

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SECRETARIA DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PREPARAÇÃO DE UM EXTRATO HOMOGÊNEO DE HORMÔNIO DE
CRESCIMENTO HUMANO, ISO – HORMÔNIO B, E SUA MARCAÇÃO
COM ¹²⁵I, PARA UTILIZAÇÃO EM RADIOENSAIOS**

Adir Janete Godoy dos Santos

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
"Mestre em Tecnologia Nuclear".**

Orientador: Dr. Paolo Bartolini

**São Paulo
1985**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS
E NUCLEARES**

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PREPARAÇÃO DE UM EXTRATO HOMOGÊNEO
DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO,
ISO-HORMÔNIO B, E SUA MARCAÇÃO COM
¹²⁵I, PARA UTILIZAÇÃO EM RADIOENSAIOS.**

ADIR JANETE GODOY DOS SANTOS

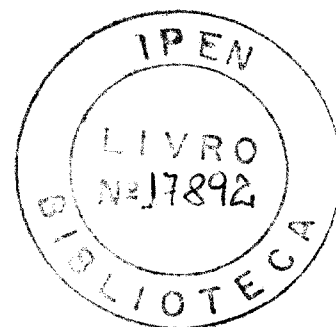
**DISSERTAÇÃO APRESENTADA
COMO PARTE DOS REQUISITOS
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
"MESTRE EM TECNOLOGIA
NUCLEAR."**

ORIENTADOR: Dr. PAULO BARTOLINI

SÃO PAULO

1985

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP
I. P. E. N.**



AO ADALBERTO.

À ALINE.

AO ADAM.

AOS MEUS PAIS.

AOS MEUS IRMÃOS.

Ao Dr. Paolo Bartolini,
ao Prof. Dr. José Carlos Barbério,
ao Prof. Dr. Júlio Kieffer,
ao Prof. Dr. Fausto Walter de Lima,
ã Irene Schwarz, M. Sc.,
ã Maria Teresa Carvalho Pinto Ribela, M.Sc.,
ao Dr. Laercio Antonio Vinhas,
ao Dr. Roberto Fulfaro,
ao Dr. José Roberto Rogero,
ao Prof. Dr. Rui Ribeiro Franco,
pela orientação, participação, críticas, sugestões
e apoio, na realização desta dissertação,

ã Rosângela do Rocio Arkaten,
ã Maria de Fátima Ferreira,
por sua contribuição técnica e dedicação,

aos demais colegas da Divisão de Radiobiologia,
pela colaboração,

o meu agradecimento.

PREPARAÇÃO DE UM EXTRATO HOMOGÊNEO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO, ISO-HORMÔNIO B, E SUA MARCAÇÃO COM ^{125}I , PARA UTILIZAÇÃO EM RADIOENSAIOS.

ADIR JANETE GODOY DOS SANTOS

RESUMO

No trabalho presente padronizou-se uma técnica analítica não - destrutiva de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e leitura direta, em densitômetro, na região UV, empregada para fins de identificação qualitativa e determinação quantitativa das formas iso-hormonais (Ihs) da molécula de hormônio de crescimento humano (HCH). A reprodutibilidade da técnica foi muito satisfatória, obtendo-se coeficiente de variação (CV) intra-ensaio da ordem de 0,76% e interensaio de 1,76%. A sensibilidade do método quantitativo foi comparável à dos métodos clássicos de determinação, que empregam leitura espectrofotométrica e que não discriminam entre os vários componentes presentes.

A técnica analítica padronizada foi empregada em método preparativo, para a obtenção de uma forma iso-hormonal homogênea, iso-hormônio B, em quantidade da ordem de miligramas, utilizando EGPA com corrente elétrica reversa (ER) para eluir a banda protéica do gel. A recuperação percentual obtida foi de 72%, para número de ensaios igual a nove.

Apesar da metodologia empregada ser não - destrutiva, do ponto de vista físico-químico, achou-se necessário investigar se eram realmente mantidas as propriedades bio-imunológicas, no caso do HCH. Para essa finalidade elaborou-se um ensaio biológico "in vivo", por incremento de peso, em ratos hipofisectomizados, no esquema fatorial 2 x 2. Usou-se HCH submetido à ER (HCH-U), em comparação a esta mesma preparação, empregada como referência, que não sofreu tal processo. A análise da preservação da imunoatividade foi feita por intermédio de radioimunoensaio (RIE), marcando-se o Ih-B purificado

com ^{125}I e empregando-o como padrão secundário e como traçador em curvas de dose-resposta. Determinou-se sua potência imunológica absoluta contra um padrão secundário calibrado.

Pelos resultados, pôde-se concluir que foram preservadas, além das propriedades físico-químicas, as características bio-imunológicas, permanecendo inalterada a atividade somatotrófica "in vivo" e a capacidade de ligação ao anticorpo específico, da molécula de HCH. A preparação purificada de Ih-B pode ser usada para marcação com ^{125}I e como padrão de referência em curvas de RIE, que empregam, portanto, reagentes homogêneos.

PREPARATION OF A HOMOGENEOUS EXTRACT OF HUMAN GROWTH HORMONE,
ISOHORMONE B, AND ITS ^{125}I -LABELING FOR UTILIZATION IN
RADIOLIGAND ASSAYS.

ADIR JANETE GODOY DOS SANTOS

S U M M A R Y

In the present work, a rapid, non-destructive polyacrylamide gel electrophoretic (PAGE) technique, with direct UV-densitometry, was set up to permit both qualitative and quantitative studies of human growth hormone (hGH) isohormone purification. The precision of this technique proved to be quite satisfactory, with an intra-assay coefficient of variation (CV) of the order of 0,76% and an inter-assay CV of 1,76%. Its sensitivity was also comparable to that of classical quantitative spectrophotometric techniques, which, in general, measure the total protein content, without discriminating among the various individual components present.

This technique was used on a preparative scale to obtain milligram amounts of the fundamental form of hGH, isohormone B (Ih-B). Reversed electrophoresis was employed to elute the protein band from the gel. The protein recovery was of the order of 72%.

Retention of bio- and immunoactivity was demonstrated via two separate experiments. An "in vivo" bioassay, based on the weight increase of hypophysectomized rats with a 2 x 2 factorial assay design, was used to compare the true somatotrophic activity of an hGH preparation submitted to the purification process with that of a single control preparation. Retention of immunoactivity was confirmed by studying the antibody binding properties of purified and radioiodinated Ih-B and by determination of its absolute immunopotency against a calibrated secondary standard. Both experiments indicated no alteration in bio- or immunoactivity. Radioimmuno

assay curves, determined using I_h-B, as a standard and la
belled preparation, showed its applicability in setting up
assays based on more homogeneous reagents.

ABREVIATURAS

IPEN	- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Comissão Nacional de Energia Nuclear. São Paulo.
NIAMDD	- National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases.
WHO	- World Health Organization.
UI	- Unidade Internacional.
UIC	- Unidade Internacional de caliceína.
HC	- Hormônio de crescimento.
HCH	- Hormônio de crescimento humano.
HCH-IPEN	- Hormônio de crescimento humano produzido no IPEN.
HCH-NIAMDD	- Hormônio de crescimento humano fornecido pelo National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases.
Ac	- Anticorpo.
Ac-IPEN	- Anticorpo específico, anti-HCH, produzido no IPEN.
Ac-NIAMDD	- Anticorpo específico, anti-HCH, fornecido pelo National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases.
d	- daltons.
20K	- Variante molecular do hormônio de crescimento humano, com peso molecular de 20.000 daltons.
Ih(s)	- Iso-hormônio (s).
Ih-B	- Iso-hormônio B, forma fundamental da molécula de hormônio de crescimento humano.
SAB	- Soroalbumina bovina.
M-SAB	- Banda monomérica da soroalbumina bovina.
aa	- aminoácidos.
EGPA	- Eletroforese em gel de poliacrilamida.
EGPAP	- Eletroforese preparativa em gel de poliacrilamida.

ER	- Eletroforese reversa.
R _m	- Distância de migração eletroforética relativa.
K	- Razão entre a migração relativa do iso-hormônio B e a banda monomérica da soroalbumina bovina , no gel.
O	- Origem da migração no gel.
F	- Distância de migração da frente eletroforética no gel.
CE	- Sentido da corrente elétrica no gel.
A(%)	- Concentração de acrilamida no gel.
QMD	- Quantidade mínima detectável.
HCH-S	- Preparação de hormônio de crescimento humano padrão, referência no ensaio biológico.
HCH-U	- Preparação de HCH submetida a técnica de EGPA preparativa, para uso no ensaio biológico.
RIE	- Radioimunoensaio.
Ag	- Antígeno.
PEG	- Polietileno glicol.
T	- Antígeno marcado total
B	- Fração de antígeno marcado ligado ao anticorpo.
Bo	- B correspondente ao ponto de dose zero.
ED ₅₀	- Dose que determina 50% de queda na resposta, <u>re</u> lativa à dose zero.
cpm	- Contagens por minuto.
rpm	- Rotações por minuto.
V _{ER}	- Volume de eluição relativo.
V ₀	- Volume de exclusão molecular.
D ₁	- Fração de antígeno marcado correspondente a <u>li</u> gações inespecíficas.
ACQI	- Amostras de controle de qualidade interno.

S	- Desvio padrão.
CV	- Coeficiente de variação.
μCi	- Microcurie; $3,7 \times 10^4$ desintegrações por segundo.
mCi	- Milicurie.
Bq	- Bequerel. Uma desintegração por segundo.
μg	- micrograma, 10^{-6} gramas.
μl	- microlitro, 10^{-6} litros.
A	- Absorvância.
E	- Coeficiente de extinção.
d	- Caminho óptico na cubeta de leitura, igual a 1 cm.
nm	- Nanômetros.
UV	- Irradiação luminosa com comprimento de onda no intervalo de luz ultravioleta (185 - 325nm).

C O N T E Ú D O

	Pag.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 - Equipamentos	13
2.2 - Eletroforese Analítica	14
2.2.1 - Material biológico	14
2.2.2 - Reagentes e materiais	14
2.2.3 - Soluções e tampões estoque	15
2.2.4 - Técnica eletroforética	16
2.2.4.1 - Preparação das amostras para EGPA	16
2.2.4.1.1 - Extração e purificação do HCH	16
2.2.4.1.2 - Preparo das amostras de HCH-IPEN	17
2.2.4.1.3 - Preparo das amostras de SAB	19
2.2.4.1.4 - Preparo das amostras de HCH-NIAMDD	19
2.2.4.2 - Géis de referência	19
2.2.4.3 - Preparo das matrizes de gel	20
2.2.4.3.1 - Soluções para polimerização	20
2.2.4.3.2 - Polimerização do gel	21
2.2.4.4 - Aplicação da amostra	21
2.2.4.5 - Corrida eletroforética	22
2.2.4.6 - Remoção dos géis	22
2.2.5 - Técnica densitométrica	23
2.2.5.1 - Análise qualitativa	24
2.2.5.1.1 - Emprego dos géis de referência	24
2.2.5.1.2 - Cálculos	24
2.2.5.1.2.1 - Migração relativa (Rm)	24
2.2.5.1.2.2 - Razão entre a Rm do Ih-B e M-SAB	25

	Pag.
2.2.5.2	- Análise quantitativa 26
2.2.5.2.1	- Fundamentos teóricos 27
2.2.5.2.2	- Curva padrão de concentração 29
2.2.5.2.2.1	- Cálculo da área dos picos 29
2.2.5.2.2.2	- Determinação da equação da reta 30
2.2.5.2.3	- Comparação entre densitometria e espec trofotometria 32
2.2.5.2.4	- Cálculo da sensibilidade 32
2.3	- Técnica Preparativa para Obtenção do Ih-B Puro 35
2.3.1	- Material biológico 35
2.3.2	- Eletroforese de separação (Fase I) ... 35
2.3.2.1	- Preparação do gel 35
2.3.2.2	- Preparação das amostras 36
2.3.2.2.1	- HCH 36
2.3.2.2.2	- SAB 36
2.3.2.3	- Aplicação da amostra 37
2.3.2.4	- Eletroforese 37
2.3.3	- Densitometria (Fase II)..... 37
2.3.4	- Eluição da banda iso-hormonal 37
2.3.4.1	- Difusão simples 37
2.3.4.2	- Eletroforese reversa - ER (Fase III) . 39
2.3.4.2.1	- Preparo da amostra 39
2.3.4.2.2	- Preparo do gel 40
2.3.4.2.3	- Polimerização 40
2.3.4.2.4	- Eletroforese 40
2.3.5	- Diálise 42
2.3.6	- Análise do Ih-B purificado 42
2.3.7	- Estocagem 42
2.4	- Ensaio Biológico 43

		Pag.
2.4.1	- Produtos químicos e biológicos	43
2.4.2	- Animais	45
2.4.3	- Técnicas de hipofisectomia em rato	45
2.4.3.1	- Importância da hipófise	45
2.4.3.2	- Hipofisectomia em rato	45
2.4.4	- Cuidados pós-cirúrgicos	49
2.4.5	- Controle de peso	49
2.4.6	- Tipos de ensaio biológico	49
2.4.7	- Ensaio por ganho de peso corpóreo total	50
2.4.7.1	- Preparo das amostras de HCH para o bio ensaio	51
2.4.7.2	- Esquema do ensaio	52
2.4.8	- Cálculos e análise estatística	52
2.4.8.1	- Determinação da curva de crescimento .	52
2.4.8.2	- Parâmetros necessários	53
2.4.8.3	- Cálculos	54
2.4.8.3.1	- Potência biológica (M) da preparação U, em relação à S	54
2.4.8.3.2	- Inclinação combinada (b) das curvas de crescimento das duas preparações	55
2.4.8.3.3	- Desvio padrão (S) da curva dose-respos ta	55
2.4.8.3.4	- Índice de precisão (λ)	55
2.4.8.3.5	- Erro padrão do ensaio (S_M)	56
2.4.8.3.6	- Limites de confiança (XL)	56
2.4.8.4	- Testes de significância	56
2.4.8.4.1	- Diferença entre as preparações	56
2.4.8.4.2	- Diferença entre doses	57
2.4.8.4.3	- Divergência entre as inclinações das curvas de dose-resposta	57

	Pag.
2.4.8.4.4	- Diferença entre dose-grupos (gaiolas) . 57
2.4.8.5	- Processamento dos dados 58
2.5	- Radioimunoensaio 58
2.5.1	- Material radioativo 59
2.5.2	- Material biológico 59
2.5.3	- Reagentes analíticos 60
2.5.4	- Tampões estoque, concentrados 60
2.5.5	- Marcação e purificação da proteína 61
2.5.5.1	- Soluções usadas na marcação 61
2.5.5.2	- Técnica de marcação 61
2.5.5.3	- Técnica de purificação 63
2.5.6	- Controle de qualidade da proteína radio iodada 64
2.5.6.1	- Condições de ensaio 64
2.5.6.2	- Separação das frações livre (F) e liga da ao anticorpo (B) 65
2.5.6.3	- Cálculos 65
2.5.7	- Radioimunoensaio 66
3	- RESULTADOS 68
3.1	- Eletroforese analítica 68
3.1.1	- Poder de resolução da matriz 70
3.1.1.1	- Influência da concentração de acrilami da 71
3.1.1.2	- Influência do pH 71
3.1.2	- Géis de referência 71
3.1.3	- Análise qualitativa 74
3.1.4	- Análise quantitativa 81
3.2	- Eletroforese preparativa (EGPAP) 88
3.2.1	- Purificação da M-SAB 88

		Pag.
3.2.2	- Purificação do Ih-B	88
3.3	- Ensaio Biológico	95
3.3.1	- Preparo da amostra	95
3.3.2	- Ensaio biológico	98
3.4	- Radioimunoensaio	101
3.4.1	- Radioiodação e purificação	101
3.4.2	- Rendimento da radioiodação e ligação do ^{125}I -Ag ao anticorpo específico	101
4	- DISCUSSÃO	115
5	- CONCLUSÕES	126
6	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

1. INTRODUÇÃO

O hormônio de crescimento humano (HCH) é produzido no lobo anterior da hipófise e exerce, principalmente, a função biológica de promover o crescimento somático, existindo na circulação sanguínea em concentrações inferiores a 4 ng/ml de plasma, em indivíduos normais. A molécula de HCH possui estrutura primária formada por uma seqüência conhecida de 191 resíduos de aminoácidos (aa), com peso molecular de aproximadamente 22.000 d. Possui duas pontes dissulfeto, formando duas alças, com formato globular característico e resíduos de fenilalanina nos grupos terminais amínico e carboxílico(13, 68, 69). O centro ativo da molécula ainda não foi localizado com certeza(13, 29). Trabalhos(29, 49) indicam evidências de que o HCH não atua diretamente no crescimento ósseo, mas o faz via liberação de somatomedinas pelo fígado, em resposta ao estímulo. Os receptores para este hormônio, até o momento, foram caracterizados no fígado(18, 20, 29, 36, 47, 69, 104), monócitos circulantes(29, 58, 59), glândula mamária(47, 90), adipócitos(29, 39) e tecido muscular(29). A figura 1 representa a molécula de HCH.

A partir da década de 60, tornou-se reconhecido o fato dessa molécula polipeptídica ser heterogênea, apresentando diferentes formas, denominadas iso-hormônios(Ihs), que quando isoladas apresentam a imuno- e bioatividade característica deste hormônio. Tais formas iso-hormonais podem ser caracterizadas por diferenças na estrutura primária, seja pela ausência de alguns resíduos de aa e/ou desamidação, com conseqüente alteração na rede de cargas elétricas efetivas da cadeia, além de formas diméricas. A caracterização física do primeiro tipo de Ihs mostrou a falta de resíduos de aa em região que não altera a configuração, a massa molecular permanece quase idêntica, porém, apresentando aumento acentuado de carga elétrica, regularmente progressivo, da forma fundamental à mais eletronegativa, estimado por alguns autores(27) em 1,0 a 1,5 unidades de valência (prótons/molécula) e por outros(110) em 0,3 a 0,5 unidades de valência entre cada Ih subsequente. A maioria das formas iso-hormonais do HCH, portanto, são considera

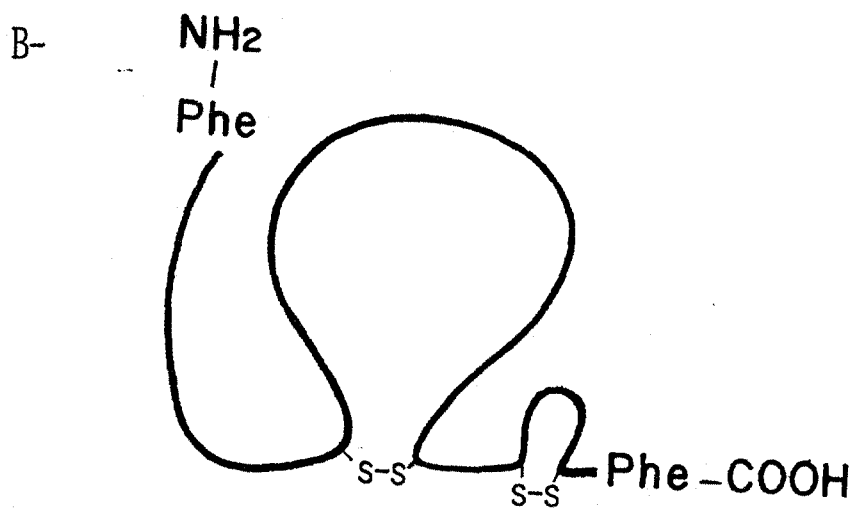
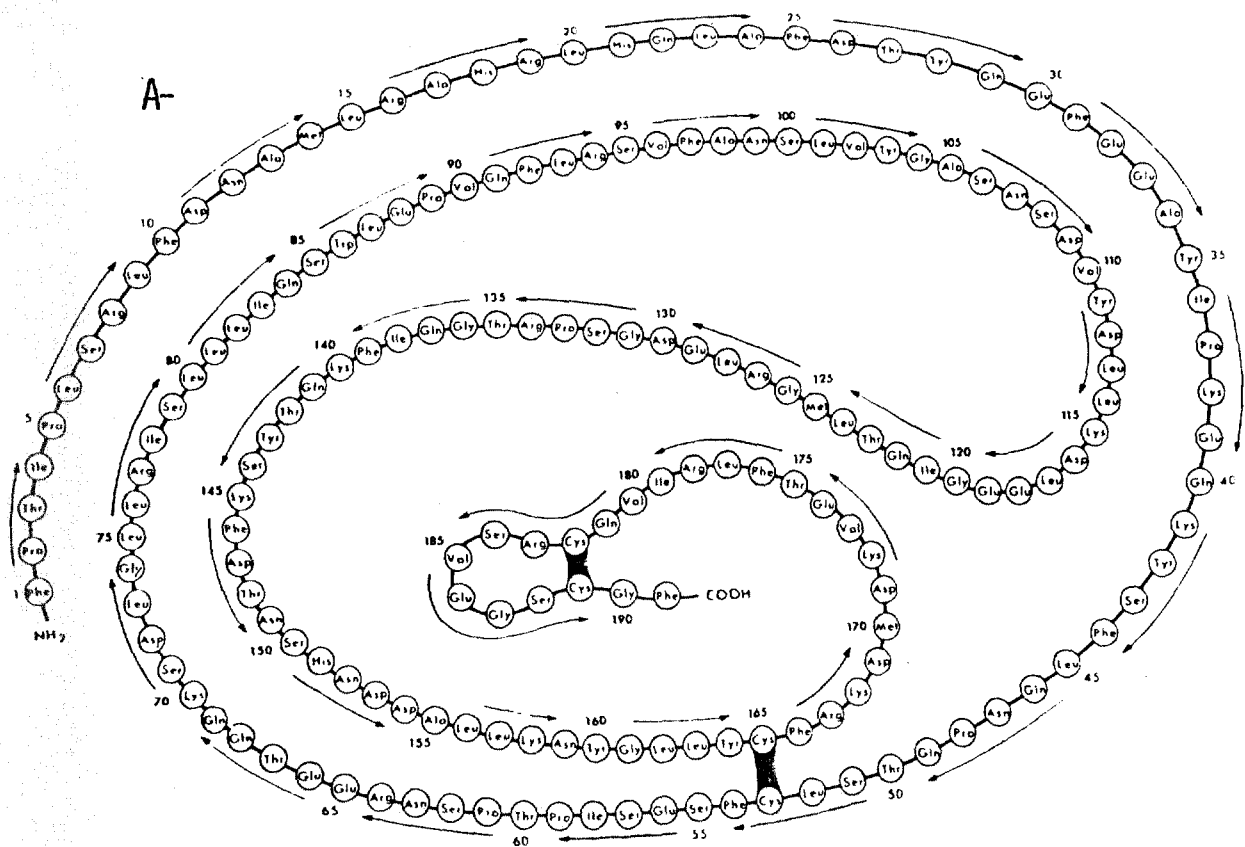


FIGURA 1 - MOLÉCULA DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO (HCH).

A- Sequência de aa e estrutura molecular, segundo LI et al. (69). Vê-se as pontes dissulfeto entre os resíduos cisteína 53-165 e 182-189.

B- Representação estrutural da molécula, com o formato globular característico.

das isômeros de carga, existindo somente uma forma dimérica (isômero de massa), facilmente separada mediante a técnica de purificação por cromatografia de peso molecular. Neste trabalho serão considerados somente os isômeros de carga.

As formas iso-hormonais são denominadas por diferentes simbologias, dependendo dos autores. O grupo de LEWIS e colaboradores (63, 64, 65, 92) as identifica como sendo HCH, a molécula intacta e α_1 , α_2 , α_3 e β as formas parcialmente clivadas e progressivamente mais eletronegativas, com peso molecular maior ou igual ao valor de 21.500d. SKYLER et al. (94) as denomina respectivamente iso-hormônio B (Ih-B), a forma fundamental e Ihs C_1 , C_2 , D e E (Ih- C_1 , Ih- C_2 , Ih-D e Ih-E). Adotaremos, aqui, a nomenclatura proposta por SKYLER.

LEWIS e seus colaboradores (22, 63, 65, 66, 67, 94, 109) estabeleceram uma série de fatores tidos como responsáveis pela heterogeneidade do HCH. Estes fatores são: proteólise enzimática, desamidação, agregação e ligação com os ácidos graxos. Dentre estes fatores o mais comumente aceito é a proteólise enzimática, associada à desamidação. Os trabalhos mais decisivos para estabelecer este fator como a causa da transformação da molécula íntegra do HCH foram os dos grupos de CHRAMBACH (27, 109, 110) e SINGH (92). Ambos observaram que a adição de plasmina humana a uma preparação de HCH, rica em Ih-B, resultava na transformação gradual deste em Ihs de carga negativa crescente, identificados como Ihs C_2 , D e E. A diferença de carga encontrada entre estes Ihs foi atribuída a reações de proteólise enzimática, que ocorrem entre os aa da região 135 a 158 da sequência, sem alterar as pontes dissulfeto, mantendo o formato globular da molécula inalterado. Para comprovar esta hipótese os autores (92) submeteram os Ihs resultantes da digestão plasmínica a uma redução forçada em presença de mercaptoetanol, provocando a quebra das pontes dissulfeto da molécula, obtendo como resultado dois componentes $-F_1$ e F_2- de pesos moleculares aproximados de 16.000 e 9.000d. A soma da massa molecular destes dois fragmentos corresponde, aproximadamente, à do HCH intacto. A figura 2 representa a divisão dos dois fragmentos.

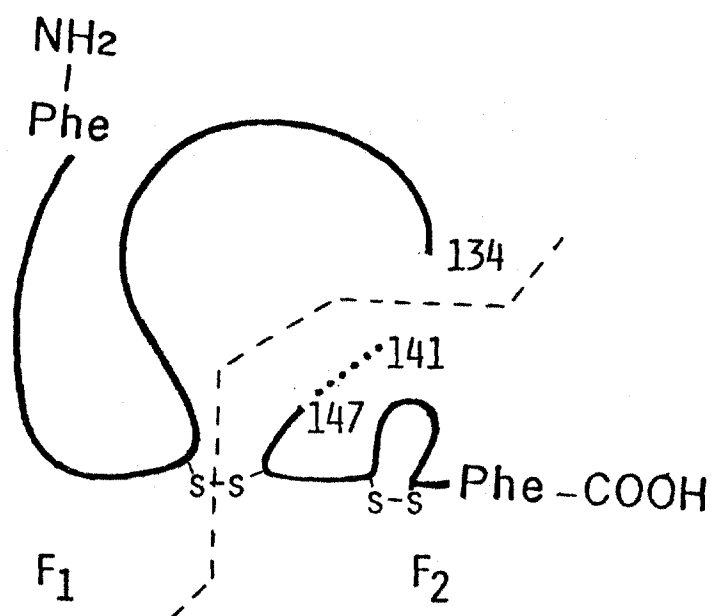


FIGURA 2 - Clivagem de resíduos de aa em região que não altera a conformação molecular (92). Quando a molécula é submetida à redução forçada, em presença de mercaptoetanol (92), ocorre a ruptura das pontes dissulfeto, resultando dois fragmentos F₁ (16.000 d) e F₂ (9.000 d).

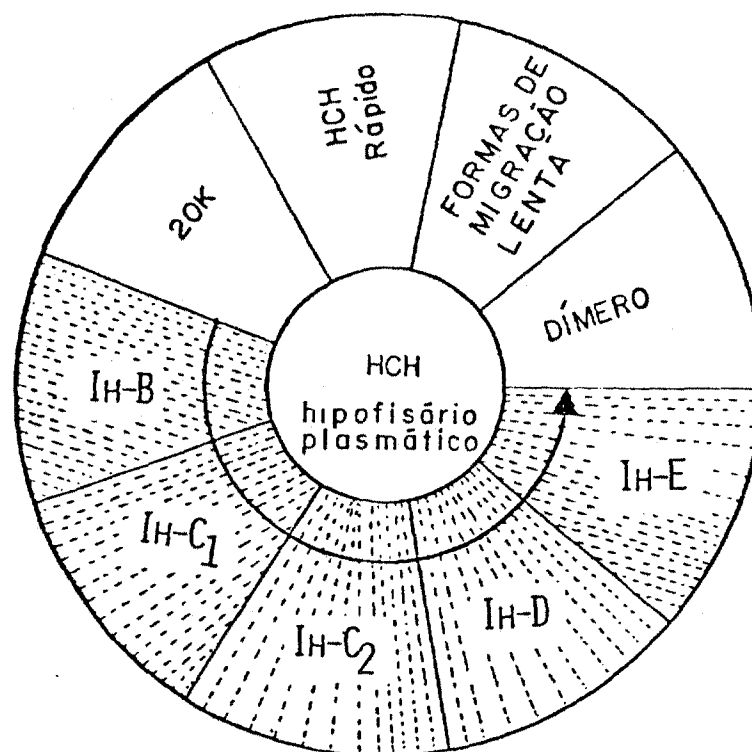


FIGURA 3 - Formas heterogêneas do HCH hipofisário e plasmático. A área tracejada representa os iso-hormônios, isômeros de carga, segundo a nomenclatura proposta por SKYLER (94). O sentido da seta indica o aumento progressivo de eletronegatividade molecular.

Os produtos derivados "in vitro" pela ação da plasmina ou fibrinolisinase bacteriana são idênticos ou muito similares, tanto química quanto biologicamente, aos Ihs que existem naturalmente, isolados de preparação de extrato hipofisário (8, 35, 67, 92, 109).

Existem muitos trabalhos para determinar as diferenças configuracionais existentes entre as várias formas iso-hormonais. As diferenças configurativas entre os Ihs C₁ e C₂ não estão totalmente esclarecidas até o presente, embora tenham sido verificados pontos isoelétricos aparentes distintos (94) entre ambos ($5,35 \pm 0,07$ e $5,30 \pm 0,06$; respectivamente). Por análise de configuração molecular esclareceu-se, recentemente, que no Ih-C₂ ocorre a ausência de um hexapeptídeo na alça maior da molécula (resíduos 134 a 139) e a glutamina (resíduo 140) é desamidada a ácido glutâmico (65). No Ih-D ocorre a perda de um fragmento de doze aa, dos resíduos 135 a 146 (92). No Ih-E, forma mais instável (8) e difícil de caracterizar (65), alguns autores presumem que ocorra, além das alterações notadas no Ih-D, uma série de clivagens da cadeia entre os resíduos 147 a 158 (92). Outros (65) sugerem a possibilidade de várias clivagens não quantitativas adicionais ocorrerem próximo ao corte do hexapeptídeo removido inicialmente (134 a 139), além de ocorrer simultaneamente a desamidação de alguns resíduos de glutamina nesta região da cadeia molecular. A figura 2 mostra a molécula do HCH, com as clivagens dos diferentes fragmentos de resíduos de aa citadas acima.

A presença dos Ihs já foi demonstrada ao nível de variações genéticas (10, 12, 20, 21, 44, 66). É o caso da forma comumente chamada de 20K, devido ao seu peso molecular de 20.000d, que portanto, difere consideravelmente na sequência de aa, tendo estrutura primária e propriedades biológicas diferentes, podendo ser considerado um novo hormônio hipofisário (66). Demonstraram-se, também, outras formas derivadas de modificações em fase pós-traducional, recentemente descritas em relação às suas propriedades de migração eletroforética (66, 91). Uma forma iso-hormonal com grupo amino-terminal bloqueado, provavelmente acetilado, foi designada HCH rápido. Outra

variante é um dímero formado por ligação covalente via ponte dissulfeto. Outras, ainda, cujos tipos de modificações são desconhecidos, foram demonstradas somente através de eletroforese em presença de uréia e denominadas formas de migração lenta.

Não se excluem, ainda, modificações moleculares relacionadas com a técnica de extração que geralmente origina, além de produtos análogos, fragmentos hormonais. A figura 3 mostra as formas iso-hormonais diferentes do HCH.

Todas as preparações de HCH, obtidas no IPEN-CNEN/SP (HCH-IPEN), a partir de extração de hipófises congeladas, apresentam de duas a quatro formas iso-hormonais, quando analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo a forma fundamental, Ih-B, a mais abundante (1, 3, 42, 89).

É bom lembrar que a análise de uma preparação de HCH produzida por engenharia genética, extraída de *Escherichia coli* (93), apresentou uma distribuição em Ihs similar àquela de preparações obtidas de extração hipofisária.

Adenomas pituitários, obtidos de pacientes portadores de acromegalia, mantidos em cultura de órgão, produziram a forma fundamental, Ih-B, em maior quantidade, não havendo evidência de alteração proteolítica durante o processo de cultura (96). Em outro trabalho (10), estudou-se a síntese e secreção de HCH por glândulas pituitárias humanas, em cultura de órgão. Utilizaram-se uma glândula normal e cinco glândulas de pacientes com doenças hipofisárias. Em todos os casos, a forma principalmente secretada foi o Ih-B e as formas clivadas obtidas representaram menos que 5% do HCH total.

O significado fisiológico da heterogeneidade do HCH e o mecanismo de clivagem enzimática "in vivo" é completamente desconhecido até o momento (8, 10, 12, 63, 66, 67, 110), embora estudos, da bioatividade das formas iso-hormonais diferentes do HCH, tenham comprovado ação somatotrófica maior para as formas clivadas, demonstrada em rato hipofisectomiza

do por ensaios de ganho de peso corpóreo (63), crescimento da cartilagem da epífise proximal da tíbia (63, 92, 110) e produção de somatomedina (11). Estes dados reforçam a hipótese aventada por LEWIS et al. (63) e RAUMANN & MAC CART (8, 10) de que o Ih-B pode ser um pró-hormônio e que deve ser modificado enzimaticamente "in vivo", pós-síntese, para exercer totalmente seus efeitos fisiológicos. A hipótese então proposta (63) é que os ribossomos formariam HCH com uma seqüência intacta de 191 aa, forma estocada. Antes (2, 10) ou durante (2, 10, 63) a secreção ocorreria a supressão de resíduos seqüenciais, resultando em formas parcialmente clivadas, com potência biológica aumentada. A clivagem da molécula intacta seria, por assim dizer, uma função secretória pituitária. Isto seria confirmado pela dificuldade em demonstrar a presença de formas clivadas em glândulas frescas (63).

Alguns autores reconhecem a plasmina humana como sendo a enzima responsável pela conversão proteolítica do HCH a seus Ihs na glândula hipofisária (35, 92). Outros (63) acham que a plasmina não é a única responsável pela clivagem em extratos hipofisários e sugerem também a ação de outras proteinases.

Também o estudo da atividade lactogênica, pelo ensaio de papo de pombo (63, 92, 109, 110), demonstrou potência acentuada para as formas clivadas do HCH. LEWIS et al. (67) estudaram a ação diabetogênica dos Ihs do HCH, em cachorro, e verificaram que a forma fundamental do HCH, Ih-B, apresenta atividade hiperglicêmica fraca, porém quando convertida a formas clivadas "in vitro" pela ação da subtilisina, torna-se extremamente ativa na produção de intolerância à glicose e hiperinsulinemia.

Quando a investigação foi estendida ao homem, "in vivo", as observações sobre as diferenças na bioatividade e talvez no significado biológico, para os vários Ihs, também foram confirmadas. Um trabalho realizado por BUNNER et al. (17), injetando Ihs produzidos por digestão com subtilisina B em indivíduos deficientes em hormônio de crescimento (HC), determinou diferenças entre o Ihs, a saber, níveis aumentados de atividade metabólica, implicando em graus maiores de retenção de

N e K, bem como aumentada calciúria e glicemia para as formas clivadas. Análise sobre o metabolismo "in vivo", dos vários Ihs (8), em indivíduos normais, utilizando formas que ocorrem naturalmente, isoladas de uma preparação de HCH hipofisário, demonstrou diferenças significativas entre as velocidades de depuração metabólica, sendo os Ihs clivados C₂ e D, os quais possuem potência biológica maior, depurados em velocidade menor que o polipeptídeo intacto, Ih-B. Tal fato poderia fornecer uma explicação para as potências biológicas desiguais das várias formas iso-hormonais, uma vez que a velocidade de depuração menor, somada às diferenças encontradas no trabalho de BUNNER et al., citado anteriormente, poderia resultar em ação biológica prolongada e potência maior.

Ainda não foi demonstrado se os diferentes Ihs apresentam atividades somatotróficas reais diferentes no homem, no que diz respeito ao efeito em tratamento prolongado sobre o crescimento linear. A dificuldade de obtenção de Ihs puros tem impossibilitado dados conclusivos neste campo (8).

Diante de todos estes resultados, evidencia-se a necessidade em se obter quantidades suficientes das formas iso-hormonais puras, que possibilitem trabalhos experimentais "in vivo" e "in vitro" que possam auxiliar no esclarecimento do significado biológico destas formas hormonais. Diferentes grupos de pesquisadores têm demonstrado grande interesse na obtenção de quantidades da ordem de miligramas de iso-hormônios puros para esta finalidade (8).

Citam-se, na literatura, técnicas diferentes para obtenção de formas iso-hormonais puras, do hormônio de crescimento humano.

BAUMANN & CHRAMBACH (9) utilizaram um método preparativo de isotacoforese (ITF), acoplado ao sistema convencional de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Submeteram até 500 mg de preparações heterogêneas de HCH, intacta e após digestão com plasmina, para obtenção de formas homogêneas. Aplicaram a técnica de ITF, por um tempo total de 72 horas, obtendo a resolução dos Ihs em bandas distintas. A região do

gel, contendo os Ihs, foi seccionada e os segmentos foram eluídos por difusão simples em água. Os eluatos foram analisados por EGPA em placa. Obtiveram algumas formas iso-hormonais puras e outras com contaminação entre si, provavelmente devido às mobilidades próximas entre os Ihs. A recuperação do método variou de 86 a 98%, sendo fatores desfavoráveis o tempo longo e a complexidade operacional, além do aquecimento considerável durante a ITF, condições que facilitam a degradação protéica. A referida técnica também não se preocupou com a contaminação por acrilatos, que provavelmente ocorreu durante a eluição do segmento de gel por difusão aquosa. Estes não interferem em EGPA analítica, porém devem ser eliminados no caso em que a técnica seja utilizada para fins preparativos de formas iso-hormonais purificadas.

LEWIS et al. (63) submeteram 100 mg de HCH à proteólise com fibrinolisa bacteriana e aplicaram a técnica de cromatografia por troca iônica em coluna de DEAE-celulose (DEAE-C) para separação das formas iso-hormonais, usando tempo de eluição de aproximadamente nove horas. Obtiveram três formas iso-hormonais que, assim purificadas, foram recromatografadas pela mesma técnica para obter material realmente homogêneo. Em outro trabalho, realizado pelo mesmo grupo (92), utilizou-se também a mesma técnica para obter, de um extrato hipofisário, quatro formas iso-hormonais homogêneas, que correspondem aos Ihs B, C₂, D e E e outra fração heterogênea que corresponde aos Ihs C₁ mais C₂. Este método, além de exigir uma quantidade elevada de material, é relativamente demorado, pois necessita a repurificação de cada fração obtida, tendo a técnica de troca iônica poder resolutivo inferior ao das técnicas eletroforéticas.

YADLEY et al. (110) utilizaram a técnica de EGPA preparativa (54) para obter Ihs puros. Aplicaram 50 mg de uma preparação heterogênea de HCH hipofisário intacto e dessa mesma preparação digerida por plasmina, coletando, diretamente, por eluição eletroforética, frações que foram analisadas por EGPA, dialisadas, liofilizadas e estocadas a -20°C. Amostras contendo 1 a 5 mg de proteína foram repurificadas, por gel-filtração em Sephadex G-50, para obter separação maior entre as várias for

mas e eliminar os contaminantes não protéicos também eluídos do gel, provavelmente derivados da poliacrilamida e reagentes de polimerização. Esta técnica permitiu a obtenção de formas iso-hormonais puras sem contaminantes não protéicos, como é comprovado pelo acordo existente entre a determinação protéica ponderal e pelo método de LOWRY (17). Isto, porém, foi conseguido à custa de quatro fases: EGPA preparativa, diálise, liofilização e filtração em gel de Sephadex, que são notoriamente demoradas, trabalhosas e, especialmente a segunda e terceira, causadoras de possíveis alterações moleculares (2, 3, 50, 61, 62).

Neste trabalho, propõe-se a padronização de uma técnica simples, rápida e flexível, para a obtenção de formas iso-hormonais puras e que mantenha completamente inalteradas as propriedades imunobiológicas das moléculas hormonais. O método utiliza exclusivamente a EGPA, associada à densitometria. A técnica de EGPA, usada amplamente para fins qualitativos e quantitativos, evidencia, na grande maioria dos casos, as bandas protéicas mediante o tratamento com diversos corantes, inclusive nitrato de prata. Estes métodos de coloração, podem alcançar uma sensibilidade de detecção muito boa, porém não podem se estender a aplicações preparativas, pois alteram as propriedades bio-imunológicas das proteínas e apresentam precisão baixa e, especialmente, exatidão ruim, na determinação quantitativa, sendo a intensidade de coloração não relacionável linearmente com o conteúdo protéico real do gel, altamente irreprodutível no interensaio e extremamente variável, em função da estrutura e do ponto isoelétrico da proteína em exame.

Alguns autores já aplicaram a leitura direta do gel na região de luz ultravioleta (UV) para fins de quantificação de bandas protéicas (33, 43, 105) e outros descreveram técnicas preparativas utilizando aparelhos complexos, para a eluição destas bandas (16, 19, 23, 55, 60, 71).

No laboratório do IPEN-CNEN/SP (IPEN), padronizou-se uma técnica de leitura densitométrica direta do gel em luz

UV, que possibilitou a quantificação dos Ihs de HCH, verificando-se a existência de uma relação linear no intervalo entre 5 e 100µg de proteínas (45). Esta metodologia foi aplicada à técnica de eletroforese reversa, descrita por OTTO & ŠNEJDÁRKOVÁ (80), oportunamente modificada, com a finalidade de obter maior simplicidade, juntamente com o máximo de recuperação. As fases do procedimento preparativo incluem FGPA e leitura direta por densitometria UV e subsequente eluição da banda iso-hormonal por meio de EGPA com corrente elétrica reversa (eletroforese reversa ou ER), utilizando equipamentos simplificados e reagentes disponíveis no mercado interno. Tentou-se simplificar a elaboração das fases, aumentando a rapidez, de modo a efetuar a detecção, separação e eluição da forma iso-hormonal no mesmo dia, sendo esta submetida ao menor número possível de operações, diminuindo assim, consideravelmente, as possibilidades de degradação, agregação e perda da atividade imunobiológica.

Tentou-se obter uma técnica, com flexibilidade, aplicável em todos os níveis de mobilidades eletroforéticas. Para tanto ajustou-se a concentração de acrilamida no gel e o pH dos tampões de polimerização e de corrida às condições ideais de resolução.

A finalidade principal deste trabalho foi, portanto, padronizar uma técnica de EGPA preparativa, para obtenção de formas iso-hormonais puras, tornando-a aplicável, simultaneamente, para fins analíticos qualitativos e quantitativos de Ihs protéicos, sempre com procedimento não-destrutivo.

Considerando que a técnica de EGPA preparativa tem resultado, em alguns casos, em perda de atividade imunológica do hormônio humano luteinizante (hLH) e tireotrófico (hTSH) (87, 103), após padronização do método de obtenção de formas iso-hormonais puras, uma das metas do trabalho aqui apresentado foi também investigar se tal procedimento mantinha inalteradas as propriedades imunobiológicas e físico-químicas das formas iso-hormonais do HCH. Tais parâmetros são de importância para o radioensaio (RIE) (2,46) para o ensaio por receptores de membrana (18, 59, 90, 104), estudos sobre o mecanismo de ação e o metabolismo (8, 17) e uso clínico (2, 61, 62, 82,

88) deste hormônio. A preservação da atividade somatotrófica foi analisada aqui em ratos hipofisectomizados, pelo ensaio de ganho de peso corpóreo total (4, 72, 81, 108). Foi examinado também o comportamento do Ih-B puro, em relação à marcação com radioiodo 125 (^{125}I), visando a obtenção de produtos marcados de Ih-B, cujos parâmetros de controle de qualidade sejam aceitáveis, comparados àqueles estabelecidos para as nossas marcações de rotina (6), os quais estão de acordo com os dados da literatura assim como com os parâmetros aceitáveis pelos laboratórios no campo clínico-diagnóstico (2, 13, 62, 68, 91, 92, 94). Analisou-se, também, seu comportamento na ligação ao anticorpo específico, mediante curva de determinação da diluição ótima, em comparação com preparações heterogêneas. Este estudo foi feito utilizando um anti-soro, anti-HCH, de qualidade comprovada, fornecido pelo "National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases" (NIAMDD - E.U.A.) além de outro anti-soro gerado no IPEN. Isto se fez necessário, pois permitirá futuramente, além de maior controle e homogeneidade de reagentes, realizar estudos comparativos baseados nestas formas iso-hormonais diferentes. Curvas de RIE para uso clínico-diagnóstico poderão servir para avaliar a influência que possa ter o uso de traçadores homogêneos ou heterogêneos na determinação dos níveis séricos de HCH, basal e sob estímulo (91), e na própria validade destes ensaios (2, 62, 66, 91).

Será possível também, montando sistemas de RIE específicos para os vários Ihs (66, 91), investigar mais propriamente seu comportamento e significado fisiológico, que ainda são obscuros (2, 8, 12, 66, 67).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 EQUIPAMENTOS

- Suporte para tubos e lâmpada fluorescente de 15 Watts, para polimerização, construídos no IPEN.
- Cuba eletroforética, de acrílico, com reservatórios inferior e superior com capacidade de 600ml. Técnica Permatron, São Paulo.
- Fonte de alta tensão, com tensão variável de 0 a 1000V e 0 a 250mA. Técnica Permatron, São Paulo.
- Balança analítica modelo H20T, com precisão de 0,01mg. Mettler, Zurique, Suíça.
- Agitador mecânico do tipo "Vortex", modelo "ciclomixer" . Clay-Adams, U.S.A.
- Agitador magnético, modelo 16. Fisher Scientific Corporation, U.S.A.
- Densitômetro, modelo Scan 400. Joyce Loebel, Londres, Inglaterra.
- Registrador gráfico, modelo 28.000. Bryans, Londres, Inglaterra.
- Espectrofotômetro PQM II - Carl Zeiss, Alemanha.
- Liofilizador, modelo ML-L10-3. Metal-Lux, São Paulo.
- "Gel-Slicer", série 264. Joyce Loebel, Londres, Inglaterra.
- Lente binocular, modelo 16.249. Carl Zeiss, Alemanha.
- Bomba de vácuo, modelo XX-6.000.000. Millipore, U.S.A.
- Balança com precisão de 0,1g, modelo 1001, Marte, São Paulo.
- Espectrômetro de cintilografia automático, tipo poço, com cristal de NaI(Tl), que será denominado "contador-gama" . Beckman, Calif., U.S.A.
- Coletor de frações automático, refrigerado, "ULTRORAC" 7000. LKB, Estocolmo. Suécia.
- Bomba peristáltica, modelo 4912A. LKB, Estocolmo, Suécia.
- Centrífuga refrigerada automática, "Superspeed", RC-2B, Sorvall, Conn., U.S.A.

- Rotor tipo HS-4, série 7654566. Sorvall, Conn., U.S.A.

2.2 ELETROFORESE ANALÍTICA

Utilizou-se, neste trabalho, para análises qualitativa e quantitativa dos Ihs do HCH, a técnica de eletroforese em zona empregando-se matriz formada pela reação de polimerização da acrilamida, a qual denomina-se eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- HCH produzido a partir de hipófises congeladas, no IPEN/CNEN-SP (HCH-IPEN), lote 20.
- HCH, preparação AFP-4793B, fornecido pelo National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases - NIAMDD, (HCH-NIAMDD). Baltimore, U.S.A.
- Soroalbumina bovina (SAB), fração V, especialmente purificada para radioimunoensaio, número de catálogo A-7888. Sigma, St. Louis, U.S.A.

2.2.2 REAGENTES E MATERIAIS

- Acrilamida, 97%. Inlab, São Paulo.
- N, N' - metileno bis-acrilamida (BIS-acrilamida), P.A. Merck, São Paulo.
- N, N, N', N' tetrametileno diamina (TEMED), P.A. Merck, São Paulo.
- Riboflavina. Roche, São Paulo.
- Sacarose, cristais, P.A. Merck, São Paulo.
- Ácido clorídrico concentrado, P.A. Merck, São Paulo.
- Glicina, P.A. Merck, São Paulo.
- Tris-hidroximetilaminometano (TRIS-básico), P.A. Merck, São Paulo.

- Bicarbonato de amônio, P.A. Carlo Erba, São Paulo.
- Bicarbonato de sódio, P.A. Merck, São Paulo.
- Membrana de celulose para diálise, 8/32. Visking Company, Japão.

2.2.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES ESTOQUE

Estas soluções foram preparadas de acordo com o método descrito por DAVIS (30), mantendo-se a nomenclatura original utilizada por esse autor.

Todas as soluções foram estocadas em frasco âmbar, a 4°C, exceto a solução F, que foi armazenada a uma temperatura de -15°C.

a- Soluções usadas para polimerização da matriz.

Solução estoque A

TRIS-básico	36,6g
TEMED	0,23ml
Ácido clorídrico 1N	48,0ml (aproximadamente)
Água destilada q.s.p.	100ml

pH: 8,0 ; 8,9 e 9,3 ; variando a quantidade de HCl 1N em pregada.

Solução estoque C

Acrilamida	28,0g
BIS-acrilamida	0,735g
Água destilada q.s.p.	100ml

Solução estoque E

Riboflavina	4,0mg
Água destilada q.s.p.	100ml

b- Solução usada na aplicação da amostra.

Solução estoque F

Sacarose	40,0g
Água destilada	100ml

c- Tampão usado para corrida eletroforética.

Tampão estoque tris-glicina-0,4M

Tris-básico	6,0g
Glicina	28,8g
Água destilada q.s.p.	100ml
pH : 8,3	

2.2.4 TÉCNICA ELETROFORÉTICA

O método de DAVIS (30) foi parcialmente adaptado, modificando-se, inicialmente, o pH da solução estoque A, empregando-se somente o gel de separação ou gel principal e excluindo a polimerização da amostra em gel, adotando-se a eletroforese de amostras líquidas.

Como catalisador da reação de polimerização da matriz usou-se a riboflavina, em concentração final de 0,005mg/ml, em substituição ao persulfato de amônio. A fotopolimerização da matriz foi executada a 4°C, por 45 minutos. Foi abolido o uso do traçador azul de bromofenol para fins quantitativos. A coloração dos géis foi substituída pela leitura densitométrica direta.

2.2.4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA EGPA

2.2.4.1.1 Extração e Purificação do HCH

A preparação de HCH aqui utilizada foi obtida nos laboratórios da Divisão de Radiobiologia, do IPEN-CNEN/SP, de nominado HCH-IPEN, lote 20.

Partiram-se de hipófises congeladas a -15°C, empregando o método de extração descrito por ROOS et al. (86), modificado por ASSIS et al. (1) quanto à fase de primeira extra

ção do material biológico e semi-automatização durante a fase de fracionamento do extrato em gel de Sephadex G-100, substituindo nesta fase o uso de tampão fosfato por glicina-fosfato. O HCH-IPEN obtido foi liofilizado e mantido a 4°C, sob vácuo, em dessecador.

A figura 4 apresenta um esquema geral do método de extração do HCH-IPEN.

2.2.4.1.2 Preparo das amostras de HCH-IPEN

Verificou-se, experimentalmente, que a presença de glicina, na amostra, produz interferência na análise protéica por densitometria. Tornou-se então necessário submeter a amostra à diálise para eliminação da glicina.

A fim de manter o HCH armazenado sob a forma de pó liofilizado, essa operação foi efetuada sempre imediatamente antes da eletroforese, preparando-se somente quantidade de hormônio necessária no dia do experimento.

A membrana de celulose para diálise foi mantida sob ebulição, por 30 minutos, em solução de bicarbonato de amônio 0,1M; para neutralizar a superfície e homogeneizar os poros. A seguir, foi lavada em água destilada corrente e armazenada a 4°C, imersa em água destilada.

Definiu-se a relação existente entre a quantidade de HCH para glicina, que foi de 1:21. Pesou-se a quantidade de pó total contendo a quantidade de proteína desejada e dissolveu-se em água destilada; pH 7,0; para a concentração de 1mg/ml. A menos que seja citado no texto subentender-se-á que todas as amostras protéicas foram usadas nesta concentração.

Diferentes tampões e soluções para diálise foram por nós analisados, por exemplo, água destilada, água destilada com pH 7,0; tampão fosfato de potássio 0,05M - pH 7,6; solução de bicarbonato de sódio 0,01M. A última foi a que se

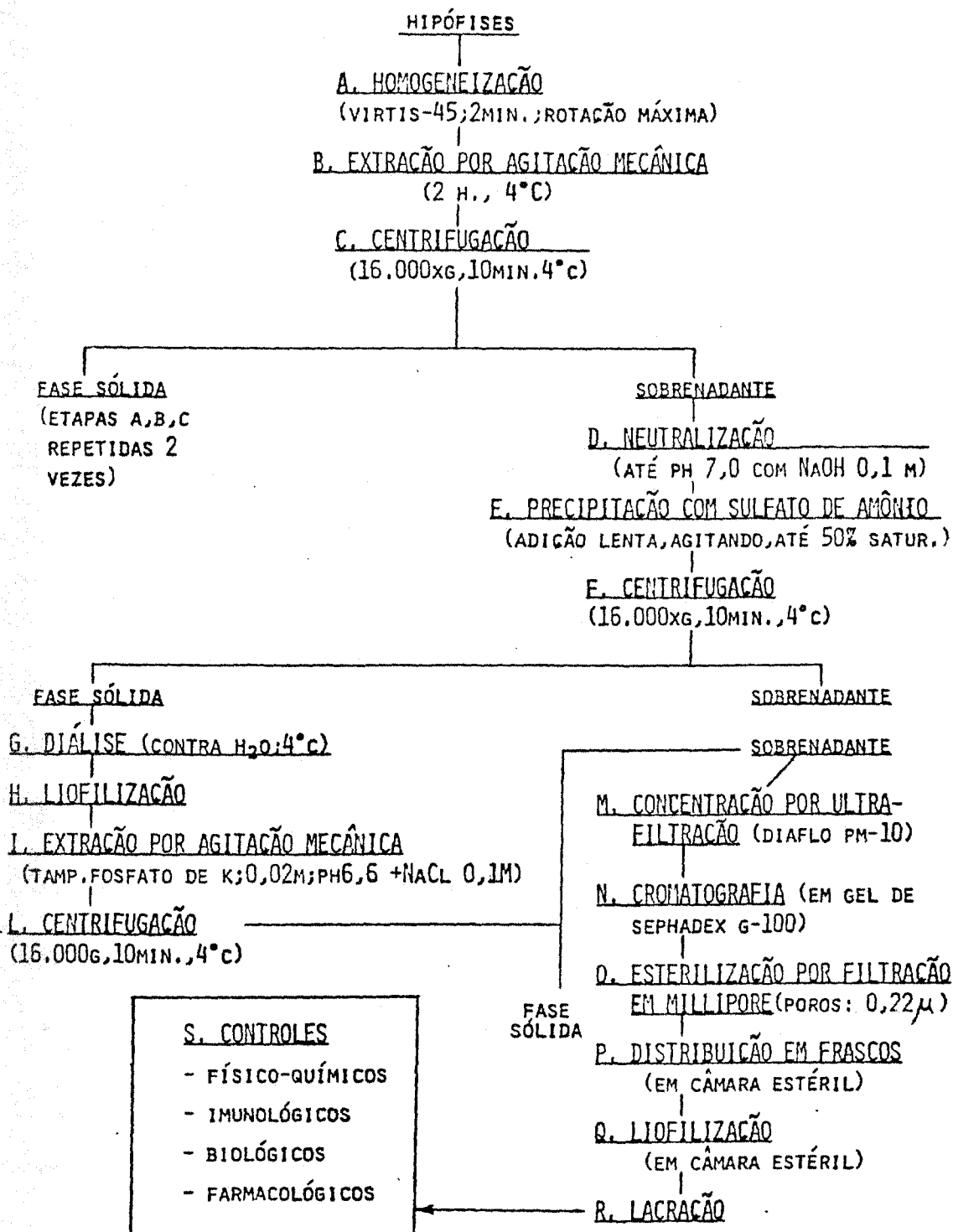


FIGURA 4 - Esquema do método de extração e purificação do HCH-IPEN, obtido da referência 3.

mostrou mais eficiente, não apresentando o inconveniente de turbidez ou precipitação parcial da proteína, não ocorrendo perdas do material nesta fase. A diálise foi então efetuada em recipiente de vidro de 8 litros, sob agitação magnética, a 4°C, com duas trocas de solução (8,0 l), por tempo total de 16 horas.

2.2.4.1.3 Preparo das amostras de SAB

A SAB utilizada apresenta-se sob a forma cristalizada, como proteína pura, portanto ela foi pesada em balança analítica com precisão de 0,01mg e dissolvida em água destilada com pH 7,0; para a concentração final de 1mg/ml. Preparou-se, em cada corrida eletroforética, nova solução de SAB, para impedir que possíveis erros iniciais, oriundos de uma única pesagem, se prorrogassem na análise quantitativa, no interensaio.

2.2.4.1.4 Preparo das amostras de HCH-NIAMDD

A preparação de HCH fornecida pelo NIAMDD, de alta pureza, foi pesada e dissolvida nas mesmas condições citadas no ítem acima.

2.2.4.2 Géis de Referência

Cada corrida eletroforética foi sempre acompanhada de dois géis usados como controle.

Gel-branco: Contém todos os elementos da amostra, excluindo a proteína, sendo preparado ao mesmo tempo que as amostras protéicas.

Gel M-SAB: Utilizaram-se 100µg de SAB, nas mesmas condições das amostras protéicas em análise. Essa proteína quando analisada em EGPA, apresenta três bandas distintas

que correspondem ao monômero, dímero e trímero. Como referência qualitativa para a corrida eletroforética adotou-se a banda monomérica da SAB (M-SAB), a qual teve sua migração relativa (R_m) determinada em todos os experimentos, fornecendo assim uma validade estatística interensaio.

2.2.4.3 Preparo das Matrizes de Gel

2.2.4.3.1 Soluções para polimerização

O gel de separação foi preparado, inicialmente, em quatro concentrações diferentes de acrilamida, seguindo a metodologia descrita por HEDRICK & SMITH (51), mantendo-se constante a razão acrilamida para bis-acrilamida em 38,1.

As soluções de preparo dos géis foram feitas imediatamente antes da polimerização, mantendo-se, para cada concentração total de acrilamida no gel (A%), as seguintes proporções entre as soluções estoque:

A%	Sol. A(ml)	Sol. C(ml)	Sol. E(ml)	Água destilada(ml)
7	1	2	1	4
10	1	2,85	1	3,15
12	1	3,43	1	2,57
14	1	4	1	2

Após o estudo inicial da resolução da matriz, em diferentes concentrações de acrilamida, definiu-se a concentração ideal para os Ihs do HCH, que foi de 7%. Variou-se, experimentalmente, outra condição físico-química da matriz, que pode influir na resolução, tal como pH da solução estoque A, empregando-a em pH 8,0; 8,9 e 9,3, mantendo-se o menor tempo de corrida eletroforética. Na EGPA analítica, portanto, empregou-se matrizes de 7% de acrilamida, com sol. estoque A em pH 8,9.

2.2.4.3.2 Polimerização do gel

Utilizaram-se tubos de vidro de 6mm de diâmetro interno por 80mm de comprimento, vedando-se uma das extremidades com membrana adesiva do tipo "Parafilm". Os tubos foram dispostos em estante apropriada para manter uma posição rigorosamente vertical. As soluções de polimerização foram transferidas para os tubos de vidro, mantendo-se uma altura uniforme de 6,5cm de solução em cada tubo. Sobre a superfície da solução pipetou-se cerca de 0,2ml de água destilada, a fim de evitar a formação de menisco na extremidade superior do gel e permitir bandas perfeitamente horizontais na separação eletroforética.

A reação de fotopolimerização da matriz foi efetuada, dispondo-se os tubos a distância aproximada de 7cm da fonte luminosa, durante 45 minutos, a 4°C. Após esse tempo a água na extremidade superior foi retirada por meio de papel absorvente.

2.2.4.4 Aplicação da Amostra

Imediatamente antes da aplicação no gel, as soluções protéicas foram homogeneizadas, sob agitação mecânica moderada, em aparelho do tipo "Vortex". Empregando-se micropipetas reguláveis Gilson de 0 a 20 μ l e 0 a 200 μ l (Rainin, MA, U.S.A.) as soluções protéicas contendo SAB, HCH-IPEN e HCH-NIAMDD foram aplicadas na extremidade superior do gel de separação, em quantidades de 5, 10, 25, 50 e 100 μ g por gel. As amostras foram analisadas, sempre, em duplicata. O HCH-NIAMDD, devido a sua escassez, foi analisado em um único ensaio. O volume final da amostra foi sempre igualado, completando-se com o diluente até um volume máximo de 200 μ l. A cada amostra adicionaram-se cerca de 50 μ l de solução estoque F, com a finalidade de aumentar a densidade da solução, evitando sua mistura com o tampão de corrida antes do início da eletroforese.

A amostra aplicada foi homogeneizada por inversões re

petidas dos tubos de vidro, vedando-se a extremidade superior com "Parafilm".

2.2.4.5 Corrida Eletroforética

O tampão estoque tris-glicina foi diluído até 0,04M , imediatamente antes do uso e empregado como tampão de corrida da.

Os tubos de gel foram posicionados verticalmente na cuba, entre os dois reservatórios. Completou-se o volume acima da amostra, em cada tubo, com o tampão de corrida e a seguir preencheram-se os reservatórios com esse mesmo tampão . Aplicou-se corrente elétrica anódica constante de 2mA por gel, efetuando-se a eletroforese a 4°C. O tempo de corrida foi determinado pela distância de migração do azul de bromofenol ou da banda amarela visível que migra sempre à frente das proteínas, provavelmente formada pela riboflavina presente na solução estoque E usada no preparo da matriz, ou por frações não polimerizadas de acrilamida (105).

Experimentalmente, verificou-se que a mobilidade eletroforética desta banda amarela nas condições eletroforéticas aqui empregadas, é muito semelhante à do traçador azul de bromofenol, permitindo assim sua omissão, especialmente na técnica quantitativa. O azul de bromofenol, mesmo em concentração baixa, provoca arraste junto a SAB, interferindo na quantificação por densitometria.

Interrompeu-se a corrida eletroforética quando a frente de migração chegou até cerca de 5mm da extremidade inferior do gel.

2.2.4.6 Remoção dos Géis

Após a eletroforese, as matrizes de gel foram retiradas dos tubos de vidro, utilizando-se uma seringa de 10ml, com agulha de aço inoxidável BD 23. A agulha foi introduzida en

tre a parede interna do tubo e a superfície do gel, injetando-se água gelada e simultaneamente girando a agulha por volta da parede, de modo a desprender toda a superfície do gel. Deve-se tomar todo o cuidado para não arranhar a superfície do gel, o que produziria o aparecimento de artefatos na leitura.

Os géis foram colocados em tubos de ensaio, de 10 mm x 105 mm, imersos em água destilada e mantidos em posição horizontal. Verificou-se, experimentalmente, que a permanência dos géis nesta posição fornece densitogramas com linha base menos acidentada e mais uniforme.

2.2.5 TÉCNICA DENSITOMÉTRICA

Imediatamente após a eletroforese a matriz de gel foi submetida a uma leitura direta em densitômetro, na região UV, com feixe de luz no intervalo de 220 a 310 nm. O densitômetro está acoplado ao registrador que descreve graficamente, em várias ampliações e velocidades do papel, um perfil de absorvância por comprimento de gel.

Neste trabalho as condições de registro foram estabelecidas em:

velocidade do papel : 1 mm/s,
diferença de potencial: 2,5 mV,
uma vez, que a velocidade do gel, em frente ao feixe de luz, é fixa em 25 mm/min.

A partir do densitograma obtido, fez-se a análise qualitativa e quantitativa, não destrutiva, das bandas iso-hormonais das proteínas empregadas. Para as medidas respectivas de migração eletroforética e área empregou-se régua transparente de 20 cm, com divisões de 0,5 mm.

2.2.5.1 Análise Qualitativa

2.2.5.1.1 Emprego dos géis de referência

Todos os parâmetros físico-químicos usados para caracterização e identificação dos Ihs do HCH, por meio de EGPA (10,27,35,63,92,94,109,110), foram simplificados nesse procedimento, introduzindo-se o uso de um padrão protéico, M-SAB, como referência de migração eletroforética. Mudanças pequenas nas condições físicas, pH e/ou concentrações das soluções empregadas na técnica são suficientes para modificar significativamente a mobilidade eletroforética das bandas protéicas (24, 25, 56, 85).

O emprego da banda protéica M-SAB, como um indicador das condições eletroforéticas, acusou fugas pequenas das condições de eletroforese estabelecidas inicialmente, além de permitir as correções necessárias para a identificação confiável da forma iso-hormonal.

O gel utilizado como controle (branco) definiu a linha base do perfil de absorvância obtido.

2.2.5.1.2 Cálculos

2.2.5.1.2.1 Migração relativa (R_m)

A partir do eletroforetograma de absorvância x comprimento de gel, obtido por densitometria direta, calculou-se a distância de migração relativa (R_m) para a proteína de referência, estabelecendo inicialmente um valor médio interensaio, com confiabilidade estatística boa, para número de ensaios igual a 20.

A seguir, determinaram-se valores de R_m para as bandas iso-hormonais das diferentes preparações de HCH.

Adotou-se como ponto médio das bandas protéicas o ponto máximo dos picos no perfil de absorvância. Em cada perfil efetuaram-se as seguintes medidas, expressas em mm:

1. distância de migração do azul de bromofenol : X
2. distância de migração de cada banda iso-hormonal : Y

O cálculo da migração das bandas protéicas em relação à frente eletroforética, ou R_m , é feito pela seguinte relação.

$$R_m = \frac{Y}{X} \quad (\text{equação 1}).$$

Os valores de R_m obtidos foram analisados quanto à sua reprodutibilidade intra-e interensaio, por meio de desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV).

$$CV = \frac{S}{\bar{M}} \cdot 100 \quad (\text{equação 2}).$$

\bar{M} = média de dados experimentais, de uma maneira genérica.

2.2.5.1.2.2 Razão entre a R_m do Ih-B e M-SAB

Observou-se, experimentalmente, que há sempre uma relação constante entre a migração das diferentes bandas protéicas, em géis a 7% de acrilamida. Mesmo quando as condições eletroforéticas preestabelecidas se modificam, a relação é obedecida, apesar das R_m s se apresentarem com valores alterados.

Com o propósito de simplificar o procedimento de análise qualitativa, de modo a obter identificação que corresponda verdadeiramente a determinada banda iso-hormonal, em tempo curto, imediatamente após a leitura densitométrica, aproveitou-se essa relação e definiu-se a razão numérica entre a migração da banda iso-hormonal do Ih-B do HCH e a banda protéica usada como referência (M-SAB).

Essa razão, estabelecida para a finalidade descrita acima, foi denominada K e foi definida como sendo:

$$K = \frac{\text{Rm do Ih-B}}{\text{Rm da M-SAB}} \quad (\text{equação 3}).$$

O valor médio para esta razão K obtido após 32 corridas eletroforéticas, calculando-se o desvio padrão e o coeficiente de variação, foi extremamente útil em comparações interensaios de dados obtidos em tempos e condições diferentes.

Observou-se que a razão K é mantida mesmo quando existem diferenças significativas no pH dos tampões usados no preparo das matrizes e na corrida eletroforética.

Por meio do valor numérico de K, foi possível identificar realmente o Ih-B, no caso de ensaios em que houve mudanças nas condições eletroforéticas, pois o seu uso possibilitou aplicar a seguinte correção:

$$K_{\text{no ensaio}} = \frac{\text{Rm do Ih-B}_{\text{no ensaio}}}{\text{Rm da M-SAB}_{\text{no ensaio}}}$$

$$\text{Rm Ih-B}_{\text{cor}} = K_{\text{no ensaio}} \times \text{Rm M-SAB}_{\text{(valor médio)}} \quad (\text{equação 4}).$$

onde,

$\text{Rm Ih-B}_{\text{cor}}$ = migração relativa do Ih-B corrigida, por meio do valor médio da migração relativa da M-SAB, que foi definido estatisticamente em condições normais de eletroforese.

2.2.5.2 Análise Quantitativa

2.2.5.2.1 Fundamentos teóricos

A análise quantitativa, por nós padronizada, utilizando densitometria direta, fundamentou-se na lei de LAMBERT-BEER (38) cujo enunciado diz: "Se na trajetória de um feixe de radiação luminosa há aumento sucessivo no número de moléculas absorventes idênticas, a intensidade do feixe diminui proporcionalmente com o incremento de moléculas do meio".

Seguem, então, as expressões matemáticas:

$$\frac{dI}{dN} = -\mu_{\lambda} \cdot I \quad (\text{equação 5}).$$

Onde:

dI = Quantidade de energia absorvida, da energia total, I_0 , incidente na célula.

dN = Aumento no número de moléculas absorventes do meio.

I = Intensidade de radiação transmitida pela amostra.

μ_{λ} = Constante de proporcionalidade, função do comprimento de onda (λ) na solução.

O sinal negativo na equação 5 significa justamente que a energia transmitida é inversamente proporcional ao incremento do número de moléculas absorventes idênticas do meio.

Integrando-se a equação 5, vem:

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -\mu_{\lambda} \int dN$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\mu_{\lambda} N$$

$$\ln \frac{I_0}{I} = \mu_\lambda \cdot N$$

Onde:

N = Número de moléculas absorventes contidas no ponto onde a intensidade é reduzida de I_0 a I , por um feixe de secção transversal de 1cm^2 .

I_0 = Intensidade de energia luminosa que incide na cubeta.

Quando a secção transversal do feixe (s), é diferente de 1cm^2 , tem-se:

$$\ln \frac{I_0}{I} = \mu_\lambda \cdot N \cdot s \quad (\text{equação 6}).$$

O produto ($N \cdot s$), na equação 6, é equivalente ao número de partículas efetivas na absorção e pode ser substituído pelo produto concentração vezes comprimento da trajetória do feixe luminoso no meio absorvente ($c \cdot d$). Neste trabalho d corresponde a 1cm . A constante μ_λ é então substituída por k , que é expressa em unidades de massa por área da secção transversal. Da equação 6, resulta:

$$\ln \frac{I_0}{I} = k \cdot c \cdot d \quad (\text{equação 7}).$$

O parâmetro k é substituído pelo coeficiente de extinção ou índice de absorvância (a), que é característica de uma combinação particular entre o soluto e o solvente, para um determinado λ incidente. Este coeficiente já inclui as unidades de transformação de logaritmo neperiano (\ln) para logaritmo na base 10 (\log), obtendo-se a equação 7 na forma abaixo.

$$\log \frac{I_0}{I} = a \cdot c \cdot d$$

A expressão ($\log (I_0/I)$) define, fisicamente, a absorvância (A) de uma amostra, do que resulta:

$$A = a \cdot c \cdot d \quad (\text{equação 8}).$$

Quando se deseja comparar quantitativamente a absorvância de várias substâncias conhecidas, usa-se o coeficiente de extinção molar ϵ .

$$A = \epsilon \cdot C \cdot d \quad (\text{equação 9}).$$

Onde:

ϵ = coeficiente de extinção molar ou índice de absorvância molar.

C = concentração molar (Mol/litro).

Quando se trabalha com substâncias de peso molecular alto, especialmente proteínas, o coeficiente de extinção pode ser expresso em função do peso percentual, $E_{1\text{cm},\lambda}^{0,1\%}$, ou seja, extinção de uma solução de 0,1% da substância em estudo, utilizando-se, para leitura, cubeta de 1cm de caminho óptico interno, para determinado λ .

$$E_{1\text{cm},\lambda}^{0,1\%} = \frac{A}{d \cdot C'} \quad (\text{equação 10}).$$

C' = concentração percentual em peso.

Neste trabalho, adotaremos o coeficiente de extinção, ou extinção, conforme o expresso na equação 10.

2.2.5.2.2 Curva padrão de concentração

2.2.5.2.2.1. Cálculo da área dos picos

Aplicaram-se, às matrizes de gel, quantidades de proteína de 5, 10, 25, 50 e 100 μ g, para eletroforese e leitura densitométrica subsequente. Aplicaram-se sempre duplicata de amostras, efetuando-se também duplicata de leitura. Fizeram-se quatro ensaios para a SAB e cinco ensaios para o HCH-IPEN. Para a determinação quantitativa do HCH-NIAMDD efetuou-se somente uma corrida eletroforética.

A partir do cromatograma de absorvância por comprimento de gel, obtido na análise densitométrica, calculou-se a área dos picos protéicos sob a curva obtida, expressa em mm^2 . A linha base definida pelo gel branco já citado no item 2.2.5.1.1, serviu como referência na determinação da área dos cromatogramas dos géis contendo proteína. A área foi calculada manualmente, definindo-se uma linha base e dividindo-se o pico total em triângulos, de forma a obter o aproveitamento total da superfície correspondente à posição da proteína no gel.

Obtiveram-se as áreas das divisões triangulares pelo método geométrico convencional: base vezes altura, dividido por dois.

Para os valores de área calculados, analisou-se a reprodutibilidade intra e interensaio, por meio do desvio padrão e CV.

2.2.5.2.2 Determinação da equação da reta

O valor de área calculado foi relacionado com o teor de proteína correspondente, lançando-se, em gráfico linear, na abscissa a quantidade crescente de proteína (μg) e na ordenada os valores de área (mm^2) respectivos.

Calculou-se, em cada ensaio, a reta de calibração, utilizando o método dos mínimos quadrados, em calculadora TI 51 III (Texas Instruments, U.S.A.). Tratou-se a quantidade de proteína como variável independente (X) e a área como variável dependente (Y).

Para cada proteína, calculou-se a reta padrão média, pela qual, conhecendo-se a área densitométrica, se pode estimar o teor protéico desconhecido de uma solução, empregando o método de quantificação não-destrutivo.

As equações empregadas no cálculo foram:

A - Equação da reta

$$Y = m X + b \quad \text{(equação 11).}$$

Onde:

m = inclinação da reta ($\text{mm}^2/\mu\text{g}$)

b = intersecção da reta com a ordenada

X = quantidade de proteína (μg)

Y = área (mm^2)

A.1 - Cálculo de m

$$m = \frac{N \cdot \sum (x_i \cdot y_i) - \sum x_i \cdot \sum y_i}{N \cdot \sum (x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad \text{(equação 12).}$$

Onde:

N = número de dados experimentais.

A.2 - Cálculo de b

$$b = \bar{Y} - m \bar{X} \quad \text{(equação 13).}$$

Onde:

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{N} \quad \text{e} \quad \bar{Y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

B - Coefficiente de correlação linear (r)

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{X}) \cdot (y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{X})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{Y})^2}} \quad \text{(equação 14).}$$

Para esse tipo de quantificação protéica é muito importante obter-se linha base de leitura com flutuações mínimas e horizontalidade. O gel branco, de referência, foi usado aqui para verificar as alterações ou contaminações possíveis nas soluções de polimerização, mantendo-se as condi

ções ideais para a quantificação por intermédio de leitura densitométrica direta.

2.2.5.2.3 Comparação entre densitometria e espectrofotometria

Com o objetivo de validar a técnica de quantificação densitométrica ao nível dos métodos que utilizam leitura espectrofotométrica para a determinação protéica quantitativa, efetuou-se o seguinte. Prepararam-se soluções de SAB e HCH-IPEN, em concentração de 0,2mg/ml, em água destilada. Para estas duas soluções, fez-se a leitura em espectrofotômetro, em cubeta de quartzo com caminho óptico (d) igual a 1cm, nos λ_s de 230, 260 e 280nm. A leitura em densitômetro foi feita no mesmo tipo de cubeta, em feixe no intervalo de 220 a 310nm.

Os valores de absorvância obtidos foram transformados em coeficiente de extinção de 0,1% da substância em análise, conforme a equação 10, no ítem 2.2.5.2.1.

Compararam-se os coeficientes de extinção obtidos nos dois instrumentos de leitura óptica. Os valores obtidos por espectrofotometria, para SAB e HCH-IPEN, a 280nm foram comparados aos citados na literatura, neste mesmo λ .

2.2.5.2.4 Cálculo da sensibilidade

Determinou-se a sensibilidade da técnica de análise quantitativa, de acordo com RODBARD (84), empregando-se somente as médias e desvios-padrões respectivos, referentes à área, para o ponto zero (gel branco) e para a menor quantidade de proteína usada no ensaio (5 μ g).

Adotando-se, ainda, as definições empregadas para as variáveis X e Y, no ítem 2.2.5.2.2.2, as equações empregadas no cálculo foram:

A - Graus de liberdade (n)

$$n = (N_0 - 1) + (N_1 - 1) \quad (\text{equação 15}).$$

$$n = n_0 + n_1$$

Onde os índices $i = 0$ e $i = 1$, referem-se respectivamente aos valores nas quantidades zero e $5\mu\text{g}$ de proteína.

N_i = Número de dados experimentais.

B - Desvio padrão médio (S_m)

$$S_m = \sqrt{\frac{(S_0^2 \times n_0) + (S_1^2 \times n_1)}{n}} \quad (\text{equação 16}).$$

Onde:

S_i = desvio padrão das respectivas médias (branco e $5\mu\text{g}$ de proteína).

C - Valor t de Student experimental (t)

$$t = \frac{\bar{Y}_0 - \bar{Y}_1}{\left[(S_0^2/n_0) + (S_1^2/n_1) \right]^{1/2}} \quad (\text{equação 17}).$$

Onde:

\bar{Y}_i = valor médio experimental das medidas respectivas.

D - Cálculo do valor mínimo detectável para a variável dependente ($Y_{\text{mín}}$).

$$Y_{\text{mín}} = \bar{Y}_0 - t \cdot S_m \left[(1/n_0 + 1/n_1) \right]^{1/2} \quad (\text{equação 18}) .$$

E - Quantidade mínima detectável (QMD ou $X_{\text{mín}}$)

Substituindo o $Y_{\text{mín}}$ na equação 11, do ítem 2.2.5.2.2.2 , determina-se o valor mínimo que pode ser determinado para a variável independente ($X_{\text{mín}}$).

$$X_{\text{mín}} = \frac{Y_{\text{mín}} - b}{m} \quad (\text{equação 19}) .$$

O valor calculado para $X_{\text{mín}}$ determina a sensibilidade, ou seja, a quantidade mínima de proteína detectável (QMD) pela técnica quantitativa de densitometria direta, em ção padronizada.

Analisou-se a precisão e reprodutibilidade intra- e interensaio, determinando-se os CVs respectivos, conforme a equação 2.

2.3 TÉCNICA PREPARATIVA PARA OBTENÇÃO DO Ih-B PURO

Padronizou-se a técnica de EGPA preparativa (EGPAp) para a obtenção da forma iso-hormonal B, eletroforeticamente homogênea.

Os reagentes, materiais e equipamentos empregados foram os já citados no item 2.2, eletroforese analítica.

O método preparativo padronizado inclui três fases, a saber.

- I. Eletroforese de separação. Resolução do Ih-B.
- II. Densitometria ultravioleta com leitura direta. Identificação e localização da banda iso-hormonal.
- III. Segunda eletroforese com corrente reversa. Eluição do Ih-B da matriz de gel.

2.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- HCH-IPEN, lotes 24 e 25.

- SAB, já especificada no item 2.2.1.

2.3.2 ELETROFORESE DE SEPARAÇÃO (FASE I)

2.3.2.1 Preparação do Gel

Empregou-se, para o preparo da matriz, tubo de vidro de 10mm de diâmetro interno por 110mm de comprimento. Usouse a mesma metodologia aplicada na EGPA analítica, com a mesma concentração em acrilamida (7%), mesmas soluções, tampões e condições de polimerização.

2.3.2.2 Preparação das amostras

2.3.2.2.1 HCH

A preparação de HCH-IPEN, lote 24 e 25, usada para a purificação do Ih-B, foi obtida seguindo a metodologia citada no item 2.2.4.1.1, com a modificação seguinte.

A extração, a partir da operação de homogeneização das hipófises (operação A, da figura 4) foi efetuada em presença do inibidor enzimático aprotinina (Trasylo1, Bayer, São Paulo), na concentração de 50 UIC/ml, com a finalidade de obter uma preparação mais rica na forma fundamental, Ih-B.

Pesaram-se 105mg de pó liofilizado, contendo 5mg de HC, que foi dissolvido em 1 ml de água destilada com pH 7,0. A amostra foi dialisada nas condições já citadas no item 2.2.4.1.2, por tempo total de 16 horas, com três trocas de solução (8 litros).

Após diálise, separou-se uma alíquota contendo 0,4mg de HC, mantida a 4°C, para análise posterior, denominada alíquota de referência. A quantidade restante (4,6mg) foi aplicada ao gel.

2.3.2.2.2. SAB

Pesaram-se 3mg de proteína, que foi dissolvida em 1 ml de água destilada com pH 7,0.

As amostras foram preparadas imediatamente antes da aplicação na matriz.

2.3.2.3 Aplicação da amostra

As amostras, em solução, em volume máximo de até 1 ml, foram aplicadas na parte superior do gel de separação. Para cada 1 ml de amostra adicionou-se 200 µl de solução estoque F, seguida de homogeneização.

2.3.2.4 Eletroforese

A primeira corrida eletroforética foi realizada à temperatura de 4°C, com corrente elétrica anódica constante de 5mA e 300V. Foi mantida até migração da frente eletroforética a cerca de 5mm do final do gel. Nessa fase ocorre a resolução das bandas iso-hormonais na matriz, possibilitando sua identificação e localização. A figura 5 representa a eletroforese de separação.

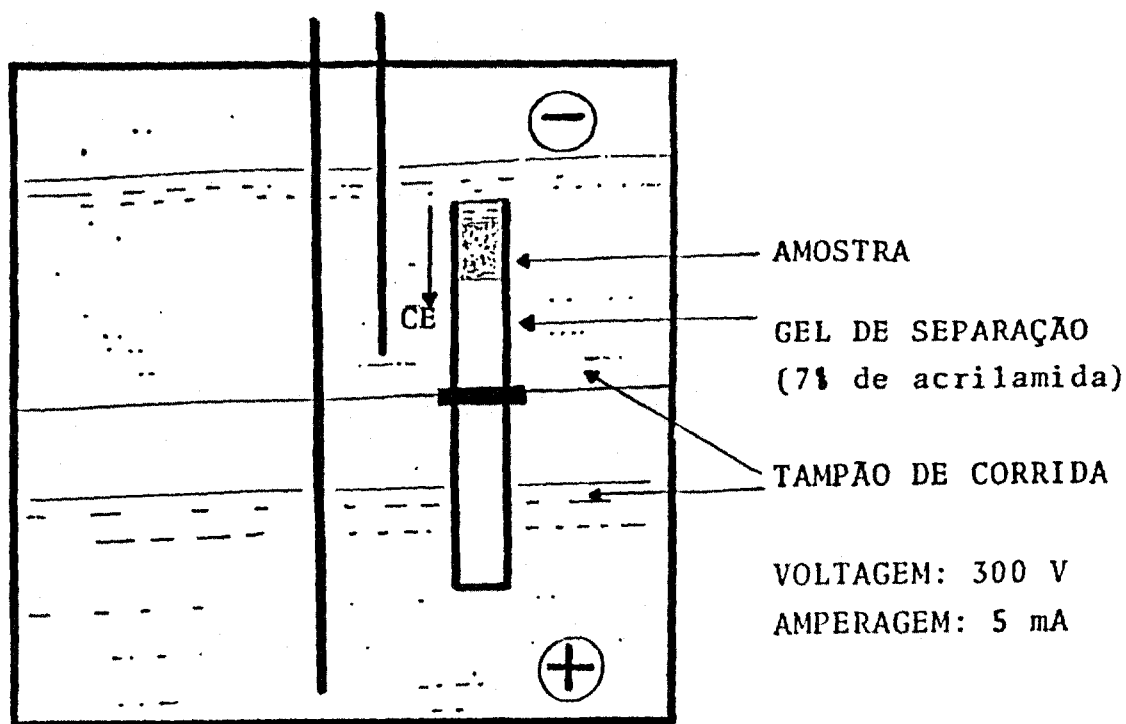
2.3.3 DENSITOMETRIA (FASE II)

Após a eletroforese, a matriz preparativa foi imediatamente submetida à leitura densitométrica direta. O Ih-B foi reconhecido e localizado, empregando-se a técnica de análise qualitativa citada anteriormente (Ítem 2.2.5.1). A região da matriz contendo o Ih-B foi delimitada e seccionada, obtendo-se o segmento de gel P. A figura 6 mostra essa fase do procedimento.

2.3.4 ELUIÇÃO DA BANDA ISO-HORMONAL

2.3.4.1 Difusão Simples

Inicialmente, tentou-se extrair a banda iso-hormonal da matriz de gel por meio de eluição por difusão simples. Neste procedimento o segmento de gel P, contendo a banda iso-hor



CE - Sentido da corrente elétrica (anódica).

FIGURA 5 - Esquema da eletroforese de separação do método preparativo, para a obtenção do Ih-B puro (FASE I).

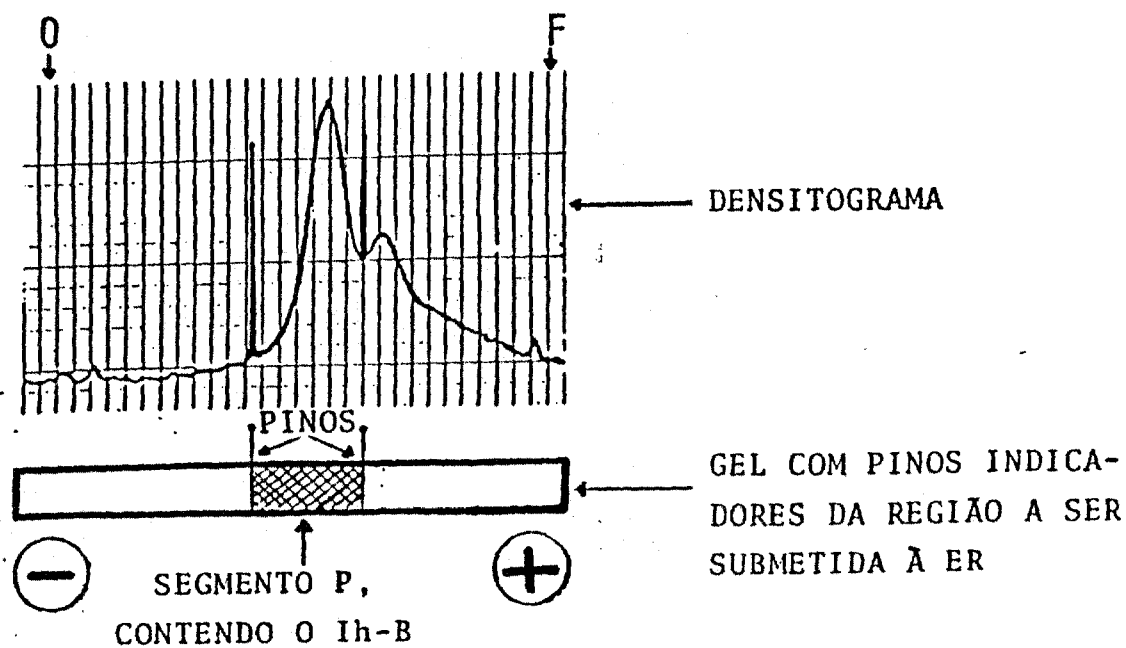


FIGURA 6 - Densitograma obtido em leitura direta, indicando a posição dos Ihs na matriz de gel (FASE II).

monal foi multiseccionado em pedaços de 1mm, empregando-se um "gel-slicer". Cada segmento foi imerso individualmente em 0,5ml de tampão fosfato de potássio - 0,05M - pH 7,6; mantido a 4°C, sob agitação moderada constante, por tempo de 16 horas, em agitador mecânico (modelo Kline, Fanem, São Paulo).

Com a finalidade de eliminar os contaminantes e diminuir o tempo operacional desse estágio, introduziu-se a técnica de eletroforese reversa (ER) de OTTO & ŠNEJDÁRKOVÁ (80), modificada, eliminando-se o gradiente de sacarose e introduzindo-se a membrana de diálise para coleta.

2.3.4.2 Eletroforese Reversa - ER (Fase III)

Utilizaram-se os mesmos equipamentos, materiais, soluções e tampões empregados na fase I.

Antes de aplicar a ER para a obtenção do Ih-B puro, a técnica foi executada usando-se SAB, para a obtenção da forma monomérica (M-SAB) pura e eletroforeticamente homogênea, até se conseguir rendimento experimental considerado satisfatório.

2.3.4.2.1 Preparo da amostra

O segmento de gel P, contendo o Ih-B, foi introduzido no interior de uma membrana de diálise cilíndrica, preparado conforme o item 2.2.4.1.2, com a extremidade inferior vedada por um nó.

O segmento assim revestido foi introduzido num segundo tubo de vidro do mesmo diâmetro que o usado na primeira eletroforese, com comprimento menor (10 x 80mm). Aplicaram-se 2,0ml do tampão de corrida na parte superior do segmento, no interior da membrana. Fechou-se a extremidade da membrana com linha de algodão, na altura do líquido, de modo a não permitir a formação de bolhas de ar no interior.

2.3.4.2.2 Preparo do gel

Preparou-se a solução de polimerização com 7% de acrilamida. Com parte dessa solução lavou-se o interior do tubo de vidro contendo o segmento P. A solução de lavagem foi desprezada. Fechou-se a extremidade inferior do tubo de vidro com membrana adesiva do tipo "Parafilm". A solução restante foi transferida para uma seringa de plástico de 20ml. Uma cânula de plástico de 1mm x 100mm foi acoplada à saída da seringa. Introduziu-se a cânula de plástico entre a parede interna do tubo de vidro e a membrana de diálise. A solução de polimerização foi injetada lentamente para o interior do tubo de vidro, mantido em posição vertical ligeiramente inclinada, de modo a permitir a saída de ar pelo local de introdução da cânula, à medida que a solução de polimerização foi sendo introduzida. Todas as bolhas de ar no interior do tubo devem ser assim eliminadas. A figura 7-a mostra essa parte do procedimento.

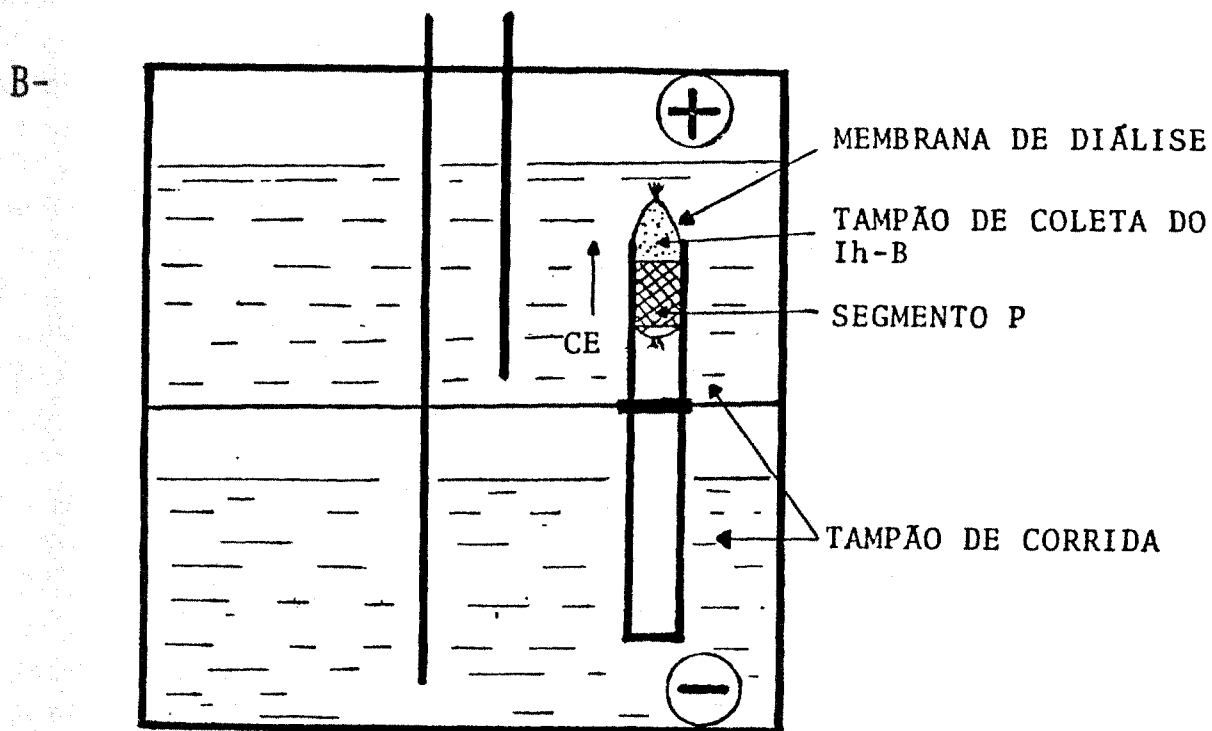
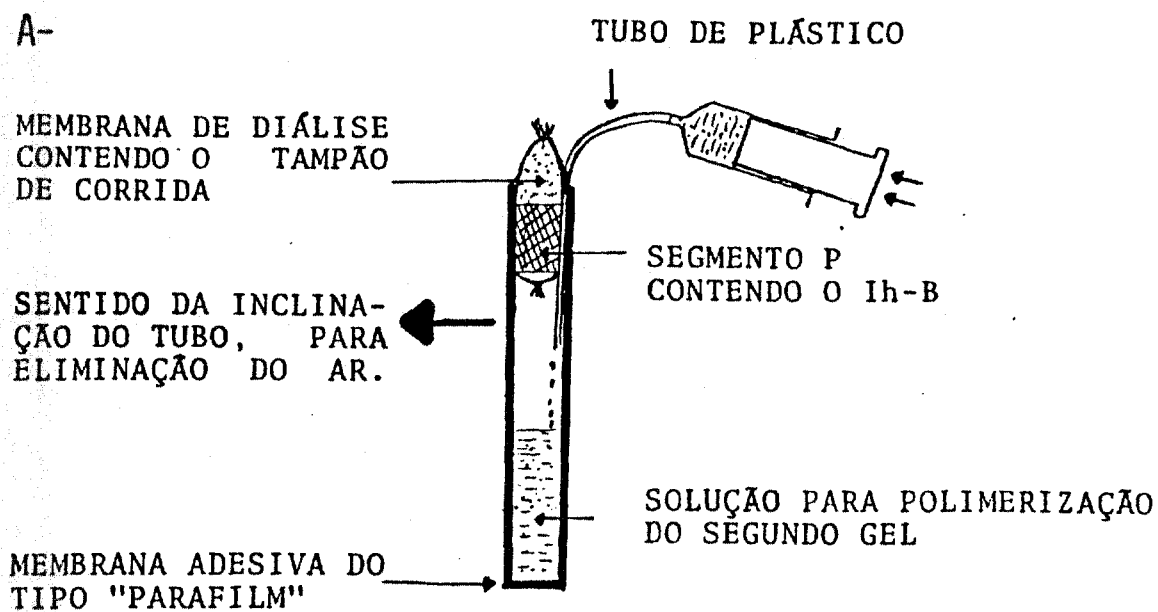
2.3.4.2.3 Polimerização

A região do tubo contendo o segmento P foi recoberta com folha de alumínio para evitar exposição à luz. A polimerização foi realizada à temperatura de 4°C, em luz fluorescente, durante 45 minutos.

2.3.4.2.4 Eletroforese

A matriz assim preparada foi submetida à segunda corrida eletroforética com corrente elétrica reversa (catódica), ou simplesmente, eletroforese reversa (ER). Aplicou-se intensidade de 10mA e 300V. O I_h-B migrou do segmento de gel P para o tampão retido no interior da membrana. A migração total ocorreu após 60 minutos de corrida eletroforética. A figura 7-b apresenta a ER.

Após ER o segmento P foi corado com ¹⁴Coomassie blue[†] (26) e descorado com ácido acético 7% para análise da



CE - Sentido da corrente elétrica (catódica).

FIGURA 7 - FASE III, do método de EGPA preparativa.

A - Preparo do gel.

B - Eletroforese com corrente reversa.

presença de proteína residual. O volume final de coleta do Ih-B foi de 1,6ml, completado para 3,0ml.

2.3.5 DIÁLISE

A eletroforese de separação, densitometria UV e FR foram realizadas no mesmo dia. A seguir, a solução contendo o Ih-B purificado foi dialisada por aproximadamente 12 horas (durante a noite) nas condições já citadas (ítem 2.2.4.1.2). A alíquota de referência, separada no início, foi dialisada simultaneamente.

2.3.6 ANÁLISE DO Ih-B PURIFICADO

No dia seguinte à purificação, efetuou-se EGPA analítica para identificação qualitativa e determinação quantitativa, seguindo-se o procedimento citado nos ítems 2.2.5.1 e 2.2.5.2 para este fim. Utilizaram-se as seguintes amostras, em duplicata.

1. Controle branco
2. Controle SAB
3. 200 μ l da solução contendo Ih-B puro
4. 100 μ g do HC não submetido à FR. Alíquota de referência, separada inicialmente.

A cada amostra foi acrescentado 50 μ l da solução estoque F.

Nessa fase de EGPA analítica efetuou-se a quantificação protéica da solução de Ih-B purificado, além de verificar-se paralelamente se as propriedades físico-químicas foram preservadas. Determinou-se também a recuperação percentual do método preparativo.

2.3.7 ESTOCAGEM

Após a quantificação em solução, o Ih-B purificado foi dividido em várias ampolas. Sofreu congelamento lento em congelador (-15°C), foi liofilizado, fechado em atmosfera de N₂

e depois disso armazenado à temperatura de 4°C.

Para utilização futura em marcação com radioiodo dividiu-se também em quantidades de 10µg/tubo, em tubo de ensaio de fundo cônico de 9 x 70mm, fechado com rolha de borracha e mantido a 4°C, em dessecador, sob vácuo.

A figura 8 mostra o diagrama das operações realizadas para a obtenção do Ih-B eletroforeticamente homogêneo.

2.4 ENSAIO BIOLÓGICO

Com a finalidade de investigar se a técnica de FGPAp e eluição com corrente elétrica reversa produz alteração na atividade somatotrófica da molécula de HCH, planejou-se a determinação da atividade biológica da preparação de HCH antes e após ter sido submetida a tal processo. Considerando a possibilidade de haver diferença na atividade biológica das várias formas iso-hormonais, impos-se que as amostras "antes" e "depois" possuíssem uma distribuição iso-hormonal comum. O Ih-B puro, já então obtido, não poderia ser analisado biologicamente contra uma preparação heterogênea. Para tanto, houve a necessidade de se submeter à eletroforese reversa, uma preparação heterogênea, a mesma usada na obtenção do Ih-B puro, eluindo-se todas as formas iso-hormonais presentes.

2.4.1 PRODUTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

- Pentobarbital sódico a 3% em solução. Fontoura Wyeth, São Paulo.
- Éter-etílico. Merck, São Paulo.
- Solução fisiológica, estéril. Veafarm, São Paulo.
- Mercurocromo. Lilly, São Paulo.
- Solução de glicose a 10%, estéril. Hiplex, Campinas.
- Penicilina procaína, 400.000UI, injetável, Majercilin. Majer, São Paulo.

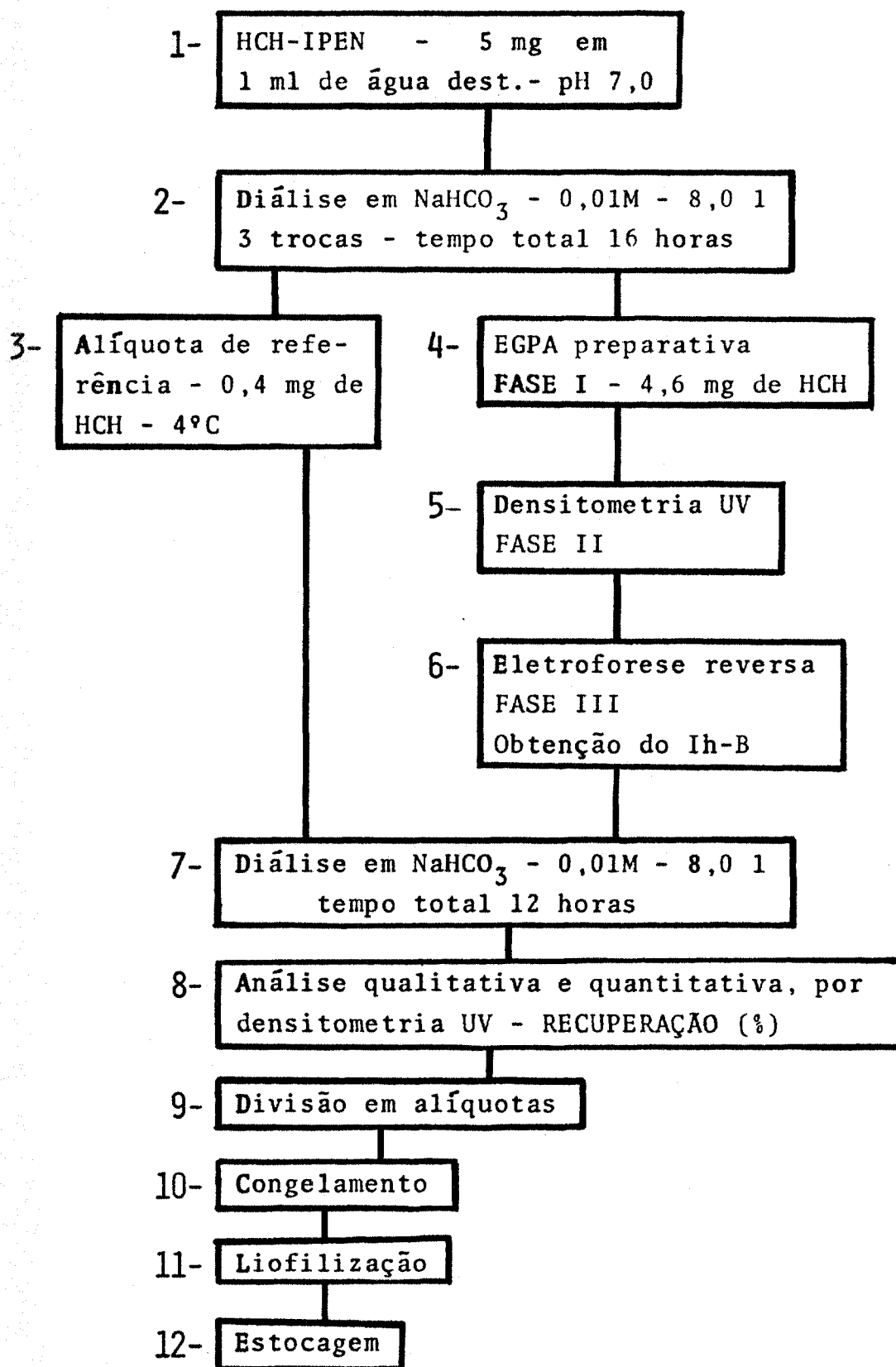


FIGURA 8 - Diagrama operacional do método preparativo empregado para a obtenção do I_h-B eletroforeticamente homogêneo.

2.4.2 ANIMAIS

Os ratos submetidos à hipofisectomia foram obtidos no biotério da Divisão de Radiobiologia do IPEN-CNEN/SP, com as características seguintes:

- raça : Wistar
- sexo : feminino
- idade : 30 a 40 dias, na época da cirurgia
- peso : 90 a 120g.

2.4.3 TÉCNICA DE HIPOFISECTOMIA EM RATO

2.4.3.1 Importância da Hipófise

A hipófise é a glândula de secreção interna que comanda, por intermédio de cinco hormônios tróficos por ela secretados, as funções de quase todas as outras glândulas do organismo animal (13,29). A remoção da hipófise determina profundas modificações fisiológicas que podem ser observadas no metabolismo geral, metabolismo de água e eletrólitos, sensibilidade à temperatura, reprodução e condições físicas gerais (7, 28, 39, 40, 57, 72, 73, 74, 102). Essas alterações físicas e metabólicas são conseqüências não apenas da atrofia das glândulas cuja secreção é controlada pela hipófise, como também da falta de hormônio de crescimento e, possivelmente, de outros fatores produzidos pela glândula (39).

2.4.3.2 Hipofisectomia em Rato

É uma técnica de microcirurgia que tem por finalidade a remoção total da hipófise do animal e que foi desenvolvida na Divisão de Radiobiologia, do IPEN/CNEN-SP, por MURAMOTO (4), seguindo o método parafaríngeo (53, 102, 111), que é conhecido por produzir maior período de sobrevivência pós-operatória e maior efetividade na remoção completa da glândula (102).

Os animais foram anestesiados com éter-etílico, utilizando a técnica de máscara aberta ou com pentobarbital sódico, em injeção intraperitonal, empregando doses de 40mg/Kg de peso corpóreo total. O animal anestesiado foi posto em posição de decúbito dorsal, em mesa cirúrgica apropriada, que possibilitou fixar seguramente a cabeça por meio dos dentes incisivos e prender os membros superiores e inferiores, impedindo eventuais movimentos do animal.

Fez-se uma incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo desde a borda superior do esterno até a sínfise da mandíbula. Com uma pinça, cuja ponta estava envolvida com algodão, separou-se cuidadosamente as glândulas submaxilares e o músculo pré-traqueal. A traquéia foi exposta e inseriu-se nela uma cânula, com a finalidade de facilitar a respiração. Colocaram-se afastadores apropriados, bilateralmente, expondo a região a ser operada. Passou-se então a observar o animal por meio de lente binocular, com aumento de 12,5 vezes, com feixe de luz dirigível e foco ajustável. Para não estrangular a traquéia, inseriu-se uma pinça, de curvatura adequada, na região triangular formada pelos músculos pré-traqueal, digástrico e esternocleidomastóideo e afastou-se a traquéia, o esôfago e o músculo pré-traqueal para um lado (geralmente o esquerdo do operador), expondo a base do crâneo. A figura 9 apresenta essa fase do procedimento. Esta posição foi mantida até o final da cirurgia, segurando-se uma pinça em cada mão.

Encontrou-se então o músculo pré-vertebral. Este músculo termina na sutura óssea entre o occipital e o esfenoide, região coberta por uma aponevrose que foi removida totalmente com uma pinça de dissecação, expondo a base do esfenoide. Para localizar a região óssea a ser perfurada adotou-se como pontos de referência a linha média do occipital e a sutura óssea entre o occipital e esfenoide. Seguiu-se a linha média e logo após a sutura óssea iniciou-se manualmente a perfuração na base do osso esfenoide, utilizando broca odontológica redonda, com 2mm de diâmetro (K. G. Torenson, São Paulo). A figura 10 mostra o local exato da perfuração.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP
I. P. E. N.

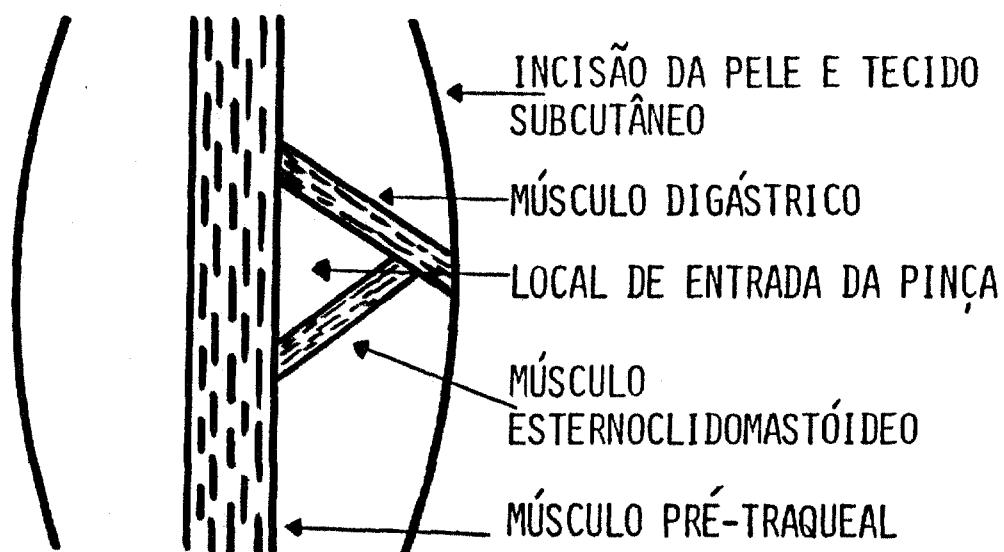


FIGURA 9 - Representação do corte cirúrgico longitudinal, mostrando, de maneira simplificada, o local de inserimento da pinça, para afastamento da traquéia, esôfago e músculo pré-traqueal, para a esquerda do operador. Representado em tamanho acima do normal.

Tomou-se todo o cuidado para que a perfuração fosse efetuada na linha média e que a broca não fosse introduzida abruptamente, rompendo vasos e tecidos nervosos, com hemorragias profundas, que provocariam a morte do animal. Perfurou-se com a broca redonda, em movimentos giratórios, sem muita pressão, até se verificar que estava tocando a tábua óssea interna. Usou-se, então, uma broca de base reta, do mesmo diâmetro da primeira, para expor a máxima área possível da tábua óssea. Com uma broca redonda de diâmetro de 0,8mm deslocou-se a tábua óssea interna para cima, rompendo-a totalmente. Nesta fase é muito comum ocorrerem pequenas hemorragias pela perfuração óssea. Esses sangramentos foram estancados com algodão embebido em solução fisiológica.

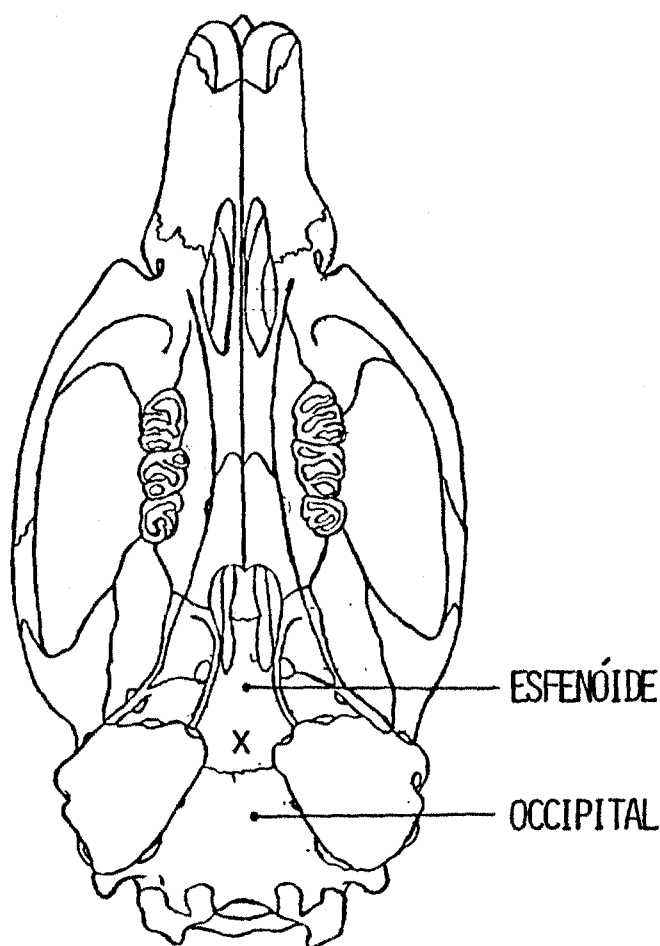


FIGURA 10 - Aspecto basal do crânio de rato, modificado da referência 41. O local marcado com χ representa a posição da perfuração, acima da sutura entre os ossos occipital e esfenoide, obedecendo a linha média.

Após a eliminação da tábua observou-se a glândula hipófise exposta. Com uma agulha de injeção rasgou-se a membrana que reveste a glândula. Com uma cânula, adaptada a um sistema de vácuo, aspirou-se a glândula, aplicando-se vácuo de 38cm Hg. A seguir, verificou-se se a hipófise foi extirpada totalmente, controlando-se as hemorragias possíveis. Removeram-se os afastadores, desinfetou-se o local com mercurocromo, retirou-se a cânula da traquéia e fez-se a sutura da pele e te

cido celular subcutâneo, utilizando-se linha de algodão nº 10 (Corrente - São Paulo) e agulha para sutura G-14-1132 (Sutura ma, Alemanha). Os equipamentos cirúrgicos empregados incluíam tesoura, duas pinças com ponta curva de 8cm, duas pinças re_utas de 10cm, pinça para sutura de aço inoxidável (Fdlo, Rio Grande do Sul).

2.4.4 CUIDADOS PÓS-CIRÚRGICOS

Os ratos hipofisectomizados são, de um modo geral, ani_umais muito mais sensíveis que os normais. Não somente o seu metabolismo é perturbado em muitas fases, como também são afe_utados mais facilmente por doenças e mudanças ambientais brus_ucas (72). Portanto, imediatamente após a cirurgia injetou-se, por via subcutânea, solução de penicilina, na dose de 30.000 UI por animal.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas em am_ubiente cuja temperatura variou entre 22-27°C. Inicialmente, foi fornecida ração embebida (pastosa) e glicose a 5% em água, ou água pura.

2.4.5 CONTROLE DE PESO

O animal teve seu peso controlado geralmente a partir do terceiro dia após a cirurgia. O peso foi estabilizado no período de 15 dias após a operação e foram rejeitados animais cujo peso sofreu variação de $\pm 3\%$ no intervalo de dez dias (108), parâmetro de referência se a glândula hipófise foi extirpada totalmente.

O peso médio dos ratos, no início do ensaio, foi de 98,94 \pm 8,0g, para um número de animais igual a 40.

2.4.6 TIPOS DE ENSAIO BIOLÓGICO

A série de alterações, associada ao crescimento, que

ocorre no organismo de animais hipofisectomizados, fornece muitas possibilidades para a determinação da atividade biológica de preparações de HC, empregando-se ensaios biológicos "in vivo".

Na literatura (108), citam-se aproximadamente 20 métodos para essa finalidade, dentre os quais dois são usados com frequência maior, o ensaio por incremento de peso corpóreo total, descrito inicialmente por MARX et al., em 1942 (72) e o ensaio de crescimento da cartilagem epifisária da tíbia (epífise proximal), padronizado por FVANS et al., em 1943 (37), ambos empregando ratos jovens hipofisectomizados, respectivamente, com 34-36 dias e 26-28 dias de idade na ocasião da hipofisectomia.

O ensaio da tíbia é muito usado devido à sua grande sensibilidade e economia de material. O ensaio de ganho de peso corpóreo é também sensível para doses diárias de, no mínimo, 5 a 10µg (4,108) e é tido como o mais simples dentre todos os bioensaios (108), além de ser considerado o único que pode medir a atividade real de crescimento total.

2.4.7 ENSAIO POR GANHO DE PESO CORPÓREO TOTAL

O ensaio biológico "in vivo" empregado foi o de incremento de peso corpóreo total. Nesse bioensaio os animais submetidos à hipofisectomia, com peso estabilizado, quando submetidos a injeções diárias consecutivas de doses de HC, têm período curto de crescimento normal estimulado pelo hormônio injetado e o animal interrompe o seu crescimento, estabilizando o peso, após uma série de injeções diárias de nove ou dez dias (108).

MARX et al. (72), na tentativa de estabelecerem uma base para a determinação da potência desconhecida de preparações de HC, usando esse tipo de bioensaio, efetuaram diferentes experimentos, construindo curvas de incremento de peso corpóreo total, para grupos de ratos hipofisectomizados, que

receberam diariamente quantidades crescentes de HCH (30, 60, 120, 240, 480µg/rato/dia) por um período de vinte dias (dezesete injeções). Observaram que existe uma relação diretamente proporcional, entre a dose de HCH e o ganho de peso corpóreo, em doses de até 250µg/dia. Com doses maiores, a curva de incremento de peso aproxima-se de um patamar.

WILHELMI (108) confirmou os resultados obtidos por MARX et al. (72), o incremento de peso corpóreo total é proporcional ao logaritmo da dose diária de HC, num intervalo de dose de 10 a 250µg/rato/dia, nesse tipo de bioensaio, para a determinação de atividade biológica.

Contrariamente a estes dados, verificou-se, nas condições deste trabalho, que o intervalo ideal de linearidade na relação dose-resposta situa-se entre 10 e 20µg/rato/dia (4).

2.4.7.1 Preparo das Amostras de HCH para o Bioensaio

O diagrama da figura 8 mostra todas as operações às quais a proteína foi submetida antes do ensaio biológico. No preparo das amostras para o bioensaio, mantiveram-se todas as características do método preparativo empregado anteriormente na obtenção do Ih-B.

Partiu-se de pó liofilizado contendo 10mg de HCH, que após a operação 2 do diagrama foi dividida em duas alíquotas. A alíquota de referência (operação 3) foi aqui denominada de preparação padrão (S) e a alíquota submetida à ER (operação 4) chamou-se de preparação desconhecida (U). Na operação 6, a etapa de ER foi aqui modificada. Após densitometria, o segmento de gel contendo todos os Ihs foi dividido em duas partes iguais, as quais foram submetidas à ERs não simultâneas, até a eluição total da proteína da matriz. O tempo em que cada segmento ficou exposto à passagem de corrente elétrica foi de aproximadamente 120 minutos. Após ER, as duas frações de coleta do HCH foram reunidas e a solução final foi submetida às operações subsequentes. Após a operação 8, as preparações

S e U foram diluídas em solução de NaCl - 0,9%; para a concentração final de 50µg/ml, atendendo às necessidades do bioensaio. O volume final de 72ml, de cada preparação, foi dividido em nove frações de 8ml, estocadas a -15°C. Descongelou-se uma fração de cada preparação, no dia de injeção nos animais, durante o ensaio.

2.4.7.2 Esquema do Ensaio

O ensaio biológico foi realizado no esquema fatorial 2 x 2. Empregaram-se duas preparações de HCH, que são, S, a preparação padrão e U, preparação submetida à técnica de purificação. As doses de HCH, por via subcutânea, em dias consecutivos, foram de 10µg/rato/dia (U_1 e S_1) e 20µg/rato/dia (U_2 e S_2), totalizando quatro grupos de animais ($K=4$), com total de 10 animais por grupo ($N=10$). O período de injeções foi de nove dias, com pesagens diárias em balança com precisão de 0,1g; incluindo pesagem no primeiro dia de ensaio e um dia após a última injeção. Um animal de cada grupo foi reunido por gaiola, obtendo-se um total de dez gaiolas, com número total (N_T) de 40 animais no bioensaio.

2.4.8 Cálculos e Análise Estatística

2.4.8.1 Determinação da curva de crescimento

Para cada animal, calculou-se a curva de crescimento, relacionando o incremento de peso corpóreo total, com o dia consecutivo de ensaio, obtendo-se reta de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (equação 11), inclinação em g/dia (equação 12) e coeficiente de correlação linear (equação 14). O incremento total de peso de cada rato, durante o ensaio, calculado pela equação da reta obtida (inclinação vezes nove) foi empregado como parâmetro de resposta no cálculo fatorial.

A análise estatística usada foi a análise de variân

cia descrita por BLISS (15), para ensaios fatoriais 2 x 2, to mando-se:

- Incremento de peso como variável dependente : Y
- Log da dose de HCH empregada como variável independente : X.

2.4.8.2 Parâmetros Necessários

- Termo de comparação entre as preparações (Ta).

$$Ta = - S_1 - S_2 + U_1 + U_2 \quad (\text{equação 20}).$$

Onde, os símbolos U_1 , S_1 , U_2 e S_2 indicam a somatória do incremento de peso dos animais (dez) por dose-grupo, onde os índices 1 e 2 são, respectivamente, a dose menor e maior (10 e 20 μ g).

- Termo de comparação entre as doses (Tb).

$$Tb = -S_1 + S_2 - U_1 + U_2 \quad (\text{equação 21}).$$

- Termo de comparação entre as inclinações das curvas de incremento de peso (Tab).

$$Tab = S_1 - S_2 - U_1 + U_2 \quad (\text{equação 22}).$$

- Termo de comparação entre os incrementos de peso total dos animais por gaiola (Tg).

$$(Tg)_\ell = (U_1)_\ell + (S_1)_\ell + (U_2)_\ell + (S_2)_\ell \quad (\text{equação 23}).$$

O índice ℓ indica os animais de cada dose-grupo, nas gaiolas, de 1 a N.

$$Tg = \sum_{\ell=1}^N (Tg)_\ell$$

- Termo que indica o ganho de peso total dos animais no bioensaio (Td).

$$Td = U_1 + S_1 + U_2 + S_2 \quad (\text{equação 24}).$$

- Relação entre dose máxima e dose mínima (i).

$$i = \log \frac{D1}{D2} \quad (\text{equação 25}).$$

Onde,

D1 = dose máxima
D2 = dose mínima.

Neste caso, vem:

$$i = \log \frac{20}{10}$$

$$i = 0,301.$$

- Graus de liberdade (n).

$$n = N_T - (N + K - 1) \quad (\text{equação 26}).$$

Onde:

K = Dose-grupos, igual a 4 (U_1 , S_1 , U_2 , S_2).

N = Número de animais por dose-grupo = 10.

N_T = Número total de animais, igual a 40.

2.4.8.3 Cálculos

2.4.8.3.1 Potência biológica (M) da preparação U, em relação a S.

$$M = \text{antilog}_{10} \left[i \left(\frac{Ta}{Tb} \right) \right] \quad (\text{equação 27}).$$

2.4.8.3.2 Inclinação combinada (b) das curvas de crescimento das duas preparações.

$$b = \frac{Tb}{2.i.N} \quad \text{(equação 28).}$$

2.4.8.3.3 Desvio padrão (S) da curva dose-resposta.

$$S = (S^2)^{1/2} \quad \text{(equação 29).}$$

Onde:

$$S^2 = \frac{|Y^2| - D^2 - B^2 - Y_B^2 - Z}{n} \quad \text{(equação 30).}$$

Onde:

$$|Y^2| = \sum_{\ell=1}^{N_T} Y_{\ell}^2 - C \quad \text{(equação 31).}$$

$$C = \left(\frac{\sum_{\ell=1}^{N_T} Y_1}{N_T} \right)^2 \quad \text{(equação 32).}$$

$$Z = \left[\left(\frac{\sum_{\ell=1}^N (Tg^2)}{K} \right) - C \right] \quad \text{(equação 33).}$$

Os parâmetros D^2 , B^2 e Y_B^2 foram definidos no ítem 2.4.8.4.4, que virá.

2.4.8.3.4 Índice de precisão (λ)

$$\lambda = \frac{S}{b} \quad \text{(equação 34).}$$

2.4.8.3.5 Erro padrão do ensaio (S_M)

$$S_M = \lambda \left[\frac{4}{N_T} \left(1 + \frac{D^2}{B^2 - (S^2 \cdot t^2)} \right) \right]^{1/2} \quad \text{(equação 35).}$$

Limites do erro padrão (SE):

$$SE = \text{antilog} (M' \pm S_M) \quad \text{(equação 36).}$$

Onde:

$$M' = i \left(\frac{T_a}{T_b} \right) \quad \text{(equação 37).}$$

2.4.8.3.6 Limites de confiança (XL)

Devem ser calculados quando $B^2/S^2 < 60$

$$XL = \text{antilog} (Cf^2 \cdot M' \pm t \cdot Cf \cdot S_M) \quad \text{(equação 38).}$$

Onde:

$$Cf^2 = \frac{B^2}{B^2 - (S^2 \cdot t^2)} \quad \text{(equação 39).}$$

$$Cf = (Cf^2)^{1/2} \quad \text{(equação 40).}$$

t = valor de t de "Student" teórico = t(n;0,95).

2.4.8.4 Testes de Significância

2.4.8.4.1 Diferença entre as preparações

É significativa quando:

COMISSÃO DE ENERGIA NUCLEAR/SP C. P. E. N.

$$\frac{D^2}{S^2} > F(1,n)$$

Onde:

$$D^2 = \frac{Ta^2}{N_T} \quad (\text{equação 41}).$$

2.4.8.4.2 Diferença entre doses

É significativa quando:

$$\frac{B^2}{S^2} > F(1,n)$$

Onde:

$$B^2 = \frac{Tb^2}{N_T} \quad (\text{equação 42}).$$

2.4.8.4.3 Divergência entre as inclinações das curvas de dose-resposta

É significativa quando:

$$\frac{Y_B^2}{S^2} > F(1,n)$$

Onde:

$$Y_B^2 = \frac{(Tab)^2}{N_T} \quad (\text{equação 43}).$$

2.4.8.4.4 Diferença entre dose-grupos (gaiolas)

É significativa quando:

$$G > F_{(N-1,n)}$$

Onde:

$$G = \frac{Z/(N-1)}{S^2} \quad (\text{equação 44}).$$

Os termos D^2 , B^2 , Y_B^2 , e G indicam a média dos quadrados, obtidos pela análise de variância, das variações individuais no ganho de peso total dos animais, respectivamente ocasionadas pela diferença entre preparações, diferença entre doses, desvio de paralelismo das retas de crescimento e diferença entre gaiolas.

Para que o bioensaio seja válido é necessário que seja significativa a diferença entre doses e que não seja significativo o desvio de paralelismo.

Para os cálculos e testes adotou-se erro tipo I igual a 5% ($p=0,05$), n igual a 27, $t_{(n;0,95)}$ igual a 2,052, $F_{(1,n)}$ igual a 4,210 e $F_{(N-1,n)}$ igual a 2,25.

2.4.8.5 Processamento dos Dados

Os dados do bioensaio foram processados automaticamente, por meio de programa realizado em linguagem FORTRAN (32), implementado no sistema IBM/370 do IPEN.

2.5 RADIOIMUNOENSAIO (RIE)

As técnicas de RIE (73) fazem uso de antígenos marcados com traçadores radioativos e consistem na competição de duas formas da mesma molécula, uma marcada e outra não radioativa, para ocuparem os sítios de ligações de uma terceira no meio, o anticorpo. São denominadas genericamente de ensaios por ligação competitiva (46) e exigem inicialmente a preparação do antígeno marcado, o que envolve a seleção do radio-nuclídeo, sua incorporação no composto (marcação), a purificação e avaliação de sua adequação ao sistema de ensaio. Uma ou

tra etapa é a reação de competição, entre o antígeno radioativo e o não-radioativo, pelos sítios de ligação a um anticorpo específico. A última fase é a separação entre as frações de antígeno ligado ao anticorpo e de antígeno livre. Avaliando a fração de antígeno ligado ao anticorpo pode-se analisar se a proteína de interesse apresenta, ou não, atividade imunológica "in vitro".

2.5.1 MATERIAL RADIOATIVO

- Na ^{125}I , livre de carregador e redutor, em meio alcalino. A atividade específica do produto foi sempre de aproximadamente 500mCi/ml ($1,85 \times 10^{10}$ Bq), fornecido pela "New England Nuclear", Boston, Mass, U.S.A.

2.5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Ih-B puro, com metodologia de obtenção descrita neste trabalho (ítem 2.3).
- HCH-IPEN, preparações heterogêneas ampolizadas denominadas Segundo Padrão e Terceiro Padrão (HCH-2ºP e HCH-3ºP, respectivamente).
- HCH-NIAMDD, já descrito no ítem 2.2.1.
- Soro humano normal.
- SAB, já especificada no ítem 2.2.1.
- Anticorpo específico contra HCH, duas preparações:
 - a) Anti-soro, anti-HCH, de coelho, usando como antígeno uma preparação de HCH-IPEN, heterogênea em iso-hormônios. Será chamada de Ac-IPEN.
 - b) Anti-soro, anti-HCH, de qualidade comprovada, fornecido pelo NIAMDD. Será denominado de Ac-NIAMDD.

Diluídos a 1:2000, em presença de timerosal (Qeel - São Paulo), na concentração de 0,02%, estocados a -15°C , em alíquotas.

- HCH comercial, SOMATORMON. KABI, Estocolmo, Suécia.

2.5,3 REAGENTES ANALÍTICOS

- Sephadex G-100 (40-120 μ), Pharmacia, Uppsala, Suécia.
- Cloramina T, P.A. Merck, São Paulo.
- Iodeto de potássio, P.A. Merck, São Paulo.
- Metabissulfito de sódio. Carlo Erba, São Paulo.
- Azul dextran 2000. Pharmacia, Uppsala, Suécia.
- Fosfato de sódio monobásico hidratado. Merck, São Paulo.
- Fosfato de sódio bibásico. Merck, São Paulo.
- Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS). Merck, São Paulo.
- Ácido clorídrico. Merck, São Paulo.
- Polietileno glicol, PM 6000, (PEG). Atlas, São Paulo.
- Ácido 5,5 dietil barbitúrico. Merck, São Paulo.
- Dietil barbiturato de sódio, Merck, São Paulo.

2.5,4 TAMPÕES ESTOQUE, CONCENTRADOS

- Tampão Veronal - 0,1M.

Ácido 5,5 dietil barbitúrico	3,768g
Dietil barbiturato de sódio	16,400g
Água destilada q.s.p.	1000ml
pH :	8,6

- Fosfato de Sódio - 0,5M.

Fosfato de sódio monobásico hidratado	8,972g
Fosfato de sódio bibásico	61,764g
Água destilada q.s.p.	1000ml
pH :	7,4.

- Tris-HCl - 0,1M.

Tris 12,114g

Água destilada q.s.p. 1000ml

Acerta o pH com HCl - 0,1N.

pH : 7,6

2.5.5 MARCAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

2.5.5.1 Soluções Usadas na Marcação

Preparadas imediatamente antes do uso.

- Cloramina T.

Cloramina T 5mg

Tampão fosfato 0,05M - pH 7,4 1ml

- Metabissulfito de sódio

Metabissulfito de sódio 10mg

Tampão fosfato 0,05M - pH 7,4 1ml

- Iodeto de potássio

Iodeto de potássio 10mg

Tampão tris-HCl 0,025M - pH 7,6 - 0,1% SAB 1ml

- Azul dextran

Azul dextran 1mg

Tampão tris-HCl 0,025M - pH 7,6 - 0,1% SAB 1ml

2.5.5.2 Técnica de Marcação

A introdução de iodo radioativo em uma molécula proteica pode ser feita de várias maneiras e, embora, em algumas condições, o iodo possa reagir com grupos sulfidrílicos, resíduos histidina ou triptofano, a química da radioiodação se baseia na reação de substituição do hidrogênio pelo iodo (76) nos resíduos de tirosina (46).

O método empregado para a radioiodação biológica do

HCH e Ih-B, que contêm 8 tirosinas (figura 1), foi o desenvolvido por GREENWOOD & HUNTER (48,52) modificado neste laboratório, obtendo-se a diminuição de produtos danificados (5), usando a cloramina T como agente oxidante para a introdução do iodo na molécula protéica. A cloramina T, quando adicionada em solução aquosa, em pH levemente alcalino (46,76), contendo proteína e iodeto radioativo, promove a incorporação do iodo na proteína, por um mecanismo ainda não bem estabelecido, mas que, provavelmente, envolve a formação de iodo catiônico. O metabissulfito de sódio é usado para parar a reação, reduzindo o excesso de cloramina T e transformando o I_2 que não reagiu em iodeto, limitando, assim, a danificação química à molécula de proteína (46).

O pó liofilizado contendo a proteína e glicina-fosfato foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,05M; pH 7,4; para a concentração de 0,5mg/ml, imediatamente antes do início da reação. A reação de iodação foi efetuada à temperatura ambiente em tubo de ensaio de fundo cônico, de 10mm x 70mm. Os reagentes foram adicionados por meio de micropipetas Gilson (RAININ, U.S.A.), mantendo agitação moderada e contínua. Foi obedecida a seguinte ordem:

- Tampão fosfato de sódio, 0,5M ; pH 7,4 40 μ l
- Na ^{125}I (\approx 2 μ l) \approx 700 μ Ci
- HCH ou Ih-B (10 μ l) 5 μ g
- Cloramina T (10 μ l) 50 μ g
- Tempo de reação : 30 segundos.
- Metabissulfito de sódio (20 μ l) 200 μ g
- Iodeto de potássio (200 μ l) 2mg

O intervalo entre a adição dos reagentes foi de poucos segundos, tempo suficiente para as pipetagens. Terminado o procedimento, a solução de marcação foi homogeneizada em agitador do tipo "Vortex", sendo retirada uma alíquota de 10 μ l e diluída para 1 ml do tampão de purificação, para contagem e cálculo posterior da recuperação.

A mistura de reação restante foi imediatamente aplicada, com auxílio de micropipeta, no topo de uma coluna cromatográfica, para purificação. O tubo de marcação foi lavado com a solução de azul dextran e a solução de lavagem foi também adicionada à coluna.

2.5.5.3 Técnica de Purificação

O método foi baseado no trabalho de BARTOLINI et al. (5), utilizando cromatografia por exclusão molecular, em coluna de vidro de 2cm x 45cm (IPEN), "empacotada" com gel Sephadex G-100.

Para o preparo da coluna o gel Sephadex foi entumescido em água destilada, empacotado e pré-equilibrado com tampão tris-HCl; 0,025M; pH 7,6; a 0,1% de SAB (tampão de purificação). Após aplicação da mistura de marcação, manteve-se um fluxo descendente de 12ml/hora, por meio de bomba peristáltica. Coletaram-se cerca de 90 frações de 2,0ml, usando coletor refrigerado automático. Alíquotas de 10 μ l de cada fração tiveram sua radioatividade determinada em contador-gama tipo poço, com eficiência de 72%. Foi construído então o cromatograma do antígeno marcado (125 I-Ag), registrando-se cpm no eixo da ordenada e o número da fração coletada no eixo da abscissa. Obtiveram-se quatro picos principais distintos que correspondem respectivamente ao hormônio agregado, radioatividade carregada pela SAB, hormônio íntegro e iodo livre.

O rendimento da marcação foi calculado considerando a radioatividade correspondente ao pico de proteína íntegra radioiodada como porcentagem da radioatividade total eluída. As frações correspondentes ao hormônio íntegro marcado foram reunidas e divididas em alíquotas menores, armazenadas a -15°C.

A estabilidade da proteína marcada, durante os ensaios, foi avaliada em EGPA analítica (42), verificando a desnaturação e liberação de iodo inorgânico, sofridas no decorrer do tempo.

2.5.6 CONTROLE DE QUALIDADE DA PROTEÍNA RADIOIODADA

2.5.6.1 Condições de Ensaio

Após cada processo de marcação, obtendo-se HCH radioiodado ($^{125}\text{I-HCH}$) ou Ih-B radioiodado ($^{125}\text{I-Ih-B}$), foi necessário avaliar sua adequação ao sistema de RIE. Utilizando tubo de vidro de 12mm x 70mm, o marcado foi incubado a 4°C, durante 22 horas, em tampão veronal 0,025M; pH 8,6; 0,25% SAB; em três condições.

- Ausência de anticorpo (branco).
- Excesso de anticorpo (excesso).
- Diluições crescentes de anticorpo.

O produto marcado foi usado sempre numa diluição fixa de 1:10, procurando-se manter não a radioatividade na incubação, e sim a concentração da proteína marcada competindo no meio de reação. Para as diluições do marcado e anti-soro usou-se o mesmo tampão de incubação. Incubou-se sempre em duplicata, respeitando o volume final de 1 ml. A meta deste ensaio foi determinar qual a diluição do anti-soro que corresponde a uma relação, entre o hormônio ligado (B) para o hormônio total (T), de 30%, parâmetro este que está relacionado com a afinidade do antígeno e a avidéz dos anticorpos, duas características fundamentais para o controle de qualidade dos reagentes, nesse tipo de ensaio. O protocolo da figura 11, esquematiza o procedimento experimental.

Tubos nº	Diluição do Ac (v:v)	Ac nas diluições indicadas (µl)	Tampão diluente (µl)	¹²⁵ I-Ag 1:10 (µl)
1 (branco)	—	—	900	100
2 (excesso)	1:8 x 10 ⁴	800	100	100
3	1:2,5 x 10 ⁵	800	100	100
4	1:5 x 10 ⁵	800	100	100
5	1:10 ⁶	800	100	100
6	1:2 x 10 ⁶	800	100	100
7	1:10 ⁷	800	100	100

Figura 11: Protocolo 1, ensaio para a determinação da diluição ótima do anticorpo.

2.5.6.2 Separação das frações livre (F) e ligada ao anticorpo (B).

A técnica empregada foi a de precipitação fracionada (31) do complexo antígeno marcado-anticorpo (¹²⁵I-Ag:Ac) por meio de polietileno-glicol, de peso molecular 6000 (PEG). Separaram-se do volume de incubação, em duplicata, 200µl, dispondo-os em tubos de polietileno de 12mm x 70mm. Determinou-se a atividade em contador e a seguir adicionaram-se à cada fração 30µl de soro humano normal e 500µl de PEG em tampão veronal 0,025M; pH 8,6; com homogeneização imediata da amostra, sob agitação, em "Vortex". As frações foram submetidas a 4000rpm (3079G), por 20 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi aspirado por meio de bomba de vácuo e o precipitado teve sua radioatividade novamente determinada.

2.5.6.3 Cálculos

Dos valores de cpm obtidos descontou-se a radiação de fundo, tomando-se a primeira contagem como radioatividade total (T).

Determinou-se então a porcentagem de ligação (%B) em relação à T. Por meio do tubo de referência branco (tubo 1), determinou-se a porcentagem de ligação inespecífica (D_1) que, no cálculo da ligação específica, foi subtraída em cada ponto da curva de diluição do anticorpo. Construiu-se então um gráfico semilogarítmico de %B x log da diluição do anti-soro, obtendo-se uma curva do tipo sigmóide, por intermédio da qual foi possível determinar a diluição de anticorpo correspondente à porcentagem de ligação desejada (30%), que, geralmente, ficou em torno de 1:200.000 para o Ac-IPEN e Ac-NIAMDD.

Conforme descrito anteriormente (6), preferiu-se fixar dentro das possibilidades dos reagentes disponíveis, a concentração de ^{125}I -Ag e Ac, para não alterar a cinética de reação e assim conseguir uma reprodutibilidade interensaio maior.

2.5.7 RADIOIMUNOENSAIO

Foi elaborado empregando-se as condições, equipamentos e materiais citados no item 2.5.6. Os padrões secundários foram resultantes de diluições consecutivas de uma solução padrão de HCH, de 20 $\mu\text{g/ml}$, nas concentrações citadas no protocolo 2.

O tubo controle B^+ , no qual estão presentes o antígeno no mercado, anticorpo específico e padrão secundário em excesso, forneceu a porcentagem de ligações inespecíficas (D_1). O ponto zero forneceu a ligação máxima (B_0) do ^{125}I -Ag do Ac, tendo ausência de antígeno não-radioativo, capaz de competir e deslocar o hormônio marcado. A %B dos outros pontos da curva foram calculadas em relação a B_0 .

Empregaram-se também amostras de controle de qualidade interno (ACQI), obtidas liofilizando e fechando em ampolas, sob vácuo, quantidades constantes de um extrato hipofisário de HCH comercial (Somatormon). A figura 12 mostra o protocolo das condições experimentais seguidas.

Tubos	Padrão Se cundário conc.	Padrão Secun dário na con cent.indicada	Anti-soro 1:200.000	Tampão diluyente	$^{125}\text{I-Ag}$ 1:10
nº	ml	(μl)	(μl)	(μl)	(μl)
1	10 μg (B^+)	100	800	-	100
2	zero (B_0)	-	800	100	100
3	2,5ng	100	800	-	100
4	5 ng	100	800	-	100
5	10 ng	100	800	-	100
6	20 ng	100	800	-	100
7	50 ng	100	800	-	100
8	100 ng	100	800	-	100
ACQI	45,9 ng	10	800	90	100
ACQI	45,9 ng	20	800	80	100

Figura 12: Protocolo 2. Esquema do radioimunoensaio.

3. RESULTADOS

3.1 ELETROFORESE ANALÍTICA

Embora a eletroforese seja uma das técnicas mais eficientes de separação dos componentes iônicos de uma mistura, o poder de resolução dos vários métodos eletroforéticos é bem variável (79). A EGPA permite a separação de moléculas de acordo com suas dimensões, forma e carga (25, 56, 85), sendo muito sensível para mudanças pequenas em qualquer um destes três fatores (25, 92), produz bandas da ordem de 10 micrômetros de espessura, a partir de bandas iniciais com a espessura da ordem de centímetros (79), podendo-se alcançar, dessa forma, uma resolução alta em corridas rápidas, permitindo o uso de amostras muito diluídas (24, 79) e análise de quantidades da ordem de μg de proteína, em misturas heterogêneas (79, 85). O gel de poliacrilamida é termoestável e transparente, relativamente inerte do ponto de vista químico, em contraste com outros tipos de matriz (56, 79), apresentando a vantagem de se poder ajustar o tamanho dos poros, num intervalo variável de 0,5 a 3nm, pelo simples efeito de mudança da concentração total de acrilamida (A%) na reação de polimerização (25), produzindo o chamado efeito de peneira molecular, tornando a técnica aplicável a qualquer faixa de peso molecular (25, 83), que pode variar desde oligonucleotídeos ($\text{PM} < 1000$) a RNA ou proteínas de alto peso molecular ($\text{PM} > 10^6$). Além disso, pode-se também otimizar separações de substâncias por diferenças simples de carga molecular (85), operando-se em qualquer pH entre 3 e 11, para obter resolução máxima entre as cargas efetivas das moléculas.

A resolução máxima depende (24) da separação entre duas bandas quaisquer, de interesse, e suas respectivas dispersões ou larguras de banda, como em qualquer outro método de fracionamento. Sabe-se que a largura das bandas no gel é dependente de fatores, a saber, concentração da amostra, força iônica do tampão de corrida, intensidade de corrente elétrica aplicada, concentração de acrilamida (A) no gel (24,25),

tempo e temperatura na reação de polimerização (25, 56), os quais afetam isoladamente a dispersão da proteína na matriz (24, 85). É muito difícil distinguir entre os efeitos diretos e indiretos de cada uma destas variáveis na resolução entre as bandas (24), pois todos estes fatores são claramente inter-relacionados, resultando em não-linearidade e não-somatória de efeitos (24).

Sabe-se que o uso de EGPA, como uma técnica físico-química, para fins analíticos, exige polimerização e eletroforese sob condições controladas continuamente com rigor, em contraste com o procedimento praticado rotineiramente (25,56, 85).

Na elaboração deste trabalho, empenhou-se muito para garantir que as condições de preparo da matriz e separação eletroforética fossem mantidas constantes e reproduzíveis, na tentativa de se garantir a obtenção de matrizes de gel com o mesmo tamanho de poros, possibilitando bandas iso-hormonais com largura e mobilidade eletroforética bem definidas no interensaio, exigência primordial para determinações quantitativas (25). Os reagentes empregados sofreram pouca variação, durante a execução do trabalho, mantendo-se o mesmo lote de produção. As soluções estoque foram preparadas sob as mesmas condições e estocadas em frascos de vidro âmbar, sob refrigeração, tendo a solução estoque A o seu pH monitorado no decorrer do uso, sendo descartada quando apresentou alteração. Como as matrizes são preparadas em pH básico, a solução de polimerização do gel não foi submetida em vácuo, para eliminação do O_2 atmosférico, pois esse inibidor da reação de polimerização é ativo realmente, em pH ácido ou temperaturas em torno de $0^{\circ}C$ (25, 85).

A reação de polimerização foi sempre controlada quanto ao tempo, temperatura e iluminação, sendo realizada a $4^{\circ}C$ para evitar as variações, provocadas pela oscilação da temperatura ambiente, na formação do polímero e garantir dissipação eficiente da exotermia gerada na reação, visto que a velocidade de polimerização é dependente, primordialmente, da tem

peratura (25). A temperatura de polimerização e corrida foi a mesma (4°C), procedimento aconselhável para evitar a contração ou expansão térmica do gel (25) e promover a dissipação do calor gerado pelo efeito Joule durante a eletroforese (83).

A corrente elétrica aplicada foi controlada rigorosamente, sendo mantida constante, durante a corrida, tanto nas condições analíticas quanto preparativas, produzindo reproduzibilidade interensaio no tempo de duração da eletroforese (24, 25).

Aplicando-se o método de EGPA, para fins analíticos e preparativos tentou-se explorar todas as características inerentes à técnica, com a finalidade de alcançar a resolução máxima entre as formas iso-hormonais, isômeros de carga, do HCH, as quais têm seu comportamento, nesta técnica, bem conhecido, tendo sido estudadas nas mais variadas condições de análise, (89), cujas diferenças moleculares se manifestam por distâncias de migração anódica diferentes (89).

3.1.1 PODER DE RESOLUÇÃO DA MATRIZ

O poder de resolução foi avaliado a partir da análise dos fatores principais que influem nos parâmetros que o definem: difusão da proteína na matriz após eletroforese e distância de separação entre as bandas iso-hormonais na matriz, que é dependente do tempo de corrida eletroforética. Visando à recuperação posterior da proteína, da matriz de gel, procurou-se estabelecer as condições que proporcionassem menor difusão protéica e maior resolução entre os Ihs e nas quais houvesse menor exposição da amostra protéica à passagem de corrente elétrica, portanto, menor tempo de corrida eletroforética.

Elaborou-se esse tipo de análise com a finalidade de avaliar a aplicabilidade da técnica a proteínas que possuam componentes isoméricos com mobilidades eletroforéticas muito próximas.

3.1.1.1 Influência da Concentração de Acrilamida

Analisou-se a influência da concentração total de acrilamida no intervalo de 7 a 14%. Concentrações menores, de até 5%, embora possíveis, resultam em géis de baixa consistência, com poros menores que 50 Å (79), nos quais o fenômeno de difusão protéica é bem mais acentuado que a 7%. Quando ocorre difusão, a banda iso-hormonal se apresenta com limites amplos e imprecisos, dificultando a definição exata da sua localização (89).

A figura 13 apresenta os densitogramas de 100µg de HCH-IPEN, lote 20, em matrizes de concentrações crescentes de acrilamida, em igual tempo de corrida eletroforética. Observa-se, no perfil 13-a, a 7% de acrilamida, resolução satisfatória entre os Ihs B e C₂ e à medida que a concentração de acrilamida no gel aumenta o poder de resolução diminui, chegando quase à sobreposição dos Ihs no gel de 14% de concentração de acrilamida (13-d), apesar das bandas protéicas sofrerem menos difusão.

3.1.1.2 Influência do pH

Avaliou-se a flexibilidade da técnica em função do pH da solução estoque A, empregada no preparo do gel de separação, com concentração de acrilamida igual a 7%.

A figura 14 apresenta os densitogramas parciais das matrizes, em pH 8,9 e 9,3; com 150µg de HCH-IPEN, lote 20. Verificou-se resolução maior, entre os Ihs B e C₂, em pH 9,3.

3.1.2 GÉIS DE REFERÊNCIA

a - Gel branco

Utilizou-se como um dos critérios para validar um experimento, especialmente quando a quantidade da proteína em

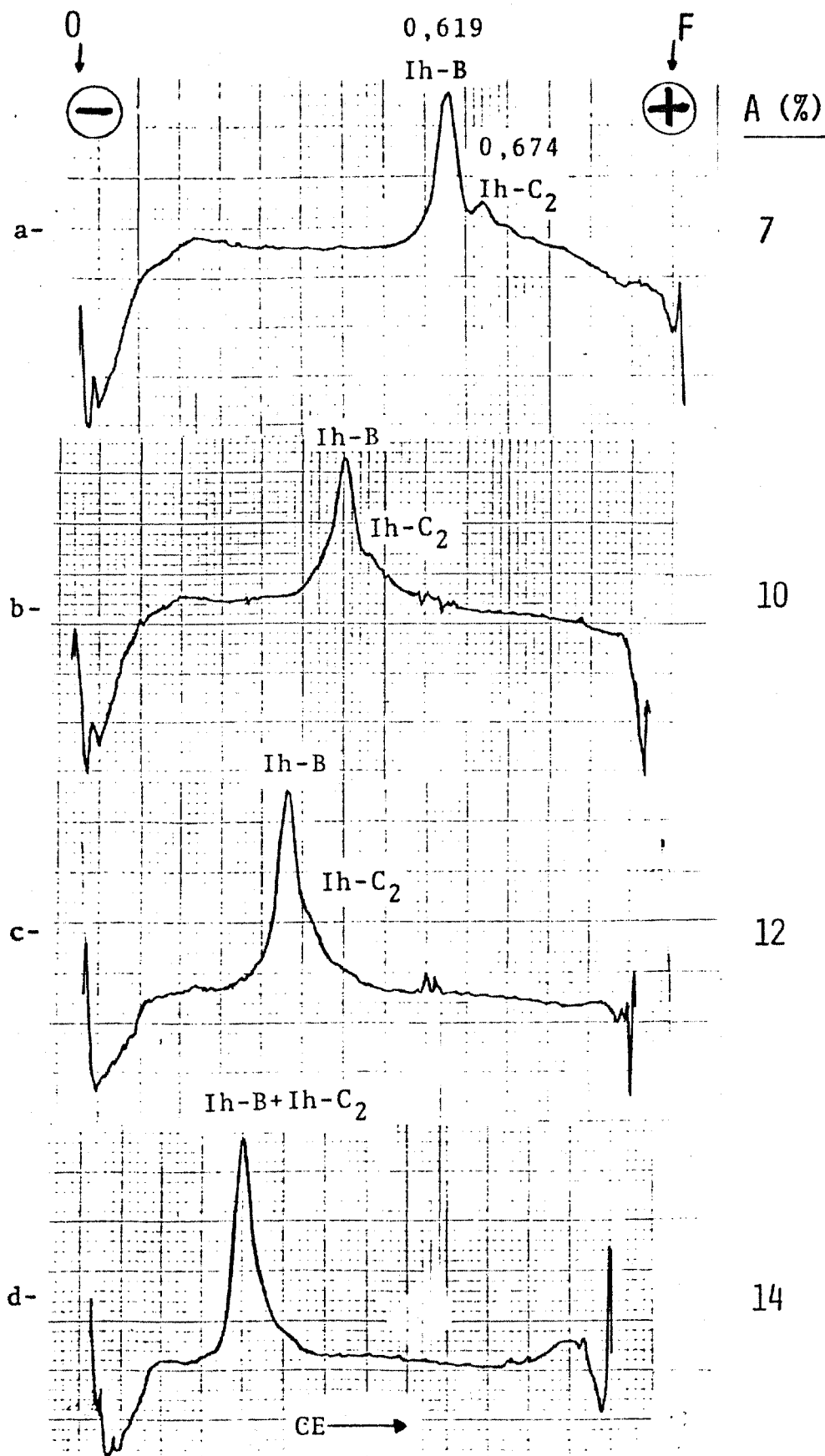


FIGURA 13 - Densitogramas em luz UV, de 100 µg de HCH-IPEN, lote 20, aplicados a matrizes com diferentes concentrações de acrilamida (A%), em igual tempo de corrida. O = Origem da migração eletroforética, começo do gel. F = Distância de migração da frente eletroforética.

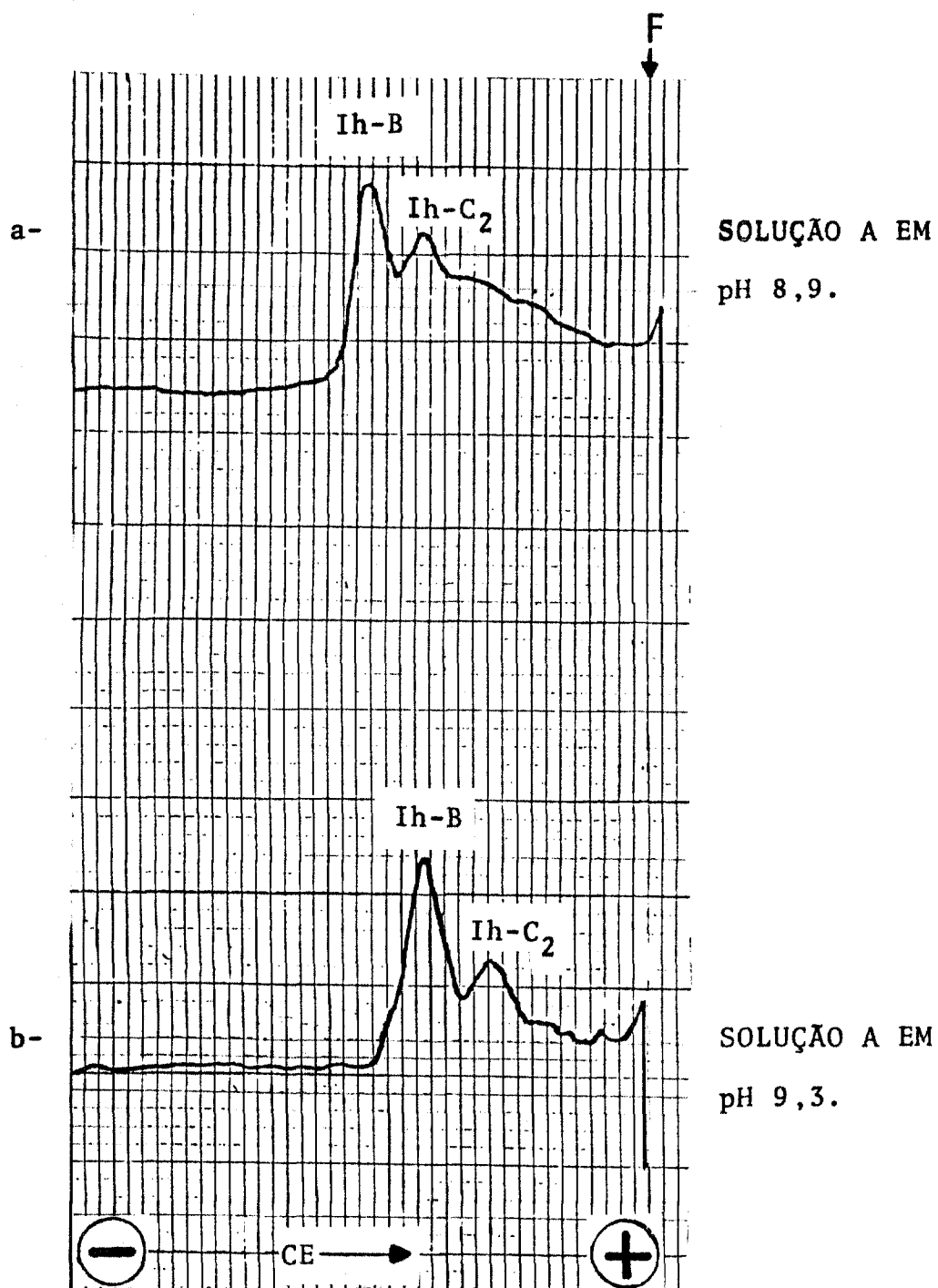


FIGURA 14 - Densitogramas parciais de 150 µg de HCH-IPEN, lote 20, em condições diferentes de pH no gel de separação, com A% igual a 7.

estudo era pequena. As condições de eletroforese foram aceitas quando a leitura densitométrica deste gel de referência apresentou uma linha base limpa e estável, perfeitamente horizontal, como se mostra na figura 15a.

b - Gel SAB

Como proteína de referência interna, empregou-se para controlar a estabilidade das condições eletroforéticas. Na análise qualitativa usou-se como referência a Rm da banda monomérica (M-SAB). Na análise quantitativa empregou-se a área total das três bandas protéicas, monômero, dímero e trímero. A figura 15-b mostra um perfil característico obtido para a SAB.

3.1.3 ANÁLISE QUALITATIVA

O uso de uma proteína de referência permitiu obter identificação qualitativa dos Ihs imediatamente após a leitura densitométrica. A figura 15 mostra o densitograma completo da proteína de referência (15-b) e de uma amostra de 120µg de HCH-IPEN, lote 20 (15-c), com os respectivos valores de Rm obtidos.

Foi analisada a confiabilidade estatística das medidas de Rm. A tabela I apresenta a análise da reprodutibilidade de interensaio para os valores de Rm da M-SAB e do Ih-B, obtidos em EGPA com 7% de acrilamida e pH 8,9; e a razão K existente entre as Rms dos dois. Verificou-se, portanto, que a precisão é ótima, sendo os coeficientes de variação (CV) entre 1 e 2%, para número de ensaios (N) igual a 20.

A tabela II mostra a análise da reprodutibilidade intra-ensaio para as distâncias de Rm da M-SAB e do Ih-B de preparações de HCH-IPEN e HCH-NIAMDD, para número de amostras igual a 5. Observa-se um valor consideravelmente baixo para o CV.



FIGURA 15 - Densitogramas obtidos após EGPA analítica, com 7% de acrilamida. Os triângulos tracejados em b- e c- delimitam a área total (A), pela qual se quantifica a proteína contida no gel. a- gel branco. b- SAB (100 µg). c- HCH-IPEN (120 µg).

Ensaio	Rm M-SAB	Rm Ih-B	K*
1	0,790	0,624	0,790
2	0,804	0,623	0,775
3	0,809	0,629	0,777
4	0,805	0,610	0,758
5	0,776	0,620	0,799
6	0,792	0,623	0,787
7	0,805	0,631	0,784
8	0,838	0,655	0,782
9	0,797	0,627	0,787
10	0,793	0,632	0,797
11	0,790	0,613	0,776
12	0,822	0,637	0,775
13	0,768	0,608	0,792
14	0,823	0,636	0,773
15	0,787	0,615	0,781
16	0,796	0,632	0,794
17	0,798	0,631	0,791
18	0,806	0,639	0,793
19	0,796	0,623	0,783
20	0,788	0,622	0,789
média	0,799	0,626	0,784
S	0,016	0,011	0,010
CV(%)	2,002	1,762	1,260
N	20	20	20

Tabela I - Reprodutibilidade interensaio das medidas de Rm.

$$* K = \frac{Rm \text{ Ih-B}}{Rm \text{ M-SAB}}$$

Proteína	Rm	S	CV(%)	N
M-SAB	0,789	0,0074	0,940	5
Ih-B (HCH-IPEN)	0,658	0,0050	0,760	5
Ih-B (HCH-NIAMDD)	0,619	0,0110	0,864	5

Tabela II - Reprodutibilidade intra-ensaio das medidas de Rm.

A tabela III mostra o resultado da análise das Rms , variando-se o pH da solução estoque A empregada no preparo dos géis de separação. Os valores médios obtidos em pH 8,0 e 8,9 foram comparados por teste t de "Student", com nível de significância de 5% ($p=0,05$). Compararam-se nos dois pHs os valores médios da Rm da M-SAB, Rm do Ih-B, K e Rm do Ih-B_{cor}. Para todos os parâmetros analisados, o valor de F calculado (F_{calc}) foi menor que o teórico nos respectivos graus de liberdade $F_{(8,2)}$, implicando em homocedasticidade para os dados experimentais obtidos. Pelo teste de t aplicado, para os valores de Rm da M-SAB e do Ih-B, nos dois pHs, obteve-se t calculado (t_{calc}) maior que t teórico $t_{(0,95;10)}$, indicando diferença significativa entre as médias. Quando se aplicou o teste aos valores de K e Rm do Ih-B_{cor} não se observou diferença significativa entre as médias, nos pHs diferentes $t_{calc} < t_{(0,95;10)}$. Isso indica que a Rm, para uma mesma banda iso-hormonal, varia significativamente em pH 8,0 ou 8,9; porém, apesar dessa variação sensível na Rm, a razão K é mantida (médias iguais), mesmo com essa mudança significativa nas condições eletroforéticas.

O uso da proteína de referência, possibilitou a obtenção da razão K, gerando valores de Rm do Ih-B corrigidos, permitindo a comparação interensaio e interlaboratorial dos dados obtidos em condições diferentes de pH, em EGPA a 7%.

Por meio dos valores de K, obtidos nas tabelas I e III, calculou-se a média da razão K para o Ih-B de preparações de HCH-IPEN, em EGPA a 7% de acrilamida. O valor obtido para número de ensaios igual a 32, foi: $K=0,780 \pm 0,013, CV(\%)=1,62$.

Ensaio	pH Sol. A	Rm M-SAB	Rm Ih-B	K	Rm Ih-B _{cor} (*)
1	8,0	0,959	0,750	0,782	0,627
2	8,0	0,944	0,740	0,784	0,629
3	8,0	0,914	0,706	0,773	0,621
4	8,9	0,861	0,670	0,778	0,622
5	8,9	0,771	0,598	0,776	0,623
6	8,9	0,730	0,569	0,779	0,625
7	8,9	0,754	0,594	0,788	0,633
8	8,9	0,812	0,620	0,764	0,613
9	8,9	0,717	0,548	0,764	0,613
10	8,9	0,764	0,565	0,739	0,595
11	8,9	0,741	0,574	0,775	0,622
12	8,9	0,761	0,579	0,761	0,611
Média		0,939	0,732	0,780	0,626
S		0,023	0,023	0,006	0,004
CV(%)	8,0	2,40	3,20	0,80	0,67
N		3	3	3	3
Média		0,770	0,586	0,769	0,617
S	8,9	0,038	0,025	0,014	0,011
CV(%)		4,93	4,27	1,90	1,77
N		9	9	9	9
F _{calc}		2,750	1,175	5,971	6,896
F _(8,2)		19,370	19,370	19,370	19,370
t _(calc)		7,139	8,898	1,288	1,350
t _(0,95;10)		2,228	2,228	2,228	2,228

(*) O Rm do Ih-B_{cor} foi obtido pela equação 4, item 2.2.5.1.2.2

TABELA III - Análise da razão K, em pHs diferentes de solução estoque A. Teste t de "Student", com nível de significância de 5%.

A tabela IV mostra os valores de Rm que levaram ao cálculo da razão K, para o Ih-B de preparações de HCH-NIAMDD. Consideraram-se seis experimentos, efetuados em épocas diferentes, ao longo de um ano e meio, em EGPA a 7%, pH 8,9. Nesta comparação interensaio, pode-se observar que o CV calculado para K é nitidamente menor (cerca de 2,5 vezes) que os CVs obtidos para os valores de Rm da M-SAB e do Ih-B. A média da razão K, definida para o Ih-B de preparações de HCH-NIAMDD foi de $0,789 \pm 0,018$, para número de ensaios igual a seis, com $CV(\%) = 2,34$, o qual foi analisado por teste de t, em comparação ao valor obtido para preparações de HCH-IPEN ($0,780 \pm 0,013$).

Teste t de "Student", para $p=0,05$.

Preparação	K	s	s ²	N	F _{calc}	F _(5,31)	t _{calc}	t ₃₆
Ih-B (HCH-NIAMDD)	0,789	0,018	0,000324	6	1,92	2,53	1,47	2,03
Ih-B (HCH-IPEN)	0,780	0,013	0,000169	32				

Pelos resultados indicados no quadro acima observa-se a homocedasticidade dos dados $F_{calc} < F_{(5,31)}$ e diferença não significativa entre os valores médios obtidos para a razão K das duas preparações de HCH ($t_{calc} < t_{36}$). Este dado é muito importante, porque comprova que a forma fundamental, Ih-B, aqui analisada e purificada, é a mesma considerada internacionalmente como tal.

Para fins de comparação interlaboratorial observou-se que o valor de 0,617 para a Rm do Ih-B, apresentado por CHEEVER & LEWIS (22), está muito próximo do valor médio obtido neste trabalho: $0,626 \pm 0,011$, calculado na tabela I. Não foi possível uma comparação entre os valores de K, sendo este parâmetro empregado somente neste trabalho. Entretanto, usando o valor da Rm da M-SAB; de 0,790; apresentado por HEDRICK & SMITH (51), em trabalho que emprega a mesma técnica usada por CHEEVER & LEWIS, obtém-se um valor de K igual a 0,781, muito próximo dos valores apresentados no ítem 3.1.3.

ENSAIO	Rm M-SAB	Rm Ih-B	K
01.10.81.	0,804	0,615	0,765
05.10.81	0,754	0,618	0,819
10.03.82	0,720	0,567	0,787
15.03.82	0,750	0,596	0,795
18.02.83	0,839	0,651	0,776
04.05.83	0,829	0,658	0,794
MÉDIA	0,782	0,623	0,789
S	0,048	0,036	0,018
CV(%)	6,160	5,850	2,340
N	6	6	6

TABELA IV - Comparação interensaio da Rm do Ih-B e K, para preparação de HCH-NIAMDD, em EGPA com 7% de acrilamida.

3.1.4 ANÁLISE QUANTITATIVA

Confrontaram-se inicialmente os valores de absorvância obtidos por espectrofotometria àqueles obtidos por densitometria direta, com a finalidade de validar o último método, o qual foi empregado na leitura dos géis para fins quantitativos. Em ambos os casos, utilizaram-se as mesmas soluções de SAB e HCH-IPEN, em concentração de 0,2mg/ml.

A tabela V apresenta os resultados de absorvância e coeficiente de extinção, nos dois tipos de equipamento, calculando-se o coeficiente de extinção, a partir da absorvância, por meio da equação 10, do ítem 2.2.3.1. Como o feixe de luz do densitômetro é fixo no intervalo de 220 a 310nm, achou-se de interesse fazer as leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda (λ) seguintes: 280, 260 e 230nm.

Apesar de estarmos comparando uma leitura obtida em feixe de luz monocromático a outra obtida em intervalo mais amplo de luz UV, o coeficiente de extinção da SAB, por exemplo, obtido em densitometria; de 4,99; na faixa de 220-310nm, não é incoerente quando confrontado aos obtidos em 280(0,835), 260(0,690) ou 230nm (5,200), apresentando um valor aceitável. Em seguida à tabela V, apresentam-se, comparativamente, os coeficientes de extinção citados na literatura para SAB e HCH, em 280nm, que é o λ mais usado na quantificação protéica direta.

A tabela VI mostra os valores de área calculados pelos densitogramas, conforme mostrado na figura 15-b (SAB) e 15-c (HCH-IPEN), para as quantidades diferentes de SAB aplicadas ao gel, em quatro ensaios. Obteve-se, experimentalmente, o ponto zero utilizando o gel branco de referência e considerando como pico protéico as oscilações encontradas na região típica da proteína sob análise. A equação resultante, calculada com os valores médios de cada dose, para SAB, foi:

$$Y = 4,55 X - 0,35, \quad \text{(equação 45).}$$

com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999.

PROTEÍNA	ESPECTROFOTOMETRIA (nm)						DENSITOMETRIA (nm)	
	280		260		230		220-310	
	A	E*	A	E*	A	E*	A	E*
0,2 mg/ml								
SAB	0,167	0,835	0,138	0,690	1,040	5,200	0,998	4,990
HCH-IPEN	0,194	0,970	0,182	0,910	0,910	4,550	0,966	4,830

E* = Coeficiente de extinção de uma solução 0,1% da substância, em cubeta com caminho ótico de 1 cm, no comprimento de onda respectivo, (equação 10, ítem 2.2.5.2.1).

Na literatura, os valores de $E_{280}^{0,1\%}$, 1 cm citados são:

A- PARA SAB

- 0,661 - WETLAUFER, 1962 (106).
- 0,820 - MAYER & MILLER, 1970 (77).
- 0,701 - WHITAKER & GRANUM, 1980 (107).

B- PARA HCH

- 0,930 - BEWLEY et al., 1969 (13 e 14).
- 0,930 - TARLI & LI, 1974 (97).
- 0,680 - CHAPMAN et al., 1981 (21).
- 0,885 - STEIN et al., 1982 (95).
- 0,710 - MATTERA et al., 1982 (75).

TABELA V - Comparação entre os valores de absorvância e coeficientes de extinção respectivos, obtidos por densitometria direta e espectrofotometria, em λ_s diferentes. Comparação com os dados da literatura, a 280 nm.

QUANTIDADE APLICADA AO GEL (μg)	ÁREA (mm^2)				
	ENSAIO				MÉDIA
	1	2	3	4	
ZERO	0,0	2,3	5,7	2,1	2,5
5	23,1	23,3	34,2	27,8	27,1
10	49,2	43,6	46,7	48,3	47,0
25	110,8	87,9	127,2	109,1	108,7
50	221,1	---	---	---	---
100	374,0	462,2	469,5	460,2	464,1
m	4,39	4,63	4,63	4,57	4,55
b	1,81	-5,79	6,99	1,45	-0,35
r	0,9997	0,9979	0,9997	0,9998	0,9999

Reta padrão para quantificação protéica da SAB, em EGPA a 7%.

$$Y = 4,55 X - 0,35$$

$$r = 0,9999 (P < 0,001).$$

TABELA VI - Valores de área para SAB e parâmetros da equação da reta.

Na tabela VII são apresentados os valores de área obtidos para preparações de HCH-IPEN, média resultante de quatro ensaios, HCH-NIAMDD um ensaio. As equações resultantes foram:

Para HCH-IPEN

$$Y = 4,37 X + 16,40, \text{ com } r = 0,9950 \quad (\text{equação 46}).$$

Para HCH-NIAMDD

$$Y = 4,42 X + 13,30, \text{ com } r = 0,9999 \quad (\text{equação 47}).$$

Os coeficientes de correlação obtidos foram significativos ao nível de $P < 0,001$.

A figura 16 mostra o gráfico linear correlacionando a quantidade de proteína (μg) à respectiva área (mm^2). Nele está representada graficamente a reta resultante da equação obtida na tabela VI, para a proteína de referência, para a quantificação protéica em EGPA a 7%. Como se pode observar na figura, os valores relativos ao HCH (IPEN e NIAMDD) encontram-se muito próximos da reta obtida para a SAB, confirmando o resultado já apresentado na tabela V, ou seja, que nesta faixa de λ , a SAB pode servir como padrão de referência quantitativa para o HCH.

Imediatamente após a passagem, em EGPA, de uma solução de concentração protéica desconhecida, leitura densitométrica e cálculo da área, pode-se obter a quantidade de proteína presente, por interpolação na curva. Tendo, porém, disponibilidade de material, prefere-se sempre, como no presente trabalho, realizar em cada determinação quantitativa a corrida simultânea de uma quantidade padrão, da proteína de referência.

A tabela VIII-A foi construída com os valores de área correspondentes ao ponto zero e a menor quantidade de SAB, determinados experimentalmente, mostrados na tabela VI. A quantidade mínima detectável (QMD ou $X_{\text{mín}}$), em μg , determinada na tabela VIII-B, foi obtida pela média dos quatro ensaios. O valor foi de $1,5\mu\text{g} \pm 0,8$.

QUANTIDADE APLICADA AO GEL (μg)	ÁREA (mm^2)	
	HCH-IPEN	HCH-NIAMDD
ZERO	0,0	0,0
5	34,5	39,0
10	92,5	53,5
25	116,4	--
50	231,0	235,0
100	455,0	--
N	4	1
m	4,37	4,42
b	16,40	13,30
r	0,9950	0,9999

Equações da reta para quantificação protéica, em EGPA a 7%.

A - HCH-IPEN

$$Y = 4,37X + 16,40 \quad \text{com } r=0,9950 \quad (P < 0,001).$$

B - HCH-NIAMDD

$$Y = 4,42X + 13,30 \quad \text{com } r=0,9999 \quad (P < 0,001).$$

TABELA VII - Valores de área para HCH-IPEN e HCH-NIAMDD e parâmetros da equação da reta.

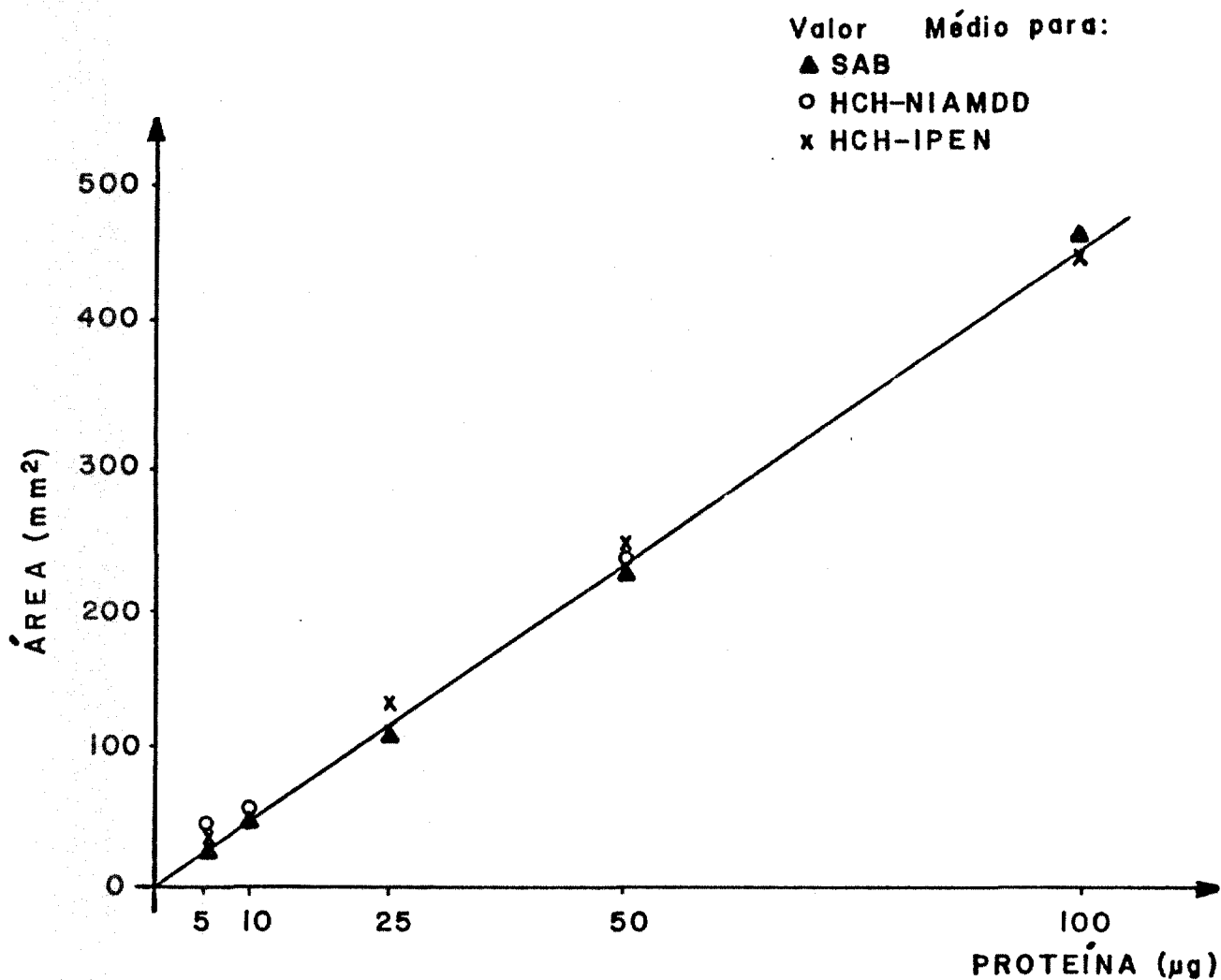


FIGURA 16 - Retra padrão para quantificação protéica, obtida em EGPA com 7% de acrilamida.

A- QUANTIDADE APLICADA AO GEL (μg)	ENSAIO							
	1		2		3		4	
	ÁREA (mm^2)	N	ÁREA (mm^2)	N	ÁREA (mm^2)	N	ÁREA (mm^2)	N
ZERO	0,0	2	2,3	3	5,7	2	2,1	4
5	23,1	4	23,3	4	34,2	2	27,8	4

B- PARÂMETRO	ENSAIO			
	1	2	3	4
n	4	5	2	6
S_m	2,92	2,61	2,17	3,84
$t(0,95)$	2,13	2,01	2,92	1,94
$Y_{\text{mín}}$	5,39	6,34	12,10	7,40
QMD ($X_{\text{mín}}$)	0,82	2,62	1,10	1,30

QMD = $1,5 \mu\text{g} \pm 0,8$ - PARA $N = 4$.

TABELA VIII - Cálculo da sensibilidade do método de quantificação protéica, por densitometria direta.

3.2 ELETROFORESE PREPARATIVA (EGPAP)

3.2.1 PURIFICAÇÃO DA M-SAB

A técnica de EGPA preparativa por ER (EGPAP) foi aplicada, inicialmente, com a utilização de SAB, em quantidades de 2 a 5mg e obtendo-se a banda monomérica (M-SAB) purificada, totalmente livre de qualquer outro componente protéico.

A figura 17 mostra um exemplo do resultado analítico desses ensaios, apresentando um densitograma da M-SAB purificada (17-a), em comparação com a SAB heterogênea (17-b). Verifica-se que a Rm da banda purificada permanece idêntica àquela da amostra não submetida à técnica de EGPAP para purificação.

A tabela IX apresenta a recuperação protéica percentual obtida na purificação da M-SAB. Obtiveram-se valores extremos, para recuperação, de 55,0% a 99,2% e um valor médio de $71,33 \pm 11,45\%$, com CV de 16,05%, para número de ensaios igual a doze.

A aplicação do método preparativo à purificação da M-SAB não serviu somente para tentar melhorar a recuperação, como também para possibilitar o domínio do procedimento experimental, tornando-o prático, rápido e de aplicação viável à purificação do Ih-B, do HCH.

3.2.2 PURIFICAÇÃO DO Ih-B

A figura 18 mostra o resultado da EGPAP de 2mg de HCH IPEN, lote 25. A área do gel delimitada pelos pinos no densitograma, segmento P, foi submetida a ER, para a obtenção do Ih-B eletroforeticamente homogêneo.

A figura 19 apresenta a análise qualitativa e quantitativa, por meio de EGPA, da solução protéica contendo o Ih-B

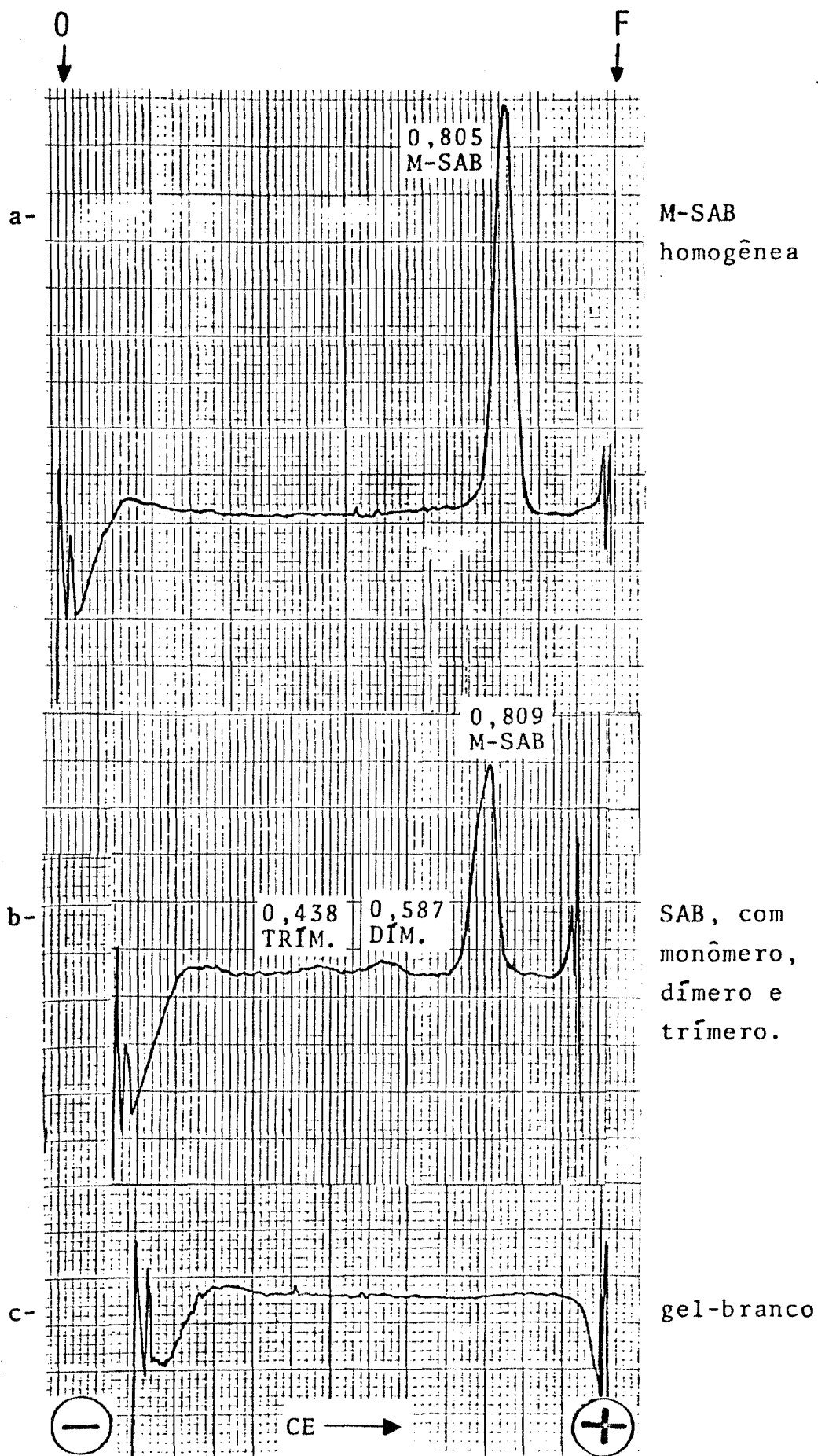


FIGURA 17 - Densitogramas obtidos após EGPA analítica, da M-SAB purificada (a), da SAB heterogênea (b) e gel de referência branco. (c).

ENSAIO	RECUPERAÇÃO (%)	
	M-SAB	Ih-B (HCH-IPEN)
1	58,7	74,0
2	99,2	89,3
3	55,0	56,0
4	81,0	72,3
5	69,2	60,0
6	75,9	59,3
7	64,3	74,1
8	66,4	72,3
9	74,0	93,9
10	67,9	----
11	75,9	----
12	68,5	----
MÉDIA	71,33	72,35
S	11,45	12,98
CV(%)	16,05	17,94
N	12	9

TABELA IX - Recuperação percentual da técnica de EGPA preparativa.

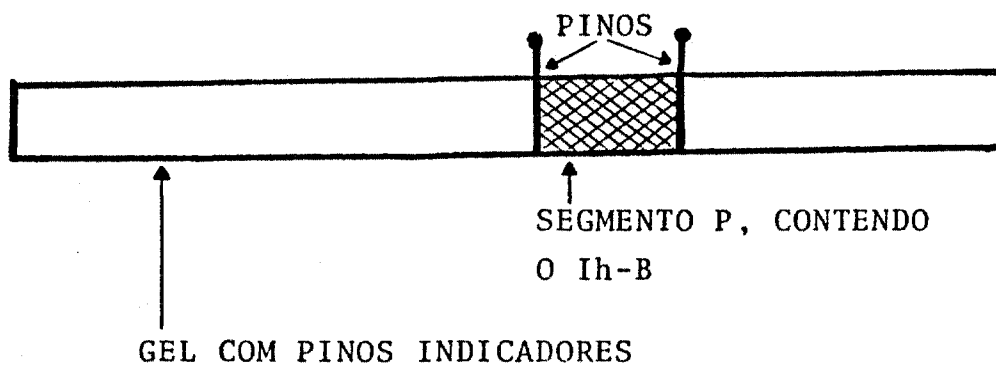
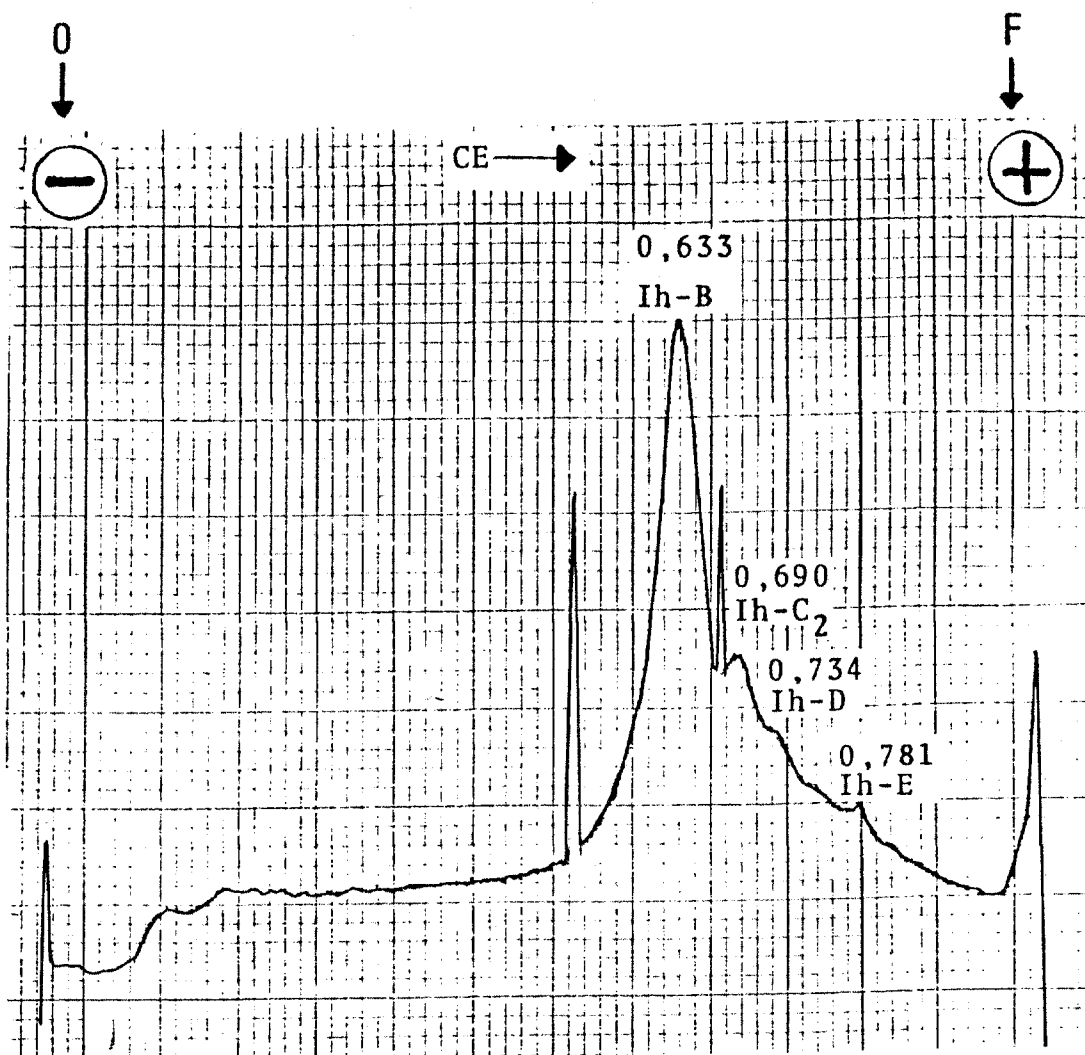


FIGURA 18 - Densitograma da preparação de HCH-IPEN, obtido em EGPA preparativa. A área do gel, delimitada pelos pinos, contendo o Ih-B foi, posteriormente, submetida à ER.

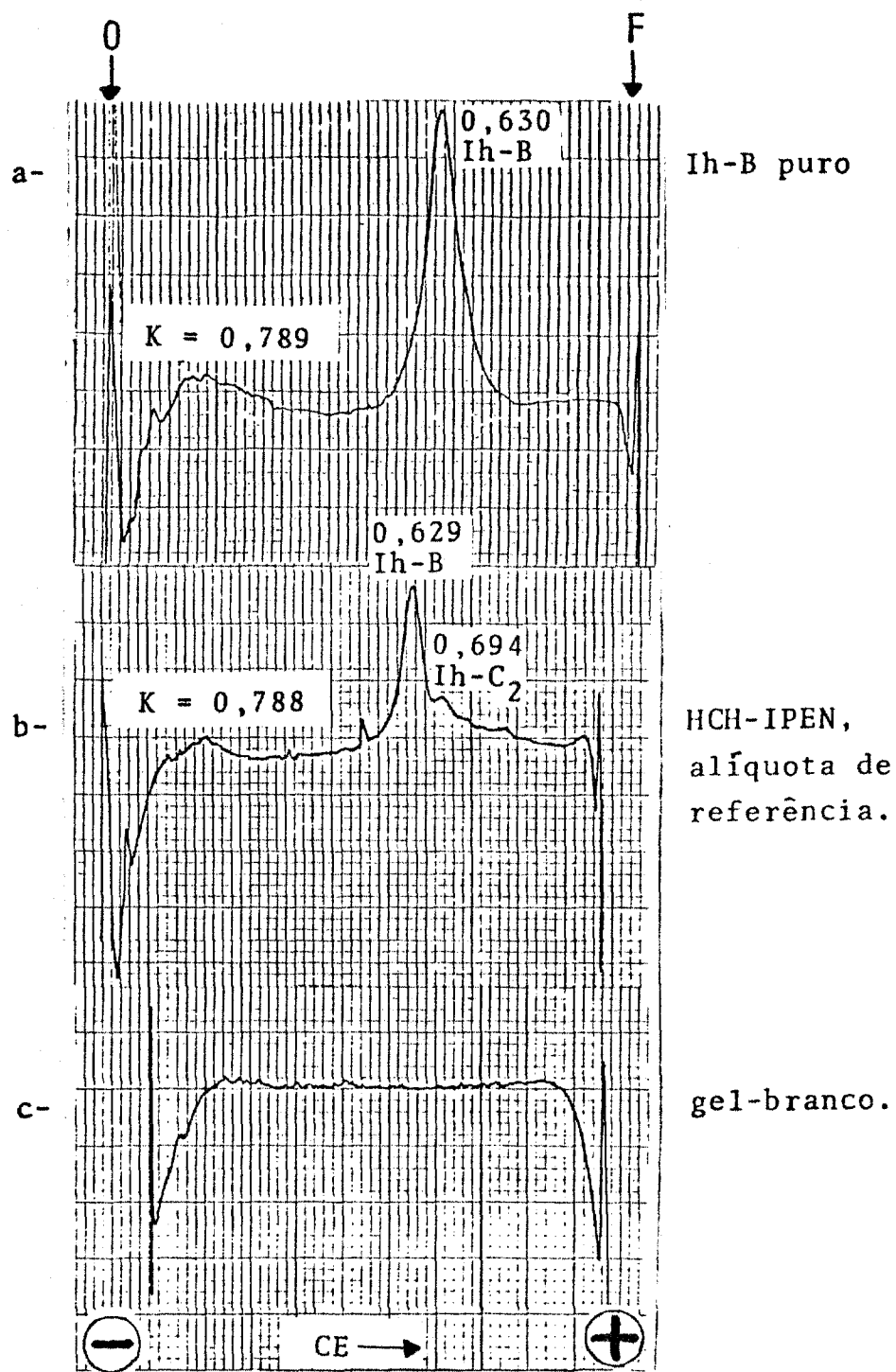


FIGURA 19 - EGPA analítica do Ih-B purificado.

purificado. Pode-se notar que a razão K é mantida após o procedimento de purificação, o que indica que as propriedades físico-químicas fundamentais da molécula, as quais determinam a mobilidade eletroforética no gel, foram preservadas.

A figura 20 compara o Ih-B puro e o HCH-NIAMDD, que contém teor alto de Ih-B. Verifica-se que os valores de K obtidos no ensaio, para o Ih-B nas duas preparações, estão dentro do valor médio mais ou menos um desvio padrão, definido estatisticamente no ítem 3.1.3 (HCH-NIAMDD: $0,789 \pm 0,018$ e HCH-IPEN: $0,789 \pm 0,013$). Isso define que o valor de K para o Ih-B puro e o valor de K para o Ih-B da preparação de HCH-NIAMDD não são diferentes significativamente, ao nível de 5%, conforme o teste de t elaborado no ítem 3.1.3.

A última coluna da tabela IX indica a recuperação protéica percentual, do método de EGPAp, quando aplicada à purificação do Ih-B, de amostras de HCH-IPEN. Os valores extremos foram de 56,0% e 93,9%. Obteve-se um valor médio de $72,35 \pm 12,98$; com CV de 17,94%; para número de ensaios igual a nove. Os dados de recuperação da tabela IX referem-se somente à eluição das bandas iso-hormonais por meio de ER. Os dados obtidos por eluição com difusão simples não foram registrados aqui.

Na ER, a forma iso-hormonal é coletada em solução, no interior de uma membrana de diálise tubular, vedada totalmente. Portanto, sempre há parte da solução de coleta em contato direto com o segmento de gel P e o interior da membrana, acarretando adsorção do Ih eluído nas paredes. Por coloração da membrana de diálise e do segmento P, com "comassie-blue" (26), observou-se a presença de proteína na parede da membrana e na região superficial do segmento, embora houvesse ausência total de proteína residual no interior do segmento de gel. As perdas assim ocasionadas foram diminuídas parcialmente, por lavagens sucessivas do segmento e da membrana. Essa operação apresenta o inconveniente de que, dependendo da quantidade de proteína purificada, a amostra seja obtida em solução muito diluída.

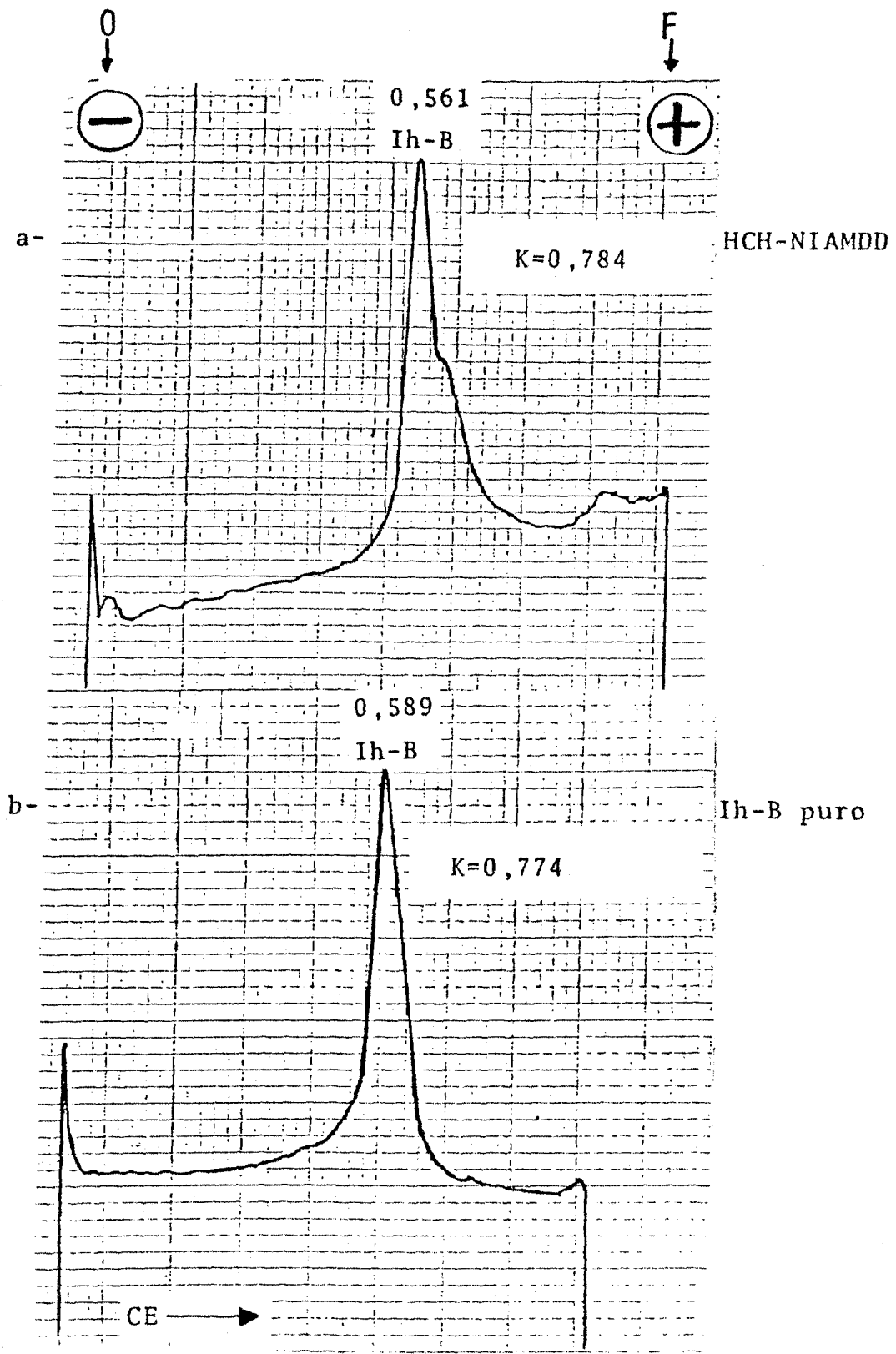


FIGURA 20 - Comparação, em EGPA com 7% de acrilamida, dos densitogramas obtidos para o HCH-NIAMDD (a) e para o Ih-B purificado neste trabalho (b).

3.3 ENSAIO BIOLÓGICO

3.3.1 PREPARO DA AMOSTRA

Partiu-se de dez miligramas de HCH-IPEN, lote 25. Após diálise, seis miligramas foram submetidos a eletroforese reversa (U ou HCH-U) e quatro miligramas foram mantidos a 4°C (S ou HCH-S).

A figura 21 apresenta o densitograma da alíquota U, referente à fase II do procedimento de EGPA preparativa a 7% de acrilamida (figura 8, ítem 2.3.7), após a primeira eletroforese. A região delimitada pelos pinos, no gel, foi seccionada em dois segmentos iguais, cada um submetido separadamente a uma ER. As setas 1 e 2, na figura, indicam o sentido da corrente elétrica durante a eletroforese reversa, em cada segmento, obrigando, assim, a região de maior concentração de proteína no gel, a ser eluída em primeiro lugar. Pôde-se observar, pelo densitograma preparativo, a distribuição qualitativa dos Ihs, identificados pelos valores de Rm. Não sendo o objetivo da eletroforese, neste caso, a purificação de uma banda iso-hormonal particular, não houve preocupação em se obter uma resolução melhor entre os Ihs.

Após ER efetuou-se a EGPA analítica, para fins qualitativos e quantitativos. Empregou-se a alíquota S como referência, em comparação com a alíquota U. A figura 22 apresenta os densitogramas obtidos nessa análise. O perfil 22-a (S) mostra dados de Rm que são praticamente idênticos aos do perfil 22-b(U), o que nos indica que, qualitativamente, a distribuição iso-hormonal permanece inalterada após ER, obtendo-se, nos dois casos, valores para a razão K comparáveis entre si e àquele definido estatisticamente ($0,780 \pm 0,013$) no ítem 3.1.3. Por intermédio dos valores de área obtidos nos densitogramas 22-a e 22-c determinou-se a quantidade de proteína recuperada na alíquota U(22-b).

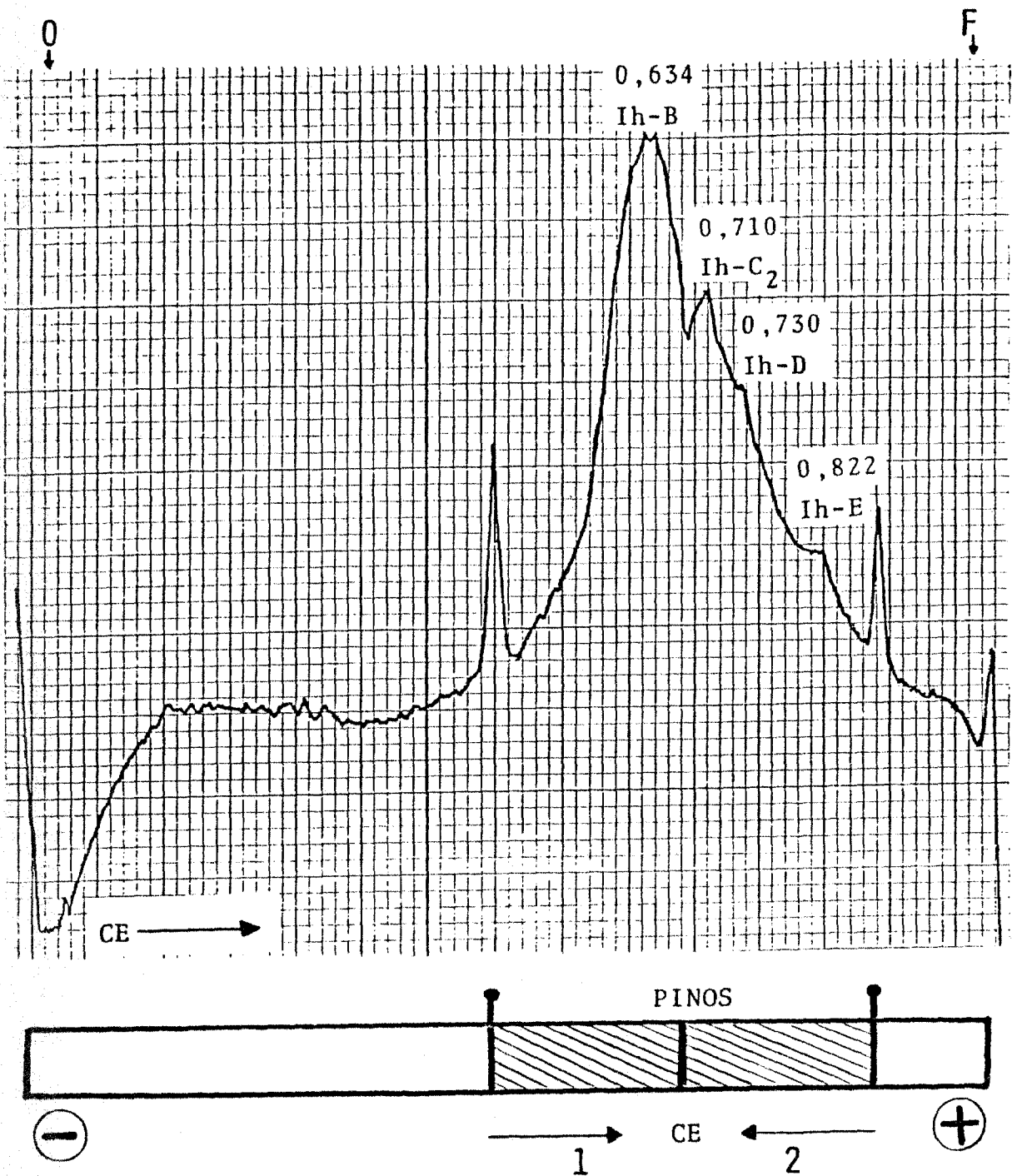


FIGURA 21 - Densitograma da alíquota HCH-U (HCH-IPEN, lote 25). FASE II do procedimento preparativo (figura 8). As setas 1 e 2 indicam o sentido da corrente elétrica nas ERs subseqüentes.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP
I. P. E. N.

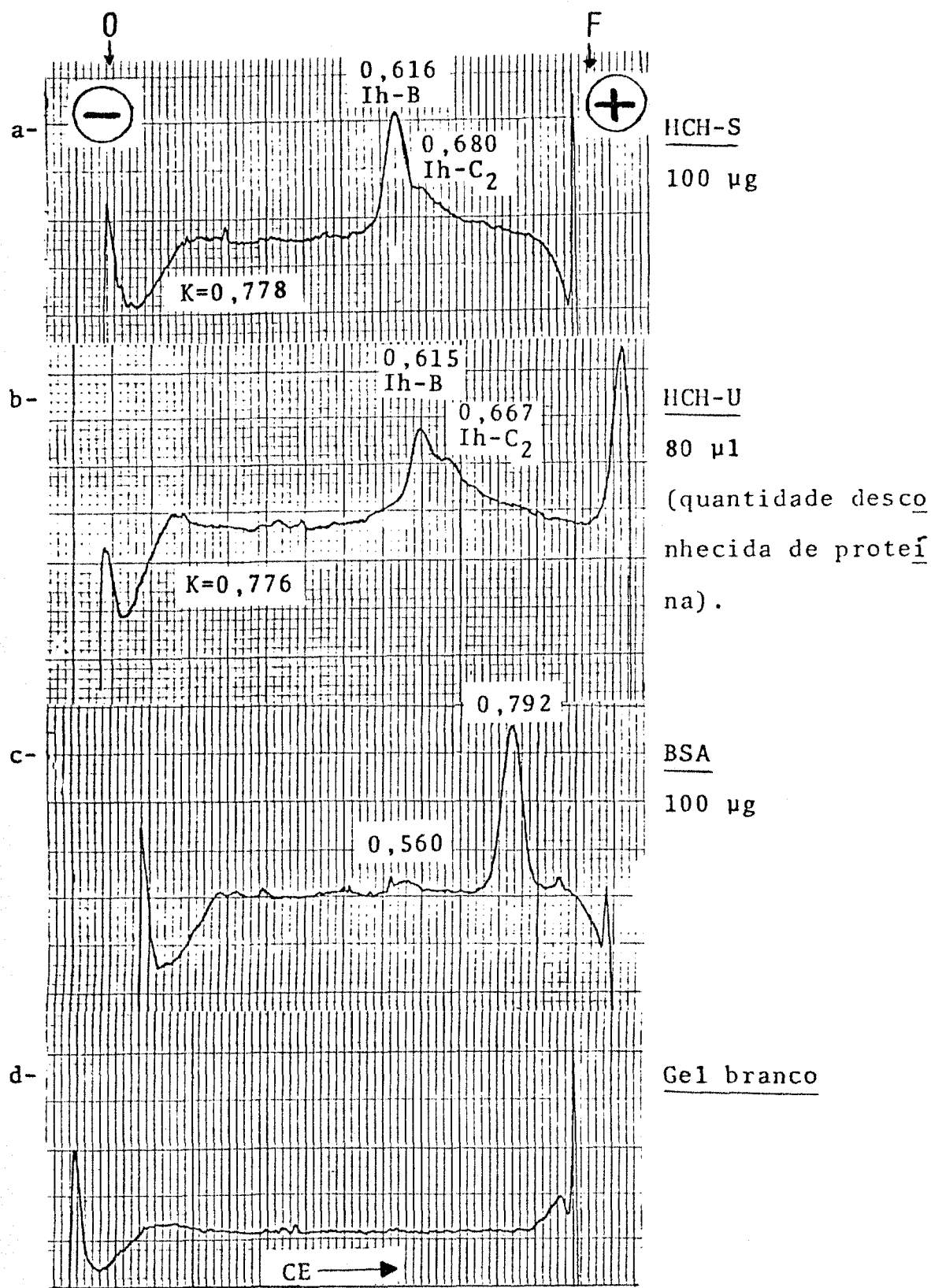


FIGURA 22 - EGPA analítica das preparações de HCH empregadas no ensaio biológico.

3.3.2 ENSAIO BIOLÓGICO

Na figura 23 estão representados os dados de saída do programa para processamento automático dos resultados referentes ao ensaio biológico das amostras S e U. Nas colunas de 1 a 10 estão impressos os dados de entrada do programa, ou seja, os incrementos de peso (g) de cada animal, no intervalo de dez dias de ensaio. A coluna TD expõe a somatória de ganho de peso dos animais para cada dose empregada. A linha TG indica a somatória do ganho de peso por cada gaiola.

Abaixo da tabela estão relacionados os dados obtidos pela análise de variância empregada e resultados calculados utilizando-se o método estatístico, parâmetros e cálculos já citados no item 2.4.8. Estes dados demonstraram um ensaio plenamente válido, porque a diferença entre doses foi significativa, obtendo-se uma inclinação combinada das duas curvas dose-resposta de 11,54. O desvio de paralelismo entre as duas curvas dose-resposta não foi significativo, indicando que não há diferença qualitativa, ou alteração apreciável, entre as duas preparações. A diferença entre grupos não foi significativa, podendo-se concluir que a divisão dos animais por dose-grupo foi adequada e o ganho de peso dos animais, por gaiola, foi homogêneo em relação ao total.

A figura 23 foi obtida totalmente no idioma inglês, que é o comumente empregado no sistema IBM 370, instalado no IPEN. Manteve-se a terminologia empregada internacionalmente nesse tipo de ensaio.

A figura 24 mostra o gráfico linear de incremento de peso por log da dose diária, para os quatro grupos de ratos, relativos às duas doses e duas preparações (U_1 , S_1 , U_2 e S_2), no intervalo de dez dias de ensaio. As curvas de dose-resposta foram construídas utilizando-se a coluna TD da tabela de dados da figura 23.

BIOLOGICAL ASSAY (BASSY)

2X2 FACTORIAL ASSAY DESIGN

RUN ON 19/12/84

U=H.GH REVERSED ELECTROPHORESIS

S=H.GH CONTROL

µG/DAY	TD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
10	U1	88.8	9.5	7.5	8.0	7.5	10.5	10.0	7.5	10.0	7.3	11.0	
10	S1	91.1	11.7	9.5	7.5	8.0	11.0	6.0	8.5	10.0	8.5	10.4	
20	U2	122.4	11.5	12.0	13.5	12.0	13.0	11.5	11.5	13.4	12.0	12.0	
20	S2	127.0	13.5	13.3	14.0	10.5	13.4	11.3	12.5	11.5	12.5	14.5	
	SY	429.3	TG	46.2	42.3	43.0	38.0	47.9	38.8	40.0	44.9	40.3	47.9

DIFFERENCE BETWEEN PREPARATIONS IS NOT SIGNIFICANT (P= 0.05)

DIFFERENCE BETWEEN DOSES IS SIGNIFICANT (P= 0.05)

SLOPE DIVERGENCE IS NOT SIGNIFICANT (P= 0.05)

DIFFERENCE BETWEEN GROUPS IS NOT SIGNIFICANT (P= 0.05)

POTENCY = 0.93

FIDUCIAL LIMITS UPPER = 1.08 LOWER = 0.80

COMBINED SLOPE = 11.54

STANDARD DEVIATION = 1.15

INDEX OF PRECISION = 0.100

STANDARD ERROR UPPER = 1.004 LOWER = 0.868

FIGURA 23 - Dados de saída do programa para análise computadorizada (32) dos resultados do ensaio biológico.

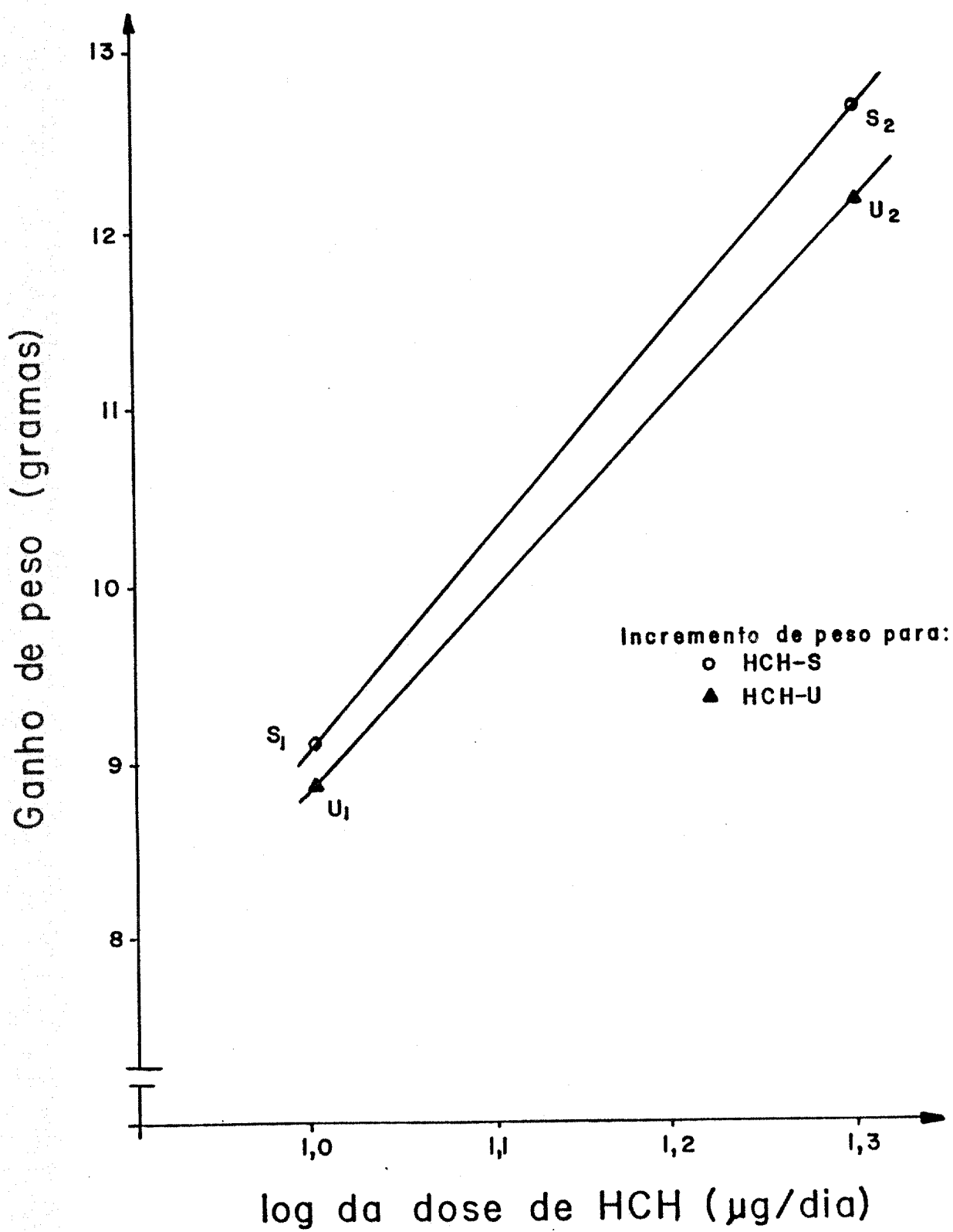


FIGURA 24 - Curvas de dose-resposta, do ensaio biológico.

3.4 RADIOIMUNOENSAIO

3.4.1 RADIOIODAÇÃO E PURIFICAÇÃO

A figura 25 apresenta o cromatograma característico obtido na purificação da mistura de marcação, em coluna de gel de Sephadex G-100, para uma atividade de ^{125}I de aproximadamente $700\mu\text{Ci}$, de uma das marcações do HCH-IPEN, realizada em rotina nesta divisão. São obtidos:

PICO	FRAÇÃO CORRESPONDENTE	RADIOATIVIDADE CORRESPONDENTE (%)
I	Hormônio agregado marcado	3,8
II	Radioatividade carregada pela SAB	15,8
III	Hormônio monomérico marcado	23,5
IV	Iodo livre	56,8

A radioatividade correspondente ao Pico III indica o rendimento percentual da reação de marcação. O perfil cromatográfico aqui apresentado é referente à preparação de HCH denominada segundo Padrão IPEN (HCH-29P), que apresenta teor baixo de Ih-B (aproximadamente 10%), já especificada no ítem 2.5.2.

O volume de eluição relativo ($V_{ER} = V_E/V_0$), para o pico de hormônio monomérico marcado, neste caso, foi de 2,09. O V_0 corresponde ao volume de exclusão molecular da coluna, que é definido pela posição de eluição do azul dextran. O V_E do ^{125}I fornece o valor do volume total de solvente, existente dentro do gel, disponível a moléculas muito pequenas.

3.4.2 RENDIMENTO DA RADIOIODAÇÃO E LIGAÇÃO DO ^{125}I -Ag AO ANTICORPO ESPECÍFICO.

A tabela X apresenta o levantamento feito ao longo de dois anos, dos dados de marcação e ligação ao anticorpo espe

$$V_{ER} = V_E^{125I-HCH} / V_0 = 2,09$$

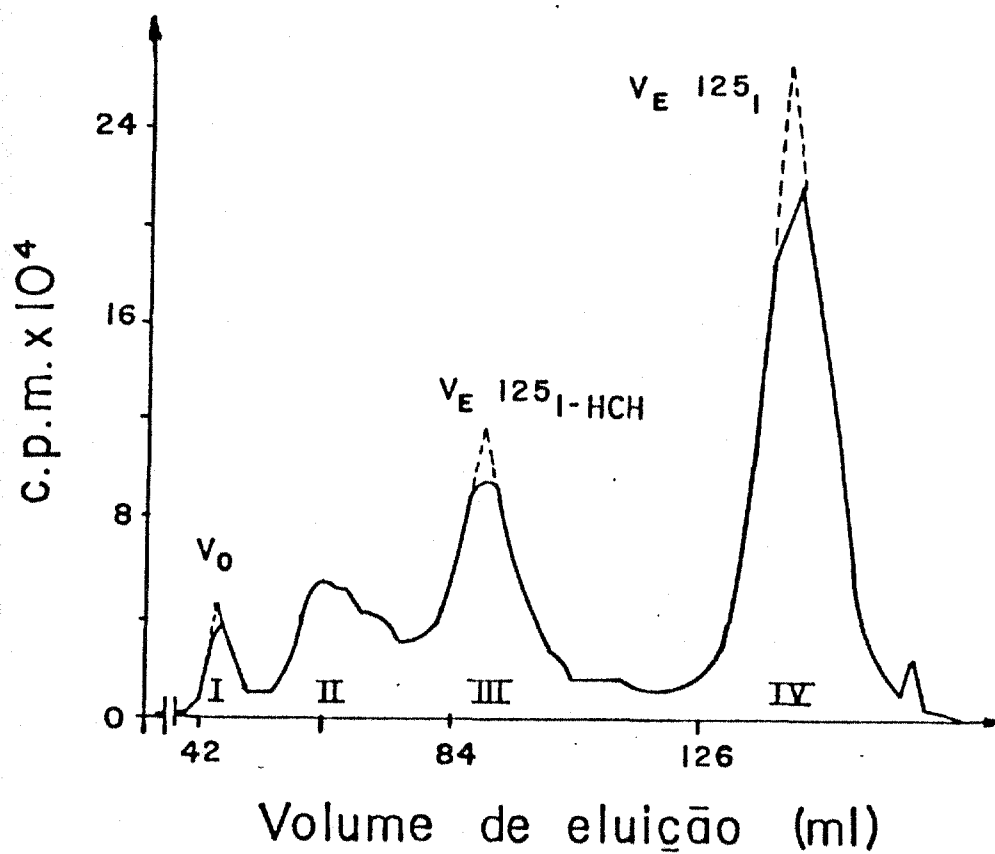


FIGURA 25 - Cromatograma de purificação característico de uma preparação de HCH-IPEN radioiodada, obtido em gel de sephadex G-100.

cífico da preparação de HCH-2^oP, com teor baixo de Ih-B. As tabelas XI e XII são relativas a estes mesmos parâmetros, porém, em espaço curto de tempo. A tabela XI refere-se ao Ih-B puro e a tabela XII à preparações heterogêneas ricas em Ih-B, HCH-NIAMDD, altamente purificado e HCH-IPEN, denominada HCH-3^oP, já especificado no item 2.5.2, com aproximadamente 70% de Ih-B. A preparação de anticorpo empregada foi a mesma em todos os casos, Ac-IPEN.

Observa-se nas três tabelas uma reprodutibilidade interensaio satisfatória, em parâmetros da técnica de marcação, a saber, radioatividade usada, volume de eluição relativo (V_{ER}), atividade específica e rendimento. A radioatividade usada, em torno de 700 μ Ci, produzindo produtos com a atividade específica na faixa apresentada aqui, proporciona durabilidade maior do produto marcado. Os valores médios obtidos em cada tabela, para o parâmetro V_{ER} do 125 I-HCH confirma os dados existentes na literatura para esta razão, relativos ao HCH monomérico não marcado, citados por LI et al., que são de 2,12 (68) e 2,06 (69). A estatística obtida para V_{ER} nas tabelas citadas acima, fornece um controle de qualidade eficiente, com relação a não alteração das dimensões moleculares do produto marcado.

Os valores médios relativos ao rendimento percentual de marcação e concentração ideal de Ac específico para produzir uma ligação de 30% do antígeno marcado, de preparações de HCH heterogêneo e Ih-B, foram analisados comparativamente. Os valores, referentes a estes dois parâmetros, relativos a preparações de HCH heterogêneo, foram obtidos por meio da junção dos dados das tabelas X e XII. Esta junção foi possível, uma vez que os valores médios, obtidos em cada caso, não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de significância. Obtiveram-se, número de ensaios, N, igual a 23, rendimento percentual de marcação igual a $26,4 \pm 13,45$ e concentração ideal de Ac ($\times 10^{-3}$) igual a $0,30 \pm 0,139$. Os dados relativos à preparação de Ih-B foram os calculados na tabela XI. Obteve-se para rendimento percentual de marcação o valor de $26,8 \pm 1,0$; com N igual a 3. Para concentração

ENSAIO	RADIOATI- VIDADE (μCi)	V_{ER} ($V_{\text{E}}/V_{\text{O}}$)	RENDI- MENTO (%)	ATIV. ESPEC. ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	CONC. IDEAL $\text{Ac} \times 10^{-3}$ (%)	LIGAÇÃO INESPEC. (%)
1	462,5	2,11	25,7	25,4	0,08	7,2
2	570,0	2,09	23,5	31,1	0,18	6,3
3	554,2	2,06	19,5	22,5	0,16	8,7
4	883,0	2,15	18,3	32,3	0,31	13,8
5	706,2	2,14	23,3	40,7	0,19	6,3
6	616,0	2,03	18,8	25,4	0,48	9,5
7	704,7	2,19	23,6	35,9	0,33	10,4
8	697,7	1,91	15,1	22,6	0,53	9,3
9	1064,5	1,95	31,9	67,9	0,33	8,2
10	660,8	1,84	24,2	37,3	0,38	11,2
11	546,6	1,85	30,1	35,4	0,42	12,0
12	777,6	2,00	19,5	35,6	0,41	10,4
13	648,9	2,10	18,2	24,9	0,42	7,9
14	859,5	2,35	16,5	32,1	0,16	8,8
15	678,8	2,17	11,5	20,6	0,42	7,0
16	984,3	2,07	19,2	48,4	0,11	6,1
média	713,5	2,06	21,2	33,6	0,36	8,9
S	164,4	0,13	5,3	11,8	0,13	2,2
N	16	16	16	16	16	16

Tabela X - Levantamento ao longo de dois anos, dos dados de marcação e ligação ao anticorpo específico, da preparação HCH-29P (HCH-IPEN), pobre em I^h-B.

ENSAIO	RADIOATI- VIDADE (μCi)	V_{ER} ($V_{\text{E}}/V_{\text{O}}$)	RENDI- MENTO (%)	ATIV. ESPEC. ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	CONC. IDEAL $\text{Ac} \times 10^{-3}$ (%)	LIGAÇÃO INESPEC. (%)
1	713,7	2,27	27,3	42,9	0,23	11,4
2	661,3	2,19	27,5	39,8	—	—
3	792,5	2,15	25,7	45,0	0,19	12,1
Média	722,5	2,20	26,8	42,6	0,21	11,7
S	66,0	0,06	1,0	2,6	0,03	0,5
N	3	3	3	3	2	2

Tabela XI - Dados relativos à marcação e ligação ao anticorpo específico, da preparação de Ih-B, purificada neste trabalho.

ENSAIO	RADIOATI- VIDADE (μCi)	V_{ER} ($V_{\text{E}}/V_{\text{O}}$)	RENDI- MENTO (%)	ATIV. ESPEC. ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	CONC. IDEAL $\text{Ac} \times 10^{-3}$ (%)	LIGAÇÃO INESPEC. (%)
1	583,7	2,16	69,9	83,6	0,27	7,0
2	710,7	2,11	59,5	86,3	0,20	13,3
3	639,0	2,07	33,4	45,9	0,24	9,5
4	698,0	2,09	29,9	58,4	0,19	8,0
5	685,8	2,05	30,9	45,7	0,21	6,2
6	879,8	2,23	24,3	42,8	0,23	12,8
7	798,2	2,03	19,5	36,1	0,59	7,9
Média	713,6	2,10	38,2	57,0	0,28	9,2
S	98,5	0,07	18,9	20,2	0,14	2,8
N	7	7	7	7	7	7

Tabela XII - Dados referentes à técnica de marcação e ligação ao anticorpo específico, de preparações com teor alto de Ih-B: ICH-I'PEN (ICH-39P) e ICH-NIAMDD.

ideal de Ac ($\times 10^{-3}$), o valor obtido foi $0,21 \pm 0,03$; com N igual a 2.

Na análise comparativa do rendimento percentual de marcação, entre preparações heterogêneas de HCH e o Ih-B, aplicou-se o teste de t de "Student", para dados heterocedásticos, verificando-se que o Ih-B comportou-se equivalente às preparações heterogêneas, não havendo diferença significativa entre as duas médias, no nível de significância de 5%, embora as variâncias fossem muito diferentes nos dois casos. No que se refere à concentração ideal de Ac, aplicou-se o teste t de "Student", para dados homocedásticos. Verificou-se que os valores médios obtidos para os dois tipos de preparações não apresentaram diferença significativa, no nível de significância citado acima. Isto indica que, para se obter a mesma ligação percentual do antígeno marcado (30%) ao anticorpo específico, as preparações heterogêneas exigem concentração de Ac, no meio de reação, equivalente à preparação homogênea de Ih-B, o que demonstra, sem dúvida, que o Ih-B purificado mantém sua capacidade de reconhecimento do Ac específico, ou seja, mantém sua atividade imunológica.

A tabela XIII mostra os resultados de três séries de marcações (A, B e C) de preparações de HCH com teores diferentes de Ih-B, analisando-se o seu comportamento na reação de marcação e ligação ao Ac específico. Cada série de marcação foi realizada com o mesmo lote de radioiodo, mesma coluna de purificação e em dias consecutivos. As preparações de HCH-IPEN aqui empregadas foram o HCH-2ºP, pobre em Ih-B, em todas as séries. HCH, lote 24, nas séries A e B e HCH-3ºP, na série C, ricos em Ih-B. O Ih-B puro foi o obtido neste trabalho.

Os parâmetros relativos à técnica de marcação, por exemplo, radioatividade usada e V_{ER} estão no mesmo intervalo já comentados para as tabelas X, XI e XII. Quanto ao rendimento, comparando-se o valor obtido para o Ih-B puro ($26,8 \pm 1,0$) em relação a preparações ricas em Ih-B ($24,9 \pm 5,7$), por meio de teste t de "Student", com $p=0,05$, a diferença não

SÉRIE DE MARCAÇÃO	PREPARAÇÃO DE HCH	RADIOATIVIDADE (μCi)	V_{ER} (V_{E}/V_0)	RENDIMENTO (%)	ATIV. ESPEC. ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	CONC. IDEAL $\text{Ac} \times 10^{-3}$ (%)
A	pobre Ih-B	859,5	2,35	16,3	32,1	0,16
	rico Ih-B	879,8	2,23	24,3	42,8	0,21
	Ih-B puro	713,7	2,27	27,3	42,9	0,23
B	pobre Ih-B	678,8	2,17	11,5	20,6	0,42
	rico Ih-B	685,8	2,05	30,9	45,7	0,21
	Ih-B puro	661,3	2,19	27,5	39,8	—
C	pobre Ih-B	984,3	2,07	19,2	48,4	0,22
	rico Ih-B	798,2	2,03	19,5	36,1	0,59
	Ih-B puro	792,5	2,15	25,7	45,0	0,19
Média \pm S	pobre Ih-B	840,9 \pm 153,6	2,20 \pm 0,142	15,7 \pm 3,9	33,7 \pm 14,0	0,26 \pm 0,136
	rico Ih-B	787,9 \pm 97,4	2,10 \pm 0,110	24,9 \pm 5,7	41,5 \pm 4,9	0,34 \pm 0,219
	Ih-B puro	722,5 \pm 66,04	2,20 \pm 0,061	26,8 \pm 1,0	42,6 \pm 2,6	0,21 \pm 0,03

Tabela XIII - Análise do comportamento, na reação de marcação e ligação ao anticorpo específico, de preparações com teores diferentes de Ih-B.

foi significativa. Comparando-se o valor obtido para o Ih-B puro à preparação pobre em Ih-B ($15,7 \pm 3,9$) no mesmo tipo de teste, verificou-se que o rendimento percentual médio é significativamente maior para a preparação homogênea (Ih-B).

Na tabela XIII os valores médios obtidos para a concentração ideal de Ac ($\times 10^{-3}$), confirmam os dados já comentados anteriormente para as tabelas X, XI e XII. O Ih-B exige concentração equivalente à necessária para a preparação heterogênea rica em Ih-B, porém, apresenta diferença significativa, em relação a preparação pobre em Ih-B. Estes dados foram analisados por meio do teste t de "Student" para dados homocedásticos.

A tabela XIV apresenta os resultados da análise da ligação percentual, do hormônio marcado, ao anticorpo específico em diluição fixa de 1 : 200.000, empregando-se Ac-IPEN e Ac-NIAMDD. Os antígenos marcados analisados foram os obtidos nas séries de marcação A e C. Após incubação, as frações B e F foram separadas por meio de EGPA com 7% de acrilamida (42), que, como é sabido, proporciona resultados de maior confiabilidade que a separação por meio de PEG. A diferença não significativa entre a ligação percentual média, obtida para as três preparações, confirma a preservação da atividade imunológica do Ih-B.

A figura 26 mostra as curvas de diluição ótima do anticorpo específico, anti-HCH. Empregaram-se duas preparações de Ac, Ac-IPEN e Ac-NIAMDD. Os hormônios marcados utilizados foram o Ih-B (^{125}I -Ih-B) e outra preparação heterogênea (^{125}I -HCH 29P). As curvas foram construídas em gráfico semi-logarítmico, registrando-se na ordenada o parâmetro $B/B_0 \times 100$ e na abscissa a diluição do Ac (V:V). Por meio destes dados, obtidos num intra-ensaio, observa-se que o Ih-B marcado apresenta capacidade de ligação, ao Ac-IPEN, da mesma ordem daquela apresentada pela preparação heterogênea, confirmando os dados apresentados anteriormente. Entretanto, em relação ao Ac-NIAMDD, o Ih-B apresentou, neste caso, uma ligação levemente inferior à apresentada pela preparação heterogênea.

SÉRIE DE MARCAÇÃO	ANTICORPO	LIGAÇÃO (%) DAS PREPARAÇÕES DE HCH- ¹²⁵ I		
		POBRE EM Ih-B	RICA EM Ih-B	Ih-B PURO
A	IPEN	57,1	50,1	52,7
	NIAMDD	62,1	56,4	54,0
C	IPEN	50,9	36,2	69,2
Média		56,7	47,6	58,6
S		5,6	10,3	9,2
N		3	3	3

TABELA XIV - Análise da ligação ao anticorpo específico, em diluição de 1:200.000, das preparações de HCH com teores diferentes de Ih-B. Separação das frações B e F por meio de EGPA com 7% de acrilamida.

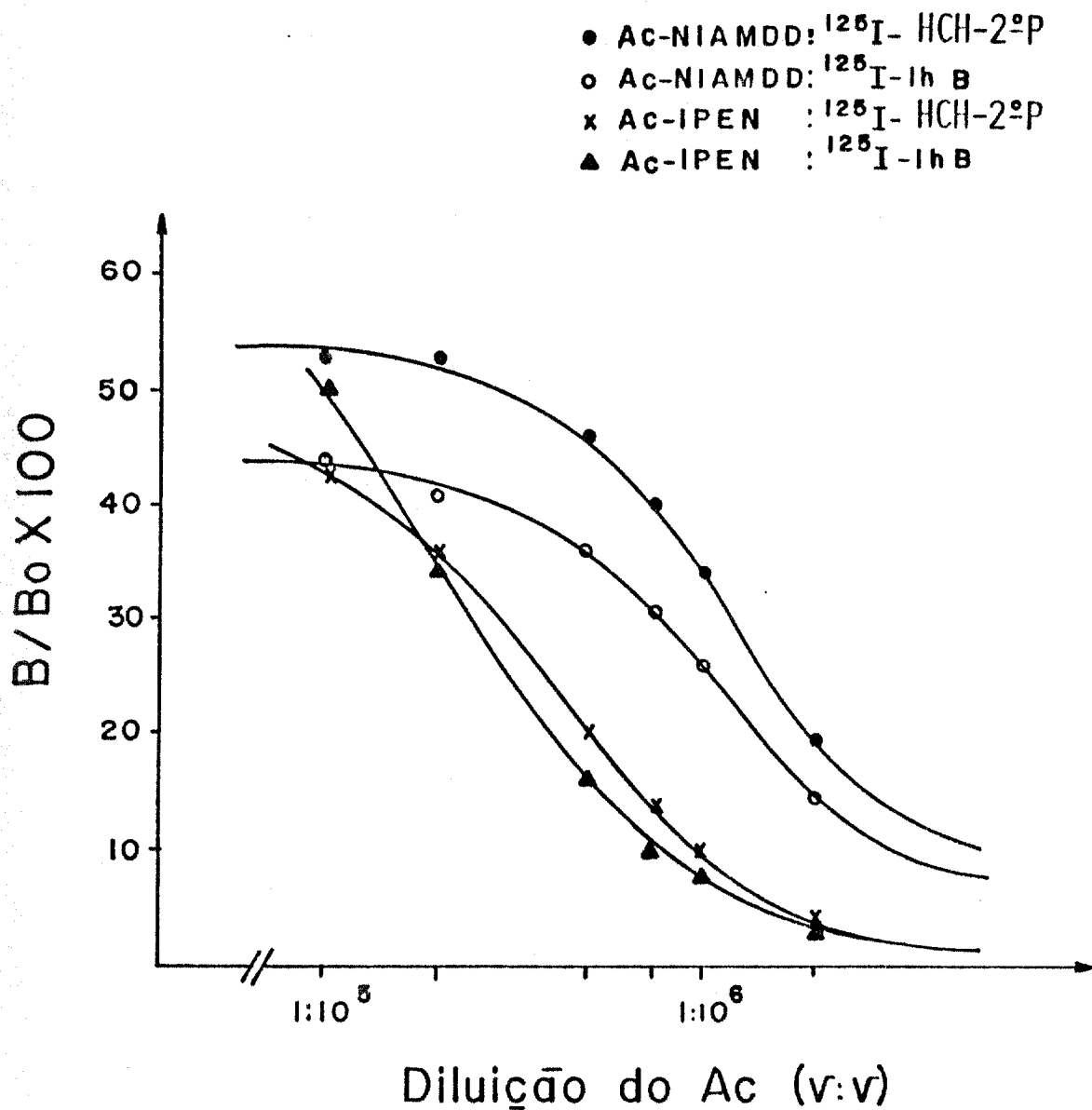


FIGURA 26 - Curvas de diluição ótima do Ih-B puro marcado em comparação ao HCH heterogêneo, empregando duas preparações de Ac.

3.4.3 RIE

A figura 27 mostra um exemplo de curvas de RIE, empregando-se como antígeno marcado a preparação HCH-3^oP e o Ac-IPEN, na diluição fixa de 1 : 200.000. Como padrões secundários empregaram-se o Ih-B e o HCH-2^oP, determinando-se a potência imunológica do primeiro em relação a este último. As curvas de RIE foram construídas em escala semi-logarítmica, registrando-se na ordenada a razão $B/B_0 \times 100$ e na abscissa a concentração do hormônio não marcado, em ng/ml, e mostram a possibilidade de utilização do Ih-B como padrão secundário, sendo sua potência imunológica definida, a seguir, na tabela XV.

Na figura 28 é apresentada a utilização do Ih-B marcado, em comparação a uma preparação análoga de HCH-3^oP, ambos sendo deslocados pela preparação não marcada de Ih-B.

A tabela XV apresenta dados relativos ao uso do Ih-B puro no RIE. Empregaram-se aqui três preparações de HCH marcado, com teores diferentes de Ih-B, utilizando para cada marcado o Ih-B e a preparação HCH-2^oP, como padrões secundários. A tabela apresenta os resultados do cálculo da potência imunológica relativa do Ih-B, em confronto à potência do HCH-2^oP. Dados anteriores obtidos neste laboratório (3) indicam uma atividade imunológica, para o HCH-2^oP; de 7,28 UI/mg; em relação ao padrão internacional 66/217, fornecido pela World Health Organization (WHO). Na quarta coluna da tabela XV calcula-se, assim, para o Ih-B uma potência relativa de $0,64 \pm 0,12$; com CV de 18,8%; correspondente à atividade imunológica de 4,66 UI/mg, para o Ih-B purificado.

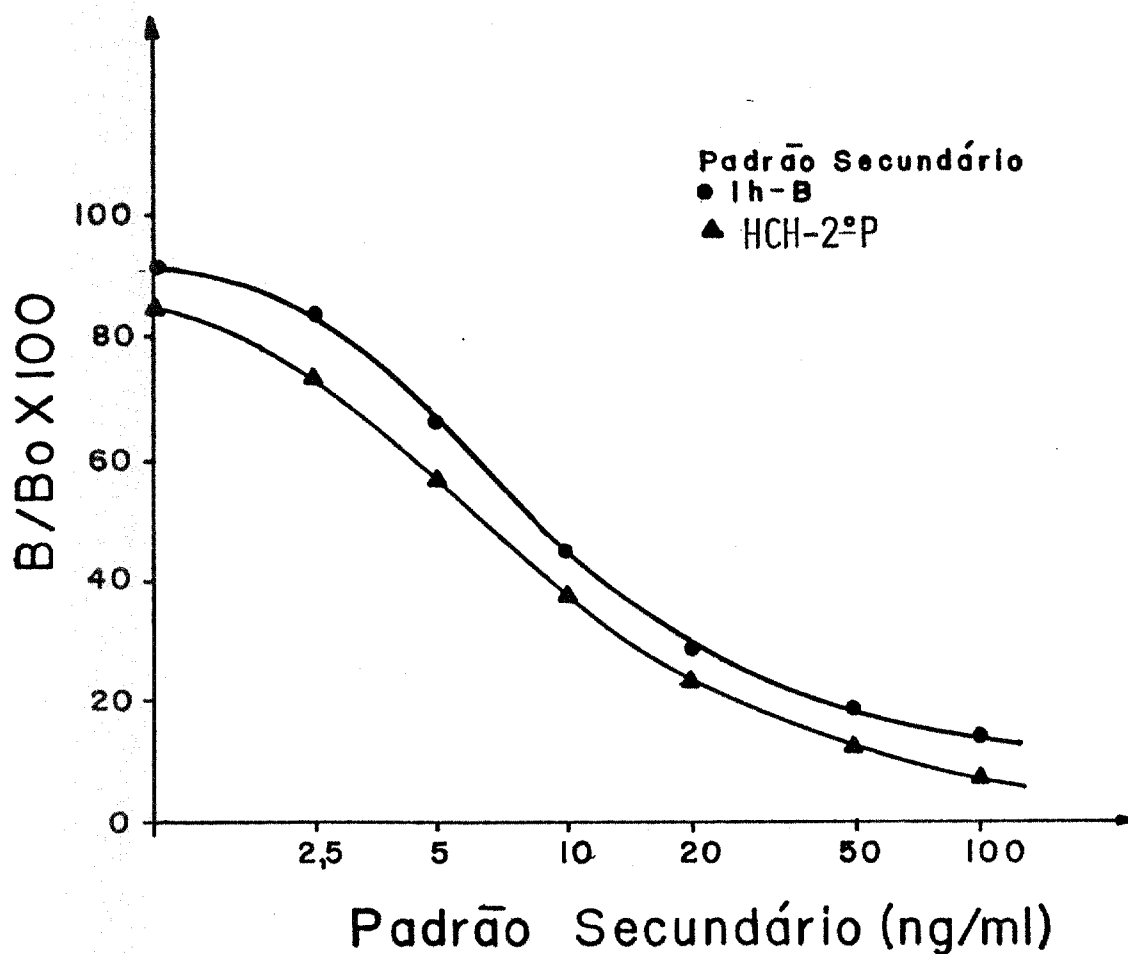


FIGURA 27 - Curvas de RIE, empregando o mesmo ^{125}I -HCH 3°P e como padrões secundários, o Ih-B e o HCH-2°P.

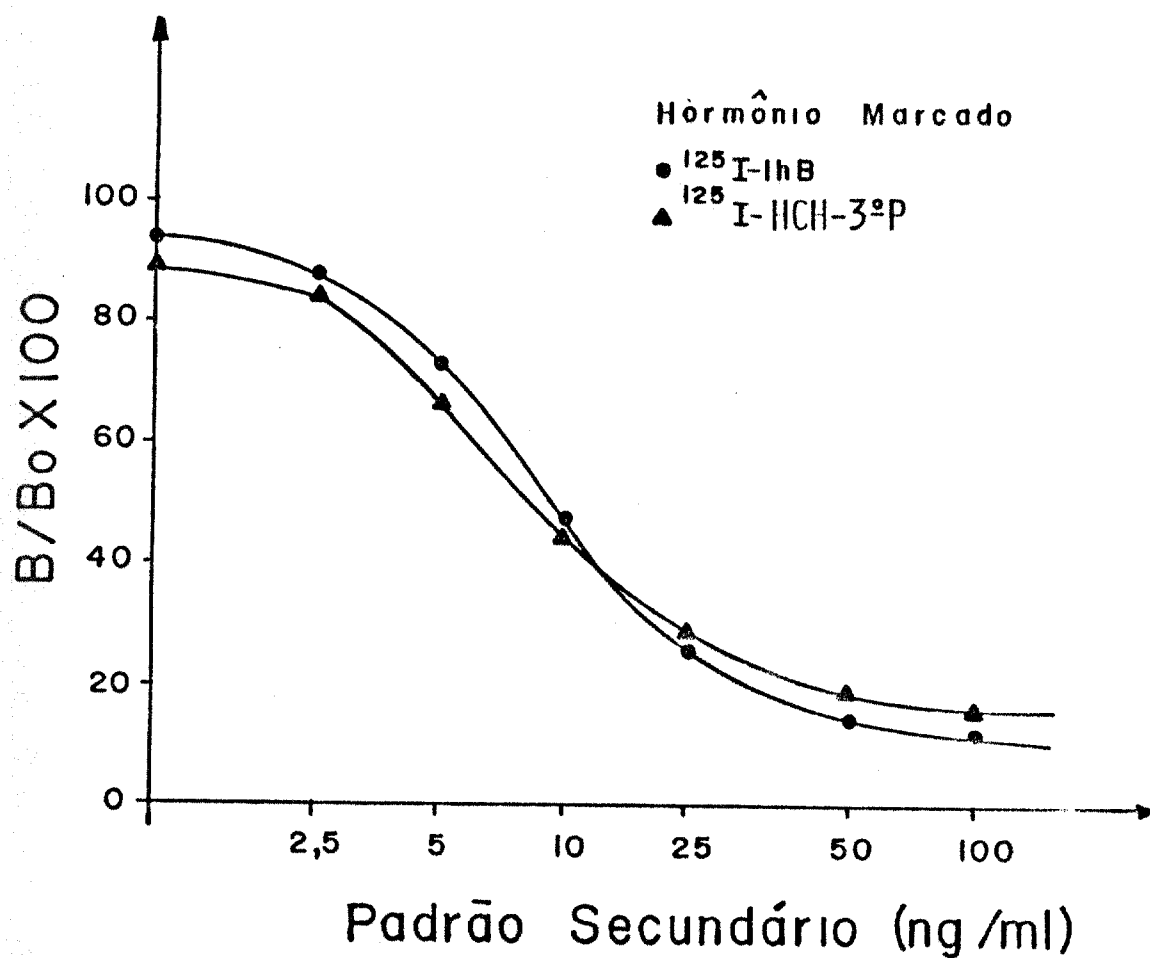


FIGURA 28 - Curvas de RIE empregando o mesmo padrão secundário, Ih-B, e utilizando o $^{125}\text{I-Ih B}$ e o $^{125}\text{I-HCH 3}^\circ\text{P}$.

^{125}I -HCH NO RIE	HCH SECUNDÁRIO	ED ₅₀	POTÊNCIA RELATIVA
^{125}I -Ih B	Ih-B	21,5	0,56
	HCH-2ºP	12,0	
^{125}I -HCH 2ºP	Ih-B	8,2	0,78
	HCH-2ºP	6,4	
^{125}I -HCH 3ºP	Ih-B	8,6	0,58
	HCH-2ºP	5,8	
POTÊNCIA RELATIVA MÉDIA			0,64
S			0,12
N			3

TABELA XV - Radioimunoensaio do Ih-B: determinação da potência imunológica.

4. DISCUSSAO

O uso da leitura densitométrica direta, na região UV, aplicada aos géis de poliacrilamida, possibilitou a determinação quantitativa e a identificação qualitativa, rápida, não-destrutiva, das formas iso-hormonais do HCH.

No sentido qualitativo foram estabelecidos critérios de identificação que, além de simplificar o procedimento de análise e diminuir o tempo operacional, possibilitou a passagem do método analítico para o preparativo. Na determinação da migração relativa, R_m , avaliou-se a precisão intra- e interensaio (tabelas I e II), obtendo-se coeficientes de variação em torno de 1 a 2% para o intra-ensaio e de 2% para o interensaio, níveis muito satisfatórios para os fins aqui propostos. O uso da M-SAB como proteína de referência interna proporcionou o controle das condições ideais de resolução dos Ihs, no gel. Ao se definir a relação numérica entre a R_m do Ih-B e a R_m da M-SAB, razão K, obtida estatisticamente para N igual a 32 ensaios, calculou-se um parâmetro de comparação que assegura a confiabilidade da identificação qualitativa, além de possibilitar a comparação interensaio de dados obtidos em EGPA com 7% de acrilamida, em ocasiões ou condições de pH diferentes, possibilitando a sua aplicação em comparações interlaboratoriais. A obtenção da R_m do Ih-B corrigida por intermédio da R_m da M-SAB (tabela III), com o uso da razão K, eliminou as flutuações interensaio, além de fornecer ao método de análise um controle rigoroso das condições de ensaio.

Os valores médios obtidos para a razão K, relativa ao Ih-B de preparações de HCH-IPEN (ítem 3.1.3) e de HCH-NIAMDD (tabela IV) não demonstraram diferença significativa, ao nível de 5% de significância, o que indica que a forma iso-hormonal aqui analisada como Ih-B é a reconhecida internacionalmente como tal. A razão K assegura à técnica a confiabilidade exigida, visto que ela é mantida mesmo quando as condições físico-químicas da matriz são significativamente modifi cadas, conforme os resultados da tabela III.

No campo quantitativo, esta técnica densitométrica permitiu a determinação protéica, de maneira rápida e específica, fornecendo uma resposta relacionada somente com o teor da proteína de interesse e independente de erros sistemáticos originados da aplicação de técnicas de precipitação ou coloração a diferentes proteínas no gel.

A exatidão da determinação quantitativa, que pôde ser avaliada na determinação de várias quantidades pesadas de HCH, por extrapolação na reta de concentração construída com SAB, também mostrou-se plenamente satisfatória. Obteve-se uma curva padrão média, com linearidade no intervalo de 5 até 100 μ g (figura 16).

A reta padrão de quantificação protéica (figura 16), aqui obtida, com os valores médios para a SAB, mostrou-se válida para o HCH-IPEN e HCH-NIAMDD, dados que confirmam os valores de coeficientes de extinção, calculados por densitometria (tabela V), que indicam que a SAB e o HCH-IPEN, na região de 220 a 310nm, têm o mesmo nível de absorvância. Os valores apresentados na tabela V para $E_{280,1\text{cm}}^{0,1\%}$ relativos à SAB e ao HCH, citados pelos diferentes autores, são muito variáveis, revelando as divergências existentes quanto à definição de um valor exato para esse parâmetro. Os valores obtidos aqui, para SAB (0,835) e HCH (0,970) estão no intervalo definido pelos diferentes dados da literatura, como se observa na tabela V.

A única desvantagem da técnica de determinação quantitativa por densitometria direta é a impossibilidade de se alcançar uma alta precisão para quantidades inferiores a 10 μ g. No entanto, vale a pena lembrar que, teoricamente, a sensibilidade do método (tabela VIII) com QMD igual a 1,5 μ g \pm 0,8 é aceitável, se comparada aos métodos clássicos de determinação protéica, como por exemplo o método de LOWRY (70) e de EHRESMANN (34), os quais, conhecidamente, não dão qualquer informação qualitativa.

Na prática, a quantidade mínima que se determinou foi de 5µg, sendo considerada inaceitável a precisão obtida para quantidade de proteína inferior. Havendo disponibilidade de material, o intervalo ideal para quantificação é de 25 a 75µg de proteína por gel.

Na literatura a maioria dos trabalhos relativos à técnica densitométrica, empregam a leitura dos géis pós-coloração (24,83) e poucos empregam a leitura dos géis sem coloração a 280nm (33, 43, 105), em espectrofotometria. Considere-se, portanto, neste trabalho, o aspecto original da aplicação densitométrica não-destrutiva à proteínas ativas biologicamente.

Uma vez que as condições de resolução ideal, para o fracionamento dos Ihs do HCH em EGPA, foram propriamente de finidas e otimizadas, a passagem do método analítico para a escala preparativa envolveu a mudança da quantidade de proteína aplicada, diâmetro da matriz, intensidade de corrente e introdução da técnica de eluição da banda iso-hormonal de interesse. Isto permitiu a padronização de um método de purificação de Ihs protéicos empregando a EGPA associada à densitometria direta em luz UV, técnica simples, rápida, flexível e que utilizou, principalmente, instrumentação de custo pequeno, usada amplamente na rotina clássica de um laboratório bioquímico. Com relação aos outros métodos de purificação dos Ihs do HCH, existentes na literatura (9, 63, 67, 92, 110), alguns já citados na introdução deste trabalho, podemos afirmar que este é o único que permitiu a obtenção imediata do Ih puro, sem a presença significativa de acrilatos ou outros contaminantes derivados dos reagentes de eletroforese, utilizando uma única técnica de separação e, consequentemente um processamento tão rápido (aproximadamente oito horas).

A eliminação dos acrilatos só foi possível após a substituição da eluição por difusão simples pela eletroforese reversa modificada. Na ER, o segmento contendo a banda iso-hormonal de interesse foi introduzido no interior de uma

membrana de diálise, evitando-se, a contaminação por macromoléculas, de eliminação posterior difícil. Assim, os possíveis acrilatos oriundos do procedimento de coleta, possuindo dimensões moleculares da ordem dos poros da membrana foram eliminados na diálise subsequente (operação 7, da figura 8), assegurando a pureza da forma iso-hormonal.

Diferentemente de alguns dos trabalhos mais conhecidos nessa área e que somente podem utilizar grandes quantidades de material (63, 67, 92, 110), o método padronizado permite também o processamento de quantidades mínimas de proteínas (da ordem de 30-50 μ g), chegando até a níveis de 5 a 10mg por gel. Na prática, isto cobre toda a escala preparativa de interesse laboratorial, relativa a proteínas hormonais.

A técnica de EGPAp foi empregada na obtenção de duas formas isoméricas, eletroforeticamente homogêneas, a M-SAB (figura 17-a) e o Ih-B (figura 19-a). A primeira é isômero de massa, a qual apresenta em EGPA a 7% migração eletroforética muito distinta, originando banda protéica com resolução realmente satisfatória (figura 15-b). O segundo é isômero de carga, apresentando migração eletroforética muito próxima dos outros Ihs da preparação heterogênea (figura 18). Como se pode observar, a flexibilidade da técnica possibilitou a sua aplicação à proteínas com quaisquer níveis de mobilidade eletroforética, isômeros de massa ou carga. A resolução pode, ainda, ser adequada à qualquer proteína de interesse, por intermédio de mudanças nas condições de eletroforese, explorando as suas características inerentes (figuras 13 e 14).

O controle da qualidade do Ih-B e M-SAB obtidos por meio de eletroforese analítica (figura 17 e 19) demonstrou que as migrações relativas foram mantidas, indicando claramente que o método padronizado mantém inalteradas as propriedades físico-químicas fundamentais da molécula, que determinam sua mobilidade eletroforética.

A preparação de Ih-B aqui obtida mostrou grau de homogeneidade eletroforética maior, quando em confronto analíti

co ao HCH-NIAMDD, o qual é declarado como sendo essencialmente Ih-B (figura 20), obtendo-se, para as duas preparações, valores de K iguais aos definidos estatisticamente neste trabalho para o Ih-B. Estes dados asseguram que o poder de resolução do método preparativo atendeu plenamente aos fins propostos inicialmente.

O processo de obtenção e estocagem do Ih-B, obtido de preparações heterogêneas de HCH-IPEN, nos levou à solução de problemas práticos de importância considerável para manter um produto realmente inalterado, como por exemplo, as condições de diálise, liofilização e ampolização do produto final. Em trabalhos anteriores (2, 3, 50, 61, 62) já se observou o risco alto de alterações, especialmente devidas à agregação molecular, relacionadas com os processos de diálise e liofilização. Por esta razão, após avaliação de várias análises em pequena escala, resolveu-se diminuir o tempo da última diálise (operação 7, figura 8) para um máximo de 12 horas, empregando solução de bicarbonato de sódio 0,01M. Assim, também o uso de condições de liofilização menos drásticas, incluindo pré-congelamento lento, vácuo de 0,1 torr e temperatura de secagem primária inferior a 10°C, somado à presença de glicina em alta quantidade (1:25), possibilitou a ampolização, em atmosfera de N₂, de várias frações de Ih-B, em quantidade de 160 µg/ampola, em forma comprovadamente inalterada. Estas ampolas foram e deverão ser abertas na ocasião de sua utilização para fins de marcação, construção de curva padrão ou outro tipo de estudo, em que seja necessária a utilização de uma preparação fundamental, homogênea, de HCH. Em trabalho anterior (5) comprovou-se a não interferência de quantidade alta de glicina, na reação de marcação do HCH, com ¹²⁵I.

A recuperação percentual total da referida técnica preparativa, em torno de 72%, mesmo sendo próxima das apresentadas por alguns autores (9, 80, 54) não pode ser considerada satisfatória totalmente. Isto deveu-se também ao fato de que neste trabalho deu-se mais ênfase à pureza e inalterabilidade

de do produto obtido e não tanto ao rendimento da técnica de purificação. No entanto, trabalha-se atualmente na direção de alcançar um resultado aceitável plenamente também neste aspecto. Embora a coloração do segmento do gel, após a eluição, ter mostrado a ausência de proteína residual no interior do gel e ter acusado a presença de proteína na superfície externa da matriz, sabe-se que a recuperação de proteína em EGPAp é dependente do pH empregado no tampão de corrida (54), sendo maior a retenção de proteína na matriz em pH 7,8 que em 10,2 por exemplo. A retenção percentual de proteína na matriz é inversamente proporcional à quantidade aplicada na amostra, ou seja, quanto menor é a quantidade de proteína processada, maior é a perda (54). Em EGPAp a recuperação geralmente obtida, está no intervalo de 50 a 70% (54), podendo ocorrer perdas durante a fase de coleta e operações posteriores do eluato, além de adsorção protéica na superfície do gel.

Outra meta deste trabalho foi a avaliação do efeito não-destrutivo do método preparativo padronizado, analisando se a inalterabilidade das atividades imunobiológicas do produto hormonal assim purificado. Obviamente, isto se constitui como um objetivo de importância primária, considerando-se, especialmente, a utilização que a forma iso-hormonal radioiodada deverá ter no RIE e também em estudos biológicos e metabólicos "in vivo" e "in vitro".

Para a avaliação da atividade somatotrófica do HCH, obtido após todos os estágios do processamento preparativo, empregou-se o ensaio por incremento de peso corpóreo total, em ratos hipofisectomizados. Conforme já citado no item 3.3.2 e visualizado na figura 23, o índice de precisão (λ) obtido, que identifica a qualidade do ensaio ($\lambda=0,100$), foi menor do que os valores encontrados, frequentemente na literatura (4, 98, 99, 101, 108), para este parâmetro, que estão na faixa de 0,4 a 0,5; para este tipo de bioensaio. Valores de λ inferiores ou iguais a 0,3 (98) indicam um nível de precisão rigorosamente aceitável. O valor aqui obtido; $\lambda=0,100$; indicou uma qualidade de ensaio definitivamente

te ótima, uma vez que, com essa qualidade de ensaio, seriam percebidas diferenças relativamente pequenas na ação somatotrôfica das preparações de HCH de referência e HCH submetido à ER.

Os limites de confiança determinaram intervalos suficientemente estreitos (0,80 a 1,08) e a inclinação combinada da curva dose-resposta (11,54), mesmo usando-se doses baixas, é da mesma ordem dos valores relatados por outros autores (72, 102, 108). Pelos testes de significância confirmou-se como significativa a diferença entre doses e obteve-se a inexistência de qualquer desvio significativo do paralelismo entre as curvas de ganho de peso, relativas à preparação "antes" e "depois" do processamento. Sabe-se de fato que um desvio significativo do paralelismo, além de poder ter outras origens, pode ser devido à ocorrência de alterações estruturais na molécula, que mesmo sem afetar a ação biológica completamente (13), podem indicar que o produto está danificado, além de, obviamente, produzir um ensaio inválido. Portanto, estes dados confirmam a ausência de alterações qualitativas possíveis, ocorrentes eventualmente durante o processamento preparativo, que podem influir no mecanismo de ação biológica "in vivo".

Concluiu-se, assim, num ensaio perfeitamente válido, que a diferença entre as preparações não é significativa, ou seja, a preparação de HCH submetida à ER mantém significativamente inalterada a sua ação somatotrôfica "in vivo".

Esse tipo de controle, referente aos efeitos produzidos na molécula, pelas técnicas de purificação dos Ihs é muito importante, pois conforme mencionou-se no capítulo 1 deste trabalho, há relatos na literatura (87, 103) que mencionam a ocorrência de alteração parcial na bioatividade de extratos hormonais hipofisários, após a purificação em EGPA. Nas técnicas citadas para a obtenção dos Ihs do HCH (9, 63, 67, 92, 110), geralmente não há a preocupação com esta possibilidade e não temos conhecimento de outro trabalho da literatura, no qual esta análise da preservação da atividade bio

lógica tenha sido realizada.

Considerando-se que a principal aplicação do produto iso-hormonal purificado será na preparação de reagentes para RIE analisou-se o seu uso como produto marcado com ^{125}I e como padrão secundário.

Na reação de radioiodação, a qualidade do ^{125}I -Ih B foi analisada quanto ao rendimento de marcação (%), atividade específica e volume de eluição relativo (V_{ER}), em comparação à preparações heterogêneas de ^{125}I -HCH. Por meio da análise do cromatograma de purificação do produto marcado, em Sephadex G-100, foi possível avaliar a presença de produto agregado, de outros compostos marcados interferentes e possíveis alterações no raio molecular do produto monomérico, que está relacionado com o V_{ER} (figura 25).

O valor de V_{ER} obtido para o ^{125}I -Ih B (tabela XI) e os obtidos para preparações heterogêneas (tabela X e XII) apresentam concordância entre si e foram equivalentes aos encontrados na literatura para o HCH monomérico não marcado (68, 69), indicando que o Ih-B radioiodado, aqui obtido, mantém o seu raio molecular inalterado. Sabe-se que os vários Ihs do HCH podem ter estruturas terciárias diferentes e certamente têm carga elétrica (27, 110) e ponto isoelétrico distintos (94), fatores que podem influir no impedimento estérico dos oito resíduos de tirosina, na reação de radioiodação. Sabe-se também que o raio molecular altera-se facilmente, devido à mudanças de pH ou força iônica, reações de oxidação e redução ou pela introdução de vários grupos na molécula (3). Sendo o raio molecular diretamente relacionado à estrutura terciária e, portanto, ao mecanismo de ação biológica e imunológica do hormônio, foi muito importante obter uma preparação de Ih-B radioiodada que não apresentasse alterações significativas neste parâmetro.

Quanto ao rendimento percentual na reação de marcação, a preparação de Ih-B mostrou comportamento equivalente ao das preparações heterogêneas, conforme indicado no item 3-4-2. As marcações de HCH heterogêneo citadas, neste caso,

foram as obtidas na rotina de dois anos de marcação neste laboratório, tendo teores variáveis de Ih-B (10% ou 60-70%). Quando o rendimento percentual foi comparado em séries consecutivas de marcação (tabela XIII), o comportamento do Ih-B não mostrou diferença significativa em relação às preparações de HCH com teor alto de Ih-B, porém, o rendimento do Ih-B foi significativamente maior em relação à preparação pobre em Ih-B. Isto relaciona-se, provavelmente, ao fato de que a preparação de HCH pobre em Ih-B, possui teor maior, de Ih-D e Ih-E, formas que apresentam clivagem molecular além do resíduo 143 (92), possuindo uma tirosina a menos na molécula.

Antes de utilizar o Ih-B marcado, no próprio RIE, avaliou-se o seu comportamento em relação à ligação ao anticorpo específico; anti-HCH (IPEN e NIAMDD), em curvas de titulação (figura 26). No item 3.4.2 citou-se o resultado dos testes de significância estatística do parâmetro concentração ideal ($\times 10^3$) de anticorpo (Ac-IPEN) para produzir 30% de ligação ao antígeno marcado. Não se observou diferença significativa entre o Ih-B e as preparações heterogêneas para os dados obtidos ao longo de dois anos (tabelas X, XI e XII). No entanto, na análise em séries consecutivas de marcações (tabela XIII), o Ih-B apresentou comportamento significativamente equivalente à preparação rica em Ih-B, mostrando diferença significativa em relação à preparação de HCH pobre em Ih-B. A pequena discordância entre os resultados obtidos deveu-se, provavelmente, ao número muito maior e heterogêneo de dados empregados no estudo ao longo do tempo, em relação às marcações em série. Na maior parte dos casos, contudo, para se obter a mesma ligação percentual, o Ih-B marcado exigiu concentração de Ac no meio de reação, equivalente à necessária para as preparações heterogêneas. Este fato indica que o Ih-B purificado, pelo menos, mantém sua atividade imunológica preservada ao nível das preparações heterogêneas de HCH, com capacidade de reconhecer o Ac específico, mantendo, por ele sua afinidade.

Fixando-se a diluição do Ac em 1:200.000, (Ac-IPEN e Ac-NIAMDD) observou-se que o Ih-B marcado (tabela XIV) tem afinidade para Acs diferentes, ao mesmo nível dos marcados

heterogêneos, chegando até a ligações percentuais de mais de 50%. O método empregado para a separação das frações B e F, neste caso, foi a EGPA com 7% de acrilamida (42). Este aspecto de ligação aos Acs diferentes mereceria uma análise mais aprofundada, não somente a fim de se obter mais dados estatísticos, mas também para avaliar todas as variáveis envolvidas no fenômeno. Assim, dever-se-ia considerar, além dos respectivos títulos dos anticorpos em relação aos diferentes antígenos marcados, também as constantes de dissociação (dependentes da avidéz do Ac e da afinidade do antígeno) e capacidade de ligação dos sistemas envolvidos.

O Ih-B confirmou a sua aplicabilidade e adequação, diretamente em curvas de RIE, seja como traçador radioativo ou padrão secundário, para determinação de extratos hormonais, comparando-se as curvas obtidas às outras preparações heterogêneas marcadas (figuras 27 e 28). Nos três sistemas que utilizam preparações de $^{125}\text{I-HCH}$ com teores diferentes de Ih-B (tabela XV), o Ih-B puro confirmou uma atividade imunológica relativa ao HCH-29P; de 0,64. Isto, considerando-se que o HCH-29P tem uma atividade determinada de 7,28UI/mg, corresponde a uma atividade imunológica de 4,66UI/mg. A reprodutibilidade intra-ensaio desta determinação foi aceitável, tendo apresentado um CV de 18,8%, especialmente considerando-se as variáveis relacionadas à utilização de três preparações diferentes de HCH radioiodadas.

Esta primeira comparação entre RIEs, baseados em antígenos marcados com diferente distribuição iso-hormonal, indicou que, pelo menos, quando se utiliza o mesmo anti-soro, não há diferença significativa na atividade determinada num extrato, que também possui distribuição iso-hormonal diferente do padrão. Isto, claramente, não invalida a necessidade de se trabalhar sempre mais, na obtenção de RIEs que utilizem reagentes com maior pureza, homogeneidade e capazes de garantir uniformidade e continuidade laboratorial e interlaboratorial. A meta de continuação deste trabalho poderá ser, por exemplo, a montagem de um sistema de RIE, em que um antígeno puro e homogêneo marcado, sem alterações significativas,

possa ser utilizado, juntamente com um anticorpo monoclonal específico de ampla produção e distribuição. É nossa convicção que, somente assim, poder-se-á obter sistemas radioimunológicos realmente analíticos, plenamente válidos e de alta reprodutibilidade.

O estudo iniciado, graças à disponibilidade do Ih-B marcado, estender-se-á à utilização também de diferentes anticorpos e à determinação de HCH sérico, no nível basal e sob estímulo, cuja validade no uso de sistemas heterogêneos de RIE, ainda não foi confirmada. Este tipo de controle, assim como, a montagem do RIE completo e específico para cada forma iso-hormonal, possivelmente circulante "in vivo", poderão também ser realizadas, como já foi feito num primeiro estudo por LEWIS et al (66, 91), empregando-se o método de purificação de Ihs, aqui padronizado. Esse método, com provadamente, manteve significativamente inalteradas as propriedades físico-químicas fundamentais, ação somatotrófica "in vivo" e atividade imunológica "in vitro" da forma fundamental, iso-hormônio B.

5. CONCLUSÕES

1 - Padronizou-se uma técnica preparativa, para purificação de isômeros protéicos, em EGPA, com eluição dos componentes por meio de eletroforese reversa. Rápida, flexível e não - destrutiva, pode ser empregada para a obtenção de produtos eletroforeticamente homogêneos, em quantidades da ordem de miligramas.

2 - O método densitométrico aplicado na purificação iso-hormonal, com leitura direta dos géis de poliacrilamida na região de luz UV, possibilitou:

a - A padronização de uma técnica analítica qualitativa, para identificação das várias bandas isoméricas na matriz, de alta resolução e precisão intra- e interensaio.

b - A padronização de uma técnica analítica que permite a quantificação exata de qualquer componente protéico purificado, que, além de rápida, apresenta alta precisão intra-ensaio, precisão interensaio satisfatória e sensibilidade comparável à das técnicas convencionais empregadas para este fim.

3 - Alguns miligramas de iso-hormônio B, forma fundamental do HCH, foram obtidos e após estudo das condições de estocagem, foram liofilizados em ampolas, para serem usados sucessivamente na marcação com ^{125}I e como padrão para RIE.

4 - O RIE, baseado na utilização do Ih-B e sua comparação à preparações heterogêneas de HCH, levou-nos a concluir que:

a - O método padronizado, de purificação do Ih-B, não afetou a capacidade de incorporação do iodo na reação de marcação.

b - O ^{125}I -Ih-B apresentou capacidade de ligação ao anticorpo específico, anti-HCH, sendo viável o seu emprego no RIE.

c - O seu uso como padrão secundário nas curvas de RIE e a determinação da sua atividade imunológica, demonstraram que a imunorreatividade da molécula é mantida após submeter-se ao procedimento preparativo padronizado. O Ih-B puro pode, portanto, ser usado como preparação padrão homogênea.

5 - A avaliação do efeito não - destrutivo da referida técnica, com relação à atividade biológica, demonstrou a inalterabilidade significativa da atividade somatotrófica "in vivo" da molécula de HCH. Este tipo de controle do produto obtido não consta na padronização de técnicas análogas descritas na literatura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSIS, L.M.; NICOLAU, W.; HIRATA, I.A.D.; MURAMOTO, E.; PIERONI, R.R.; SHIBATA, H. Estudo do método de preparação do hormônio de crescimento humano pelo fracionamento em sulfato de amônio e gel-filtração em sephadex G-100. Revta. Ass. med. bras., 18(8):299-304, 1972.
2. BALA, R.M.; FERGUSON, K.A.; BECK, J.C. Plasma biological and immunoreactive human growth hormone-like activity. Endocrinology, 87:506-16, 1970.
3. BARTOLINI, P. Efeitos da radioiodação sobre as atividades biológica, imunológica, de ligação a receptores e propriedades físico-químicas do hormônio de crescimento humano. 1984. (Tese de doutoramento, Escola Paulista de Medicina).
4. BARTOLINI, P. & MURAMOTO, E. Bioassay of HGH: Standardization of more economical assay designs. Horm. metabol. Res., 16(11):614-615, 1984.
5. BARTOLINI, P.; ASSIS, L.M.; FONSECA, M.L.Q. Radioiodination of human growth hormone with characterization and minimization of the commonly defined damage products. Clinica chim. Acta, 110(1652):177-185, 1981.
6. BARTOLINI, P.; CAMILLO, M.A.P.; CARVALHO, E.I.; MURAMOTO, E.; SCHWARZ, I. Quality control in the potency determination of hGH extracts: radioimmunoassay and radioreceptorassay with standardized labelling and assay conditions. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium held in Vienna, 21-25 June 1962. Vienna, 1962. p.540-3.

7. BAUMAN JR., J.W. Effect of hypophysectomy on the renal concentrating ability of the rat. Endocrinology, 77: 496-500, 1965.
8. BAUMANN, G. Metabolic Clearance Rates of isohormones of human growth hormone in man. J.clin.Endocr. Metab., 49(4):495-99, 1979.
9. BAUMANN, G. & CHRAMBACH, A. Gram-preparative protein fractionation by isotachophoresis: Isolation of human growth hormone isohormones. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 73(3):732-36, 1976.
10. BAUMANN, C. & MACCART, J. Growth hormone production by human pituitary glands in organ culture: Evidence for predominant secretion of the single-chain 22,000 molecular weight form (Isohormone B). J. clin. Endocr. Metab., 55(4):611-618, 1982.
11. BAUMANN, G. & NISSLEY, S.P. Somatomedin generation in response to activated and non-activated isohormones of human growth hormone. J. clin. Endocr. Metab., 48(2):246-250, 1979.
12. BAUMANN, G.; MACCART, J.G.; AMBURN, K. The molecular nature of circulating growth hormone in normal and acromegalic man: Evidence for a principal and minor monomeric forms. J. clin. Endocr. Metab., 56(5):946-952, 1983.
13. BEWLEY, T.A. & LI, C.H. The chemistry of human pituitary growth hormone. Adv. Enzymol., 42:73-166, 1975.
14. BEWLEY, T.A.; BROVETTO-CRUZ, J.; LI, C.H. Human pituitary growth hormone. Physicochemical investigations of the native and reduced-alkylated protein. Biochemistry, 8(12):4701-4708-1969.
15. BLISS, C.I. The Statistics of bioassays. New York, N. Y. Academic Press, 1952.

16. BODHE, A.M.; DESHPANDE, V.V.; LAKSHMIKANTHAM, B.C.; VARTAK, H.G. Simplified techniques for elution of proteins from polyacrylamide gel, staining, destaining, and isoelectric focusing. Analyt. Biochem., 123: 133-142, 1982.
17. BUNNER, D.L.; LEWIS, U.J.; VANDERLAAN, W.P. Comparative potency of subtilisin-cleaved and intact human growth hormone measured in growth hormone-deficient human subjects. J. clin. Endocr. Metab., 48(2):293-296, 1979.
18. CARR, D. & FRIESEN, H.G. Growth hormone and insulin binding to human liver. J. clin. Endocr. Metab., 42(3):484-493, 1976.
19. CATSIMPOOLAS, N.; GRIFFITH, A.L.; WILLIAMS, J.M.; CHRAMBACH, A.; RODBARD, D. Electrophoresis with continuous scanning densitometry separation of cells in a density gradient. Analyt. Biochem., 69:372-384, 1975.
20. CHAPMAN, G.E.; RENWICK, A.G.C.; LIVESEY, J.H. The isolation of human pituitary hormones from frozen glands. J. clin. Endocr. Metab., 53(5):1008-1013, 1981.
21. CHAPMAN, G.E.; ROGERS, K.M.; BRITTAIN, T.; BRADSHAW, R. A.; BATES, O.J.; TURNER, C.; CARY, P.D.; CRANE-ROBINSON, C. The 20,000 molecular weight variant of human growth hormone. J. biol. Chem., 256(5):2395-2401-1981.
22. CHEEVER, E.V. & LEWIS, U.J. Estimation of the molecular weights of the multiple components of growth hormone and prolactin. Endocrinology, 85:465-473, 1969.
23. CHEN, B.; RODBARD, D.; CHRAMBACH, A. Polyacrylamide gel electrophoresis with optical scanning, using multiphasic buffer systems: The stack. Analyt. Biochem., 89:596-608, 1978.

24. CHRAMBACH, A. & RODBARD, D. Factors affecting resolution, band width, number of theoretical plates, and apparent diffusion coefficients in polyacrylamide gel electrophoresis. Analyt. Biochem., 40:158-173, 1971.
25. CHRAMBACH, A. & RODBARD, D. Polyacrylamide gel electrophoresis. Science, 172:440-451, 1971.
26. CHRAMBACH, A.; REISFELD, R.A.; WYCKOFF, M.; ZACCARI, J. A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. Analyt. Biochem., 20:150-154, 1967.
27. CHRAMBACH, A.; YADLEY, R.A.; BEN-DAVID, M.; RODBARD, D. Isohormones of human growth hormone. I. Characterization by electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel. Endocrinology, 93:848-57, 1973.
28. CRAFTS, R.C. Effects of a high protein diet on the anemia induced by hypophysectomy in adult female rats, including further details on post-hypophysectomy anemia. Endocrinology, 45:159-169, 1949.
29. DAUGHADAY, W.H. The adenohypophysis. In: WILLIAMS, R.H., ed. Textbook of endocrinology. 6. ed. Philadelphia, Pa., Saunders, 1981. p. 73-116.
30. DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., (2):404-427, 1964.
31. DESBUQUOIS, B. & AURBACH, G.D. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. J. clin. Endocr., 33:732-738, 1971.
32. DOMINGUES, E.N.; DALMORA, S.; BARTOLINI, P. Análise computadorizada de bioensaios fatoriais 2x2, para a determinação da potência e dos parâmetros estatísticos relativos de extratos hormonais(BASSY). In: ENDOCRINOLOGIA e metabolismo: 16º congresso brasileiro de..., Canela, RS, 27-31 outubro, 1984, programa tema nº 043. Canela, 1984. p.87.

33. DRAVID, A.R.; FREDÉN, H.; LARSSON, S. A simple spectrophotometric scanning procedure for quantitative estimation of protein in polyacrylamide gels. J. Chromat., 41:53-60, 1969.
34. EHRESMANN, B.; IMBAULT, P.; WELL, J.H. Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. Analyt. Biochem. 54, 454-463, 1973.
35. ELLIS, S.; NUENKE, J.M.; GRINDELAND, R.E. Identity between the growth hormone degrading activity of the pituitary gland and plasmin. Endocrinology, 83:1029-1042, 1968.
36. ETZRODT, H.; MUSH, K.A.; SCHLEYER, M.; PFEIFFER, E.F. Growth hormone radioligand assay unresponsive to human prolactin. J. clin. Endocr. Metabol., 42(6):1184-1187, 1976.
37. EVANS, H.M.; SIMPSON, M.E.; MARX, W.; KIBRICK, E. Bioassay of the pituitary growth hormone. Width of the proximal epiphyseal cartilage of the tibia in hypophysectomized rats. Endocrinology, 32:13-16, 1943.
38. EWING, G.W. Instrumental methods of chemical analysis. 2. ed. New York, N.Y., McGraw-Hill, 1960. p. 15-74.
39. FAGIN, K.D.; LACKEY, S.L.; REAGAN, C.R.; DIGIROLAMO, M. Specific binding of growth hormone by rat adipocytes. Endocrinology, 107(2):608-615, 1980.
40. FAIN, J.N. & SCOW, R.O. Effect of hypophysectomy on lipid metabolism in pancreatectomized rats. Endocrinology, 77:547-552, 1965.
41. FARRIS, E.J. & GRIFFITH JR., J. Q., ed. The rat in laboratory investigation. Philadelphia, Pa., Lippincott, 1949. p.27.

42. FONSECA, M.L.C.Q. Estudo sobre os processos de danificação e a estabilidade de duas preparações de hormônio de crescimento humano marcado com ¹²⁵I. IPEN, 1978. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) (IEA-DT-092).
43. FRIES, E. & HJERTÉN, S. Scanning of polyacrylamide gel electrophoresis columns of unstained protein zones and for their localization relative to enzyme activities. Analyt. Biochem., 64:467-476, 1975.
44. FRIGERI, L.G.; PETERSON, S.M.; LEWIS, U.J. The 20.000-dalton structural variant of human growth hormone: lack of some early insulin-like effects. Biochem. biophys. Res. Commun., 91(3):778-782, 1979.
45. GODOY, A.J.; CARVALHO, E.I.; BARTOLINI, P. A simple technique for isohormone detection and extraction by UV densitometry on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Archos. Biol. Tecnol., 25(1):170, 1982.
46. GOLDSMITH, S.J. Radioimmunoassay: Review of basic principles. Semin. nucl. Med., 5(2):125-152, 1975.
47. GRÄF, L.; LI, C.H.; JIBSON, M.D. Human somatotropin. Selective removal with trypsin of residues 135-145 from the hormone molecule with no loss of biological activities. J. biol. chem., 257(5):2365-2369, 1982.
48. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M.; GLOVER, J.S. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J., 89:114-123, 1963.
49. HALL, K.; BRANDT, J.; ENBERG, G.; FRYKLUND, L. Immunoreactive somatomedin A in human serum. J. clin. Endocr. Metab., 48(2):271-278, 1979.

50. HANSON, L.Å.; ROOS, P.; RYMO, L. Heterogeneity of human growth hormone preparations by immuno-gel filtration and gel filtration electrophoresis. Nature, 212(5065): 948-949, 1966.
51. HEDRICK, J.L. & SMITH, A.J. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis, Archs. Biochem. Biophys., 126:155-164 (1968).
52. HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 194(4827):495-6, 1962.
53. JACOBSON, D. The techniques and effects of hypophysectomy, pituitary stalk section and pituitary transplantation in experimental animals. In: HARRIS, G.W., ed. The pituitary gland. London, Butterworths, 1966. v. 2, p.1-21.
54. KAPADIA, G. & CHRAMBACH, A. Recovery of protein in preparative polyacrylamide gel electrophoresis. Analyt. Biochem., 48:90-102, 1972.
55. KÅRSNÅS, P. & ROOS, P. Two methods for electrophoretic elution of protein from polyacrylamide gels. Analyt. Biochem., 77:168-175, 1977.
56. KINGSBURY, N. & MASTERS, C.J. On the determination of component molecular weights in complex protein mixtures by means of disc electrophoresis. Analyt. Biochem., 36:144-158, 1970.
57. LAMPRECHT, F. & WOOTEN, G.F. Effect of hypophysectomy on serum dopamine-beta-hydroxylase activity in rat. Endocrinology, 92(5):1543-1546, 1973.

58. LESNIAK, M.A.; GORDEN, P.; ROTH, J. Reactivity of non-primate growth hormones and prolactins with human growth hormone receptors on cultured human lymphocytes. J. clin. Endocr. Metabol., 44(5):838-849, 1977.
59. LESNIAK, M.A.; GORDEN, P.; ROTH, J.; GAVIN, J.R. Binding of ^{125}I -human growth hormone to specific receptors in human cultured lymphocytes. J. biol. Chem., 249(6): 1661-1667, 1974.
60. LEWIS, U.J. & CLARCK, M.O. Preparative methods for disk electrophoresis with special reference to the isolation of pituitary hormones. Analyt. Biochem. 6:303-315, 1963.
61. LEWIS, U.J.; CHEEVER, E.V.; SEAVEY, B.K. Aggregate-free human growth hormone. I. Isolation by ultrafiltration. Endocrinology, 84:325-331, 1969A.
62. LEWIS, U.J.; PARKER, D.C.; OKERLUND, M.D.; BOYAR, R.M.; LITTERIA, M.; VANDERLAAN, W.P. Aggregate-free human growth hormone. II. Physicochemical and biological properties. Endocrinology, 84:332-39, 1969B.
63. LEWIS, U.J.; PENCE, S.J.; SINGH, R.N.P.; VANDERLAAN, W.P. Enhancement of the growth promoting activity of human growth hormone. Biochem. biophys. Res. Commun., 67(2): 617-624, 1975.
64. LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; SEAVEY, B.K. Human prolactin: Isolation and some properties. Biochem. biophys. Res. Commun., 44(5):1169-1176, 1971.
65. LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; SEAVEY, B.K. Problems in the purification of human prolactin. In: BOYNS, A.R. & GRIFFITHS, K., eds. Prolactin and carcinogenesis. Cardiff, Wales, UK, Alpha Omega Alpha, 1972. p.4-12.

66. LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; TUTWILER, G.F.; SIGEL, M.B.; VANDERLAAN, E.F.; VANDERLAAN, W.P. Human growth hormone: A complex of proteins. Recent Prog. Horm. Res., 36, 477-508, 1980.
67. LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; VANDERLAAN, W.P.; TUTWILER, G.F. Enhancement of the hyperglycemic activity of human growth hormone by enzymic modification. Endocrinology, 101:1587-1603, 1977.
68. LI, C.H.; BEWLEY, T.A.; BLAKE, J.; HAYASHIDA, T. Human somatotropin: Restoration of full biological activity by noncovalent interaction of a natural and a synthetic fragment of the hormone. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 74(3):1016-1019, 1977.
69. LI, C.H.; BLAKE, J.; CHENG, C.H.K.; JIBSON, M.D. Human somatotropin: Semisynthesis of the hormone by noncovalent interaction of the natural NH₂-terminal fragment with a synthetic analog of the COOH-terminal fragment. Archs Biochem. Biophys., 211(1):338-345, 1981.
70. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem., 193:265-275, 1951.
71. MARDIAN, J.K.W. & ISENBERG, I. Preparative gel electrophoresis: Detection, excision, and elution of protein bands from unstained gels. Analyt. Biochem., 91(1):1-12, 1978.
72. MARX, W.; SIMPSON, M.B.; EVANS, H.M. Bioassay of the growth hormone of the anterior pituitary. Endocrinology 30(1):1-10, 1942.
73. MATHIES, J.C. & GAEBLER, O.H. The effect of growth hormone preparations on alkaline phosphatase of the tibia. Endocrinology, 45:129-134, 1949A.

74. MATHIES, J.C.; GAEBLER, O.H.; PALM, L. The effect of growth hormone on hepatic and renal acid and alkaline phosphatases. Endocrinology, 45:480-484, 1949B.
75. MATTERA, R.; TURYN, D.; FERNANDEZ, H.N.; DELLACHA, J.M. Structural characterization of iodinated bovine growth hormone. Int. J. Peptide Protein Res., 19:172-180, 1982.
76. MAYBERRY, W.E. Iodine chemistry. In: RALL, I.E. & KOPIN, I.J., eds. Methods in investigative and diagnostic endocrinology. New York, N.Y., North Holland, 1972. v. 1, part 1, p.3-26.
77. MAYER, M.M. & MILLER, J.A. Photometric analysis of proteins and peptides at 191-194m μ . Analyt. Biochem., 36:91-100, 1970.
78. MORRIS, H.G.; JORGENSEN, J.R.; ELRICK, H.; GOLDSMITH, R.E. Metabolic effects of human growth hormone in corticosteroid-treated children. J. clin. Invest., 47:436-451, 1968.
79. ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:321-349, 1964.
80. OTTO, M. & ŠNEJDÁRKOVÁ, M. A simple and rapid method for the quantitative isolation of proteins from polyacrylamide gels. Analyt. Biochem., 111:111-114, 1981.
81. PARLOW, A.F.; WILHELMI, A.E.; REICHERT JR.; L.E. Further studies on the fractionation of human pituitary glands. Endocrinology, 77:1126-1134, 1965.
82. PREECE, M.A.; TANNER, J.M.; WHITEHOUSE, R.H.; CAMERON, N. Dose dependence of growth response to human growth hormone in growth hormone deficiency. J. clin. Endocr. Metab., 42(3):477-483, 1976.

83. RICHARDS, E.G. & LECANIDOU, R. Quantitative aspects of the electrophoresis of RNA in polyacrylamide gels. Analyt. Biochem., 40:43-71, 1971.
84. RODBARD, D. Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("Sensitivity") for radio ligand assays. Analyt. Biochem., 90:1-12(1978).
85. RODBARD, D. & CHRAMBACH, A. Estimation of molecular radius, free mobility, and valence using polyacrylamide gel electrophoresis. Analyt. Biochem., 40:95-134, 1971.
86. ROOS, P.; FEVOLD, H.R.; GEMZELL, C.A. Preparation of human growth hormone by gel filtration. Biochim. biophys. Acta, 74:525-531, 1963.
87. ROOS, P.; JACOBSON, G.; WIDE, L. Isolation of five active thyrotropin components from human pituitary gland. Biochim. biophys. Acta., 379:247-261, 1975.
88. RUDMAN, D.; KUTNER, M.H.; GOLDSMITH, M.A.; BLACKSTON, R. D. Predicting the response of growth hormone-deficient children to long term treatment with human growth hormone. J. clin. Endocr. Metab., 48(3):472-477, 1979.
89. SCHWARZ, I. Estudo eletroforético de diferentes preparações de hormônio de crescimento humano: estimativa da massa molecular e caracterização dos isohormônios e outros componentes peptídicos. São Paulo, 1979. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares). (IEA-DT-134).
90. SHIU, R.P.C.; KELLY, P.A.; FRIESEN, H.G. Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones. Science, 180:968-971, 1973.
91. SIGEL, M.B.; VANDERLAAN, W.P.; VANDERLAAN, E.F.; LEWIS, U.J. Measurement of multiple forms of human growth hormone: Cross-reactivities in conventional and two-chain radioimmunoassays, Endocrinology, 106(1):92-97, 1980.

92. SINGH, R.N.P.; SEAVEY, B.K.; RICE, V.P.; LINDSEY, T.T.; LEWIS, U.J. Modified forms of human growth hormone with increased biological activities. Endocrinology, 94(3):883-891, 1974.
93. SKOTTNER, A.; FORSMAN, A.; PHOLENHAG, K.; HELLEBERG, A.; LOFBERG, E.; FRYKLUND, L.; VANGBO, B.; SKOOG, B. Human growth hormone produced by E. Coli: a preliminary study of effects on hypophysectomized rats. In: GUERIGUIAN, J.L., ed. Insulins, growth hormone, and recombinant DNA technology. New York, N.Y., Raven, 1981. p. 109-115.
94. SKYLER, J.S.; BAUMANN, G.; CHRAMBACH, A. A catalogue of isohormones of human growth hormone based on quantitative polyacrylamide gel electrophoresis. Acta endocr. (suppl.), 85(211):5-40 - 1977.
95. STEIN, J.; LESTER, J.; FOSTEN, A.; SHOWNKEEN, R.C.; HARTREE, A.S. Studies of a human growth hormone preparation used for clinical treatment in Great Britain. J. Endocr., 94:203-210, 1982.
96. TALAMANTES, F.; LOPEZ, J.; LEWIS, U.J.; WILSON, C.B. Multiple forms of growth hormone: detection in medium from cultured pituitary adenoma explants. Acta Endocr., 98:8-13, 1981.
97. TARLI, P. & LI, C.H. Human pituitary growth hormone: solubility in ammonium sulfate solutions. Archs. Biochem. Biophys., 161:696-697, 1974.
98. THORNGREN, K.G. & HANSSON, L.I. Bioassay of growth hormone. I. Determination of longitudinal bone growth with tetracycline in hypophysectomized rats. Acta Endocr., 75(4);653-668, 1974A.

99. THORNGREN, K-G. & HANSSON, L.I. Bioassay of growth hormone. II. Determination of longitudinal bone growth with tetracycline in thyroxine-treated hypophysectomized rats. Acta Endocr., 75(4):669-682, 1974B.
100. THORNGREN, K-G. & HANSSON, L.I. Effect of thyroxine and growth hormone on longitudinal bone growth in the hypophysectomized rat. Acta Endocr., 74:24-40, 1973(B).
101. THORNGREN, K-G.; HANSSON, L.I.; MENANDER-SELLMAN, K.; STENSTRÖM, A. Effect of dose and administration period of growth hormone on longitudinal bone growth in the hypophysectomized rat. Acta Endocr., 74:1-23, 1973(A).
102. THORNGREN, K-G.; HANSSON, L.I.; MENANDER-SELLMAN, K.; STENSTRÖM, A. Effect of hypophysectomy on longitudinal bone growth in the rat. Calcified Tissue Res., 11: 281-300, 1973.
103. TORJESEN, P.A.; SAND, T.; NORMAN, N.; TRYGSTAD, O.; FOSS, I. Isolation of LH, FSH and TSH from human pituitaries after the removal of HGH. Acta Endocr., 77:485-497, 1974.
104. TSUSHIMA, T. & FRIESEN, H.G. Radioreceptor assay for growth hormone. J. clin. Endocr. Metab., 37(2):334-337, 1973.
105. WATKIN, J.E. & MILLER, R.A. Quantitative measurement of protein in disc electrophoresis by direct ultraviolet absorbance. Analyt. Biochem., 34:424-435, 1970.
106. WETLAUFER, D.B. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. In: ANFISEN, C.B.; ANSON, M.L.; BAILEY, K.; EDSALL, J.I., eds. Advances in protein chemistry. New York, N.Y., Academic, 1962. v. 17, p. 303-91.

107. WHITAKER, J.R. & GRANUM, P.E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280nm. Analyt. Biochem., 109:156-159 (1980).
108. WILHELMI, A.E. Growth hormone bioassay. In: BERSON, S.A. & YALOW, R.S., eds. Methods in investigative and diagnostic endocrinology. Amsterdam, North Holland, 1973. v. 2A, chapter 2, p.296-302.
109. YADLEY, R.A. & CHRAMBACH, A. Isohormones of human growth hormone. II. Plasmin-Catalyzed transformation and increase in prolactin biological activity. Endocrinology, 93(4):858-865, 1973.
110. YADLEY, R.A.; RODBARD, D.; CHRAMBACH, A. Isohormones of human growth hormone. III. Isolation by preparative polyacrylamide gel electrophoresis and characterization. Endocrinology, 93(4):866-873, 1973(B).
111. ZARROW, M.X.; YOCHIM, J.M.; MCCARTHY, J.L. Hypophisectomy, parapharyngeal approach. In: EXPERIMENTAL endocrinology: a source-book of basic techniques. New York, N.Y., Academic, 1964. p. 308-10.