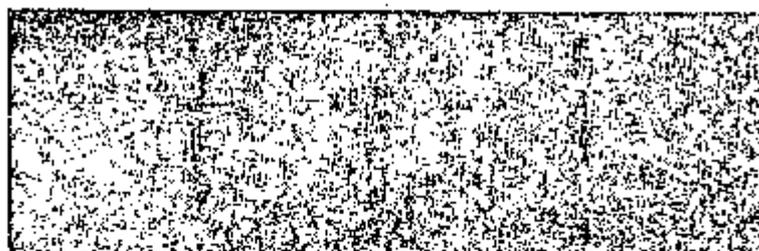
O produto proteico resultante de 10 extrações (a 11ª extração respondeu negativamente ao teste segundo Ouchterlony) foi de 3,6 g para cada 300 hipófises. O peso úmido unitário, médio, das hipófises foi 260 miligramas. Assim, o rendimento em proteínas hipofisárias foi de 12,0 mg por hipófise.

ELETROFORETOGRAMA DOS PICOS I e III e DO PADRÃO



CROMATOGRAMA DOS PICOS I e III "MARCADOS" E DO PADRÃO DE HGH ^{125}I 

Determinação de atividade imunológica do HGH¹²⁵I



AS

P

GH

Fig. 12. Radioimuno-reação em lâmina de vidro 2,5 x 7,5 cm recoberta por 3 ml de ágar a 1% em solução fisiológica. AS: sôro anti-HGH. GH: hormônio de crescimento "marcado" mais hormônio de crescimento não marcado. P: faixa de precipitação, única, com atividade determinada em contagens por minuto em aparelho Tøbor (Nuclear Chicago)

O total da proteína obtida (3,6g) foi dividido em 3 partes e, independentemente, aplicadas à coluna de Sephadex G-100 devidamente equilibrada (Fig. 3, 5, 6).

As frações correspondentes aos picos I e III foram respectivamente reunidas entre si e subsequentemente dialisadas e liofilizadas. Essa operação foi repetida com 5 partidas e a média dos rendimentos em proteínas hipofisárias fornecida pelos picos I e III foi de 576,0mg para o pico I e 397,3mg para o pico III. Os valores referidos foram obtidos pela pesagem do produto após liofilização.

A estimativa de hormônio de crescimento imunológica - mente ativo pelo processo de Ouchterlony, que de acordo com MORRIS e col. (21) se correlaciona razoavelmente bem com a atividade biológica, mostrou que cerca de 1/5 do produto obtido, tanto para o pico I como para o pico III é representado pelo HGH. Dessa forma, pode se exprimir teor em HGH imunologicamente ativo como sendo de 115,2mg para o pico I e 61,46mg para o pico III. Esses valores expressos em mg por hipófise correspondem respectivamente a 0,384 mg e 0,206mg. Calculando esses valores em base ao peso úmido unitário médio das hipófises, e que é de 260mg, obteve-se que a proteína correspondente ao pico I existe na concentração de 1,47 mg por grama de hipófise, e a do pico III na concentração de 0,792 mg por grama de hipófise.

3.8 - Rendimento da iodação com ^{125}I

A iodação, feita segundo técnica de GREENWOOD e col. (10) forneceu rendimento da ordem de 69% (Fig. 12). Esses autores citam rendimentos de 60 a 75%.

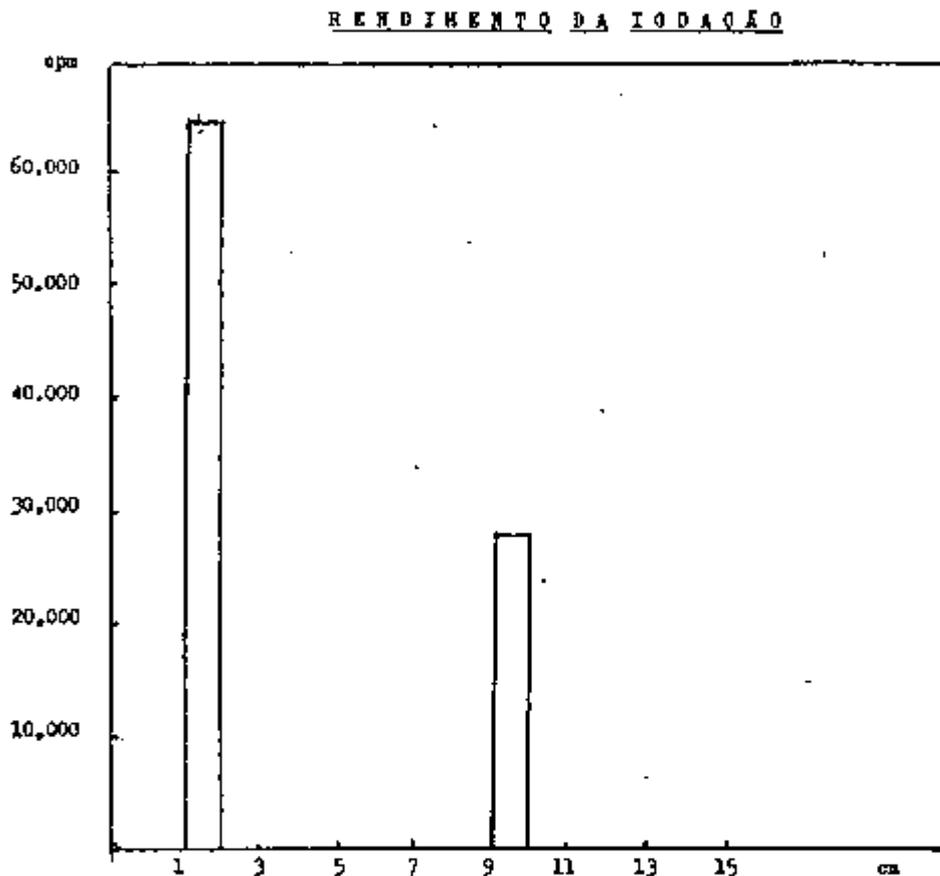


Fig. 12.

Fig. 12. Cromatografia ascendente em papel whatman nº 1. Solvente: metanol a 75%; tempo de corrida: 2 horas na obscuridade. Atividade em ^{125}I dada em contagem por minuto, em aparelho Tober (Nuclear Chicago) por centímetro da fita de papel. O primeiro pico corresponde ao hormônio "marcado"; o segundo ao iodo livre.

O rendimento percentual, do produto "marcado" e diali-
sado, calculou-se:

$$\frac{\text{Atividade final em } ^{125}\text{I (após diálise)}}{\text{Atividade inicial em } ^{125}\text{I (antes da diálise)}} \times 100 = 69$$

A atividade específica do produto obtido "marcado" com ^{125}I foi de $172,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ou $3,83 \text{ mCi/ml}$.

As atividades em ^{125}I foram determinadas por cpm no aparelho Tobar (Nuclear Chicago).

4. DISCUSSÃO

O HGH hipofisário pode ser obtido em grau de pureza razoável pelo processo descrito nesse trabalho. O sulfato de amônio a 50% precipita, além de HGH, outros hormônios hipofisários.

Foi usado, essencialmente, o método de filtração em gel de Sephadex G-100 padronizado por ROOS e col. (30).

Procurou-se, porém, introduzir modificações no sentido de torná-lo menos trabalhoso e o mais automatizado possível. Essas modificações foram possíveis devido ao uso de alguns aparelhos, especialmente o Monitor Ultra-violeta (Uviscan III) conectado a registrador, que permitiu simultaneamente a leitura e registro dos picos proteicos à medida que o eluente fluía pela coluna de Sephadex. A coleta das frações eluídas também foi automatizada com a conveniente adaptação, ao aparelho, de um coletor automático de frações (Frac-tomette-200).

Assim após a aplicação da suspensão de extrato hipofisário à coluna de Sephadex, especialmente quando se usava a cromatografia ascendente e velocidade de fluxo controlada; foi possível deixar o processo de eluição correr durante todo o período noturno, sem cuidados especiais (o processo de eluição para separação de todas as frações proteicas hipofisárias, tem duração em geral não inferior a 20 horas). O uso de coluna K 50/100, de paredes duplas, permitindo manter a temperatura a 4-5°C pela circulação de água refrige-

rada, tornou desnecessária a montagem do conjunto em câmara fria.

Outra modificação introduzida no método de ROOS e col. foi o uso da técnica imunológica de Ouchterlony. Esta tem a finalidade de evitar perdas de hormônio de crescimento durante o seu processo de extração com o tampão fosfato. ROOS e col. realizaram três extrações sucessivas. Como se pôde verificar pelo presente método, a positividade da reação segundo Ouchterlony se estendeu até a décima extração, garantindo assim maior rendimento final.

A atividade imunológica foi encontrada, como mostra a Fig. 4, nas frações correspondentes aos picos I e III. Essas frações, purificadas por filtração em gel de Sephadex G-100 forneceram, cada uma, um pico único (Fig. 5 e 6). ROOS e col. não constataram atividade biológica de HGH no pico I onde, pela gel-filtração em Sephadex G-100, se separam tôdas as grandes moléculas proteicas. Embora o pico I apresente atividade imunológica, é possível que não exiba atividade biológica significativa, o que será concluído em trabalho ulterior, já programado. Não existe explicação razoável para o arrastamento de moléculas de HGH responsável pela positividade da reação de Ouchterlony no pico I, que se mantém inalterado e com reação positiva, mesmo após nova cromatografia. (Fig. 5).

É possível que em trabalho ulterior se possa obter separação do componente imunologicamente ativo obtido no pico I, com o uso de Sephadex G-200, tal como o fizeram MacMILLAN e col. ⁽²⁰⁾ ao estudarem e provarem a heterogeneidade do HGH de Raben (extraído por processamento químico de hipófises humanas) amplamente usado nas in-

investigações e tratamento clínico.

Com base na capacidade de formação de anticorpos específicos apresentada pelos hormônios proteicos, e conseqüente formação de precipitado resultante da reação antígeno-anticorpo, conseguiu-se determinar quantitativamente o HGH nessas amostras liofilizadas como demonstraram MORRIS e col. (21).

Frente a elemento radioativo, o comportamento dos picos I e III foi também semelhante; ambos foram iodados com ^{125}I e a atividade obtida foi de aproximadamente 3,8 mCi/ml. Comparadas com padrão de HGH ^{125}I , exibiram o mesmo comportamento, demonstrado por eletroforese, cromatografia e imuno-reação (Fig. 10a, 10b, 10c, 11a, 11b, 11c e 12).

Segundo HUNTER e GREENWOOD (12), quando a atividade específica é de 300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, e até 500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, as preparações são quantitativamente idênticas ao hormônio não "marcado", determinado pelo método imunoeletroforético. Acima de 500 há uma progressiva diminuição da afinidade pelo sôro anti-HGH. Entretanto, no presente trabalho, obtiveram-se atividades específicas da ordem de 200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, absolutamente afin. pelo sôro anti-HGH.

A técnica empregada para a "marcação" do HGH cita rendimento de 60 a 75% (10). O mesmo rendimento calculado para o HGH obtido pela presente técnica foi de 69%. Quanto ao rendimento de HGH por glândula, varia muito de método para método.

WILHELM (36) consegue obter 5,3 mg de HGH, partindo de 120g de glân-

dula fresca, o que corresponde a um rendimento de 0,04426 mg por grama de glândula fresca. LI e PAPKOFF ⁽¹⁸⁾ partindo de 0,8 mg de hipófises liofilizadas obtiveram 29 mg de HGH. LEWIS e BRINK ⁽¹⁵⁾ conseguiram obter aproximadamente 100 mg de HGH por grama de hipófises conservadas em acetona o que significa 20 mg por grama de glândula fresca. GEMZELL e HELJKENSKJOLD ⁽⁶⁾ obtiveram 3,7 a 6,0 mg por glândula. ROOS e col. ⁽³⁰⁾ citam rendimento de 5 mg por grama de glândulas congeladas.

O rendimento obtido para o HGH imunologicamente ativo por grama de hipófise, conseguido pelo presente método, foi de 1,47 mg e 0,792 mg respectivamente para os picos I e III.

Deve-se lembrar que o pico III tem sido indicado para as diversas aplicações à pesquisa clínica e semiológica por ROOS e col. tendo em vista a atividade biológica em HGH concentrada nesse pico. Entretanto, os mesmos autores acham que para uso clínico a preparação pode ser muito menos pura, bastando, em simplificação do método, dissolver o precipitado pelo sulfato de amônio em tampão fosfato sem prévia liofilização (a solução será diretamente aplicada à coluna de Sephadex). Ainda os mesmos autores advertiram, como se pode induzir logicamente do presente trabalho, que além de HGH há outras substâncias de mistura com o hormônio, embora a contaminação com material hormonal ativo que não o HGH seja biologicamente pequeno, pelo menos no pico III que foi melhor estudado. Os autores sobre cujo método se baseou o presente trabalho não fizeram os estudos imunológicos aqui referidos.

5. CONCLUSÕES

1. Foi padronizado um método de separação de HGH em forma razoavelmente pura pelo fracionamento em Sephadex G-100 de extratos hipofisários sendo que as modificações introduzidas permitiram mais automatização do processo.
2. O emprêgo da imuno-reação segundo Ouchterlony nas várias etapas de extração permitiu evitar perdas de HGH.
3. A imuno-reação quantitativa, feita comparativamente com padrão de HGH, permitiu dar noção da riqueza em HGH imunologicamente ativo presente na amostra liofilizada.
4. O uso de radioisótopo, ^{125}I , permitiu por comparação com HGH padrão a identificação do produto obtido.

6. SUMÁRIO

O HGH é um hormônio de natureza proteica de difícil aquisição, já que os processos de sua obtenção são por certo dificultados pela peculiaridade do material de origem.

No presente trabalho, procurou-se desenvolver método de obtenção de HGH, visando facilidade e reprodutibilidade da técnica.

Os rendimentos, expressos em gramas, recuperados do pico III foram apreciáveis e comparáveis aos dos vários métodos existentes e citados. Entretanto, quando expressos em HGH imunologicamente ativo, verificou-se queda do rendimento para $1/5$ do HGH usado como padrão.

A fim de comprovar a identidade do hormônio obtido, foram feitos testes imunológico e radioativo. Os resultados foram perfeitamente comparáveis aos do padrão de HGH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Andrews, P.
Nature 209, 155 (1966)
- (2) Crowle, A. J.
Immunodiffusion, Acad. Press, New York and London (1961)
- (3) Ehrenberg, A. and Heijenskjold, F.
Acta Chem. Scand. 10, 1675 (1956)
- (4) Escamilla, R. F. and Bennett, L.
J. Clin. Endocrinol 11, 221 (1951)
- (5) Evans, H. M.,
Harvey Lectures 19, 212 (1925)
- (6) Gemzell, C. A. and Heijenskjold, F.
Endocrinology 59, 681 (1956)
- (7) Gemzell, C. A. and Li, C. H.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 18, 149 (1948)
- (8) Gersberg, H.
Endocrinology 61, 160 (1957)
- (9) Gornall, Bardawill e David.
Tastaldi, H. Prática de Química Biológica 2, 158 (1961)
- (10) Greenwood, F. C., Hunter, W. M. and Glover, J. S.
Biochem. J. 89, 114 (1963)

- (11) Hayashida, T. and Li, C. H.
Science 128, 1276 (1958)
- (12) Hunter, W. M. and Greenwood, F. C.
Biochem. J. 85, 39 (1962)
- (13) Hutchinson, W.
N. Y. Med. J. 72, 133 (1900)
- (14) Kinsell, L. W., Margen, S., Partridge, J. W., Michaels, G. D.
Balch, H. E. and John. J. P.
J. Clin. Endocrinol. and Metab. 14, 110 (1954)
- (15) Lewis, U. J. and Brink, M. G.
J. Amer. Chem. Soc. 80, 4429 (1958)
- (16) Li, C. H. and Evans, H. M.
Science 99, 183 (1944)
- (17) Li, C. H.
Science 123, 617 (1956)
- (18) Li, C. H. and Papkoff, H.
Science 124, 1293 (1956)
- (19) Li, C. H., Dixon, J. S. and Liu, W.
Archives of Bioch. and Bioph. 133, 70-91. (1969)
- (20) MacMillan, D. R., Schmid, J. M. Eash, S. A. and Read, C. H.
J. Clin. Endocrin. and Metab. 27, (1967)

- (21) Morris, H. G., Arai, Y., Hlad, G. J., Tompkins, R. and Elrick, H.
J. Clin. Endocr. 24, 417 (1964)
- (22) Oudin, J.
C. R. Hebd. Séances Acad. Sci 222, 115 (1946)
- (23) Oudin, J.
Methods in Med. Research 5, 335 (1952)
- (24) Ouchterlony, O.
Acta Path. Microbiol. Scand. 32, 231 (1953)
- (25) Ouchterlony, O.
Progr. Allerg. 6, 30 (1962)
- (26) Papkoff, H. and Li, C. H.
Methods in Hormone Research II, Acad. Press, Chap. 21 (1962)
- (27) Raben, M. S.
Science 125, 883 (1957)
- (28) Raben, M. S.
Recent Progr. Hormone Research 15, 71 (1959)
- (29) Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., Brink, N. G. and Steelman, S. L.
Endocrinology 71, 559 (1962)
- (30) Roos, P. Fevold, H. R. and Gemzell, C. A.
Bioch. et Bioph. Acta 74, 525 (1963)
- (31) Staub, A., Springs, V. and Elrick, H.
Int. J. Appl Radiat. Isotopes 2, 59 (1957)

- (32) United States Pharmacopeia 16, 682 (1960)
- (33) Utiger, R. D., Parker, M. L. and Daughaday, W. H.
J. Clin. Invest. 41, 254 (1962)
- (34) Villela, G. G., Bacila, M., Tastaldi, H.
Bioquímica, Kogan Guanabara, Cap. XII, 343 (1961)
- (35) Wilhelmi, A. E., Fishman, J. B. and Russel, J. A.
J. Biol. Chem. 176, 735 (1948)
- (36) Wilhelmi, A. E.
Ciba Foundatin Colloquia Endocr. 13, 25 (1960)
- (37) Yalow, R. S. and Berson, S. A.
J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960)