

**OLGA ZAZUCO HIGA**

**COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO, BIOLÓGICO E  
IMUNOQUÍMICO DO POLIPEPTÍDEO SOMATOMEDINA  
SÍMILE SINTETIZADO EM CULTURA DE TECIDO DE  
FÍGADO FETAL DE RATÓ**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
da Universidade de São Paulo, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
DOUTOR EM CIÊNCIAS na área de Fisiologia.**

**SÃO PAULO  
1979**

OLGA ZAZUCO HIGA

COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO, BIOLÓGICO E IMUNOQUÍMICO  
DO POLIPEPTÍDEO SOMATOMEDINA SÍMILE SINTETIZADO  
EM CULTURA DE TECIDO DE FÍGADO DE FETO DE RATO



Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade de  
São Paulo como parte dos requisi-  
tos necessários para obtenção do  
título de DOUTOR EM CIÊNCIAS na  
Área de Fisiologia.

SÃO PAULO

1 9 7 9

Orientador: Prof.Dr. Bernardo Léo Wajchenberg

Tese realizada nos laboratórios de  
Diabetes (NIAMDD) dos Institutos  
Nacionais de Saúde (National Ins-  
titutes of Health) em Bethesda,  
Maryland, E.U.A.

A meus pais,  
que me transmitiram a vida e  
têm sabido respeitar meus  
caminhos.

#### Nossos agradecimentos

- ao Prof. Dr. Êmulo Ribeiro Fieroni, quando no exercício do cargo de Superintendente do IPEN, pelo apoio e oportunidade que nos deu de obter uma bolsa da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), da qual se derivou o presente trabalho;
  - ao Dr. Bernardo Léo Wajchenberg, Orientador, pelos esforços que tornaram possível a realização deste trabalho;
  - ao Dr. M. M. Rechler, pesquisador do National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Disease dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH), pelo acompanhamento e orientação de nossas atividades;
  - ao Dr. H. J. Eisen, pesquisador do National Institute of Child Health and Human Development (NIH), pela orientação quanto às técnicas de cultura de órgãos adotadas em nosso experimento;
  - aos Drs. S. P. Missley e A. Moses, pesquisadores do National Cancer Institute (NIH) pela contribuição específica em aspectos técnicos importantes e indispensáveis;
  - ao Dr. L. S. Phillips, pesquisador do Center for Endocrinology, Metabolism, and Nutrition (Chicago), pela realização de ensaio biológico, complemento de relevo para nossos resultados;
  - à Dra. Seiko Hanada, do Instituto de Ciências Biorédicas da USP, pelo importante papel desempenhado na revisão global desta tese;
  - à Profa. Suzanna Caetano, pela revisão segura e criteriosa do texto;
- e ainda
- ao Dr. Seizi Oga e a todos os que, de alguma forma, prestaram sua colaboração para que alcançássemos nossos objetivos.

## A B R E V I A T U R A S

- HC - Hormônio de crescimento
- SM - Somatomedina
- IGF - *insulin-like growth factor* - fator de crescimento insulino-símile
- NSILA-s- *non-suppressible insulin-like activity soluble* - atividade insulino-símile não supressível (pelo anticorpo específico), solúvel em ácido
- MSA - *multiplication stimulating activity* - atividade estimuladora da multiplicação
- BRL - *Buffalo rat liver* - fígado de rato da raça Buffalo
- SAB - soro albumina bovina
- TCA - ácido tricloroacético
- KRP - tampão fosfato Krebs Ringer
- PEG - polietileno glicol
- SDS - dodecil sulfato de sódio
- HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil-1-piperazina)etano sulfônico
- EGF - fator de crescimento epidermal
- NGF - fator de crescimento nerval

## Í N D I C E

	<u>Pg .</u>
1- INTRODUÇÃO .....	1
1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A AÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (HC).....	1
1.2- FATOR DE CRESCIMENTO INSULINO-SÊMILE (IGF) .....	3
1.3- ATIVIDADE ESTIMULADORA DE MULTIPLICAÇÃO (MSA) .....	4
1.4- SOMATOMEDINA FETAL .....	6
2- MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
2.1- OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO MSA-BRL.....	8
2.1.1- Eletroforese do MSA-BRL, em Gel de Poliacrilamida .....	9
2.1.2- Marcação do MSA-BRL com <sup>125</sup> I .....	9
2.2- OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO PELOS FRAGMENTOS DE FÍGADO DE FETO DE RATO.....	10
2.2.1- Preparação do Meio .....	10
2.2.2- Preparo dos Fragmentos de Fígado de Feto de Rato .....	11
2.2.3- Cultura dos Fragmentos de Tecido .....	11
2.3- DETERMINAÇÃO DE DNA, PROTEÍNAS FETAIS ESPECÍFICAS E MSA NO MEIO CONDICIONADO PELO FÍGADO DE FETO .....	12
2.4- EFEITO DE INIBIDOR DE SÍNTESE PROTEICA NO MEIO DE CULTURA DE FÍGADO DE FETO.....	12
2.5- PURIFICAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO PELOS FRAGMENTOS DE FÍGADO DE RATO .....	13
2.6- CONTROLE DO MEIO PURIFICADO QUANTO À PRESENÇA DE PROTEÍNAS FIXADORAS DE SM .....	14
2.7- ENSAIOS POR COMPETIÇÃO DO MSA .....	15
2.7.1- Ensaio por Competição Usando Proteína Fixadora de SM .....	15
2.7.2- Ensaio por Radiorreceptor com Membranas Plas máticas de Fígado de Rato .....	15
2.7.3- Radioensaio do MSA .....	16
2.8- ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO MSA .....	18

	<u>Pg.</u>
2.1.8- Incorporação da Timidina - <sup>3</sup> H no DNA de Fibro blastos de Embrião de Galinha .....	18
2.8.2- Estímulo de Multiplicação dos Fibroblastos- de Embrião de Galinha .....	19
2.8.3- Incorporação de Sulfato na Cartilagem Costal de Ratos Hipofisectomizados .....	20
2.9- ENSAIOS DE ATIVIDADE INSULINO-SÍMILE DE MSA .....	20
2.9.1- Oxidação de Glicose em Adipócitos Isolados de Rato .....	20
2.9.2- Ensaio por Radiorreceptor Específico para Insulina Usando-se Linfócitos Humanos Cul- tivados .....	21
2.10- DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DO MSA FETAL .....	22
3- RESULTADO .....	24
3.1- PURIFICAÇÃO DO MSA-BRL .....	24
3.2- DETERMINAÇÃO DE DNA, PROTEÍNAS ESPECÍFICAS E MSA NO MEIO CONDICIONADO PELO FÍGADO DE FETO DE RATO .....	25
3.3- EFEITO DE INIBIDOR DE SÍNTESE PROTEICA NO MEIO DE CULTURA DE FÍGADO FETAL .....	26
3.4- PURIFICAÇÃO PARCIAL DO MSA FETAL .....	27
3.5- CONTROLE DO MEIO PURIFICADO QUANTO À PRESENÇA DE PROTEÍNAS FIXADORAS DE SM .....	27
3.6- ENSAIOS DE LIGAÇÃO COMPETITIVA DO MSA .....	30
3.6.1- Ensaio de Ligação Competitiva Usando Pro- teína Fixadora de SM .....	30
3.6.2- Ensaio por Radiorreceptor com Membranas Flag- máticas de Fígado de Rato .....	30
3.6.3- Radioensaio do MSA-BRL .....	32
3.7- ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO MSA .....	32
3.7.1- Incorporação da Timidina - <sup>3</sup> H no DNA de Fibroblastos de Embrião de Galinha .....	32
3.7.2- Incorporação de Sulfato na Cartilagem Costal de Ratos Hipofisectomizados .....	36

	<u>Pg.</u>
3.8- ENSAIOS DE ATIVIDADE INSULINO-SÍMILE .....	37
3.9- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS .....	38
4- DISCUSSÃO .....	42
RESUMO .....	54
ABSTRACT .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## 1. I N T R O D U Ç Ã O

### 1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A AÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (HC)

As pesquisas feitas em torno do hormônio do crescimento (HC), até aproximadamente há três décadas, levavam a crer que a sua ação era direta sobre os tecidos-alvo, provocando o crescimento<sup>(5)</sup>. Como se sabe, a multiplicação de células animais "in vitro" requer a presença de soro ou frações deste no meio de cultura e, tradicionalmente, tem sido empregado o soro total para esse propósito<sup>(96)</sup>. Entretanto, mostrou-se que o soro contém um certo número de fatores que afetam o crescimento e a motilidade de células eucarióticas. Por outro lado, sabe-se que a insulina pode parcialmente substituir o soro na estimulação e síntese do DNA e na multiplicação de alguns sistemas celulares<sup>(23)</sup>. No animal "in vivo", porém, é o hormônio de crescimento, e não a insulina, que exerce a função reguladora do crescimento. Assim, o hormônio de crescimento que "in vivo" promove o crescimento do esqueleto e a síntese proteica não tem, "in vitro", nenhum efeito sobre o tecido esquelético.

Com os estudos, agora clássicos, de Salmon e Daughaday<sup>(78,79)</sup>, ficou claramente demonstrado que o hormônio de crescimento por si só não exerce uma ação metabólica no tecido esquelético, mas que esta se processa através de uma outra substância, detectável no soro.

Tal fato veio à luz quando, na tentativa de desenvolver um bioensaio mais aperfeiçoado para a mensuração do hormônio de crescimento, Salmon e Daughaday observaram

que o soro de rato hipopituitário tinha atividade diminuída, em comparação ao soro de rato normal, quando usado para estimular a incorporação do sulfato radioativo ( $^{35}\text{SO}_4$ ) na cartilagem obtida a partir de ratos hipofisectomizados. Observaram que a capacidade de incorporação não podia ser amplificada pela simples e direta adição de HC no sistema de ensaio. Para que se obtivesse essa amplificação era necessário o tratamento prévio, com HC, do rato hipofisectomizado e a posterior utilização de seu soro no sistema de ensaio. Esta atividade foi designada pela expressão "fator de sulfatação", já que o ensaio empregado dependia, como foi exposto, da incorporação do sulfato radioativo na cartilagem.

Com o prosseguimento das pesquisas, novas ações biológicas foram sendo atribuídas a esse fator, evidenciando a necessidade de nova denominação, mais ampla e abrangente. O termo encontrado foi "somatomedina" (SM), proposto por Daughaday em 1972<sup>(14)</sup>, baseado no fato de que seria um fator mediador, através do qual se processaria a ação do HC sobre o organismo vivo. Ficou, portanto, postulado na hipótese da somatomedina que o hormônio de crescimento não estimula diretamente o "crescimento" tissular, mas é o responsável pela geração de um segundo agente (ou agentes) hormonal(is) - a(s) somatomedina(s)-que age(m) a nível celular. Atualmente considera-se a somatomedina (SM) como um termo geral, associado às substâncias sob o controle do HC com efeitos promotores de crescimento e ações similares à insulina, ou seja, substâncias que imitam as ações biológicas da insulina sem que possam ser neutralizadas pelos anticorpos anti-insulínicos. Por essa razão tem-se adotado também o termo fator de crescimento insulino-símile (insulin-like growth factor-IGF), para a designação de polipeptídeos com atividade de somatomedina no plasma humano.

## 1.2- FATOR DE CRESCIMENTO INSULINO-SÍMILE (IGF)

É bem conhecido o efeito metabólico agudo da insulina no transporte e oxidação da glicose e na lipogênese. Nestas condições, os fatores de crescimento insulino-símil e (IGF) podem ser considerados como uma família de polipeptídeos que têm atividade biológica semelhante à da insulina em adipócitos "in vitro", não reagindo com anticorpos anti-insulínicos<sup>(112)</sup>. Eles têm efeitos anabólicos na cartilagem "in vitro" e acredita-se que medeiam a ação do HC no esqueleto. Ademais, são mitógenos para diversos tipos de fibroblastos em cultura<sup>(2,69)</sup>.

Purificados do plasma humano e incluídos na família dos IGF estão 4 polipeptídeos: IGF-1 (conhecido também como NSILA-1); IGF-2 (ou NSILA-2); somatomedina A (SM A) e somatomedina C (SM C). Um quinto membro dessa família de polipeptídeos, é a chamada "atividade estimuladora de multiplicação" (multiplication stimulating activity-MSA), obtido a partir do meio condicionado pelas células BRL 3A, uma linhagem celular de fígado de rato em cultura<sup>(58,95)</sup>.

A somatomedina MSA, desde a sua identificação no soro há mais de uma década, vem sendo bastante estudada, tendo-se conseguido sua satisfatória caracterização. Como este peptídeo será, no presente estudo, referência para comparações bioquímicas e imunológicas, julgou-se de conveniência a apresentação esquemática de seu histórico e propriedades gerais, de modo a tornar mais clara e acessível a discussão dos resultados e as conclusões a que se chegou com o presente estudo.

### 1.3- ATIVIDADE ESTIMULADORA DE MULTIPLICAÇÃO (MSA)

Histórico e definição - Temin<sup>(95,96)</sup> usou a expressão "atividade estimuladora de multiplicação" (multiplication stimulating activity-MSA) para descrever as atividades existentes no soro que permitiam a proliferação da maioria das células em cultura. Juntamente com seus colaboradores, propôs-se a purificar as macromoléculas do soro de vitelo que possuíam atividade estimuladora de multiplicação. Verificando que a insulina também estimulava o crescimento de fibroblastos de embrião de galinha quando colocada no lugar do soro, mas somente quando adicionada em altas concentrações, esses autores<sup>(65,95)</sup> concluíram que os verdadeiros agentes promotores de crescimento presentes no soro poderiam ser pequenos polipeptídeos similares à insulina, tal como a "atividade insulino-símil não supressível (pelo anti-soro específico), solúvel em ácido" (non-suppressible insulin-like activity-acid soluble), a NSILA-s<sup>(29,30)</sup>. Deste modo, Temin e Pierson, adaptando os métodos de purificação previamente descritos para aqueles polipeptídeos, purificaram o MSA de 6.000 a 8.000 vezes, a partir do soro de vitelo<sup>(65)</sup>.

A seguir, foi constatado que certas linhagens monoclonais de células de fígado de rato da raça Buffalo, estabelecidas por Coon<sup>(12)</sup>, cresciam bem em cultura, em meio não suplementado com soro<sup>(23,60)</sup>. A hipótese por ele formulada foi de que esta célula de fígado poderia estar sintetizando o mesmo fator de crescimento, chamando-o por isso também MSA. De fato, o meio desprovido de soro, obtido a partir de uma dessas linhagens celulares, o BRL 3A, manteve o crescimento de fibroblastos de embrião de rato e de galinha (que eram soro-dependentes)<sup>(23)</sup>.

O MSA tem sido extensivamente purificado a partir do meio condicionado, livre de soro, das células BRL 3A<sup>(23,24,58,97)</sup> e comparado ao MSA de soro de vitelo<sup>(88)</sup>, quanto às suas ações biológicas. Em geral, identifica-se o MSA durante a purificação por sua capacidade de estimular a incorporação da timidina triciada ao DNA dos fibroblastos de embrião de galinha<sup>(23,24)</sup>. Usando um método modificado Nissley e Rechler<sup>(59)</sup> têm purificado o MSA até a homogeneidade a partir do meio condicionado pela mesma linhagem celular de fígado de rato (BRL 3A).

Propriedades das somatomedinas - A atividade de SM foi constatada no plasma<sup>(44,79)</sup>, no fluído cerebrospinal<sup>(4)</sup>, no fígado<sup>(17,48)</sup>, no rim<sup>(49)</sup>, nos músculos<sup>(36)</sup> e na linfa<sup>(11)</sup>. A maioria das evidências disponíveis permite afirmar que o principal sítio de produção de SM é o fígado<sup>(89,101,110)</sup>. Sabe-se que a SM é liberada pelo fígado associada a uma proteína de alto peso molecular<sup>(19)</sup>, se bem que não é conhecido com exatidão o mecanismo de transporte do hepatócito para o plasma. São as seguintes as propriedades que definem as SM como uma família de polipeptídeos<sup>(37,75,84,106)</sup>:

- a) Químicas: cadeia simples, polipeptídeos ácido-solúveis de peso molecular 5.000-10.000;
- b) Biológicas: fraca atividade insulino-símile em tecido adiposo "in vitro"; estímulo de processos anabólicos na cartilagem; estímulo da síntese do DNA e multiplicação de fibroblastos em cultura;
- c) Ligação a receptores: fraca interação com receptores de insulina e intensa com receptores de superfície celular, específicos para SM;
- d) Ligação a proteínas fixadoras séricas, específicas de SM, em soro de rato e de seres humanos;
- e) Imunorreatividade cruzada com as diversas SM.

O fato de existir diferenças no ponto isoelétrico, na composição de aminoácidos, nos receptores e na reatividade imunológica, indicam haver muitas espécies moleculares de SM. As relações entre as várias formas moleculares são ainda desconhecidas e maiores esclarecimentos virão com a elucidação de sua estrutura primária.

Com o MSA purificado até a homogeneidade foi determinado o seu peso molecular (8.700) e a composição em aminoácidos<sup>(24)</sup>. Demonstrou-se que suas reações são semelhantes aos fatores de crescimento insulino-símile humanos, quanto a propriedades biológicas e quanto a sua interação com os receptores da superfície celular e com proteínas fixadoras séricas de SM<sup>(59)</sup>.

#### 1.4- SOMATOMEDINA FETAL

Embora se saiba que a velocidade de crescimento é mais rápida na vida fetal do que após o nascimento, pouco se conhece sobre a função dos hormônios no crescimento e na diferenciação dos tecidos fetais. Em contraste, nem o HC materno nem o fetal parecem ser determinantes importantes do crescimento fetal; o HC materno está presente em baixos níveis e não cruza a barreira placentária; por outro lado, tem-se verificado que fetos com deficiência de HC atingem tamanho normal no desenvolvimento intra-uterino<sup>(98)</sup>. Diante desses fatos, foi sugerido que as SM é que teriam a função de substâncias promotoras de crescimento fetal, uma vez que estão presentes tanto no cordão umbilical como no fluido amniótico<sup>(3,40,93)</sup>.

Os tecidos de feto contêm receptores específicos de SM<sup>(21,91)</sup>, podendo assim responder a estes peptídeos. Fa

tos como este levaram à intensificação de estudos com órgãos de feto para a observação da resposta biológica às SM. Foram assim desenvolvidas técnicas empregando fragmentos teciduais de fígado de feto de rato a termo, que permitiram manter esses tecidos em cultura, sem perda da viabilidade, por 4 a 7 dias, em meio quimicamente definido e desprovido de soro. Observou-se que no meio de cultura eram liberadas proteínas como albumina e alfa<sub>1</sub>-fetoproteína, proteínas estas também presentes no líquido amniótico<sup>(85)</sup>.

O propósito do presente estudo é demonstrar que fragmentos de fígado de feto de rato mantidos em cultura são capazes de sintetizar e liberar um fator de crescimento insulino-símile, química, biológica e imunologicamente relacionado ao MSA, sintetizado este pela linhagem celular de fígado de rato BRL 3A. Por ser bem caracterizado, foi empregado como referência em nossa investigação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A experimentação consistiu basicamente na detecção de propriedades de somatomedinas no polipeptídeo obtido do meio de cultura de tecido de fígado de feto de rato, após purificação em Sephadex G-75.

### 2.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO MSA-BRL

O material inicial para a purificação do MSA-BRL foi obtido da cultura de células BRL 3A mantidas em cultura no meio mínimo de Eagle modificado<sup>(94)</sup>, desprovido de soro. O meio condicionado pelas células BRL 3A em placas de Petri foi colhido em intervalos de 3 a 4 dias, acumulando-se o necessário para o processo de purificação.

No primeiro estágio dessa purificação, 3 a 4 litros de meio condicionado foram cromatografados em coluna de 2 litros com Dowex 50 W-X8 (Sigma Chemical Co.), resina de 100-200 mesh, na forma de  $\text{Na}^+$ , equilibrada com solução de NaCl (9 g/l). O MSA adsorvido ao Dowex, em pH neutro, foi eluído da resina em pH 11 com ácido acético 1 M<sup>(23)</sup>. Os eluatos concentrados foram cromatografados em coluna de Sephadex G-75 (100 x 0,9 cm) com ácido acético 1 M<sup>(58)</sup>. Para a obtenção do MSA-BRL homogêneo das frações eluídas do Sephadex fez-se uma eletroforese preparativa em gel de poliácrilamida a 12%, pH 2,7, em uréia 9 M<sup>(58)</sup>.

O grau de atividade do MSA foi verificado pela incorporação da timidina-<sup>3</sup>H no DNA dos fibroblastos de embrião de galinha<sup>(88)</sup>.

### 2.1.1- Eletroforese do MSA-BRL em Gel de Poliacrilamida

Para a identificação e visualização das espécies ativas do MSA-BRL homogêneo eluídas do Sephadex G-75 foram usados a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%, pH 2,7 em uréia 9 M, em placas (Hoeffer) de 1,5 cm e os sistemas de tampões de Neville<sup>(56)</sup>. A eletroforese foi desenvolvida a uma corrente constante de 12,5 miliampères, empregando-se o azul de metileno como cor de referência. A placa foi fixada por 30 minutos em ácido tricloroacético (TCA) 12,5% corada com azul brilhante de Coomassie G-250, diluído a 0,0125% com TCA a 12,5%.

### 2.1.2- Marcação do MSA-BRL com $^{125}\text{I}$

O MSA-BRL pico II-1, obtido por purificação em gel de poliacrilamida, foi marcado com  $\text{Na}^{125}\text{I}$  usando-se o método da cloramina T modificado<sup>(42)</sup>. A mistura de iodação continha basicamente 6  $\mu\text{g}$  de MSA em 20  $\mu\text{l}$  de fosfato de potássio 0,3 M, pH 7,4, e 1,5 a 2 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$ . Inicialmente a cloramina T foi preparada a 2mg/ml em fosfato 0,3 M e, imediatamente antes do uso, diluída a 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e adicionada ao tubo de reação em alíquotas sucessivas de 10  $\mu\text{l}$ . A reação foi controlada pela incorporação da radioatividade no material precipitável pelo TCA. Para testar a iodação, depois de cada adição de cloramina T, a mistura era homogeneizada com a própria ponteira da pipeta. A seguir, a ponteira era mergulhada em um tubo contendo 1 ml de tampão. Desta mistura pipetou-se 10  $\mu\text{l}$  em um segundo tubo contendo 1 ml de tampão fosfato com 1 mg/ml de soro

albumina bovina (SAB), seguida da adição de 1 ml de TCA 10%. Após a centrifugação por 1 minuto, foram contados o sobrenadante e o precipitado. Quando a incorporação alcançou o platô, usualmente depois de duas adições de cloramina T, a reação foi finalizada com 1 ml de tampão fosfato 0,3M contendo 1 mg/ml de SAB. Essa mistura foi imediatamente aplicada a uma coluna de gel Sephadex G-25 (5x1,5 cm) equilibrada com ácido acético 1 M contendo 1 mg/ml de SAB. Coletaram-se 25 frações de 10 gotas. O MSA-<sup>125</sup>I, separado do <sup>125</sup>I livre, foi recromatografado em coluna de Sephadex G-75 (50 x 1 cm), previamente equilibrada com ácido acético 1 M contendo 1 mg/ml de SAB. Com este mesmo tampão a eluição foi efetuada a 4°C, coletando-se frações de 1 ml. As frações de MSA-BRL-<sup>125</sup>I foram testadas na sua capacidade de radioligação, no ensaio de receptor de membranas plasmáticas de fígado de rato. A fração ou frações selecionadas foram guardadas em alíquotas de 50 µl a -20°C.

## 2.2- OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO PELOS FRAGMENTOS DE FÍGADO DE FETO DE RATO

### 2.2.1- Preparo do Meio

O meio de cultura BGJ<sub>b</sub><sup>(6)</sup>, foi obtido da Unidade de Preparações de Meios dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH-USA). Cada 100 ml do meio foi suplementado com 20 mg de glutamina e 5 mg de ascorbato. A concentração de glicose utilizada foi 10 mM. Esse meio foi filtrado através de filtros de membrana Swinnex (0,2 µm de poro) e estocado a 4°C.

### 2.2.2- Preparo dos Fragmentos de Fígado de Feto de Rato

Ratas Sprague Dawley foram decapitadas no 19º-20º dias de prenhez e seus fetos retirados utilizando-se materiais estéreis. Os fígados dos fetos foram colocados sobre um bloco de Teflon (5,6 x 5,6 x 0,7 cm) do cortador de tecidos McIlwain (Brickman Instruments). O bloco e a montagem da lâmina do aparelho foram previamente autoclavados. Os fígados fetais distendidos sobre o bloco foram cortados a intervalos de 0,9 mm. Girando-se o bloco de 90º, cortou-se novamente os órgãos no mesmo intervalo, obtendo-se fragmentos aproximadamente cubóides. Após esta operação, os fragmentos de fígado foram transferidos para um recipiente com meio de cultura estéril.

### 2.2.3- Cultura dos Fragmentos de Tecido

Dentre os fragmentos suspensos em meio BCJ<sub>b</sub>, os de tamanho uniforme (aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>) foram selecionados para cultivo em placas Costar (24 orifícios de 16mm de diâmetro) e placas de Petri (60 x 15 mm). As culturas em placas Costar foram empregadas para avaliar o efeito da cicloheximida na síntese das proteínas extracelulares e do MSA. Nesta placa, cada orifício contendo 0,2 ml do meio foram semeados dois fragmentos sobre um suporte de "nylon". Trocou-se o meio por 4 dias consecutivos, nos quais manteve-se uma atmosfera de 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono.

As placas de Petri serviram para a obtenção de grandes quantidades de meio condicionado, sendo que as cultu

ras foram iniciadas com 50 a 60 fragmentos de fígado dispersos em 3 ml do meio de cultura. O meio foi colhido diariamente e substituído por 6 ml de BGJ<sub>b</sub>.

### 2.3- DETERMINAÇÃO DE DNA, PROTEÍNAS FETAIS ESPECÍFICAS E MSA NO MEIO CONDICIONADO PELO FÍGADO DE FETO

Para testar a presença de albumina, alfa<sub>1</sub>-fetoproteína e MSA no meio condicionado pelos fragmentos de fígado de feto, utilizou-se o meio de cultura preparado em placas de Petri, descrito em 2.2.3. Usando-se alíquotas de cada coleta diária (durante 4 dias), a alfa<sub>1</sub>-fetoproteína e albumina foram quantificadas pelo método da eletroimuno difusão de Sizaret<sup>(87)</sup>; o MSA do meio foi quantificado pelo ensaio de receptor de membranas plasmáticas de fígado de rato (descrito em 2.7.2).

O conteúdo proteico do meio foi determinado fluorimetricamente<sup>(99)</sup> usando-se como padrão o SAB cristalizado (Armour).

O DNA foi medido no conteúdo de 6 placas de Petri do 4º dia de incubação pelo método fluorimétrico de Setaro e Morley<sup>(82)</sup>.

### 2.4- EFEITO DE INIBIDOR DE SÍNTESE PROTEICA NO MEIO DE CULTURA DE FÍGADO DE FETO

Para este teste foram usadas as culturas estabelecidas em placas Costar, descritas em 2.2.3. Depois das primeiras vinte e quatro horas de incubação, o meio foi co

lhido e substituído por meio contendo cicloheximida  $5 \cdot 10^{-5} M$ . Após uma incubação adicional de 24 horas, colheu-se o meio para a determinação de alfa<sub>1</sub>-fetoproteína e albumina pelo método de Sizaret<sup>(87)</sup> e MSA pelo ensaio de radiorreceptor em membranas plasmáticas de fígado de rato, descrito em 2.7.2.

#### 2.5- PURIFICAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO PELOS FRAGMENTOS DE FÍGADO DE RATO

Na purificação do meio condicionado pelos fragmentos de fígado de rato, utilizou-se uma coluna de Sephadex G-75 de 85 x 1,5 cm. com 150 ml de volume total, mantida a 4°C, inicialmente lavada com ácido acético 1 M contendo 1 mg/ml de SAB e depois equilibrada com ácido acético 1 M. Foram coletadas frações de 55 gotas (aproximadamente 2,5 ml), sendo que o volume de exclusão ( $V_0$ ) foi demarcado com o Ig A-<sup>125</sup>I e o volume interno, pela Cis-<sup>35</sup>S. Para a identificação das frações correspondentes ao MSA-BRL usou-se, na calibração da coluna, o MSA-BRL-II-1 e o MSA-BRL-III-2, marcados com <sup>125</sup>I.

O meio condicionado de 6 placas de Petri (60x15 mm) foi coletado em intervalos de 24 horas por 4 dias, e congelado a -20°C. Em cada coleta foram obtidos de 35 a 45 ml de meio. Para a purificação, todo o material foi liofilizado e retomado em 3 ml de ácido acético 2 M. O material insolúvel foi removido por centrifugação em microcentrífuga Beckman B (2 minutos), aplicando-se, a seguir, o sobrenadante claro na coluna de Sephadex G-75 calibrada. As frações eluídas correspondentes ao MSA-BRL (pico II e pico III) foram combinadas e liofilizadas. Os resíduos lio

filizados foram retomados em 4 ml de ácido acético 1 M, divididos e secos no concentrador Spinvac Savant e guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.6- CONTROLE DO MEIO PURIFICADO QUANTO À PRESENÇA DE PROTEÍNAS FIXADORAS DE SM

O ensaio foi desenvolvido em tubos cônicos 12x75 mm (Walter Sarstedt), no volume total de 0,4 ml com tampão fosfo-salino (pH 7,4) contendo 2 mg/ml de SAB (Sigma). Alií quotas das frações eluídas da coluna de Sephadex G-75 na filtração do meio condicionado foram incubadas na ausência e na presença de MSA-BRL em excesso (1,25 ng/ml). Paralelamente, como referência ensaiou-se 6,25  $\mu\text{l}$  de soro de rato normal, fonte de proteína fixadora de SM. Desta maneira, 100  $\mu\text{l}$  da amostra, 50  $\mu\text{l}$  do padrão de MSA-BRL (1,25 ng/ml) ou tampão (controle), 200  $\mu\text{l}$  de tampão e 50  $\mu\text{l}$  de MSA- $^{125}\text{I}$  (-20.000 cpm ou 200-500 pg) foram incubados por 3 horas, a  $30^{\circ}\text{C}$  ou por uma noite, a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Usou-se carvão ativado para separar o MSA- $^{125}\text{I}$  ligado à proteína e o MSA- $^{125}\text{I}$  livre. O carvão Norit (Mallinkrodt) foi ativado com solução a 2% de SAB (livre de ácidos graxos-Sigma) em tampão fosfo-salino (suspensão a 5%), deixando-se-o por 4 horas a  $0^{\circ}\text{C}$  ou  $4^{\circ}\text{C}$ , por uma noite.

Após a incubação, 0,5 ml de carvão ativado foi adicionado a cada tubo que, depois de agitado, foi mantido no gelo por 10 minutos. Seguiu-se uma centrifugação por 20 minutos em centrífuga Sorval RC-3 a 3000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados com pipetas Pasteur e transferidos para um tubo de vidro 12 x 75 mm.

A radioatividade do sobrenadante contendo o complexo proteína fixadora-MSA-<sup>125</sup>I foi determinada no espectrômetro gama. O sedimento com o MSA-<sup>125</sup>I foi descartado.

## 2.7- ENSAIOS POR COMPETIÇÃO DO MSA

### 2.7.1- Ensaio por competição usando Proteína Fixadora de SM

O conteúdo de MSA nas amostras foi avaliado pela inibição da ligação do MSA-<sup>125</sup>I às proteínas fixadoras de SM do soro de rato (separadas da SM endógena por filtração em gel Sephadex G-50). Trata-se basicamente do mesmo método descrito em 2.6. Usou-se soro de rato diluído a 1:16 (6,25 µl/tubo) e o ensaio foi desenvolvido conforme o esquema da Tabela A. A curva dose-resposta constou de 8 pontos com concentrações de 10 a 100 ng/ml de MSA BRL e MSA fetal (conteúdo relativo de MSA determinado pelo ensaio de receptor de membrana de fígado de rato).

A porcentagem de MSA-<sup>125</sup>I especificamente ligado foi determinada a partir da radioatividade total adicionada subtraindo-se a ligação inespecífica.

### 2.7.2- Ensaio por Radiorreceptor com Membranas Plasmáticas de Fígado de Rato

Membranas plasmáticas altamente purificadas foram obtidas de fígado de rato Sprague Dawley pelo método de Neville<sup>(57)</sup>.

Para o desenvolvimento do ensaio, MSA-BRL-<sup>125</sup>I, padrão de MSA-BRL e amostras de MSA fetal (preparações 6/12 e 13/12), foram pipetadas em duplicata em microtubo (Beckman) de 0,4 ml<sup>(68)</sup>. De acordo com o protocolo ilustrado na Tabela A, o volume final de incubação foi de 150 µl, no qual o SAB estava presente na concentração de 10 mg/ml, em tampão fosfato Krebs Ringer (KRP), pH 7,4. Tampão KRP com 0,3% de SAB foi usado nas diluições do padrão de MSA-BRL e do MSA fetal ao passo que KRP com 3% de SAB foi usado para preparar o traçador (-10.000 cpm ou 200 picogramas). As membranas plasmáticas conservadas a -40°C em volume de 0,2 ml, foram diluídas com KRP sem SAB, procurando-se obter uma mistura homogênea, o que é conseguido fazendo-se passar a suspensão de membranas através de seringa e agulha. Após todas as adições, os microtubos foram agitados e incubados em banho de água a 20-22°C por 90 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados por 1 minuto, em microcentrífuga Beckman B; o sobrenadante foi aspirado e descartado e a extremidade contendo o fimo sedimentado de membranas foi cortada com uma lâmina. A radioatividade associada às membranas foi quantificada em espectrômetro gama (Searle 1285) com 85% de eficiência.

Nessa determinação, a ligação inespecífica foi definida como a radioatividade associada ao sedimento na presença de 100 ng/ml de padrão de MSA-BRL e foi subtraída da radioatividade do MSA-<sup>125</sup>I total ligado, para que fosse obtida a ligação específica.

### 2.7.3- Radioimunoensaio do MSA

Para o desenvolvimento do radioimunoensaio foram utilizados tubos de propileno (LKB) e tampão borato-sali

Tabela A  
Protocolo dos ensaios por competição do MSA

Tubo nº	Tampão µl			Concentração do padrão ou amostra padrão de MSA ng/ml			Volume do padrão ou amostra µl			Concentração final de MSA ng/ml			MSA- <sup>125</sup> I µl			Ligante proteico µl		
	EPF*	ERR**	RIE***	EPF	ERR	RIE	EPF-ERR-RIE	EPF	ERR	RIE	EPF-ERR-RIE	EPF	ERR	RIE				
1	250	50	250	-	-	-	-	-	-	-	50	100	50	100				
2	200	-	200	80	3	8	50	10	1	1	50	100	50	100				
3	200	-	200	160	15	16	50	20	5	2	50	100	50	100				
4	200	-	200	400	30	20	50	50	10	2,5	50	100	50	100				
5	200	-	200	600	60	40	50	75	20	5	50	100	50	100				
6	200	-	200	800	150	80	50	100	50	10	50	100	50	100				
7	200	-	200	2000	300	120	50	250	100	15	50	100	50	100				
8	200	-	200	4000	-	160	50	500	-	20	50	100	-	100				
9	200	-	200	8000	-	240	50	1000	-	30	50	100	-	100				
10	-	-	350	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-				

\* EPF - Ensaio da proteína fixadora de SM  
 \*\* ERR - Ensaio por radioreceptor  
 \*\*\* RIE - Radioensaio

no 0,05 M, pH 8,5 contendo 1% de SAB(Sigma).Conforme a Ta bela A foram pipetados 50  $\mu$ l do padrão (MSA-BRL)ou do desconhecido (preparações de MSA fetal), seguidos de 200  $\mu$ l de gamaglobulina bovina(2 mg/ml), 100  $\mu$ l de soro de coelho anti-MSA-BRL 1:250 (obtido conforme Vaitukaitis<sup>(102)</sup> e 50  $\mu$ l de MSA-<sup>125</sup>I (20.000-50.000 cpm ou 150-500 pg). Após agitação, os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por uma hora e a seguir incubados a 4°C por 72 horas. A incubação foi finalizada com a adição de 0,4 ml de solução a 4°C de polietileno glicol (PEG) 6.000 (Baker) a 20% no tampão borato-salino. As amostras foram agitadas vigorosamente e em seguida centrifugadas por 30 minutos a 3000 rpm, a 4°C, em centrífuga Sorval RC-3. Os sobrenadantes foram aspirados cuidadosamente e descartados. Os precipitados foram lavados com solução a 4°C de 0,8-1,0 ml de PEG a 12% em tampão borato-salino e recentrifugados a 3000 rpm, por 20 minutos. Os sobrenadantes foram aspirados e os precipitados de PEG foram contados em contador gama Beckman 3000 com 82% de eficiência. O branco foi de terminado na ausência de soro anti-MSA-BRL e subtraído de cada resultado.A ligação específica máxima ( $B_0$ ) foi determinada na ausência do peptídeo competidor.

## 2.8- ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO MSA

### 2.8.1- Incorporação da Timidina-<sup>3</sup>H no DNA de Fibroblastos de Embrião de Galinha<sup>(58,68)</sup>

Em placas de Petri de 60 mm (Falcon) foram distribuídas culturas terciárias de fibroblastos de embrião de galinha, a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/placa, em 0,2%

de meio Eagle contendo 20% (v/v) de caldo de fosfato triplo (Difco) e 0,2% (v/v) de soro fetal de vitelo (Gibco). O meio foi retirado das placas depois de 4 dias de incubação e substituído pelas soluções a serem ensaiadas. Assim, diluições de MSA-BRL (0,03 a 0,4 ng/ml) e de MSA fetal em 3 ml de meio Eagle com 0,25% de BSA foram aplicadas em culturas paralelas para a curva dose-resposta. A placa de controle, cujo conteúdo era apenas as células em meio de cultura, foi incubada também em duplicata. Depois de 12 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, o meio em estudo foi substituído por 2 ml de meio Eagle contendo 0,2 µCi/ml de timidina-<sup>3</sup>H e incubado por uma hora. O meio radioativo foi removido e as culturas foram lavadas duas vezes com solução fosfo-salina a 4°C, uma vez com 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 10% a 4°C e outra com 3 ml de etanol éter (3:1). As células da placa foram dissolvidas com NaOH 0,2 N e uma alíquota foi adicionada ao meio de cintilação Aquasol (New England Nuclear). A incorporação da radioatividade no material ácido precipitável, representando o DNA sintetizado<sup>(63)</sup> foi medida no sistema cintilador Mark II (Nuclear Chicago) com eficiência de 60%. Traçou-se uma curva dessa medida contra as concentrações de MSA.

#### 2.8.2- Estímulo de Multiplicação dos Fibroblastos de Embrião de Galinha

Culturas terciárias de fibroblastos foram distribuídas no meio Eagle 0,2% a uma densidade de  $7,05 \times 10^5$  células/placa de Petri de 60 mm. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio Eagle contendo 0,25% de SAB (controle), MSA-BRL (2,5 µg/ml), MSA fetal (5 µg/ml - conteúdo apa

rente de MSA) ou soro de feto de vitelo (2% v/v). Depois de incubadas por mais 96 horas, as células foram liberadas das placas (em duplicata) por tripsinização (tripsina a 0,25%) e contadas no Contador de Partículas (Particle Data Inc.).

### 2.8.3- Incorporação de Sulfato na Cartilagem Costal de Ratos Hipofisectomizados <sup>(64)</sup>

Este bioensaio foi realizado pelo Dr. Phillips da Northwestern University Medical School, Chicago, Illinois, USA.

## 2.9- ENSAIOS DA ATIVIDADE INSULINO-SÍMILE DO MSA

### 2.9.1- Oxidação de Glicose em Adipócitos Isolados de Ratos <sup>(45,77)</sup>

Ratos Sprague Dawley machos (100-180 g) foram anestesiados com éter e decapitados, tendo sido então removidos os coxins de gordura do epidídimo. Estes foram cortados em diversos pedaços e digeridos a 37°C, sob agitação moderada em tampão bicarbonato Krebs Ringer (KRB) contendo 2 mg/ml de colagenase (Worthington Biochemical Corp.). O tampão KRB usado em todas as experiências continha NaCl 118 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM e NaHCO<sub>3</sub> 25 mM. O pH foi ajustado a 7,4 com NaOH depois que o tampão foi equilibrado com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 40-60 minutos, os adipócitos isolados foram separados do debris por filtração em crivo de seda. As células foram lavadas três vezes em tampão KRB e ressuspensas no mesmo tampão contendo 2% de SAB.

Bioensaio - A oxidação de glicose foi avaliada pela conversão de glicose-(U- $^{14}$ C) a  $^{14}$ CO<sub>2</sub>. Assim, 0,2 ml de suspensão gordurosa foi adicionada a 1,8 ml de tampão KRB (com SAB) contendo 0,3 mM de glicose e 10  $\mu$ Ci de glicose-(U- $^{14}$ C) (New England Nuclear). Os elementos dosados, ou seja, insulina porcina (Elanco Products Co), MSA-BRL e duas preparações de MSA fetal, foram colocados em frascos de polietileno. Os frascos de incubação foram gaseificados com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, hermeticamente fechados e incubados no agitador metabólico a 37°C, por duas horas. No final da incubação os conteúdos dos frascos foram acidificados com 0,3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N e o  $^{14}$ CO<sub>2</sub> liberado foi coletado em 0,2 ml de hidróxido de hiamina. Para a curva dose-resposta diluiu-se a insulina porcina no intervalo de 0,1 - 1,6 ng/ml, o MSA-BRL, de 20 - 1000 ng/ml e o MSA fetal, de 100 - 3000 ng/ml.

#### 2.9.2- Ensaio por Radiorreceptor Específico para Insulina Usando-se Linfócitos Humanos Cultivados (20,72,73)

O tampão do ensaio constituiu-se de Hapes 100 mM (pH 8,0), NaCl 120 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KCl 2,5 mM, NaO<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 15 mM, glicose 10 mM, EDTA 1 mM e 1 mg/ml de SAB. O traçador de insulina- $^{125}$ I, o hormônio não-marcado e as células foram diluídos no referido tampão. Estas substâncias foram adicionadas em pequenos volumes, dando o volume final de 0,5 ml: a insulina- $^{125}$ I (traçador), na concentração de 145 pg/ml (-10.000 cpm), insulina porcina, MSA-BRL, MSA fe

tal, e linfócitos humanos IM-9 (concentração final de  $12,7 \times 10^6$  células/ml). Depois de 90 minutos a  $15^\circ\text{C}$ , alíquotas de 200  $\mu\text{l}$  foram pipetadas sobre 200  $\mu\text{l}$  de tampão HEPES a  $4^\circ\text{C}$ , em tubos plásticos de microcentrífuga de 0,4 ml. Após centrifugação de 1 minuto em microcentrífuga Beckman B, os sobrenadantes foram aspirados e descartados e a radioatividade do precipitado celular foi contada.

A ligação total diz respeito à radioatividade associada ao precipitado celular, no qual as células foram incubadas somente com o traçador de insulina. A fração não-específica foi determinada como a radioatividade associada com o precipitado celular, ao incubar-se as células com o traçador na presença de excesso de insulina não-marcada (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). A ligação específica foi a diferença entre a ligação total e a não-específica.

## 2.10- DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DO MSA FETAL

Para este propósito foi usada a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS). Placas de gel de 1,27 mm (Acqueboque) com 17% de poliacrilamida e SDS foram preparadas de acordo com o método de Laemmli<sup>(46)</sup> modificado por Weintraub<sup>(107)</sup>, com exceção de que no tampão das amostras de MSA fetal não foi colocado o agente redutor beta-mercaptanol e as amostras de MSA fetal não foram fervidas antes da aplicação no gel. Foi usado o fenol vermelho como cor de referência e uma voltagem constante de 150 volts.

Foi utilizado o método de Blakesley e Boezi<sup>(8)</sup> para a visualização das bandas proteicas, empregando-se o azul brilhante Coomassie G-250 (xileno brilhante cianina G, ICN Pharmaceutical Inc., N.Y.).

Para a identificação do MSA fetal, os geis foram cortados em segmentos de 1 mm e eluído com 0,5 ml de tampão borato-salino 0,05 M, pH 8,5, contendo 1% de SAB. Desenvolveu-se o ensaio de receptor em membranas de fígado de rato com alíquotas do eluato.

### 3. RESULTADO

#### 3.1- PURIFICAÇÃO DO MSA-BRL

A primeira fase da purificação do MSA-BRL, através da cromatografia em resina de troca iônica, resultou em um enriquecimento da atividade em cerca de 5 vezes. A purificação subsequente em Sephadex G-75 em ácido acético 1 M, resultou em MSA-BRL 50 vezes mais purificação do que o material inicial.

Três regiões com atividades biológicas foram recuperadas do Sephadex G-75. Estas regiões foram designadas como picos I, II e III, com base no seu perfil de eluição e na mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida em uréia 9 M, pH 2,7. O eletroforetograma das frações de MSA-BRL selecionadas da coluna de Sephadex G-75 é mostrado na Fig. 1. O pico I apresentou uma banda maior e algumas pequenas bandas proteicas coloridas, enquanto que o pico II consistiu de quatro bandas com valores de Rf de 0,42 a 0,48 (relativamente ao corante) e o pico III de duas bandas mais distintas. O MSA-BRL-II mostrou uma atividade específica superior a 50 vezes a do meio condicionado<sup>(58)</sup> e este pico foi usado como padrão nas experiências.

Com relação à purificação de MSA-BRL marcado com  $^{125}\text{I}$  envolvendo dois sistemas cromatográficos, Sephadex G-25 e Sephadex G-75, o primeiro sistema não discriminou os picos de MSA-BRL- $^{125}\text{I}$  e albumina marcada, mas a separação do iodo livre foi bem evidente. Entretanto, no segundo sistema houve uma separação nítida de MSA-BRL- $^{125}\text{I}$  da albumina radioativa. A fração do MSA-BRL- $^{125}\text{I}$ , que no en

Fig. 1- Padrão eletroforético do MSA-BRL em gel de poliacrilamida em pH ácido, observando-se as 7 espécies biologicamente ativas: uma situa-se no pico I, quatro situam-se no pico II(II-1,2,3,4) e duas no pico III(III-1,2). O MSA-BRL foi obtido da purificação em Sephadex G-75. A coloração de referência está representada por uma flecha vertical.

saio de radiorreceptor mostrou maior ligação total, maior razão entre ligação específica e não específica e maior sensibilidade, foi selecionada para as experiências de ensaios competitivos e analíticos. Cada preparação foi estável por aproximadamente 4 semanas.

### 3.2- DETERMINAÇÃO DE DNA, PROTEÍNAS ESPECÍFICAS E MSA NO MEIO CONDICIONADO PELO FÍGADO DE FETO DE RATO

O conteúdo em DNA de seis placas de cultura, determinado no quarto dia, foi de 4,8 mg.

A alfa<sub>1</sub>-fetoproteína, a albumina e o MSA, determinados em alíquotas colhidas do primeiro ao quarto dia após

o estabelecimento das culturas dos fragmentos de fígado fetal, foram produzidas em quantidades relativamente constantes do 2º ao 4º dia (Tab. 1).

Tabela 1

Liberação de alfa<sub>1</sub>-feto-proteína, albumina e MSA pe los tecidos de fígado de feto de rato em cultura.

Dias em cultura	Coleta diária ml/placa	Concentração do meio condicionado-ug/ml		
		alfa <sub>1</sub> -fetoproteína	albumina	MSA*
1	3	105	283	5,3
2	6	63	178	2,0
3	6	46	118	3,7
4	6	43	127	2,0

\* Determinado pelo ensaio de receptor de membranas de fígado de rato.

### 3.3- EFEITO DE INIBIDOR DE SÍNTESE PROTEICA NO MEIO DE CULTURA DE FÍGADO FETAL

Os dados da Tabela 2 mostram que o meio condicionado tratado com cicloheximida, inibidor de síntese proteica, apresentou um decréscimo em relação ao controle na concentração de albumina, alfa<sub>1</sub>-fetoproteína e MSA fetal, que variou de 80%, 80% e 96,5%, respectivamente.

Tabela 2

Efeito da cicloheximida no meio de cultura de tecidos de fígado de feto de rato.

Proteína	Concentração do meio condicionado µg/ml/24 horas	
	Controle	Tratado com cicloheximida
alfa <sub>1</sub> -fetoproteína	20,0	4,0
albumina	38,0	7,6
MSA fetal	0,11	< 0,005

### 3.4- PURIFICAÇÃO PARCIAL DO MSA FETAL

A coluna de gel Sephadex G-75 foi calibrada com MSA-BRL (picos II e III) marcado com <sup>125</sup>I. Como mostra a Fig. 2, as frações 25-40 englobaram os dois picos de MSA-BRL-<sup>125</sup>I. Na purificação do meio condicionado pelo fígado de feto, a mistura das frações 25-40 foi usada nos estudos subsequentes, representando o "MSA fetal", parcialmente purificado em Sephadex G-75.

### 3.5- CONTROLE DO MEIO PURIFICADO QUANTO À PRESENÇA DE PROTEÍNAS FIXADORAS DE SM

Como se observa na Fig. 3, as frações 16-24 eluídas do Sephadex G-75 na filtração do meio condicionado mostra

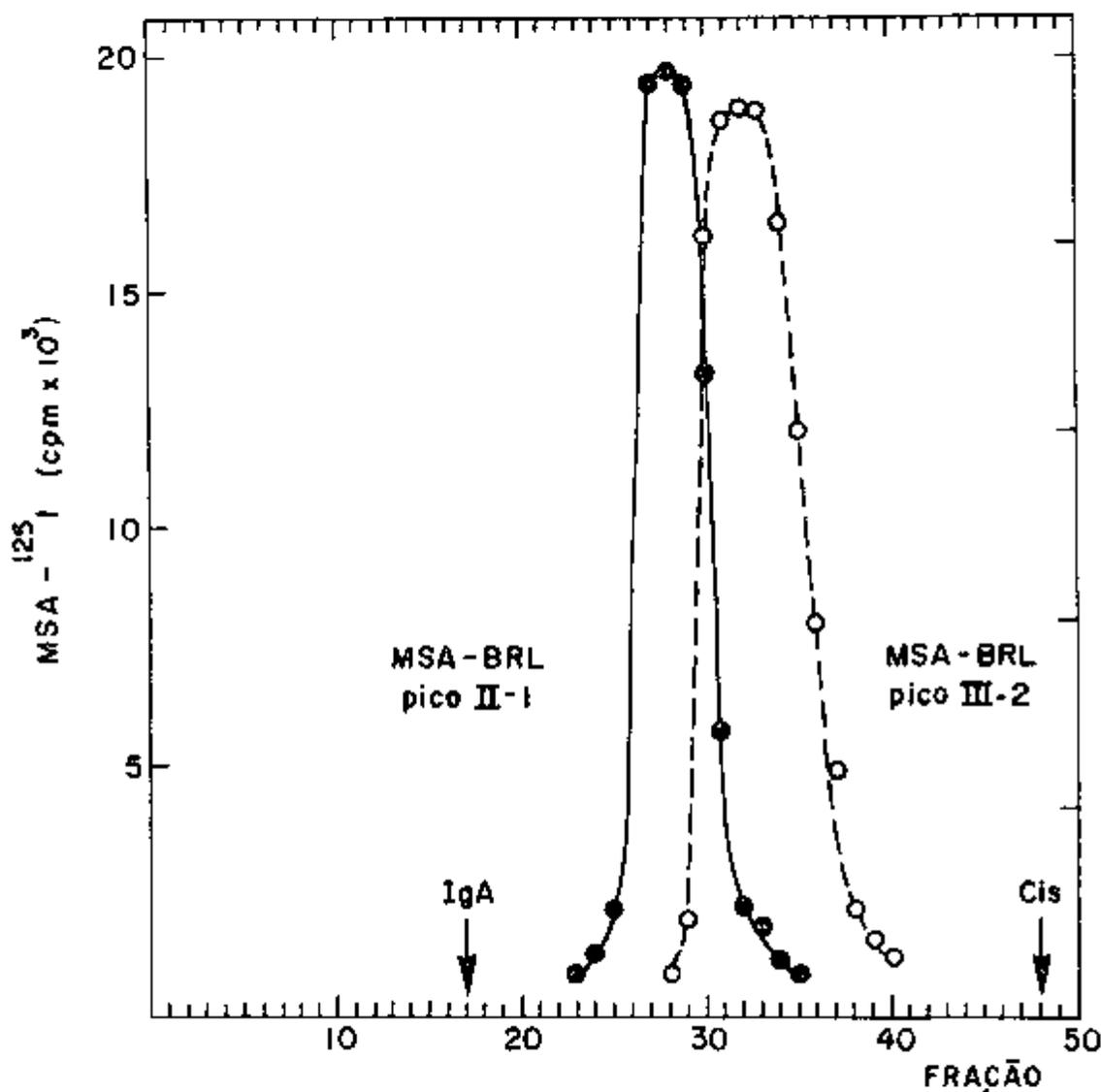


Fig. 2- Calibração da coluna de Sephadex G-75 com MSA-BRL- $^{125}\text{I}$ . As frações contendo MSA-BRL picos II e III, marcado com  $^{125}\text{I}$  foram situadas na eluição em coluna de Sephadex G-75 de 85 x 1,5 cm (volume de 150 ml), com ácido acético 1 M. O volume de exclusão ( $V_0$ ) está representado pelo Ig-A e o volume interno ( $V_i$ ) pela  $^{35}\text{S}$ -Cis. O meio coletado das culturas de fígado fetal durante 4 dias, foi usado como fonte do MSA fetal para a purificação em Sephadex G-75.

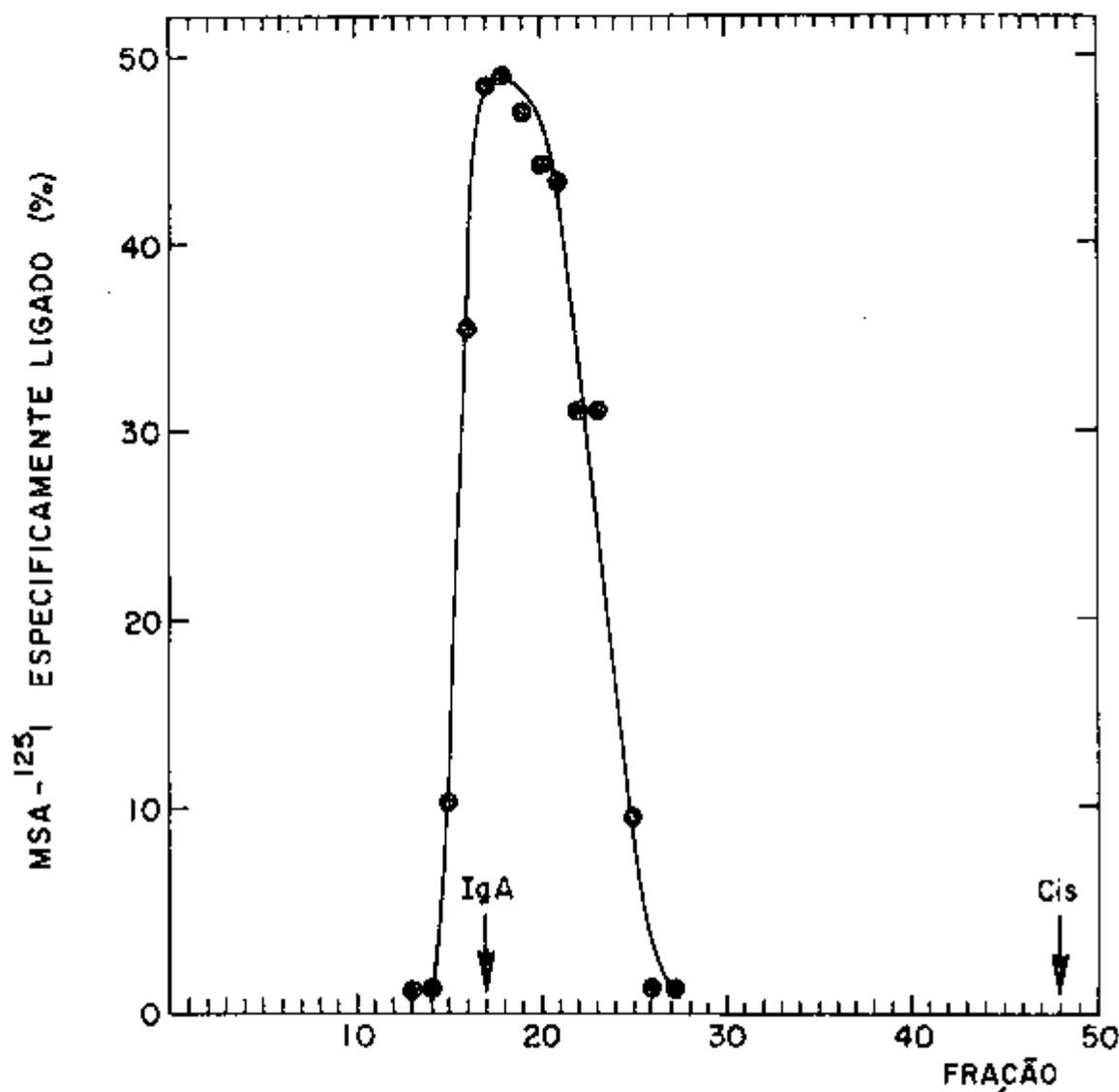


Fig. 3- Atividade inibitória da ligação do MSA-<sup>125</sup>I no filtrado do meio condicionado pelos fragmentos de fígado de feto de rato. Aliquotas das frações coletadas na filtração em gel Sephadex G-75 do meio condicionado pelos fragmentos de fígado de feto de rato foram liofilizadas e ensaiadas para testar a atividade de proteína fixadora de SM. Esta atividade está representada pela porcentagem de MSA-BRL-<sup>125</sup>I especificamente ligado.

ram uma atividade inibitória da ligação do  $MSA^{-125}I$  evidenciando a presença de proteína fixadora de SM nestas frações, enquanto que as frações 25-40 não mostraram nenhuma inibição. Nesse ensaio a ligação inespecífica foi de 5-7%. Por outro lado, o soro de rato (usado como referência), no mesmo ensaio, apresentou 35,2% de ligação específica.

### 3.6- ENSAIOS DE LIGAÇÃO COMPETITIVA DO MSA

#### 3.6.1- Ensaio de Ligação Competitiva Usando Proteína Fixadora de SM

Como mostra a Fig. 4, as curvas dose-resposta de MSA-BRL e MSA fetal foram idênticas. Nesse sentido, 100% da ligação específica corresponderam a 5,86% da radioatividade colocada. Esta ligação específica máxima foi representada contra a concentração de MSA-BRL não-marcado ou equivalente de MSA (ng/ml).

#### 3.6.2- Ensaio por Radiorreceptor com Membranas Plasmáticas de Fígado de Rato

Os preparados de MSA fetal purificados em Sephadex G-75 e MSA-BRL inibiram a ligação do  $MSA^{-125}I$  aos receptores de membranas plasmática de fígado de rato, na mesma extensão e com curvas dose-resposta paralelas (Fig. 5). O conteúdo de cada preparação de MSA fetal foi determinado mediante ensaios de radiorreceptor, sendo que nestes ensaios 50% da ligação do  $MSA-BRL^{-125}I$  corresponderam a

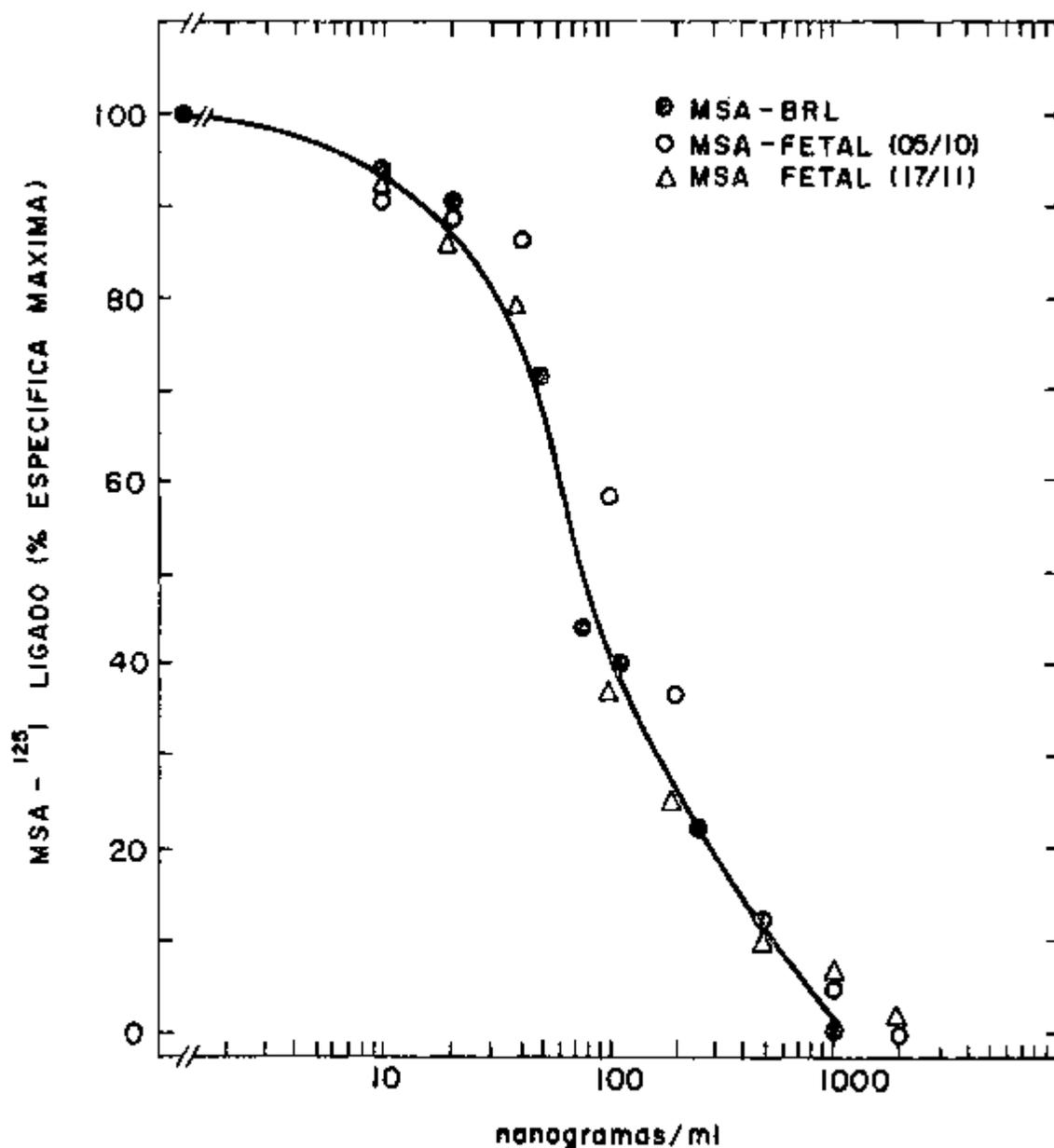


Fig. 4- Ensaio competitivo de MSA-BRL e MSA fetal na ligação do MSA-<sup>125</sup>I à proteína fixadora de somatomedina. Soro de rato normal (6,25  $\mu$ l) foi incubado com o MSA-<sup>125</sup>I e as concentrações indicadas de MSA-BRL ou preparações de MSA fetal purificadas em Sephadex G-75. 100% da ligação específica correspondeu a 5,86% da radioatividade colocada.

8-12 ng/ml do padrão de MSA-BRL. O MSA fetal determinado neste ensaio constituiu aproximadamente 5% da proteína total de cada preparação.

### 3.6.3- Radioimunoensaio do MSA-BRL

Na Fig. 6, onde os valores percentuais da razão  $B/B_0$  estão em escala logito versus as concentrações de MSA-BRL ou MSA fetal, observa-se que as curvas de MSA fetal são quase paralelas à curva padrão, demonstrando que o MSA fetal está relacionado imunologicamente ao MSA-BRL. Verifica-se que o efeito inibitório de 50% correspondeu a 6,5 ng/ml com o MSA-BRL e a 20,0 e 26,0 ng/ml com as preparações de MSA fetal. O valor do branco, determinado na ausência de soro anti-MSA resultou em 3,3% da radioatividade colocada, enquanto a ligação específica máxima ( $B_0$ ) determinada na ausência de competidor foi de 28,8%.

## 3.7- ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO MSA

### 3.7.1- Incorporação da Timidina-<sup>3</sup>H no DNA de Fibroblastos de Embrião de Galinha

O MSA fetal e o MSA-BRL estimularam cerca de três vezes a incorporação da timidina-<sup>3</sup>H no DNA de culturas terciárias de fibroblastos de embrião de galinha, mostrando curvas dose-resposta idênticas (Fig. 7). Com efeito, a incorporação de 4 placas controle variou de  $5 \times 10^3$  a  $7,5 \times 10^3$  cpm e a incorporação a 50% da máxima obtida foi de aproximadamente  $15 \times 10^3$  cpm.

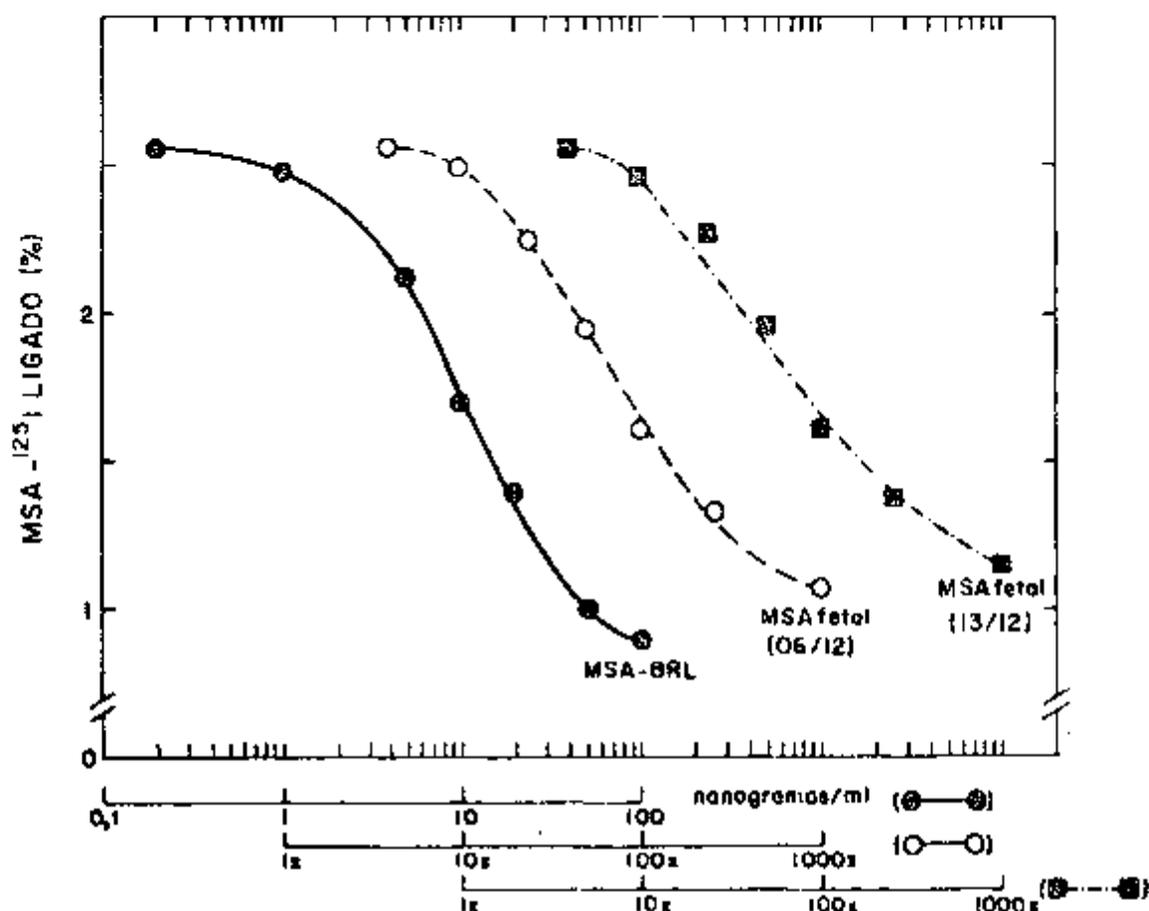


Fig. 5- Ensaio competitivo do MSA-BRL e MSA fetal na ligação do MSA-<sup>125</sup>I às membranas plasmáticas de fígado de rato. No ensaio com receptor de MSA nas membranas plasmáticas de fígado de rato, o MSA-BRL e o MSA fetal (preparações de 6/12 e 13/12) foram adicionados, respectivamente, nas concentrações indicadas absolutas (nanograma/ml) ou relativas (x). A porcentagem de MSA-<sup>125</sup>I ligado está representada no gráfico contra a concentração de MSA-BRL e MSA fetal.

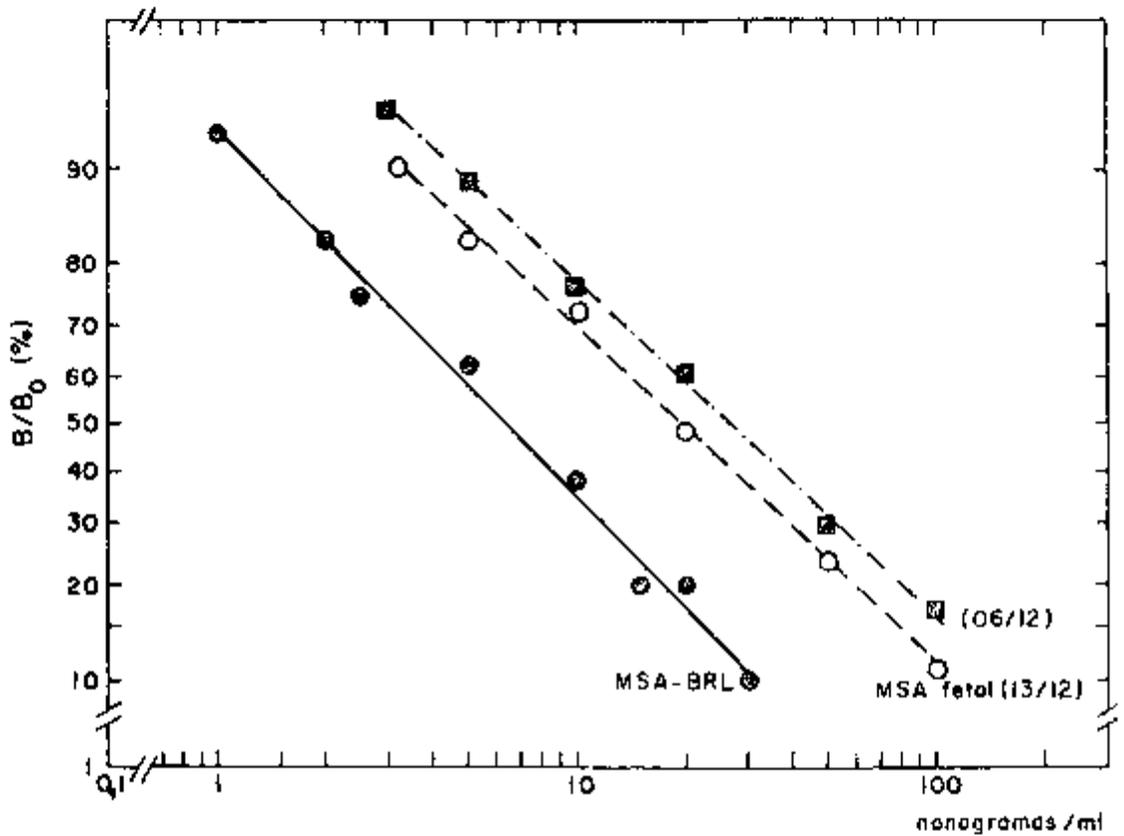


Fig. 6- Radioimunoensaio de MSA-BRL e MSA fetal usando anti-soro de coelho anti-MSA. A ligação específica máxima ( $B_0$ ) determinada na ausência do peptídeo competidor foi de 28,8% da radioatividade adicionada. B é a ligação específica de cada concentração de peptídeo competidor. A razão  $B/B_0$  está representada no gráfico contra a concentração de MSA-BRL ou MSA fetal (duas preparações purificadas em Sephadex G-75).

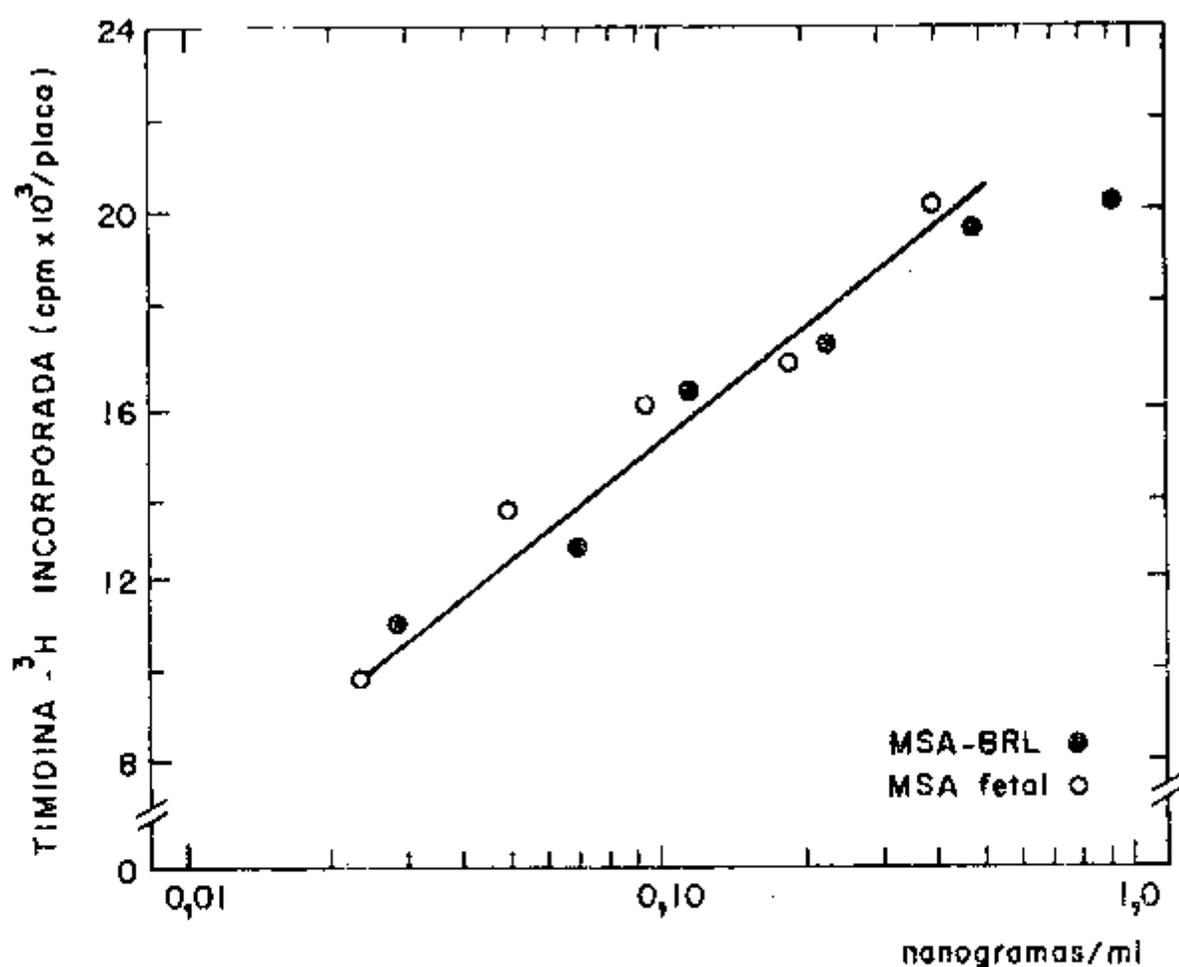


Fig. 7- Incorporação da timidina-<sup>3</sup>H no DNA de fibroblastos de embrião de galinha, induzida pelo MSA-BRL e MSA fetal. Utilizando-se culturas terciárias de fibroblastos de embrião de galinha, a timidina-<sup>3</sup>H incorporada ao DNA foi determinada pela radioatividade do material ácido precipitável, conforme descrito em métodos. O comportamento idêntico do MSA-BRL e MSA fetal foi mostrado pela superposição das curvas dose-resposta.

O MSA fetal (5  $\mu\text{g/ml}$ ) também estimulou a multiplicação de fibroblastos de embrião de galinha cultivados sem soro (Tabela 3). A magnitude de estímulo foi similar àquela obtida com 2% de soro de feto de vitelo e ligeiramente menor do que com 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de MSA-BRL.

Tabela 3

Estímulo da multiplicação de Fibroblastos de embrião de galinha.

Polipeptídeo adicionado	Concentração	Número de células/placa
Meio (controle)	-	$6,3 \times 10^3$
MSA-BRL	2,5 $\mu\text{g/ml}$	$12,85 \times 10^5$
MSA fetal	5 $\mu\text{g/ml}$	$10,05 \times 10^5$
Soro fetal de vitelo	2% (v/v)	$10,05 \times 10^5$

### 3.7.2- Incorporação de Sulfato na Cartilagem Costal de Ratos Hipofisectomizados

O MSA fetal, o MSA-BRL e o soro de rato estimulam a incorporação de sulfato na cartilagem costal de ratos hipofisectomizados (Tabela 4). Já com as menores concentrações testadas, 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de MSA-BRL e 0,27  $\mu\text{g/ml}$  de MSA fetal, nota-se um nítido estímulo.

Tabela 4

Avaliação do estímulo da captação de sulfato na cartilagem costal de ratos hipofisectomizados "in vitro".

Material adicionado	Concentração	Captação $SO_4$ ( $\mu g/$ 100 mg peso seco) Média $\pm$ E.P.**
Controle	- -	12,7 $\pm$ 1,1
Soro de rato	0,2% (v/v)	27,9 $\pm$ 3,4
Soro de rato	1,0% (v/v)	30,1 $\pm$ 4,1
Soro de rato	5,0% (v/v)	32,1 $\pm$ 4,2
MSA-BRL(pico II)	0,2 $\mu g/ml$	19,7 $\pm$ 1,2
MSA-BRL(pico II)	1,0 $\mu g/ml$	22,1 $\pm$ 2,2
MSA-BRL(pico II)	5,0 $\mu g/ml$	26,0 $\pm$ 3,8
MSA fetal(13/12)	0,27 $\mu g/ml$ *	25,0 $\pm$ 2,2
MSA fetal(13/12)	1,33 $\mu g/ml$	27,0 $\pm$ 1,8
MSA fetal(13/12)	6,67 $\mu g/ml$	20,7 $\pm$ 2,7

\* Conteúdo de MSA baseado no ensaio de receptor de membranas plasmáticas de fígado de rato.

\*\* E.P. - erro padrão.

### 3.8- ENSAIOS DE ATIVIDADE INSULINO-SÍMILE

O MSA fetal exibiu fraca atividade insulino-símile no bioensaio da oxidação da glicose em adipócitos isola

dos de rato em comparação com a insulina porcina (Fig. 8). Duas preparações de MSA fetal (5/10 e 17/11) exibiram atividades 14 e 94 mU/mg, ao passo que o MSA-BRL e a insulina porcina mostraram 47 mU/mg e 25 U/mg, respectivamente. Assim, a potência insulino-símile de MSA fetal (0,06-0,38% da insulina) é similar à da MSA-BRL (0,19% da potência da insulina).

A fraca atividade insulino-símile do MSA fetal foi vista não somente no bioensaio de adipócitos, mas também na sua fraca inibição da ligação da insulina-<sup>125</sup>I (porcina) aos receptores da linhagem celular IM-9 de linfoblastóides humanos. Deste modo, na experiência da Fig. 9, o MSA-BRL mostrou uma potência de 0,74% como inibidor da ligação da insulina, comparando-se com a potência da insulina porcina; o MSA fetal acusou uma potência relativa de 0,09%.

### 3.9- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Como está ilustrado na Fig. 10, a atividade do MSA fetal (equivalente a 25% da atividade aplicada) foi recuperada na porção do gel ligado ao citocromo C (PM 12.500) e à cadeia A da insulina (PM 2.200), onde está incluído o peptídeo II do MSA-BRL (PM 8.700).

Os Rfs foram calculados em relação à migração do fenol vermelho e o MSA fetal, de acordo com a atividade determinada pelo ensaio de receptor de membranas de fígado de rato, situou-se entre 0,47 e 0,62, aproximadamente.

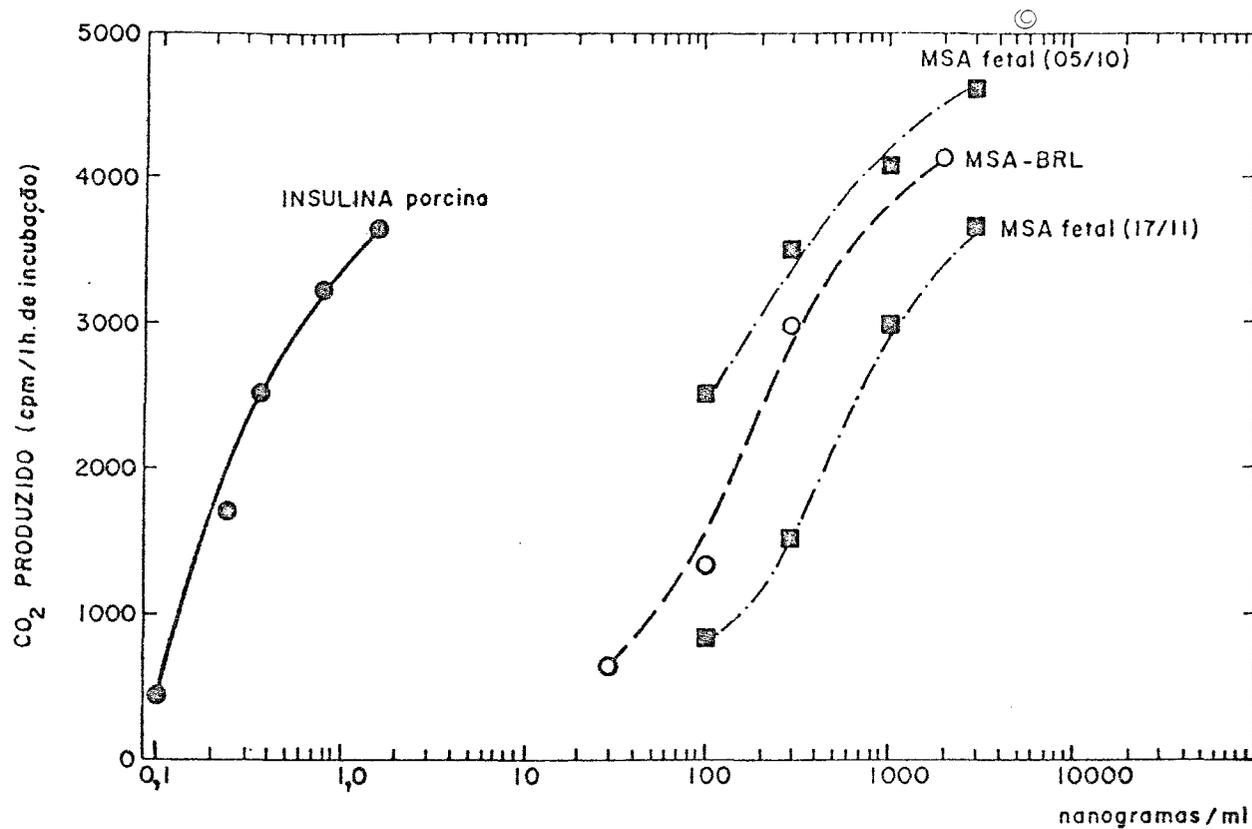


Fig. 8- Estímulo da oxidação da glicose em adipócitos isolados de rato pela insulina porcina, MSA-BRL e MSA fetal. A atividade insulino-símile foi mensurada pela conversão da glicose [U- $^{14}$ C] a  $\text{CO}_2$ . A insulina porcina, MSA-BRL e duas preparações de MSA fetal (5/10 e 17/11) foram adicionadas nas concentrações indicadas. A radioatividade do  $^{14}\text{CO}_2$  representada no gráfico corresponde à que foi produzida em uma hora de incubação.

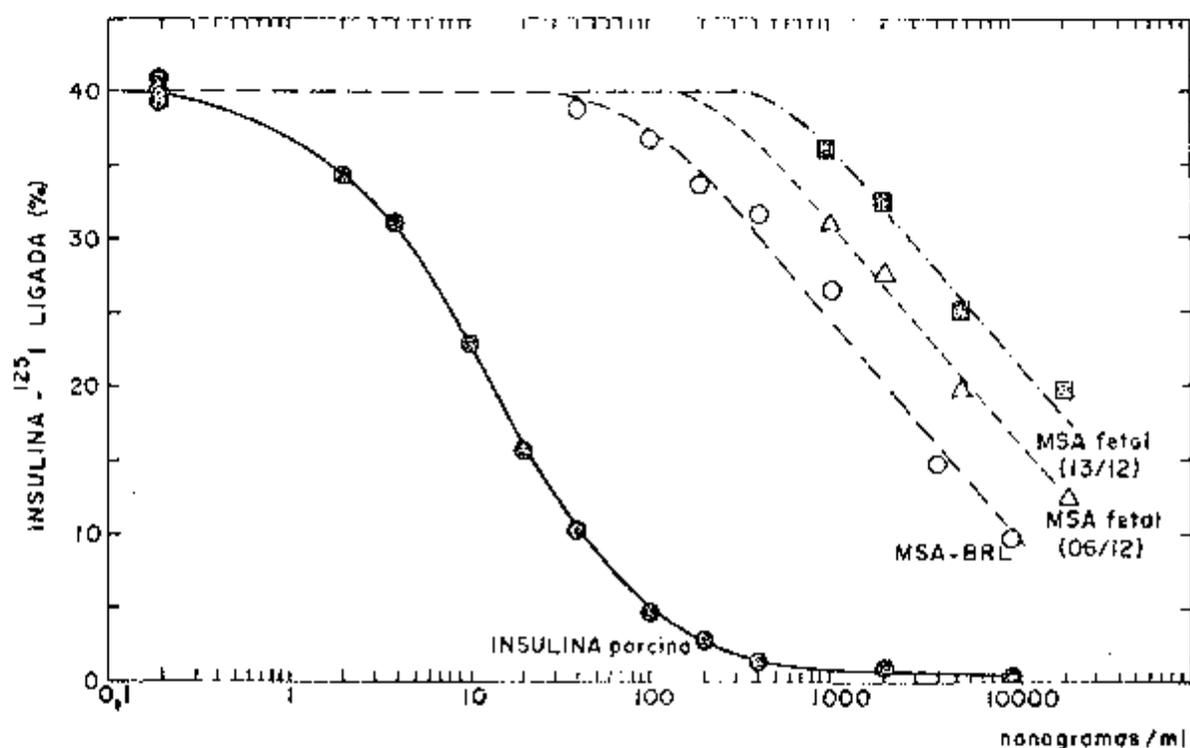


Fig. 9- Competição da insulina, MSA-BRL e MSA fetal na ligação da insulina- $^{125}\text{I}$  aos receptores de insulina nos linfócitos humanos cultivados (IM-9). A insulina porcina, o MSA-BRL e o MSA fetal (preparações de 6/12 e 13/12) foram incubados com insulina marcada e linfócitos cultivados ( $12,7 \times 10^6$  células/ml). A porcentagem da insulina ligada está representada no gráfico contra a concentração do peptídeo.

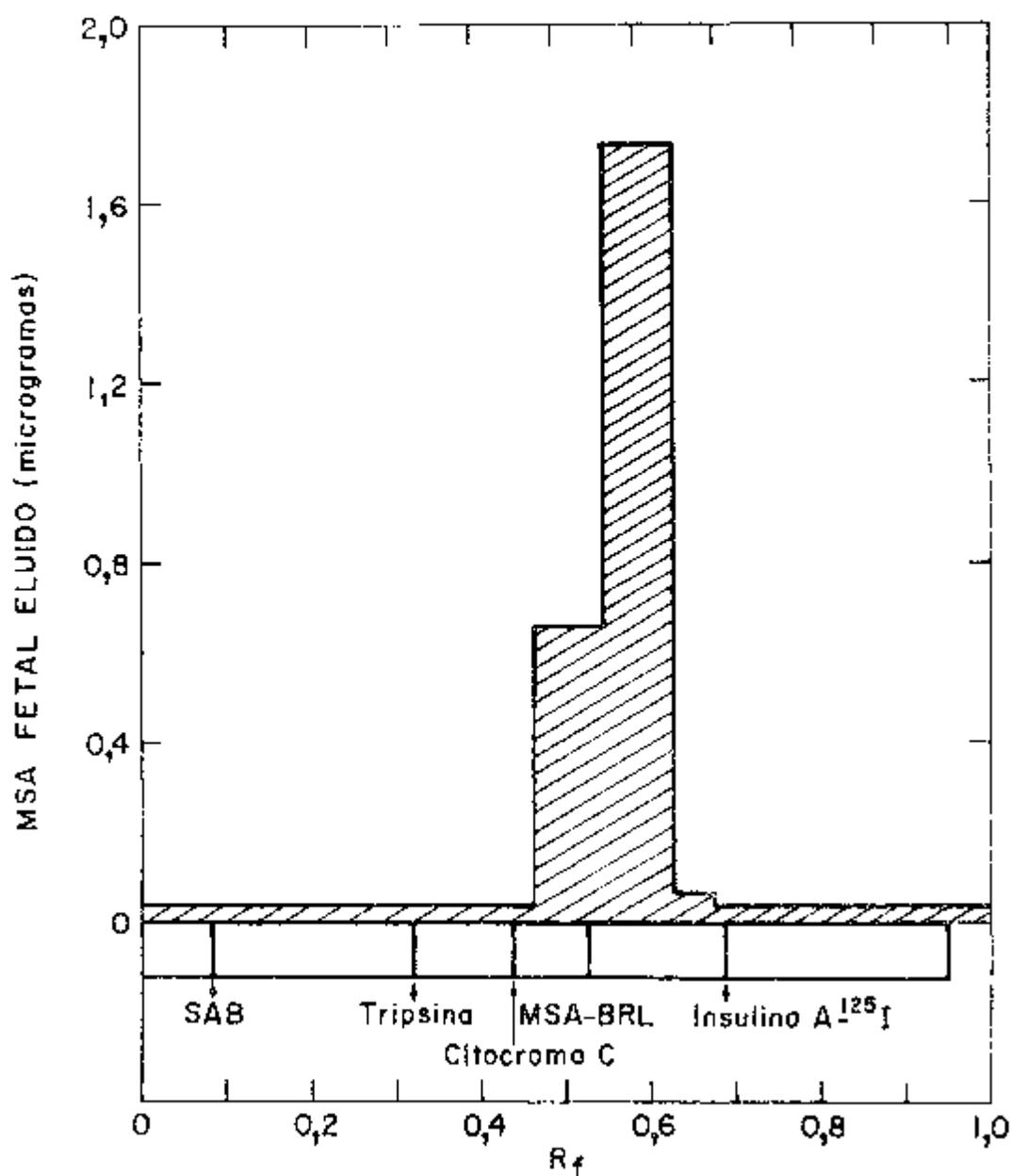


Fig. 10- Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. O peso molecular das proteínas marcadoras foram: SAB, 68.000; tripsina, 23.500; citocromo C, 12.500; MSA-BRL-II-1, 8.700; cadeia A da insulina, 2.200. Os R<sub>f</sub>s foram calculados em relação à migração do fenol vermelho.

4. DISCUSSÃO

O hormônio de crescimento (HC) pituitário, principal hormônio responsável pelo crescimento do esqueleto na infância, parece agir indiretamente na cartilagem, via mediadores polipeptídicos coletivamente conhecidos como somatomedinas (SM), presentes no plasma e que se acredita serem sintetizados no fígado<sup>(13)</sup>. Quatro possíveis SM, peptídeos de baixo peso molecular com propriedades similares, foram purificados até a homogeneidade do plasma humano<sup>(31,75,84,105)</sup>. A seqüência completa de aminoácidos de um deles, IGF-1, é conhecida e mostra uma homologia extraordinária com a proinsulina humana<sup>(76)</sup>. Embora os peptídeos de SM purificados exerçam efeitos anabólicos na cartilagem "in vitro" e seus níveis no plasma sejam dependentes do HC, permanece para ser demonstrado conclusivamente que estes peptídeos substituem o HC "in vivo" e promovem o crescimento de um animal deficiente em HC.

Rechler e Nissley purificaram e caracterizaram um quinto membro dos polipeptídeos da família das SM, o MSA-BRL<sup>(55,59)</sup>. O MSA-BRL é o produto de uma linhagem celular estabelecida, BRL 3A, derivada do fígado de rato. O MSA-BRL mostra ser muito similar às SM humanas purificadas nas propriedades biológicas e químicas e na reatividade nos ensaios específicos de ligação competitiva<sup>(55,59,68,69,74)</sup>.

O meio condicionado pelas células BRL 3A foi purificado até a obtenção de MSA-BRL homogêneo e esta purificação envolveu 3 etapas: cromatografia em resina Dowex, filtração em gel Sephadex G-75 e eletroforese preparativa em gel de poliacrilamida, conforme Nissley<sup>(58)</sup>. Na primeira etapa da purificação dos peptídeos de MSA-BRL através da cromatografia de troca iônica em Dowex, como descrito por

Dulak e Temin<sup>(23)</sup>, permitiu uma purificação rápida, aumentando de 5-10 vezes a atividade biológica do MSA. A filtração em gel Sephadex G-75 com ácido acético 1 M foi utilizada como o passo seguinte, uma vez que este procedimento separa a proteína do MSA, dos peptídeos biologicamente ativos do MSA. Esta proteína é eluída no volume de exclusão ( $V_0$ ) da coluna e não possui atividade biológica, de acordo com Moses (informação pessoal).

De acordo com a Fig. 1, no MSA-BRL homogêneo, analisado pela eletroforese em gel de poliacrilamida em meio ácido, foram identificadas 7 espécies biologicamente ativas. O MSA-BRL-II-1 foi a espécie melhor caracterizada, apresentando um PM de 8.700 e uma cadeia polipeptídica simples<sup>(59)</sup>. O MSA-BRL-III-2 possui um PM de 7.000<sup>(55,59)</sup>. O padrão de MSA-BRL usado no presente trabalho foi obtido das frações do pico II da purificação em Sephadex, incluindo portanto as 4 espécies deste pico.

As células de BRL 3A fornecem uma fonte conveniente e abundante do MSA para a caracterização química e um sistema útil para o estudo "in vitro" da biossíntese da SM. Entretanto, desde que estas células perderam a capacidade de sintetizar as proteínas específicas do hepatócito, tal como a albumina (comunicação pessoal do Dr. Coon), e desde que a síntese do MSA não é induzida pelo HC<sup>(71)</sup>, estas células parecem não ser adequadas ao estudo da regulação hormonal da síntese do MSA. A fim de se estudar o controle hormonal na síntese do MSA "in vitro", foi utilizada a cultura de fígado de feto, um sistema bem caracterizado e conhecido por preservar um modelo normal da síntese proteica hepática e dos mecanismos regulatórios<sup>(85)</sup>. No presente trabalho tentou-se demonstrar que fragmentos de tecido de fígado de feto de rato mantidos em cultura sintetizam polipeptídeos que satisfazem todos os critérios co

nhecidos para as SM e que mostram grande semelhança com o MSA-BRL.

A presença de polipeptídeos similares a SM, ao que se chamou de "MSA fetal", no meio condicionado pelos fragmentos de fígado de feto de rato foi inicialmente sugerida por sua atividade inibitória da ligação do MSA-<sup>125</sup>I aos receptores de MSA das membranas plasmáticas purificadas de fígado de rato (Tabela 1). Este ensaio por receptor é altamente específico para o MSA-BRL e para SM humanas purificadas<sup>(58)</sup>; insulina e proinsulina dão fraca reação cruzada e outros hormônios polipeptídicos e fatores de crescimento (EGF, NGF, SM B) dão uma reação cruzada insignificante<sup>(59)</sup>.

Entretanto, apenas este ensaio por receptor não é suficiente para estabelecer que a atividade inibitória aparece exclusivamente pela presença de SM. As proteínas fixadoras de SM presentes no meio de cultura podem interagir com o MSA-BRL-<sup>125</sup>I e provocar uma inibição aparente no ensaio por receptor<sup>(10,62)</sup>.

Uma característica que torna as SM substâncias distintas entre os hormônios polipeptídicos, é o fato de circularem no plasma ligadas à proteína de alto peso molecular<sup>(37,53,106,111,113)</sup>. A presença de proteínas fixadoras de SM no plasma de rato foi verificada por Daughaday<sup>(15)</sup> que notou que, após hipofisectomia, a atividade de SM desaparecia com a vida média de 4 a 5 horas, sendo mais longa que a vida média do HC que é da ordem de 20 minutos. No homem, o lento desaparecimento da SM endógena depois da hipofisectomia foi demonstrado por Almquist e Falkhedam<sup>(1)</sup> e atribuído ao fato das SM estarem unidas às proteínas plasmáticas. Estas proteínas parecem ser também dependentes do HC, o que foi demonstrado no rato com o MSA<sup>(11)</sup>, e com

as NSILA-S no homem<sup>(39)</sup>. De acordo com Zapf<sup>(113)</sup> a interação da SM com estas proteínas é específica e reversível.

A fim de separar o MSA fetal das proteínas fixadoras, o meio condicionado pelos fragmentos de fígado de feto de rato foi concentrado por liofilização e fracionado por filtração em gel Sephadex G-75 em ácido acético 1 M. Estas condições foram escolhidas em direta analogia com a purificação do MSA do meio condicionado pelas células BRL 3A, pois que, em pH ácido, o MSA-BRL é dissociado das proteínas fixadoras das SM presentes no meio<sup>(59)</sup>.

Com o perfil de calibração da coluna de Sephadex G-75, mostrado na Fig. 2, reuniu-se as frações de MSA fetal (25-40) correspondentes aos picos II e III do MSA-BRL. Nas frações eluídas do meio condicionado de fígado fetal, aquelas que se situaram no volume de exclusão (16-24) mostraram uma atividade inibitória da ligação do MSA marcado (Fig. 3), atribuída à presença de proteínas fixadoras que se dissociaram do MSA fetal no pH ácido<sup>(66)</sup>.

Para ser usada como radioligante nos ensaios competitivos e analíticos, tratou-se de se selecionar a fração de MSA-BRL-<sup>125</sup>I que mostrasse uma maior sensibilidade no ensaio de radiorreceptor de membranas de fígado de rato, já citado como ensaio altamente específico para as SM, e assim melhor caracterizar o MSA fetal no seu relacionamento com o MSA-BRL.

Como o MSA-BRL e outras SM estimulam a multiplicação celular e a incorporação da timidina-<sup>3</sup>H no DNA em várias culturas celulares<sup>(23,65,88)</sup>, esta ação mitogênica foi testada no MSA fetal usando-se culturas terciárias de fibroblastos de embrião de galinha. Assim, houve um aumento do número de células após 4 dias de incubação com o MSA fetal (Tabela 3), tal como acontece com o MSA-BRL e o

soro fetal de vitelo. O comportamento idêntico do MSA-BRL e do MSA fetal foi sentido também na superposição das curvas dose-resposta da timidina- $^3\text{H}$  incorporada ao DNA dos fibroblastos (Fig. 7).

De acordo com Gavin<sup>(33)</sup>, a insulina de diversas espécies e derivados de insulina variam em sua potência de estimular a oxidação da glicose no tecido adiposo, variando de maneira análoga na sua capacidade de inibir a ligação da insulina marcada aos linfócitos humanos (a proporção do efeito não é a mesma). Deste modo, com o MSA fetal, uma fraca atividade insulino-símile foi vista não somente no bioensaio em adipócitos (Fig. 8), mas também na sua fraca inibição da ligação da insulina- $^{125}\text{I}$  (porcina) aos receptores da linhagem celular de linfoblastóides humanos IM-9 (Fig. 9). Esta linhagem celular tem receptores de insulina abundantes e bem caracterizados<sup>(33)</sup> e não possui receptores de MSA<sup>(59)</sup>. Como está indicado na Fig. 9, o MSA-BRL mostrou uma potência de 0,74% como inibidor da ligação da insulina- $^{125}\text{I}$  em comparação com a insulina porcina; o MSA fetal mostrou uma fraca inibição (0,09%).

Quanto aos bioensaios da SM, estes, classicamente, são baseados na incorporação do sulfato ( $^{35}\text{SO}_4$ ) na cartilagem. A incorporação do sulfato marcado na cartilagem como condroitin-sulfato mostra um índice adequado do metabolismo da cartilagem<sup>(25)</sup>. Por outro lado, cartilagens de um grande número de animais podem ser usadas na determinação da SM: macaco, cavalo, vitelo, cão, porco, rato, etc. Com a cartilagem costal de ratos hipofisectomizados<sup>(64)</sup>, o MSA fetal mostrou atividade de SM, comparativamente com o MSA-BRL e soro de rato (Tabela 3).

Portanto, foi demonstrado que o MSA fetal parcialmente purificado em Sephadex G-75 possui todas as atividades biológicas "in vitro" fundamentais para caracterizá-lo como SM:

- Atividade mitogênica: estímulo da incorporação da timidina-<sup>3</sup>H em fibroblastos de embrião de galinha (Fig. 7) e multiplicação dos fibroblastos (Tabela 3).
- Fraca atividade insulino-símile demonstrada pela oxidação da glicose em adipócito (Fig. 8) e por competição com a insulina-<sup>125</sup>I na ligação com os receptores de insulina nos linfócitos IM-9 (Fig. 9).
- Estímulo da sulfatação da cartilagem de ratos hipofisectomizados (Tabela 4).

Em cada bioensaio citado, a atividade do MSA fetal relativa ao seu conteúdo em MSA, determinada no ensaio de receptor em membrana de fígado de rato (Fig. 5), foi comparável à do MSA-BRL.

Cabe aqui esclarecer que a designação de um receptor como receptor de MSA-BRL é apenas operacional e está baseada no fato de que o MSA foi o radioligante usado para identificá-lo. Os ligantes naturais de cada receptor de MSA estão ainda para ser identificados. Receptores específicos para o MSA foram identificados em 4 sistemas: membranas plasmáticas purificadas de fígado de rato<sup>(50)</sup>, fibroblastos de embrião de galinha<sup>(72)</sup>, fibroblastos de pele humana<sup>(2,70)</sup> e linhagem BRL 3A2 de células de rato cultivadas<sup>(75)</sup>. O ensaio de receptor de membranas plasmáticas de fígado de rato, por sua alta especificidade para o MSA e SM humanas, foi escolhido para avaliar os equivalentes de MSA-BRL nos meios colhidos de 5 diferentes culturas e todas mantiveram índices e proporções apropriadas de síntese de proteína fetal (Fig. 5), além de mostrarem ser hormonalmente ativas como foi visto nas experiências.

Uma vez estabelecido que a reatividade com receptores correspondia à atividade biológica da SM, foi demonstrado, em seguida, que o MSA fetal também interagiu com proteínas fixadoras específicas das SM do soro de rato e com anticorpos de coelho anti MSA-BRL.

No ensaio por ligação competitiva usando proteína fixadora de SM de soro de rato, um ensaio específico para MSA-BRL e SM humanas<sup>(80)</sup>, o MSA-BRL e duas preparações de MSA fetal mostraram curvas dose-resposta de inibição sobrepostas (Fig. 4), indicando um comportamento idêntico. Este ensaio é específico para as SM e somente o MSA-BRL, a SM-A, IGF-I e IGF-II inibem a ligação do MSA-<sup>125</sup>I<sup>(52,53)</sup>.

No método imunológico utilizado, o polietileno glicol é o agente separador do MSA-<sup>125</sup>I livre e do ligado ao anticorpo. Este método tem se mostrado particularmente valioso no imunensaio de substâncias de pequeno peso molecular<sup>(22)</sup>.

Assim, no radioensaio usando-se soro total anti-MSA-BRL e MSA-BRL-<sup>125</sup>I (fig. 6), duas preparações de MSA fetal foram aproximadamente um terço menos potentes que o MSA-BRL (com base nos equivalentes do ensaio de receptor em membranas de fígado de rato). Anteriormente, as únicas substâncias conhecidas por interagir no radioensaio do MSA eram os peptídeos do MSA-BRL e polipeptídeos dependentes do hormônio de crescimento em soro de rato<sup>(54,55)</sup>.

Portanto, receptores de MSA, proteínas fixadoras de SM no soro e anticorpo anti-MSA, três macromoléculas que reconhecem diferentes aspectos estruturais do MSA-BRL e das SM humanas, todos indicam uma relação extremamente próxima do MSA fetal com MSA-BRL.

O MSA fetal também se assemelha ao MSA-BRL no que respeita às propriedades químicas: peso molecular, estabilidade a ácido e denaturantes e mobilidade eletroforética. O peso molecular do MSA fetal determinado pela eletroforese em gel de acrilamida SDS, ficou entre 4.500 e 12.500 (Fig. 10), sendo similar ao peso molecular 8.700 do MSA-BRL-II-1 e ao peso molecular 7.000 do MSA-BRL-III-2. Tal como o MSA-BRL, o MSA fetal é estável ao ácido e não é inativado pela incubação com SDS na ausência de agentes redutores (Fig. 10).

Existe uma grande quantidade de pesquisas orientadas no sentido de se conhecer o local onde as somatomedinas são sintetizadas. A dificuldade na quantificação das SM é o maior problema enfrentado por estas pesquisas. A reatividade cruzada é tão extensa que ainda não existe nenhum ensaio que meça exclusivamente apenas um dos peptídeos da SM. Assim, quando estes ensaios são usados para determinar os níveis de SM no soro, o efeito resultante de vários peptídeos está sendo estudado; a contribuição relativa de cada SM depende do ensaio usado<sup>(69)</sup>.

A maioria dos dados de pesquisa do local de síntese das SM, sugerem o fígado como fonte predominante<sup>(9,13,18)</sup>. Os fígados de ratos hipofisectomizados liberam "in vitro" menos SM que os de ratos normais. Quando perfundidos "in vitro" com HC, os fígados de rato normal e os de hipofisectomizados liberam mais SM que os controles<sup>(64)</sup>, e quando hepatectomizados, os ratos mostraram um decréscimo nas SM séricas<sup>(9)</sup>.

Recentemente foi demonstrado que a adição de puromicina (inibidor de síntese proteica) na perfusão de fígado isolado de rato, reduzia a liberação de IGF-I desta preparação; sugerindo diretamente a síntese hepática de SM<sup>(39)</sup>.

Foi constatada também uma diminuição dos níveis de SM em doenças crônicas do fígado<sup>(81,92,110)</sup>. Todavia, ainda não foi descartada a idéia de que o fígado seja apenas o repositório das SM<sup>(48,63)</sup>.

Wicks<sup>(108)</sup> demonstrou que culturas de fígado de feto preservam características bioquímicas e hormonais significativas do fígado fetal no útero, do estágio de desenvolvimento em que se estabelece a cultura, dando um modelo bem próximo do estado "in vivo".

Assim, as culturas de fragmentos de fígado fetal, tal como o próprio fígado fetal, sintetizam albumina e alfa<sub>1</sub>-feto-proteína, as proteínas mais importantes do fluido amniótico<sup>(85)</sup>. A produção destas proteínas foram examinadas para testar a função do hepatócito fetal na cultura. Ambas as proteínas foram rapidamente sintetizadas pelos fragmentos de tecido no meio de cultura (Tabela 1). A velocidade de síntese foi relativamente constante do 2º ao 4º dia de cultura e correspondeu a 40 a 50% da proteína total do meio. Eisen demonstrou, na cultura dos fragmentos de fígado de rato, que a síntese relativa de albumina e alfa<sub>1</sub>-feto-proteína corresponde àquela da idade gestacional do feto (informação pessoal).

As experiências das Tabelas 1 e 2 sugerem a síntese de MSA fetal no meio condicionado pelo fígado fetal, não só pelo fato do MSA fetal ser produzido a uma taxa relativamente constante, mas também, porque o tratamento da cultura com o inibidor proteico, cicloheximida, diminuiu de 80 a 95% a concentração de MSA fetal. Deste modo estas experiências representam mais uma contribuição para a hipótese de que as SM são sintetizadas no fígado. É conveniente lembrar que, desde que as culturas foram estabelecidas e mantidas em meio desprovido de soro, o MSA fetal não pode ter-se originado de contaminação de soro.

Na vida fetal nenhuma função distinta para o HC foi encontrada<sup>(47,67)</sup>. Diz-se que os níveis de HC no neonato estão no intervalo descrito para os acromegálicos<sup>(98)</sup>. Além disso, o HC materno não cruza a placenta, e, de fato, é suprimido durante a gestação. Anencefálicos, sem tecidos hipotalâmico e pituitário podem atingir crescimento normal para a idade gestacional<sup>(103)</sup> e indivíduos com nanismo por deficiência de HC mostram ao nascer, um peso apropriado<sup>(47)</sup>. Ao mesmo tempo, estudos em animais confirmam a ausência de uma função para o HC na vida fetal<sup>(47)</sup>.

Por outro lado, pouco se sabe sobre a regulação da SM fetal, porém o HC parece não ser o mais importante fator regulador, não só pelo que foi mencionado mas também por não haver nenhuma correlação entre os níveis de HC fetal e de SM fetal<sup>(41,90,93,98)</sup>. De acordo com Daughaday<sup>(16)</sup> e Hurley<sup>(43)</sup>, os hormônios lactogênicos placentários podem induzir a síntese da SM em ratos hipofisectomizados. A insulina tem sido relatada mostrando um papel importante no crescimento fetal, com base nas observações de existir uma correlação entre a hiperglicemia materna (e presumindo-se uma hiperinsulinemia fetal) e o tamanho fetal (crianças grandes nascidas de mães diabéticas<sup>(61)</sup>). Eigermann<sup>(26)</sup> constatou um decréscimo da atividade de SM depois da pancreatectomia em cães e uma normalização pela terapia insulínica, concluindo que a síntese e secreção da SM, entre outros fatores, está também sob o controle da insulina. Outros estudos sugerem que a prolactina<sup>(28)</sup>, os estrógenos<sup>(109)</sup>, o glucagônio<sup>(7)</sup> e a supernutrição<sup>(13)</sup> também estimulam a liberação de SM.

A função das SM no crescimento fetal ainda não foi totalmente avaliada. Muitos autores mediram os níveis plasmáticos de SM no cordão umbelical de neonatos<sup>(21,32,34,41,90)</sup> usando diferentes ensaios, verificando-se alguma correla

ção entre níveis elevados e peso aumentado no nascimento<sup>(35,38,100)</sup>, embora os estudos ainda estejam incompletos. Por outro lado, D'Ercole<sup>(21)</sup> mostrou valores baixos em algumas crianças que manifestavam um crescimento intrauterino retardado. No mesmo trabalho, este pesquisador identificou receptores específicos de SM em tecidos fetais do porco em diferentes idades gestacionais, sugerindo que o feto, de fato, possui a capacidade de responder às SM durante o seu desenvolvimento.

A SM foi também quantificada no líquido amniótico<sup>(2,3,51)</sup>. Moberg em seu artigo<sup>(51)</sup> relata que o nível baixo de fluído amniótico está associado com o retardamento de crescimento intrauterino. Dados convincentes sobre a função das SM no crescimento fetal ainda não foram obtidos e mesmo a origem das SM quantificadas no cordão umbilical e fluído amniótico está ainda para ser determinada, pois que podem ser tanto de origem materna como fetal.

O sistema experimental usado neste estudo, cultura de fígado de rato, foi modificado e desenvolvido por Simkins<sup>(85,86)</sup>, Eisen e cols.<sup>(27,83)</sup>. A técnica permite a rápida preparação de grande número de fragmentos uniformes de fígado de rato e tem as vantagens de permitir a manipulação do meio de cultura de uma maneira relativamente pura e fácil e de não requerer uma suplementação de proteína exógena, como soro. A estabilidade dos fragmentos de tecido foi confirmada pela captação relativamente constante de glicose e galactose, conteúdo de DNA constante depois do primeiro dia e produção constante de proteína não sedimentável<sup>(85,86)</sup>. A viabilidade da cultura foi confirmada pelos dados das experiências da Tabela 1, mostrando a síntese de proteínas extracelulares (albumina e alfa<sub>1</sub>-fetoproteína) e DNA. Assim, pela fácil manipulação e retenção das propriedades de fígado fetal, este sistema parece fornecer um modelo adequado para o estudo da produção de SM fetal.

Em conclusão, o presente trabalho, por definir as propriedades biológicas e moleculares da SM sintetizada pela cultura de tecido de fígado fetal, bem como pelo sistema de cultura que utilizou, poderá constituir-se em um modelo ideal para pesquisas sobre a regulação da SM fetal e sobre o papel da SM no crescimento fetal.

R E S U M O

O presente trabalho demonstra a síntese de polipeptídeos bioquímica, biológica e imunologicamente relacionados com a bem caracterizada somatomedina (SM) MSA-BRL, purificada da cultura da linhagem celular de fígado de rato, BRL 3A. O meio condicionado pelos fragmentos de tecido de fígado fetal de rato de 19-20 dias, foi concentrado, cromatografado em Sephadex G-75 sob condições ácidas combinando-se as frações correspondentes ao MSA-BRL. Esta preparação parcialmente purificada inibiu a ligação do MSA-BRL marcado com  $^{125}\text{I}$  ao receptor de MSA em membranas plasmáticas de fígado de rato e foi chamado de MSA fetal. O conteúdo de MSA fetal das preparações purificadas em Sephadex G-75 foi avaliado pelo ensaio de receptor de membranas de fígado de rato, constituindo aproximadamente 5% da proteína total. O MSA fetal é um polipeptídeo solúvel e estável em ácido, de peso molecular 4500-12500 determinado pela eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS); o peso molecular do MSA-BRL é 8700. O MSA fetal estimulou a incorporação da timidina- $^3\text{H}$  em DNA de fibroblastos de embrião de galinha na mesma extensão e com a mesma curva dose-resposta do MSA-BRL, e induzindo também a multiplicação desses fibroblastos. O MSA fetal estimulou a oxidação da glicose em adipócito de rato comparável a atividade do MSA-BRL e ambos os peptídeos inibiram fracamente a ligação da insulina marcada com  $^{125}\text{I}$  aos receptores de insulina dos linfócitos IM-9. O MSA fetal e o MSA-BRL estimularam a incorporação do sulfato na cartilagem costal de ratos hipofisectomizados. O MSA fetal inibiu a ligação do MSA-BRL marcado com  $^{125}\text{I}$  às proteínas fixadoras da SM de soro de rato e ao anticorpo anti-MSA-BRL obtido de soro de coelho.

A incubação dos fragmentos de tecido de fígado de feto com cicloheximida  $5 \times 10^{-5}$  M, por 24 horas, diminuiu de 80-95% a concentração de MSA fetal, albumina e  $\alpha_1$ -fetoproteína no meio condicionado, mostrando a sua síntese pelo fígado fetal.

A cultura de tecido de fígado de feto de rato parece fornecer um sistema adequado para o estudo da regulação da síntese do MSA fetal e compreensão do papel das SM no crescimento fetal.

A B S T R A C T

The present work demonstrates synthesis of polypeptide biochemically, biologically and immunologically related to the well characterized somatomedin BRL-MSA, Multiplication Stimulating Activity purified from the BRL 3A rat liver cell line. Media conditioned by explants of 19-20 days fetal rat liver was concentrated, chromatographed on Sephadex G-75 under acid conditions, and fractions corresponding to BRL-MSA combined. This partially purified preparation inhibited the binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled BRL-MSA to the MSA receptor of rat liver plasma membranes, and has been termed Fetal MSA. The Fetal MSA content of the Sephadex G-75 purified preparations has been estimated by the liver membrane receptor assay, and constituted 5% of the total protein. Fetal MSA is an acid soluble, acid stable polypeptide of molecular weight 4500-12,500 determined by polyacrilamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate; the molecular weight of BRL-MSA is 8700. Fetal MSA stimulated the incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine into the DNA of chick embryo fibroblasts to the same extent and with the same dose response as BRL-MSA. It also induced the multiplication of chick embryo fibroblasts. Fetal MSA stimulated glucose oxidation in rat adipocytes, comparable to the activity of BRL-MSA, and both peptides weakly inhibited the binding of  $^{125}\text{I}$  labeled insulin to the insulin receptors of IM-9 lymphocytes. Fetal MSA and BRL-MSA both stimulated sulfate uptake in costal cartilage from hypox rats. Fetal MSA inhibited the binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled BRL-MSA to somatomedin binding proteins from rat serum and to rabbit anti-BRL-MSA serum. Incubation of fetal liver explants with cycloheximide,  $5 \times 10^{-5}\text{M}$ , for

24 hours decreased the concentration of Fetal MSA, albumin and  $\alpha_1$ -fetoprotein in conditioned media by 80-95%, showing the liver synthesis of the Fetal MSA. Fetal liver explants should provide a useful model system to study the regulation of Fetal MSA synthesis and to help elucidate the role of somatomedins in fetal growth.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALMQUIST, S. & FALKHEDEW, T. Studies on sulfation (SF) activity of human serum. Rate of decrease of serum SF after hypophysectomy Acta endocr. (Copenhagen), 37:315-21, 1961.
- 2- BALA, R.M. & SMITH, G.R. Partial characterization of somatomedin bioactivity in term human amniotic fluid J. clin. Endocr. Metab., 43:907-12, 1976.
- 3- BALA, R.M.; WRIGHT, C.; BARDAI, A.; SMITH, G.R. Somatomedin bioactivity in serum and amniotic fluid during pregnancy J. clin. Endocr. Metab., 46:649-52, 1978.
- 4- BEATON, G.R.; SAGEL, J.; DISTILLER, L.A. Somatomedin activity in cerebrospinal fluid J. clin. Endocr. Metab., 40:736-7, 1975.
- 5- BECKS, H.; SIMPSON, M.E.; EVANS, H.M.; RAY, R.D.; LI, C.H.; ASLING, C.W. Response to pituitary growth hormone and thyroxin of the tibias of hypophysectomized rats after long post operative intervals Anat. Rec., 94:631-48, 1946.
- 6- BIGGERS, J.D.; GWATKIN, R.B.; HEYNER, S. Growth of embryonic avian and mammalian tibia on a relatively simple chemically defined medium Expl. Cell Res., 25:41-58, 1961.
- 7- BINOUX, M.; SCHIMPFT, R.; DONNADIEU, M. Serum somatomedin activity depressed after glucagon administration in man J. clin. Endocr. Metab., 44:1006-9, 1977.
- 8- BLAKESLEY, R.W. & BOEZY, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G 250 Analyt. Biochem., 82:580-2, 1977.

- 9- CHOCHINOV, R.H. & DAUGHADAY, W.H. Current concepts of somatomedin and other biologically related growth factors Diabetes, 25(10):994-1007, Oct. 1976.
- 10- CHOCHINOV, R.H.; MARIZ, J.K.; HAJEK, A.S.; DAUGHADAY, W.H. Characterization of a protein in mid-term human amniotic fluid which reacts in the somatomedin C radioreceptor assay J. clin. Endocr., Metab., 44: 902-8, 1977.
- 11- COHEN, K.L. & NISSLEY, S.P. Comparison of somatomedin activity in rat serum and lymph Endocrinology, 97: 654-8, 1975.
- 12- COON, H.G. Clonal culture of differentiated rat liver cells J. Cell Biol. 39:29a, 1968 apud DULAK, N.C. & TEMIN, H.M. Multiplication stimulating activity for rat liver cell conditioned medium: a family of small peptides J. Cell Physiol., 81:161, 1973.
- 13- DAUGHADAY, W.H. Hormonal regulation of growth by somatomedin and other tissue growth factors Clinica Endocr. Metab., 6:117-35, 1977.
- 14- DAUGHADAY, W.H.; HALL, K.; RABEN, M.S.; SALMON, W.D.; VAN DEN BRANDE, J.L.; VAN WYK, J.J. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor Nature (London), 235:107, 1972.
- 15- DAUGHADAY, W.H.; HEINS, J.N.; SRIVASTAVA, L.; HAMMER, C. Sulphation factor studies of its removal from plasma and metabolic fate in cartilage J. Lab. clin. Med., 72:803-12, 1968.
- 16- DAUGHADAY, W.H. & KAPADIA, M. Maintenance of serum somatomedin activity in hypophisectomized pregnant rats Endocrinology, 102(4):1317-20, 1978.
- 17- DAUGHADAY, W.H.; PHILLIPS, L.S.; HERINGTON, A.C. Somatomedin generation by perfused livers Adv. Metab. Disord., 8:151-7, 1975.

- 18- DAUGHADAY, W.H.; PHILLIPS, L.S.; MUELLER, M.C. The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver Endocrinology, 98:1214-9, 1976.
- 19- DEHNEL, J.M.; McCONAGHEY, P.D.; FRANCIS, M.J.O. Fractionation of liver somatomedin activity by ultra filtration J. Endocrinol., 62:355-61, 1974.
- 20- DE MEYTS, P. Insulin and growth hormone receptors in human cultured lymphocytes and peripheral blood monocytes In: BLECHER, M., editor Methods in receptors research New York, Marcel Dekker, 1976 p.301-83.
- 21- D'ERCOLE, A.J.; FOUSER, D.B.; UNDERWOOD, L.F. Somatomedin C receptor ontogeny and levels in porcine fetal and human cord serum J. clin. Endocr. Metab., 43:1069-77, 1976.
- 22- DESBUQUOIS, B. & AUBARCH, G.D. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody bound peptide hormones in radioimmunoassays J. clin. Endocr. Metab., 33:732-8, 1971.
- 23- DULAK, N.C.; & TEMIN, H.M. A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication stimulating activity for embryo fibroblasts J. Cell Physiol., 81:153-60, 1973.
- 24- DULAK, N.C. & TEMIN, H.M. Multiplication stimulating activity for chicken embryo fibroblasts from rat liver cell conditioned medium: a family of small polypeptides J. Cell Physiol., 81:161-70, 1973.
- 25- EBERT, P.S. & PROCKOP, D.J. Influence of cortisol on the synthesis of sulfated mucopolysaccharides and collagen in chick embryos Biochim. biophys. Acta., 136:45-55, 1967.
- 26- EIGENMANN, J.E.; BECKER, M.; KAMMERMANN, B.; LEMANN, W.; HEIMANN, R.; ZAPP, J.; FROESCH, E.R. Decrease of non-suppressible insulin-like activity after pancreatectomy and normalization by insulin therapy Acta endocr. (Copenhagen), 85:818-22, 1977.

- 27- EISEN, H.J.; GOLDFINE, I.D.; GLINSMANN, W.H. Regulation of hepatic glycogen synthesis during fetal development roles of hydrocortisone, insulin and insulin receptors Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 70:3454-7, 1973.
- 28- FRANCIS, M.J.O. & HILL, D.J. Prolactin stimulated production of somatomedin by rat liver Nature (London), 255:167-8, 1975.
- 29- FROESCH, E.R.; BURGI, H.; MULLER, W.A.; HUMBEL, R.E.; JAKOB, A., LABHART, A. Nonsuppressible insulin-like activity of human serum: purification, physicochemical and biological properties and its relation to total serum IIA Recent Prog. Horm. Res., 23:565-616, 1967.
- 30- FROESCH, E.R.; BURGI, H.; RAMSEIER, E.B.; BALLY, P.; LABHART, A., Antibody suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity J. clin. Invest., 42:1816-33, 1963.
- 31- FRYKLUND, L.; UTHNE, K.; SIEVERTSON, H.; WESTMARK, B. Isolation and characterization of polypeptides from human plasma: enhancing the growth of human normal cells in culture Biochem. biophys. Res. Commun., 61:950-6, 1974.
- 32- FURLANETTO, R.W.; UNDERWOOD, L.E.; VAN WYK, J.J.; D'ERCOLE, A.J. Estimation of somatomedin C levels in normal and patients with pituitary disease by radioimmunoassays J. clin. Invest., 60:648-57, Sept. 1977.
- 33- GAVIN III, J.R.; GORDEN, P.; ROTH, J.; ARCHER, J.A.; BULL, D.N. Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor J. biol. Chem., 248:2202-7, 1973.

- 34- GIORDANO, G.; FOPPIANO, E.; MINUTO, F.; PERRONI, D.  
Growth hormone and somatomedin behavior in the new  
born Acta endocr. (Copenhagen), 81:449-54, 1976.
35. GLUCKMANN, P.D. & BRINSMEAD, N.W. Somatomedin in the  
Cord Blood: relationship to gestational age and  
birth size J. clin. Endocr. Metab., 43:1378-81, 1976.
- 36- HALL, K. & BOZOVIC, M. Stimulation of  $^{35}\text{S}$  incorporation  
into embryonic chick cartilage by extract from rat  
muscle Horm. Metab. Res., 1:235-40, 1969.
- 37- HALL, K.; TAKANO, FRYKLUND, L.; SIEVERTSSON, H. Soma  
tomedins Adv. Metab. Disor., 8:19-42, 1975.
- 38- HEINRICH, U.E.; DRAZNIN, B.; JOHNSON, C.J.; SCHALCH,  
D.S. In: PROCEEDINGS international symposium on soma  
tomedins and growth, Santa Margherita Ligure, Italy,  
March 1-3, 1978 (In press, Academic).
- 39- HEINRICH, U.E.; MILLER, L.L.; JOHNSON, C.J.; SCHALCH,  
D.S. Hormonal control of NSILA synthesis and release  
from isolated perfusate rat liver In: THE ENDOCRINE  
SOCIETY 59th Annual meeting, June 8-10, 1977, Chicago:  
program Bethesda, 1977.
- 40- HEINRICH, U.E.; SCHALCH, D.S.; KOCH, J.G.; JOHNSON, C.J.  
Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) II.  
Regulation of serum concentrations by growth hormone  
and insulin J. clin. Endocr. Metab., 46:672-8, 1978.
- 41- HINTZ, R.L.; SEEDS, J.M.; JOHNSONBAUCH, R.E. Somatomedin  
and growth hormone in the newborn Am. J. Dis. Child.,  
131:1249-51, 1977.
- 42- HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. Preparation of Iodine-131  
labelled human growth hormone of high specific activity  
Nature (London), 194:495-6, 1962.
- 43- HURLEY, T.; D'ERCOLE, A.; HANDWERGER, E.; UNDERWOOD, L.,  
FURLANETTO, R.; FELLOWS, R. Ovine placental lactogen  
induces somatomedin, a possible role in fetal growth  
Endocrinology, 101:1635-8, 1975.

- 44- JAKOB, A.; HAURI, C.; FROESCH, E.R. Nonsuppressible insulin-like activity in human serum J. clin. Invest., 47:2678-88, 1968.
- 45- KAHN, C.R.; BAIRD, K.; FLIER, J.S.; JARRET, D.B. Effects of autoantibodies to the insulin receptor on isolated adipocytes J. clin. Invest., 60(5):1094-106, 1977.
- 46- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub> Nature (London), 227:680-85, 1970.
- 47- LIGGINS, G.C. The influence of the fetal hypothalamus and pituitary on growth in size at birth In: CIBA Symposium, 1974 p.180 apud KNIGHT, A.B. Research development program p.23 (Relatório do Laboratory of Biochemical Pharmacology. National Institutes of Health. Bethesda, MD, USA).
- 48- McCONAGHEY, P. The production of "sulphation factor" by rat liver J. Endocr., 52:1-9, 1972.
- 49- McCONAGHEY, P. & DEHNEL, J.M. Preliminary studies of sulfation factor production by rat kidney J. Endocr., 52:587-8, 1972.
- 50- MEGYESI, K.; KAHN, C.R.; ROTH, J.; NEVILLE, D.M.; NISSLEY, S.P.; HUMBEL, R.E.; FROESCH, E.R. The NSILA-s receptor in liver plasma membranes characterization and comparison with the insulin receptor J. biol. Chem., 250(23):8990-6, 1975.
- 51- MOBERG, P.; EFENDIE, S.; HALL, K.; FRYKLUND, L. Amniotic fluid somatomedin A and fetal CNS damage Lancet, 1(7967):1016, May 1976.
- 52- MOSES, C.; NISSLEY, S.P.; COHEN, K.L.; RECHLER, M.M. Specific binding of a somatomedin like polypeptide in rat serum depends on growth hormone Nature (London) 263(5573):137-40, Sept. 1976.

- 53- MOSES, A.C.; PASSAMANI, J.; WHITE, R.M.; RECHLER, M. M. Further characterization of a GH dependent somatomedin binding protein in rat serum and demonstration of a somatomedin binding protein produced by rat liver cells in culture Endocrinology, 104(2): 536-46, 1979.
- 54- MOSES, A.C.; NISSLEY, S.P.; RECHLER, M.M.; SHORT, P.A. Demonstration by radioimmunoassay of multiplication stimulating activity (MSA) in rat serum In: THE ENDOCRINE SOCIETY 60th Annual meeting, June 14-16, 1978, Miami: Program Bethesda, 1978.
- 55- MOSES, A.C.; NISSLEY, S.P.; RECHLER, M.M.; SHORT, P.A.; PODSKALNY, J.M. The purification and characterization of multiplication stimulating activity (MSA) from media conditioned by a rat liver cell line In: MINUTO, F. editor Symposium on somatomedin and growth London, Academic, 1979 (Serona symposium series).
- 56- NEVILLE JR., D.M. Fractionation of cell membrane protein by disc electrophoresis Biochim. biophys. Acta, 133: 168-70, 1967.
- 57- NEVILLE JR., D.M. Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver Biochim. biophys. Acta, 154:540-52, 1968.
- 58- NISSLEY, S.P.; PASSAMANI, J.; SHORT, P.A. Stimulation of DNA synthesis, cell multiplication and ornithine decarboxylase in 3T3 cells by multiplication stimulating activity (MSA) J.Cell Physiol., 89:393-402, 1976.
- 59- NISSLEY, S.P. & RECHLER, M.M. Multiplication stimulating activity (MSA): a somatomedin like polipeptide from cultured rat liver cells Natl. Cancer Inst. Monograph, 48:167-77, 1978.
- 60- NISSLEY, S.P.; SHORT, P.A.; RECHLER, M.M.; PODSKALNY, J. M. Proliferation of Buffalo rat liver cells in serum free medium does not depend upon multiplication stimulating activity (MSA) Cell, 11:441-6, 1977.

- 61- PEDERSEN, J. The pregnant diabetic and her newborn: problems and management 2.ed. Baltimore, MD, Williams and Wilkins, 1967.
- 62- PEETERS, S. & FRIESEN, H.G. A growth hormone binding factor in the serum of pregnant mice Endocrinology, 101:1164-79, 1977.
- 63- PHILLIPS, L.S.; HERINGTON, A.C.; KARL, I.E.; DAUGHADAY, W.H. Comparison of somatomedin activity in perfusates of normal and hypophysectomized rats livers with and without added growth hormone Endocrinology, 98:606-14, 1976.
- 64- PHILLIPS, L.S. & YOUNG, H.S. Nutrition and somatomedin I. Effect of fasting and refeeding on serum somatomedin activity and cartilage growth activity in rats Endocrinology, 99:304-14.
- 65- PIERSON, JR., R.W. & TEMIN, H.M. The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication stimulating activity for a chicken fibroblasts in cell culture and non-suppressible insulin-like activity J.Cell Physiol., 79:319-30, 1972.
- 66- POFFENBARGER, P.L. The purification and partial characterization of an insulin-like protein from human serum J. clin. Invest., 56:1455-63, 1975.
- 67- POND, H. Some aspects of growth in diabetic children Postgrad Med. J. Suppl., 46:616, 1970 apud KNIGHT A.B. Research development program p.23 (Relatório. Laboratory of Biochemical Pharmacology. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).
- 68- RECHLER, M.M.; FRYKLUND, L.; NISSLEY, S.P.; HALL, K.; PODSKALNY, J.M.; SKOTTNER, A.; MOSES, A.C. Purified human somatomedin A and rat multiplication stimulating activity. Mitogens for cultured fibroblasts that cross-react with the same growth peptide receptors Eur. J. Biochem., 82(1):5-12, Jan.1978.

- 69- RECHLER, M.M. & NISSLEY, S.P. Somatomedin and related growth factors Nature (London), 270:665-6, 1977.
- 70- RECHLER, M.M.; NISSLEY, S.P.; PODSKALNY, J.M.; MOSES, A.C.; FRYKLUND, L. Identification of a receptor for somatomedin like polypeptides in human fibroblasts J. clin. Endocr. Metab., 44(5):820-1, 1977.
- 71- RECHLER, M.M.; PODSKALNY, J.M.; NISSLEY, S.P. Synthesis of multiplication stimulating activity by cultured liver cells: independence of growth hormone and estrogen regulation In: THE ENDOCRINE SOCIETY 57th Annual meeting, June, 18-20, 1975, New York: program Bethesda, MD, 1975 p.315.
- 72- RECHLER, M.M.; PODSKALNY, J.M.; NISSLEY, S.P. Interaction of multiplication stimulating activity with chick embryo fibroblasts demonstrates a growth receptor Nature (London), 259(5539):134-6, 1976.
- 73- RECHLER, M.M.; PODSKALNY, J.M.; NISSLEY, S.P. Characterization of the binding of multiplication stimulating activity to a receptor for growth polypeptides in chick embryo fibroblasts J. biol. Chem., 252(11):3898-910, 1977.
- 74- RECHLER, M.M.; ZAPF, J.; NISSLEY, S.P.; FROESCH, E.R.; MOSES, A.C.; PODSKALNY, J.M.; SCHILLING, E.; FRYKLUND, L. Cross-reactivity of MSA (multiplication stimulating activity) and NSILA (nonsuppressible insulin-like activity) I and II in competitive binding assays, Clin. Res., 25:300A, 1977 apud MOSES, A.C.; NISSLEY, S.P.; PASSAMANI, J.; WHITE, R.M. Further characterization of growth hormone-dependent somatomedin binding proteins in rat serum and demonstration of somatomedin binding proteins produced by rat liver cells in culture in culture Endocrinology, 104:543, 1979.

- 75- RINDERKNECHT, E. & HUMBEL, R. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell growth promoting activity in human serum. Isolation, chemical characterization and some biological properties of forms I and II Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 73: 2365-9, 1976.
- 76- RINDERKNECHT, E. & HUMBEL, R.E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin J. biol. Chem., 253:2769-76, 1978.
- 77- RODBEL, M. Metabolism of isolated fat cells I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis J. biol. Chem., 239:375-80, 1964.
- 78- SALMON JR., W.D. & DAUGHADAY, W.H. Sulphation factor, a serum component mediating the action of growth hormone in stimulating incorporation of sulfate into cartilage J. clin. Invest., 35:733, 1956.
- 79- SALMON JR., W.D. & DAUGHADAY, W.H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage "in vitro" J. Lab. clin. Med., 49:825-36, 1957.
- 80- SCHALCH, D.S.; HEINRICH, U.E.; KOCH, J.G.; JOHNSON, C.J.; SCHLUETER, R.J. Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) I. Development of a new sensitive competitive protein binding assay for determinant of serum levels J. clin. Endocr. Metab., 46:664-71, 1978.
- 81- SCHIMPF, R.M.; LEBREE, D.; DONNADIEU, M. Somatomedin production in normal adults and cirrhotic patients Acta endocr. (Copenhagen), 86:355-62, 1977.
- 82- SETARO, F. & MORLEY, C.G.D. A modified fluorometric method for the determination of microgram quantities of DNA from cell or tissue cultures Analyt. Biochem., 71:313-7, 1976.

- 83- SHERLINE, P.; EISEN, H.; GLINSMANN, W. Acute hormonal regulation of cyclic AMP content and glycogen phospho-  
rilase activity in fetal liver in organ culture Endo-  
crinology, 84(4):935-9, 1974.
- 84- SIEVERTSSON, H.; FRYKLUND, L.; UTHNE, K.; HALL, K.;  
WESTERMARK, B. Isolation and chemistry of human soma-  
tomedins A and B Adv. Metab. Disord., 8:47-60, 1975.
- 85- SIMKINS, R.A.; EISEN, H.J.; GLINSMANN, N.H. Functional  
integrity of fetal rat liver explants in a chemically  
defined medium Devl. Biol., 66:344-52, 1978.
- 86- SIMKINS, R.A.; EISEN, H.J.; SPARKS, J.W.; GLINSMANN, W.  
H. Development of glucogenesis from galactose by rat  
liver explants in organ culture Devl. Biol., 66:353-  
60, 1978.
- 87- SIZARET, P.P.; McINTIRE, K.R.; PRINCLER, G.L. Quanti-  
tation of human alfa-fetoprotein by electroimmuno-  
difusion Cancer Res., 31:1899-902, 1971.
- 88- SMITH, G.L. & TEMIN, H.M. Purified multiplication  
stimulating activity from rat liver cell conditioned  
medium: comparison of biological activity with calf  
serum, insulin and somatomedin J. Cell Physiol., 84:  
181-92, 1174.
- 89- STUART, M.C. & LAZARUS, L. Somatomedins Med. J. Inst.,  
1:816-20, 1975.
- 90- SVAN, H.; HALL, K.; RITZEN, M.; TAKANO, K.; SKOTNNER, A.  
Somatomedin A and B in serum from neonates, their  
mothers and cord blood Acta endocr., 85:636-43, 1977.
- 91- TAKANO, K.; HALL, K.; FRYKLUND, L.; HOLMGREN, A.;  
SILVERTSSON, H.; UTHNE, K. The binding of insulin  
and somatomedin A to human placental membrane Acta  
endocr., 80:14-31, 1975.
- 92- TAKANO, K.; HIZUKA, N.; SHIZUME, K.; HAYASHI, N.; MOTOIKE,  
Y.; OBATA, H. Serum somatomedin peptides measured  
by somatomedin A radioreceptor assay in chronic liver  
disease J. clin. Endocr. Metab., 45:828-32, 1977.

- 93- TATO, L.; DUCAJU, M.V.L.; PREVOT, C.; RAPPAPORT, R.  
Early variations of plasma somatomedin activity in  
the newborn J. clin. Endocr. Metab., 40:534-6, 1975.
- 94- TEMIN, H.M. Studies on carcinogenesis by avian sarcoma  
viruses. III. The differential effect of serum and  
polyanions on multiplication of uninfected and con-  
verted cells J. natn. Cancer Inst., 37:167-75, 1966.
- 95- TEMIN, H.M. Control by factors in serum of multiplication  
of aninfected cells and cells infected and covered  
by avian sarcoma viruses In: Growth regulating  
substances for animal cells in culture sem local,  
editor, 1967 p.103-4.
- 96- TEMIN, H.M.; PIERSON, JR.; DULAK, N.C. The role of  
serum in the control of multiplication of avian and  
mammalian cells in culture In: ROLLBLAT, G.H. &  
CRISTOFALO, V.J., editores. Growth, nutrition and  
metabolism of cells in culture New York, Academic,  
1972. p.50-81.
- 97- TEMIN, H.M.; SMITH, G.L.; DULAK, N.C. Control of multi-  
plication of normal and Rous sarcoma virus-transformed  
chicken embryo fibroblasts by purified multiplication  
stimulating activity with nonsuppressible insulin-  
like and sulfation factor activities In: CLARKSON,  
B. & BASERGA, R., editores. Control of proliferation  
in clinical cells. Spring Harbor Lab., 1974 p.19-26.
- 98- TURNER, R.C. & COHEN, N.M. The role of insulin and  
growth hormone in fetal growth Dev. Med. child. Neurol.  
16:371-3, 1974.
- 99- UNDEFRIEND, S.; STERN, S.; BOHLEN, P.; DAIRMAN, W.;  
LEINGRABER, W.; WEIGLE, M. Fluorescamine: a reagent  
for assay of amino acids peptides, proteins and primary  
amines in the picomole range. Science (New York),  
178:871-2, 1972.

- 100- UNDERWOOD, L.E.; D'ERCOLE, A.J.; FURLANETTO, R.W.; HANDWERGER, S.; HURLEY, T.W. In: PROCEEDINGS international symposium on somatomedins and growth, Santa Margherita Ligure, Italy, March 1-3, 1978 (In press; Academic).
- 101- UTHNE, K. & UTHNE, T. Influence of liver resection and regeneration on somatomedin (sulfation factor) activity in sera from normal and hypophysectomized rats Acta endocr., 71:255-64, 1972.
- 102- VAITUKAITIS, J.; ROBBINS, J.B.; NIESCHLAG, E.; ROSS, G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen J. clin. Endocr. Metab., 33:988-91, 1971.
- 103- VAN ASSHE, F. & GEPTS, W. The cytological composition of the foetal endocrine pancreas in normal and pathological conditions Diabetologia, 7:434, 1971.
- 104- VAN DEN BRANDE, J.L.; KOOTLE, F.; TIELENBURG, R.; VAN DEN WILK, M.; KOOT, T. In: INTERNATIONAL Symposium on growth hormone, 2nd, Milan, 1971 apud HALL, K.; TAKANO, K.; FRYKLUND, L.; SIEVERTSSON, H. Somatomedins Adv. Metab. Disord., 8:19-42, 1975.
- 105- VAN WYK, J.J., UNDERWOOD, L.E.; BASEMAN, J.B.; HINTZ, R. L.; CLEMMONS, D.R.; MARSHALL, R.N. Explorations of the insulin-like and growth promoting properties of somatomedin by membrane receptor assay Adv. Metab. Disord., 8:127-50, 1975.
- 106- VAN WYK, J.J.; UNDERWOOD, L.E.; HINTZ, R.L.; CLEMMONS, D.R.; VOINA, S.J.; WEAVER, R.P. The somatomedins: a family of insuli-like hormones under growth hormone control Recent Prog. Horm. Res., 30:259-95, 1974.
- 107- WEINTRAUB, H.; PALTER, K.; VANLENTE, R. Histones H2a, H2b, H3 and H4 from a tetrameric complex in solutions of high salt. Cell. 6:85-110, 1975.

- 108- WICKS, W.D. Induction of tyrosine alfa keto-glutarate transaminase in fetal rat liver J. biol. Chem., 243: 900-6, 1968.
- 109- WIEDERMANN, E.; SCHWARTZ, E.; FRANTZ, A. Acute and chronic estrogen effects upon serum somatomedin activity, growth hormone, prolactin in humans J. clin. Endocr. Metab., 42:942-52, 1976.
- 110- WU, A.; GRANT, D.B.; HAMBLEY, J.; LEVI, A.J. Reduced serum somatomedin activity in patients with chronic liver disease Clin. Sci. Mol. Med., 42:359-66, 1974.
- 111- YALOW, R.S.; HALL, K.; LUFT, R. Radioimmunoassay of somatomedin B application to clinical and physiologic studies J. clin. Invest., 55:127-37, 1975.
- 112- ZAPF, J.; RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R.E.; FROESCH, E. R. Non-suppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum: recent accomplishments and their physiologic implications Metabolism, 27(12):1803-28, 1978.
- 113- ZAPF, J.; WALDEVOGEL, M.; FROESCH, E.R. Binding of nonsuppressible insulin-like activity to human serum. Evidence for a carrier protein Archs. Biochem. Biophys., 168:638-45, 1975.