

# I Congresso Geral de Energia Nuclear

Rio de Janeiro, 17 a 20 de Março de 1986

## ANAIS - PROCEEDINGS

### ATIVIDADE RADIOIMUNOLÓGICA DA VARIANTE 22 K DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO

Maria Aparecida Pires Camilo, Maria Teresa C.P. Ribela e  
José Roberto Rogero  
Divisão de Radiobiologia  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares  
Comissão Nacional de Energia Nuclear - São Paulo

#### Sumário

Partindo-se de uma preparação de hormônio de crescimento humano isolou-se por isoeletrofocalização a sua variante íntegra (hGH-22K) com pH isoeletrico 5,20 e migração relativa (Rm) de 0,621 em eletroforese em gel de poliacrilamida a 7%. Realizou-se diversos testes para caracterização da variante isolada. As propriedades imunológicas foram testadas por radioensaio (RIE), no qual comparou-se a sua atividade com a preparação total. As curvas dose resposta obtidas no RIE foram paralelas, a um nível de significância de  $P < 0,01$  verificado pelo teste F. O paralelismo demonstra a identidade imunológica das duas preparações e indica que o processo de isolamento desenvolvido não provoca alterações nas propriedades imunológicas da variante.

#### Abstract

From a preparation of human growth hormone its integral variant (hGH-22K) was isolated by isoelectric focusing, having a pI of 5,20 and relative mobility (Rm) of 0,621 in the polyacrylamide gel electrophoresis. Several experiments for the characterization of the isolated variant were carried out. The immunological properties was tested by radioimmunoassay (RIE), in which the activity of the isolated variant and the activity of the total preparation were compared. The dose response-curves obtained by RIE were found to be considered parallels ( $p < 0,01$ ). It was checked using the F test between the slope of the two curves. The parallelism shown the immunological identity of the two preparation and indicates that the separation process developed does not produce alterations in the immunological properties of the variant.

Figura 1. Curvas de RIE obtidas para as purificações de hGH total e variante 22K.

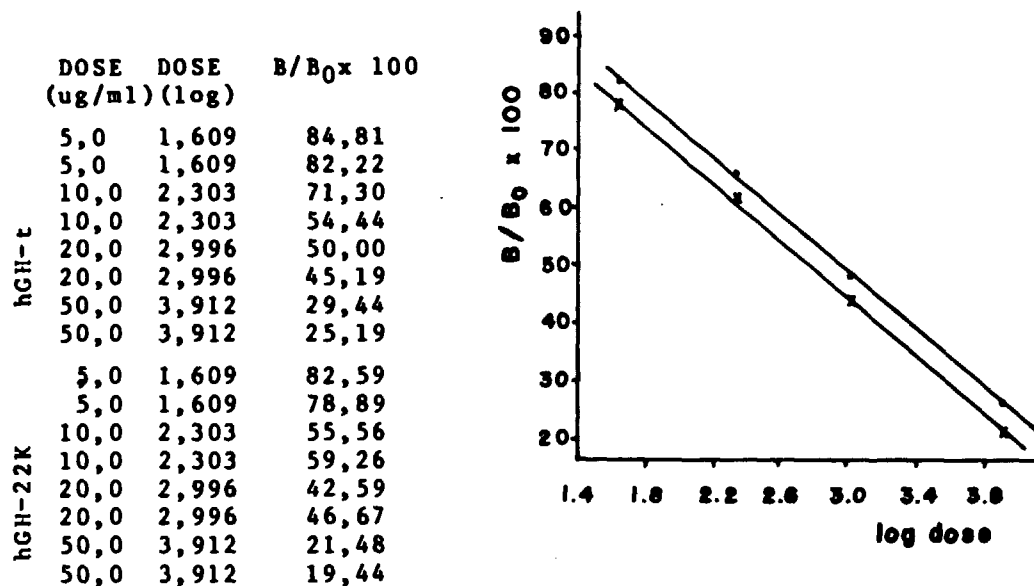


Tabela 1. hGH (total): Análise da variância e regressão linear.

FOUZE	G.L.	S.Q.	Q.M.	Vlr F	Prob. F
MODELO	1	3372,797	3372,797	109,318	0,0001
ERRO	6	185,118	30,853016		
TOTAL	7	3557,915		R.MDP = 5,554549	r = 0,9480
D.M.		55,32375		C.V. = 10,04008	
VARIÁVEIS	G.L.	PAR. EST.	ERRO PAD.	T P/ H <sub>0</sub>	Prob.  T
INTERC.	1	120,512	6,536763	18,436	0,0001
LD0SE	1	-24,0998	2,304961	-10,456	0,0001

Tabela 2. hGH-22K: Análise da variância e regressão linear

FOUZE	G.L.	S.Q.	Q.M.	Vlr F	Prob. F
MODELO	1	3759,207	3759,207	362,352	0,0001
ERRO	6	62,26680	10,37446		
TOTAL	7	3821,454		R.MDP = 3,220942	r = 0,9837
D.M.		50,81000		C.V. = 6,339189	
VARIÁVEIS	G.L.	PAR. EST.	ERRO PAD.	T P/ H <sub>0</sub>	Prob.  T
INTERC.	1	119,631	3,790503	31,561	0,0001
LD0SE	1	-25,4428	1,336589	-19,036	0,0001

## INTRODUÇÃO

O refinamento das técnicas de análise de proteínas, permitiu verificar que mesmo as preparações mais puras de hormônio de crescimento humano (hGH) apresentam heterogeneidade quanto aos aspectos físico-químicos. Várias observações indicam tratar-se de multicomponentes de uma mesma molécula, sendo que o principal é denominado íntegro ou variante 22K. (1) Entretanto, não se conhece o papel das variantes na fisiologia do crescimento. O isolamento de cada componente forneceria meios para seu esclarecimento. A reação do hGH com o seu anticorpo no radioimunoensaio (RIE) é uma forma qualitativa de verificar se ocorreram alterações estruturais na molécula durante o isolamento da variante 22K.

O RIE também é a única metodologia disponível que permitiria identificar e quantificar as formas circulantes, para estabelecer os mecanismos que resultam no amplo espectro de ações de hGH. O desenvolvimento de um RIE específico poderia significar ainda uma evolução nos diagnósticos clínicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O hGH foi preparado a partir de hipófises humanas congeladas e segundo o método de Roos, (3). A variante hGH-22K foi isolada da preparação total por iso-eletofocalização.

A radioiodação baseou-se no método de marcação com cloramina T (2). Obteve-se o hGH-<sup>125</sup>I com uma atividade específica de 39,8 µCi/µg. O marcado foi utilizado no RIE diluído 1:200 e o anticorpo 1:250.000. As duas preparações de hGH foram ensaiadas nas doses de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100,0 µg/ml. Utilizou-se tampão veronal 0,025 M, pH 8,6 contendo 0,25% de soro albumina bovina. Incubou-se o ensaio por 22 horas a 59°C.

A ligação inespecífica foi determinada na presença de excesso de hormônio não marcado (10 µg/ml). Este valor foi subtraído da ligação total de cada ponto, para o cálculo da ligação específica.

Para a separação das frações livre e ligada utilizou-se PEG 6.000 a 25% em tampão veronal 0,025 M pH 8,6. Após a centrifugação (2500g, 20 minutos, 5 a 89°C) ressuspendeu-se o precipitado em cloreto de sódio 0,4M e com a solução de PEG citada anteriormente. Segue uma nova centrifugação da suspensão (3300g, 10 minutos, 5 a 89°C). O sobrenadante é descartado e o precipitado é contado.

A curva padrão inicialmente relacionou B/T (ou seja, a fração de hormônio radioativo ligado, dividido pelo total incubado) com a dose de hormônio não marcado adicionada. Posteriormente a escala de resposta foi ampliada tomando-se a

relação  $B/B_0 \times 100$ , onde  $B_0$  é determinado na ausência de antígeno frio.

A análise estatística foi realizada pelo programa SAS (Statistical Analysis System) em um computador IBM/370 modelo 155 do IPEN-CNEN/SP.

#### RESULTADOS E CONCLUSÕES

As ligações inespecíficas obtidas foram 3,7% para preparação total e 3,6% para a variante 22K. A lavagem do precipitado, obtido após a primeira centrifugação, foi um procedimento decisivo para a diminuição da ligação inespecífica do ensaio, anteriormente ao redor de 8%.

A ligação específica máxima ( $B_0$ ) foi 52% para o hGH-total e 54% para o hGH 22K. As ligações específicas para as diferentes doses da curva padrão, expressas como  $B/B_0 \times 100$ , estão representadas na Figura 1.

A análise das curvas em escala semi-log apresentou uma porção linear, entre as doses de 5 a 50 ng/ml. Utilizando análise de variância e teste F demonstramos que o modelo de regressão linear é adequado para estes dados a um nível de significância de  $P < 0,0001$ , em ambas as preparações. (Tab. 1 e 2). As declividades calculadas foram - 24.099 para o hGH - total e - 25.443 para a variante 22K, sendo demonstrado o paralelismo das duas curvas através do Teste F. ( $P < 0,01$ ).

O paralelismo evidencia a identidade imunológica das duas preparações. (4) Também demonstra que a metodologia de isoeletofofocalização é factível, tanto do ponto de vista da resolução, quanto da conservação da capacidade imunológica do hormônio.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1- CHAWLA, R.K.; PARKS, J.S.; RUDMAN, D. Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic, and clinical aspects. In: Ann.Rev.Med., 34: 519-47, 1983.
- 2- BARTOLINI, P & CAMILLO, M.A.P. Human growth hormone radioiodination using different batches of  $^{125}\text{I}$  of various ages. In: Clin.Chim.Acta, 129: 353-58, 1982.
- 3- ROOS, P.; FEVOLD, H.R.; GEMZELL, C.A. Preparation of human growth hormone by gel filtration. In: Biochim.Biophys.Acta, 74: 525-31, 1963.
- 4- YALLOW, R.S. Radioimmunoassay methodology: application to problems of heterogeneity of peptide hormones. In: Pharmacol.Rev. 25(2): 161-178, 1973.