



22 a 27 de abril de 1990

ANAIS - PROCEEDINGS

**HORMÔNIO TIREOTRÓFICO HUMANO HIPOFISÁRIO: ISOLAMENTO E APLICAÇÃO NO RADIOIMUNOENSAIO.**

Lin Hui Lin  
Irith Rachel Arenstein  
Vânia Caira Borghi

Departamento de Aplicações em Ciências  
Biológicas - TB  
Divisão de Medicina - TBM  
Comissão Nacional de Energia Nuclear  
IPEN-CNEN/SP

**SUMARIO**

O presente trabalho descreve o isolamento de hormônio tireotrófico humano (hTSH) a partir de um sub-produto recém obtido na extração de hormônio de crescimento, empregando a mesma metodologia já utilizada em nossos laboratórios a partir de um extrato de hTSH liofilizado, armazenado durante 7 anos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A adequação do hTSH isolado para marcação com  $^{125}\text{I}$  no preparo do traçador do radioimunoensaio foi avaliada em comparação com o hTSH já obtido a partir de extrato cru liofilizado e aquele fornecido pelo NIADDK (USA).

**ABSTRACT**

This paper reports the isolation of thyrotropin (hTSH) from a side-fraction obtained during the purification of growth hormone from whole frozen pituitaries. The procedure involves the same process employed at our laboratory for the purification of hTSH from a freeze-dried side-fraction stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 7 years. The adequacy of the purified as a labelled reagent in the radioimmunoassay was evaluated in comparison with that hormone purified previously at our laboratory and with hormone supplied by the NIADDK (USA).

## INTRODUÇÃO

A obtenção de hormônio tireotrófico humano (hTSH), a partir de subproduto proveniente da extração de hormônio de crescimento (hGH), tem sido investigada em nossos laboratórios, empregando-se extrato cru de hTSH liofilizado, armazenado durante sete anos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (1,2)

O hTSH obtido, hTSH-IPEN-I, já foi radioiodado e avaliado como traçador de radioimunoensaio em comparação com o hormônio fornecido pelo "National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive & Kidney diseases" (USA), NIADDK-hTSH-I6, fornecendo curvas padrão similares. (2)

O presente trabalho tem por objetivo repetir o isolamento e aplicação do hTSH como traçador do radioimunoensaio, empregando porém extrato cru recém obtido na extração do hGH, comparando-o com os traçadores IPEN-I e NIADDK. Este estudo faz parte de um projeto desenvolvido para preparar reagentes biológicos de radioimunoensaio, a fim de substituir produtos importados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O método de extração do hGH empregado foi o descrito por ROOS e Cols. (3), modificado por ASSIS e Cols. (4). Seguiu-se a técnica de isolamento do hTSH descrita por ROOS e Cols. (5), que também parte de produtos colaterais obtidos durante a extração do hGH.

A extração foi realizada empregando-se glândulas hipofisárias que permaneceram congeladas por aproximadamente quatro meses, até perfazer um total de 165 glândulas (55g). Após limpas e secas elas foram submetidas a homogeneização intercalada de centrifugação e decantação do sobrenadante, conforme indicado na figura 1.

O extrato hipofisário foi concentrado para ser purificado em cromatografia ascendente de exclusão molecular em gel de Sephadex G-100. As frações correspondentes ao pico dos hormônios glicoprotéicos foram reunidas, concentradas e dialisadas contra o tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 contendo NaCl 0,3 M. Após a diálise, o extrato foi repurificado em coluna de Sephadex G-100, equilibrada com o mesmo tampão de diálise.

As atividades específicas de hTSH das frações obtidas nesta purificação foram determinadas pela medida de absorvância a 280 nm, sendo a atividade do hTSH expressa em relação ao padrão "63/14 MRC Research Standard A" (0,05 U/ ampola contendo 33  $\mu\text{g}$ ) e assumindo um coeficiente de extinção de 1,0 (0,1% m/v; 1 cm). (5).

As frações que apresentaram maior atividade específica foram reunidas, concentradas, dialisadas e submetidas a purificações sucessivas em cromatografias de adsorção (hidroxilapatita, BDH Chemical Co., England) e de troca iônica (SP-Sephadex C50), intercaladas por concentração e diálise, conforme indicado na figura 2.

Determinou-se apenas a concentração protéica das frações obtidas nessas duas últimas etapas de purificação, pois já se sabia a molaridade em que o hTSH seria eluído (1).

A atividade específica do hTSH obtido nas diferentes etapas de purificação foi determinada pelo radioimunoensaio (6) e pelo método de Lowry (7).

O produto assim obtido, hTSH-IPEN-II, foi radioiodado pelo método clássico da Cloramina T e purificado por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 (2). As frações mais significativas do perfil cromatográfico foram identificadas pelo seu coeficiente de distribuição (Kd) e avaliadas pela sua ligação com excesso de antissoro. (NIADDK-anti-hTSH-3 AFP - C 611818).

Esse traçador ( $^{125}\text{I}$ -hTSH-IPEN-II) foi analisado em comparação com aqueles preparados com o hTSH-IPEN-I (2) e hTSH-NIDDK(6) pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) a 7% (8), em curvas de titulação do antissoro específico e na determinação da concentração de amostras controle. Nesses ensaios empregou-se um segundo antissoro (Radioassay System Laboratories USA) para separar o traçador ligado do livre no lugar de polietilenglicol (6) e o programa computacional RIAKALK versão PC, recém implantado em nossos laboratórios (9), para a resolução e análise dos dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 3 exhibe os cromatogramas das etapas de purificação do hTSH em Sephadex G-100 (duas purificações sucessivas), hidroxilapatita e SP-Sephadex C50. As áreas hachuradas referem-se às frações que foram reunidas e dialisadas para serem aplicadas nas purificações subsequentes.

Na purificação final o hTSH foi separado em dois picos, como observado na purificação anterior, realizada a partir de extrato cru não fresco (2), apresentando o segundo pico atividade específica de hTSH mais elevada (2,28 contra 0,72 U/mg). Portanto, este segundo pico correspondeu ao hTSH-IPEN-II (figura 3D).

Os valores da atividade e recuperação das sucessivas purificações do hTSH estão apresentados na tabela I. Nota-se que a atividade do hTSH aumentou 21 vezes durante sua purificação, cerca de três vezes mais do que nas purificações anteriores, em que se empregou extrato cru mais antigo (1,2).

Este incremento foi devido não apenas ao emprego de extrato cru fresco, como também ao uso de hidroxilapatita comercial, visto ter se obtido nesta cromatografia um aumento de três vezes na atividade do hTSH, enquanto que nos anteriores, empregando o produto preparado em nossos laboratórios, o aumento era de aproximadamente 1,5 vezes (1,2).

Entretanto, a repurificação em coluna de exclusão molecular em Sephadex G-100 pareceu não ser muito eficiente, visto apresentar apenas a metade do aumento na atividade do hTSH (1,4 vezes) daquele obtido por ROOS e Cols. (5). empregando Bio-Gel P-150 (3 vezes); o que explicaria o incremento final por ele obtido de 46 vezes.

Quando o hTSH-IPEN-II, recém obtido foi radioiodado, ele apresentou na purificação em Sephadex G-100 um pico imunorreativo com valor de Kd próximo ao dos traçadores IPEN-I e NIADDK(2), figura 4. Entretanto, o rendimento da marcação continuou menor

do que o obtido na radioiodação do hormônio NIADDK.

A análise pela EGPA revelou serem os traçadores IPEN. recém radioiodados, formados por um componente principal com valor de migração relativa (Rm) próximo ao exibido pelo traçador NIADDK, que variou de 0,342 a 0,513 no exame de sete diferentes traçadores NIADDK, por um componente secundário que migra junto com o corante traçador (C.T.), também presente em menor proporção no traçador NIADDK e pelo  $^{125}\text{I}$  livre que conforme já observado em outros experimentos (10), migra um pouco mais à frente do C.T. (figura 5). Porém, observou-se pela incubação com excesso de antissor e separação em EGPA que este componente secundário não é imunorreativo (figura 6), representando provavelmente uma forma danificada do hTSH radioiodado. Apesar do traçador IPEN-II ter apresentado uma maior porcentagem da forma imunorreativa do que o IPEN-I (fig.5), a pureza dos traçadores IPEN foi inferior àquela do traçador NIADDK (apresentando um valor médio de 64,63% na análise de sete diferentes traçadores).

Esses achados foram confirmados pelas curvas de título do antissor específico obtidas com esses traçadores, nas quais o IPEN-II apresentou-se mais imunorreativo do que o IPEN-I (figura 7), porém menos reativo do que os traçadores NIADDK. Os valores de ligação inespecífica desses traçadores (Tabela 2) também refletem sua pureza e são concordes com os resultados da análise pela EGPA.

Apesar de menos reativos, os traçadores IPEN forneceram resultados muito similares aos do traçador NIADDK quando se estimou a concentração de hTSH de três amostras controle, empregando o antissor na diluição de 1:900.000 (tabela 2).

Além disso, foram obtidas curvas padrão paralelas quando se utilizou o hTSH-IPEN-I como um padrão secundário do radioimunoensaio, em comparação com o padrão 63/14 MRC Research Standard A (figura 8).

## CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que: O traçador preparado com o hTSH isolado em nossos laboratórios a partir de extrato cru recente (IPEN-II) apresentou maior pureza e maior ligação ao antissor do que aquele preparado com o hTSH isolado a partir de extrato liofilizado, armazenado por muitos anos a  $-20^{\circ}\text{C}$  (IPEN-I). Portanto, apenas extratos crus frescos devem ser empregados em futuros estudos de isolamento de hTSH para aplicação como traçador do radioimunoensaio.

Apesar dos melhores resultados obtidos com o traçador IPEN-II, sua qualidade ainda está aquém daquela apresentada pelo traçador NIADDK. Outros métodos de purificação do hTSH hipofisário devem ser examinados a fim de que se obtenha um antígeno com um grau de pureza mais elevado e que forneça um traçador com a mesma qualidade daquele preparado com o antígeno NIADDK.

O método empregado na extração do hTSH-IPEN, poderia vir a ser utilizado para a obtenção de um padrão secundário do radioimunoensaio, desde que o produto obtido seja submetido a um criterioso estudo de padronização.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao National Institute of Health (USA) e ao serviço de Verificação de Óbitos da Escola Paulista de Medicina o material biológico e à FINEP (Convênio nº 4386035100) à IAEA (res. contract. nº 4299/RB) e ao CNPq (processo nº 405.557/86), os auxílios recebidos para a realização deste trabalho, bem como à FAPESP a bolsa de mestrado concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BORGHI, V.C.; LIN, H.L.; BARTOLINI, P. - Purificação de Hormônio tireotrófico humano: Preparação preliminar. São Paulo, IPEN-CNEN/SP, 1988. (Publicação IPEN-162).
2. BORGHI, V.C.; LIN, H.L. - Application of a human thyrotropin purified from hypophyses at IPEN-CNEN/SP. In the preparation of the radioimmunoassay tracer: [<sup>125</sup>I] hTSH - In: SCIENCE and technology: VI Japan - Brazil Symposium on, realizado em São Paulo, 10-12 de Agosto de 1988. 60 (IV): 69-81 (Publicação ACIESP).
3. ROOS, P.; FEVOLD, H.R.; C.A. - Preparation of human growth hormone by gel filtration. Biochem. Biophys. Acta, 74:525-31 1963.
4. ASSIS, L.M.; NICOLAU, W.; HIRATA, I.A.D.; MURAMOTO, E.; PIERONI, R.R.; SHIBATA, H. - Estudo de método ou preparação do hormônio de crescimento humano pelo fracionamento em sulfato de amônio e gel filtração em Sephadex G100. Revta. Ass. Med. Bras., 18:299-304, 1972.
5. ROOS, P.; JACOBSON, G.; WIDE, L. - Isolation of five active thyrotropin components from human pituitary gland. Biochem. Biophys. Acta, 379: 247-61, 1975.
6. BORGHI, V.C.; BARTOLINI, P. - Desenvolvimento da Técnica de radioimunoensaio para dosagem de tireotrofina (TSH) em extratos hipofisários humanos. In: ENDOCRINOLOGIA e metabologia: 17º Congresso Brasileiro, realizado em Recife/Olinda, 7-12 de setembro de 1986. pg.59 (Abstract).
7. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.S. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-74, 1951.
8. DAVIS, B.J. - Disc eletroforesis II. Methods and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:404-27, 1964.
9. BORGHI, V.C.; LIN, L.H., LOPES, E.M.L., MORAES, V.K. - Implantação de um sistema integrado para microcomputadores de processamento de dados em radioimunoensaio. Revta. Bras. Inf. Saúde. No Prelo.
10. BORGHI, V.C.; WAJCHENBERG, B.L. - Evaluation of glucagon stability on storage for radioiodination purposes. Horm. metab. Res., 14: 384-5, 1982.

Tabela 1 - Purificação do hTSH hipofisário

Etapa de Purificação	hTSH	hTSH	
	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Recuperada U	%
Sephadex G-100 (*1)	0,11	8,1	100
Sephadex G-100 (*2)	0,18	8,5	100
Hidroxilapatita	0,59	6,4	79
SP-Sephadex C-50	2,28	0,2	2

TABELA 2 - Resultados comparativos do radioimunoensaio de hTSH realizado com traçadores preparados com o antígeno hormonal de diferentes procedências.

Traçador	% de ligação		Controles (uU/ml)		
	Bo*	NSB**	A	B	C
IPEN-I	16,7	10,82	64,00	33,0	16,50
IPEN-II	30,60	4,97	60,34	36,64	13,12
NIADDK	47,50	3,87	73,18	38,03	13,19

\* Bo = Ligação do traçador com o antissoro na ausência de hTSH padrão zero da curva padrão).

\*\*NSB= Ligação inespecífica do traçador (branco do ensaio).

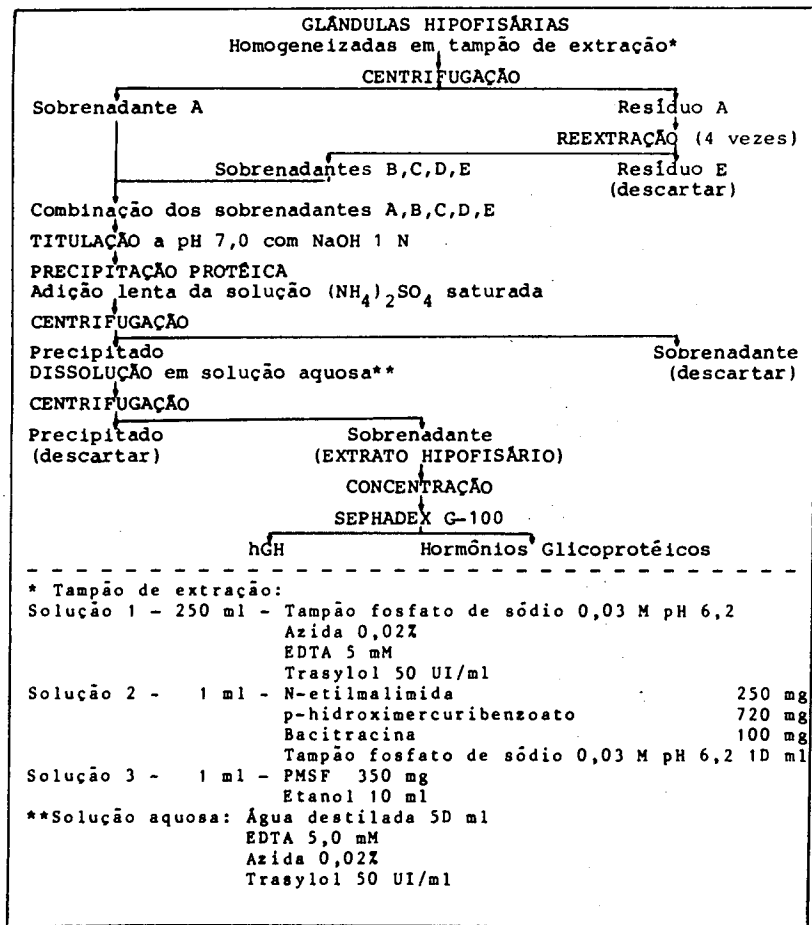


Figura 1. Esquema de extração do hGH. Todos os procedimentos foram executados a 4°C.

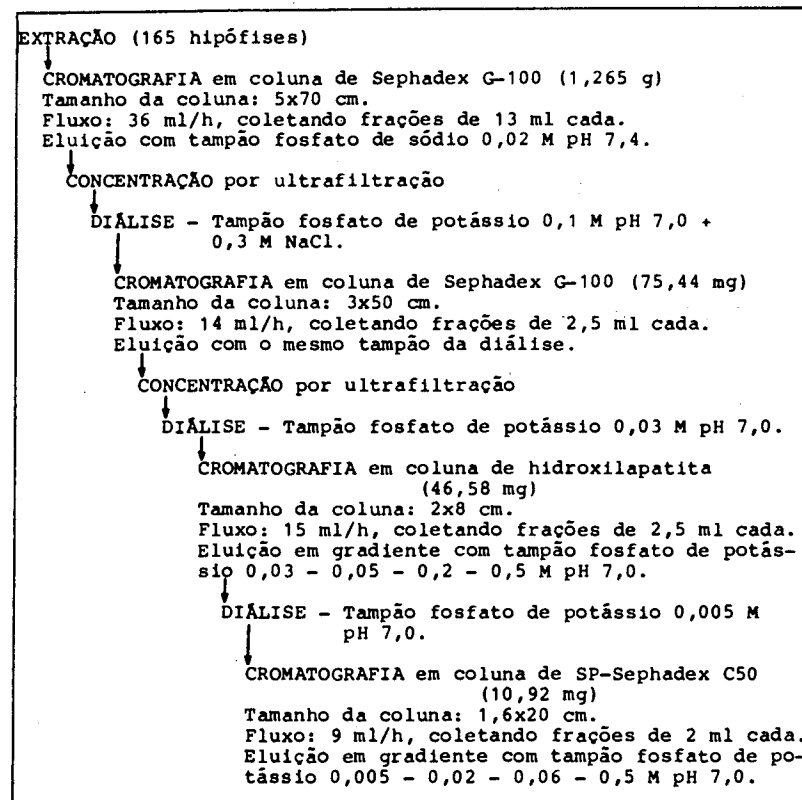


Figura 2. Esquema de purificação do hTSH. Todos os procedimentos foram executados a 4°C. Os valores entre parênteses referem-se a massa protéica submetida às respectivas cromatografias.

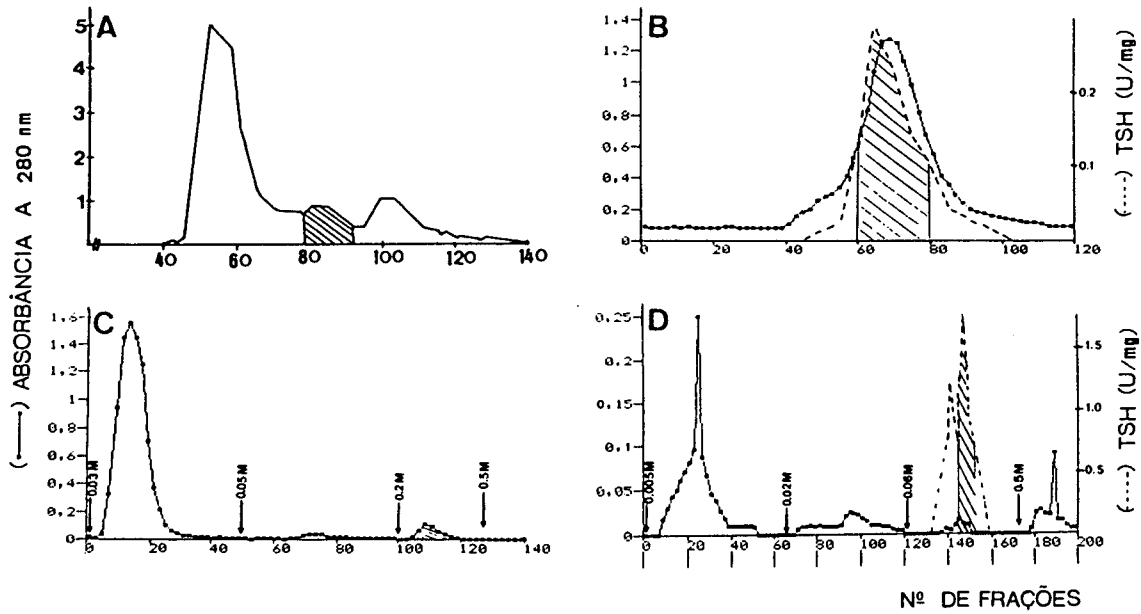


Figura 3. Cromatografias sucessivas do extrato hipofisário humano em: A - Sephadex G-100; B - Sephadex G-100 (repurificação); C - Hidroxilapatita e D - SP-Sephadex C50.

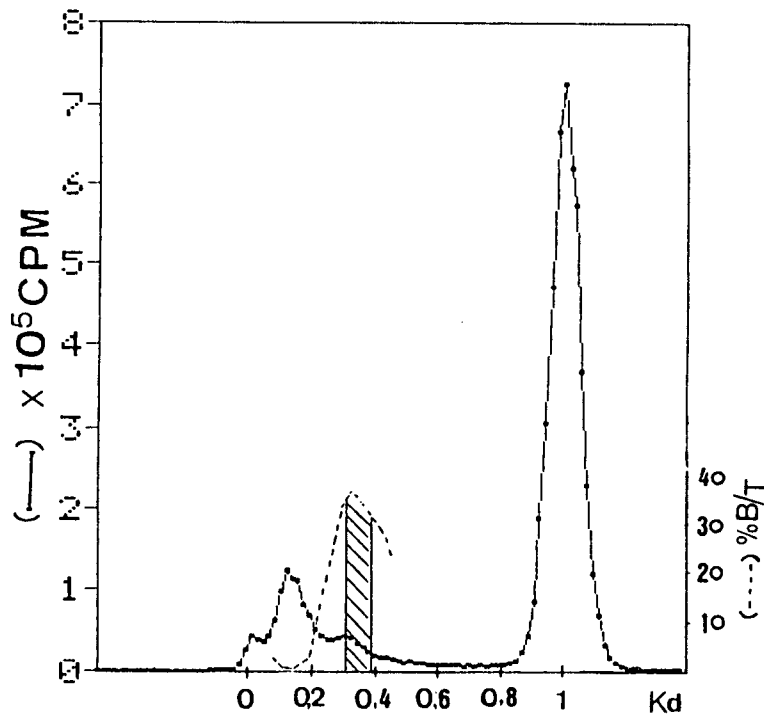


Figura 4. Cromatograma da purificação do hTSH-IPEN-II marcado com  $^{125}\text{I}$  em Sephadex G-100. A linha contínua expressa a radioatividade das frações e a linha tracejada indica a ligação do  $^{125}\text{I}$ -hTSH-IPEN-II ao seu anticorpo específico. A área hachurada corresponde às frações que foram reunidas e estocadas a  $-20^\circ\text{C}$  para serem avaliadas como traçador do radioimunoensaio.

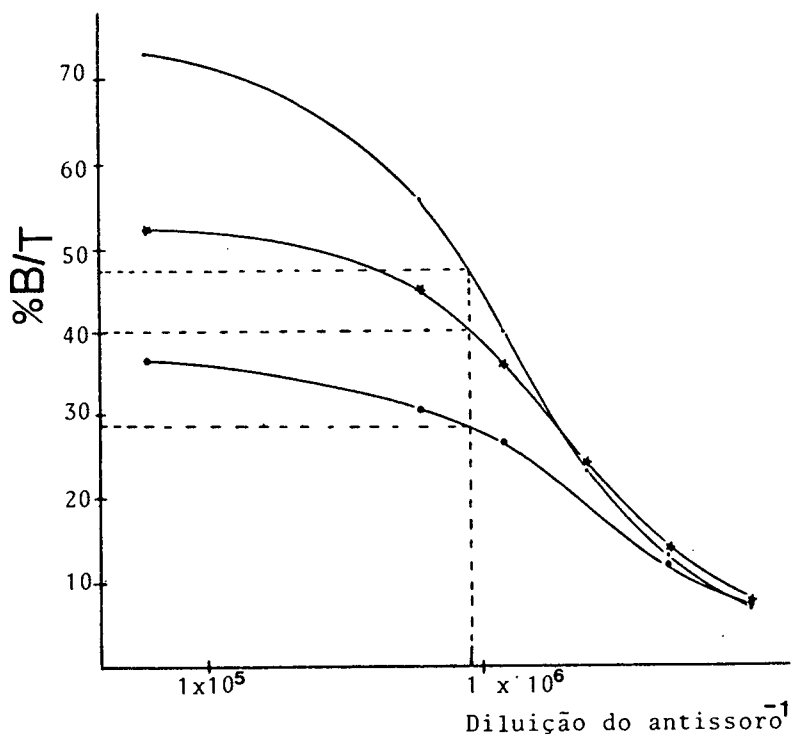


Figura 7. Titulação do antissor anti-hTSH por radioimunoensaio empregando traçadores: IPEN-I (●—●), IPEN-II (★—★) e NIADDK (◻—◻). A linha tracejada apresenta a ligação dos diferentes traçadores com o antissor na diluição de 1:900000.

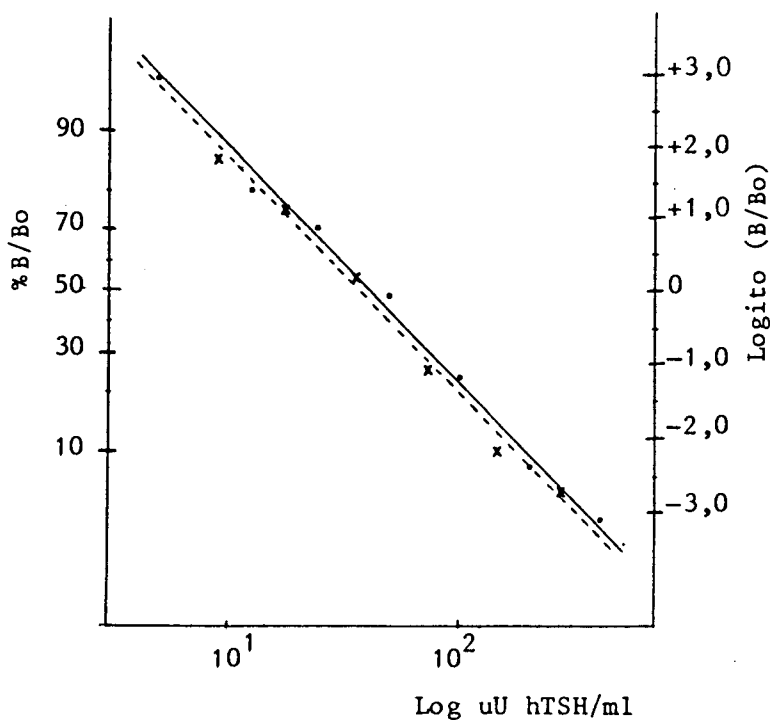


Figura 8. Comparação do deslocamento do traçador (NIADDK) por diferentes hormônios padrão: (—●—) 63/14 MRC Research Standard A e (x—x) IPEN-I. As retas são definidas pelas equações: Standard A:  $Y = -1,3846 \ln X + 5,1296$ ;  $r = 0,9971$ .

IPEN - I :  $Y = -1,3891 \ln X + 4,9760$ ;  $r = 0,9938$ .