INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBUNIDADES ALFA E BETA DOS
HORMÔNIOS GLICOPROTEICOS HUMANOS RECOMBINANTES:
FOLICULOTROFINA, LUTEOTROFINA, TIREOTROFINA E SUA COMPARAÇÃO
COM OS PRODUTOS HIPOFISÁRIOS**

Cristiane Moreira de Carvalho Mageika

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela**

SÃO PAULO

2008

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBUNIDADES ALFA E BETA DOS
HORMÔNIOS GLICOPROTEICOS HUMANOS RECOMBINANTES:
FOLICULOTROFINA, LUTEOTROFINA, TIREOTROFINA E SUA COMPARAÇÃO
COM OS PRODUTOS HIPOFISÁRIOS**

Cristiane Moreira de Carvalho Mageika

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela**

SÃO PAULO

2008

Dedico este trabalho

A Deus por tudo o que recebi e pelo que receberei. *Soli Deo Gloria!*

À minha mãe Maria Luiza, o meu maior exemplo de vida, que me criou com os sábios princípios cristãos, a verdadeira ciência da vida. Sem você sonhos não seriam possíveis!

Ao meu amado pai Ubaldo pelo apoio e incentivo.

Aos meus queridos irmãos: Marcos, Ubaldo e Flávio e também a minha cunhada Flávia, por terem me ensinado a amar em família.

Ao casal mais doce que já conheci Sra. Edelzuite e Sr. Rivaldo, meus avós que admiro grandemente.

Ao grande e único amor da minha vida Marcelo Mageika com quem passarei todos os dias da minha vida.

À minha família e amigos, pelo amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por toda obra que fez, tem feito e fará em minha vida.

À minha mãe Maria Luiza e ao meu eterno namorado Marcelo por tudo o que fizeram por mim, pelo que sou e por todo amor, carinho e dedicação durante todos os dias da minha vida... Amo vocês!

Aos meus irmãos Marcos, Ubaldo e Flávio por todo apoio, amor e igual carinho.

Em especial, à minha orientadora, Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, pela orientação, confiança, incentivo, amizade e carinho dispensados na realização deste trabalho.

Ao Dr. Paolo Bartolini, Dr. Carlos, Dra. Cibele e Dra. Kayo, pela confiança, orientação e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Arlete, Beatriz, Camila, Cláudia, Dani, Eric, Eliza, Fernanda, Flávia, Geiza, Herbert, Johnny, Karina, Larissa, Márcia, Miriam, Natália, Neide, Nélío, Renata, Sueli, Susana e Tais, companheiros do dia-a-dia que proporcionaram momentos de alegrias e prazer... SUCESSO!

Aos amigos, José Maria, Rosângela e Junqueira, companheiros em todos os momentos e sempre prontos para ajudar.

Às minhas amigas Cris e Luciana por todos os momentos de muita risada... Beijos enormes.

A todos os colegas do Centro de Biotecnologia, que direta e/ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de executar este trabalho e pelo auxílio financeiro.

ORAÇÃO MATINAL

Deus Todo Poderoso,

No limiar deste novo dia eu me entrego totalmente a Ti: alma, corpo, negócios, amigos;

Vigie, guarde, guie, oriente, santifique, abençoe-me.

Incline o meu coração aos Teus caminhos;

Como oleiro, molde-me totalmente para que eu seja à imagem de Jesus;

Que meus lábios sejam qual harpa bem afinada para cantar os Teus louvores;

Que aqueles que me cercam percebam que eu vivo pelo Teu Espírito:

- desprezando o mundo
- inconformado com vaidades mentirosas
- transformado por uma mente renovada
- revestido de toda a armadura de Deus
- brilhando como uma luz que nunca se apaga
- demonstrando santidade em todos os meus atos

Que nenhum mal suje meus pensamentos, palavras e mãos neste dia.

Que eu viaje pelos caminhos lamacentos do mundo livre de manhas, de sujeira

Em negócios necessários:

- que eu possa estar amando as coisas celestiais
- que meu amor suba ao Céu em chamas de fogo
- que meu olhar esteja fito nas coisas que se não vêem
- que meus olhos sejam abertos ao vazio, à fragilidade, ao ridículo que é este mundo e suas vaidades

Que eu possa enxergar todas as coisas no espelho da eternidade:

- aguardando a volta do meu Senhor
- escutando o chamado da última trombeta
- apressando ao novo céu e à nova terra.

Que eu organize todas as minhas comunicações deste dia de acordo com a Tua sabedoria, e para o bem comum.

Que eu fale cada palavra como se fosse a minha última.

Que eu tome cada passo como se fosse meu passo final.

Se a minha vida terminar hoje, que este seja o melhor dia dela.

(A. Bennett, "The Valley of Vision" - Jornal Os Puritanos)

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBUNIDADES ALFA E BETA DOS HORMÔNIOS GLICOPROTEICOS HUMANOS RECOMBINANTES: FOLICULOTROFINA, LUTEOTROFINA, TIREOTROFINA E SUA COMPARAÇÃO COM OS PRODUTOS HIPOFISÁRIOS

CRISTIANE MOREIRA DE CARVALHO

RESUMO

Neste trabalho é descrito um método prático e eficiente para dissociar, em subunidades α e β , quantidades pequenas (da ordem de microgramas) dos hormônios foliculotrofina (hFSH), luteotrofina (hLH) e tireotrofina (hTSH) humana, nativos e recombinantes. A dissociação destes hormônios foi conseguida incubando-os, durante 16 horas, a 37°C, com diferentes concentrações de ácido acético: 3M, 5M e 0,4M respectivamente para o hFSH, hLH e hTSH. Nestas condições, uma eficiência de dissociação acima de 98% foi obtida. Esta eficiência foi calculada com base nas determinações de massa dos heterodímeros e das subunidades, realizadas por MALDI-TOF-MS. Uma separação rápida e quantitativa das subunidades, com rendimentos da ordem de 80-90%, foi conseguida por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em uma coluna C₄. As subunidades foram caracterizadas quanto à pureza, hidrofobicidade, massa molecular e distribuição de carga por HPLC de exclusão molecular e fase reversa, SDS-PAGE e focalização isoeletrica. Quando analisadas quanto à hidrofobicidade, as subunidades α mostraram-se aproximadamente iguais, enquanto as subunidades β dos três heterodímeros apresentaram a seguinte escala de hidrofobicidade: β -hFSH < β -hTSH < β -hLH. Com relação à massa molecular relativa (M_r), as subunidades α e β do hFSH

apresentaram as maiores M_r enquanto as subunidades do hLH as menores. A distribuição dos isômeros de carga das subunidades dos três hormônios ocorreu em uma região ácida, para o hFSH, em uma região básica, para o hLH e em uma região intermediária, para o hTSH. As subunidades α dos três hormônios, quando analisadas via SDS-PAGE, apresentaram praticamente a mesma mobilidade eletroforética, enquanto as subunidades β apresentaram diferentes taxas de migração (m_R), sendo $m_R \beta\text{-hFSH} < m_R \beta\text{-hTSH} < m_R \beta\text{-hLH}$. Diferenças relativas à massa molecular, hidrofobicidade, migração eletroforética e distribuição de carga foram encontradas entre as preparações recombinantes e hipofisárias dos três hormônios.

O método descrito é suave, prático e flexível e pode ser adaptado à dissociação de outras glicoproteínas heterodiméricas recombinantes ou nativas. Permite não só estudos e caracterização direta de cada subunidade, como também detectar a presença de subunidades livres em preparações farmacêuticas, que são contaminantes indesejáveis, sendo, portanto, uma ferramenta extremamente útil para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ALPHA AND BETA SUBUNITS OF RECOMBINANT HUMAN GLYCOPROTEIN HORMONES: FOLLICLE-STIMULATING HORMONE, LUTEOTROPIN, THYROTROPHIN AND COMPARATION WITH PITUITARY GLYCOPROTEIN HORMONES

CRISTIANE MOREIRA DE CARVALHO

ABSTRACT

In this work a practical and efficient method for the dissociation into α - and β -subunits of small amounts (microgram range) of pituitary-derived and recombinant human follicle-stimulating hormone (hFSH), human luteotropin (hLH) and human thyrotropin (hTSH) is described. Dissociation was achieved by overnight treatment of the glycoproteins, at 37°C, with acetic acid in different concentrations: 3M, 5M and 0,4M for hFSH, hLH and hTSH respectively. In these conditions, a dissociation efficiency of > 98% was attained. This efficiency was calculated on the basis of relative mass determinations of the heterodimers and subunits carried out via mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The α - and β -subunits were rapidly and quantitatively separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a C₄ column with yields of the order of 80-90%. The isolated subunits were characterized concerning their purity, hydrophobicity, molecular mass and charge distribution, via size exclusion and RP-HPLC, SDS-PAGE and isoelectric focusing. When analyzed with relation to the hydrophobicity, the α -subunits presented approximately the same hydrophobicity, while β -subunits showed the following scale: β -hFSH < β -hTSH < β -hLH. Concerning molecular mass, α - and β -subunits of hFSH were shown to have the highest while hLH subunits the lowest. Charge isomers of the subunits of the three

glycohormones were predominantly distributed in an acidic region for hFSH, in a basic region for hLH, and in a wider pH range (acidic and basic) for hTSH. Similar migration rates (m_R), analyzed via SDS-PAGE, were observed for the α -subunits of the three hormones. A greater variation was found for the β -subunits: $m_R \beta\text{-hFSH} < m_R \beta\text{-hTSH} < m_R \beta\text{-hLH}$. Differences between recombinant and pituitary preparations of three hormones were observed with relation to molecular mass, hydrophobicity, electrophoretic migration and charge distribution.

The described method is mild, practical and flexible and can be adapted to dissociate any recombinant or native heterodimeric glycoprotein, allowing studies and direct characterization of each subunit as well as the detection of free subunits that are undesired contaminants in pharmaceutical preparations, being also an extremely useful tool for the quality control of pharmaceutical products.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 MATERIAL	21
3.1.1 Preparações hormonais utilizadas	21
3.1.1.1 Preparações de natureza hipofisária	21
3.1.2.2 Preparações de natureza recombinante	22
3.1.2 Reagentes utilizados	23
3.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS PRINCIPAIS	25
3.3 MÉTODOS	28
3.3.1 Dissociação dos heterodímeros de hFSH, hLH e hTSH	28
3.3.2 Purificação das subunidades α e β	28
3.3.3 Reassociação das subunidades α e β	29
3.3.4 Caracterização das subunidades α e β purificadas	29
3.3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC) ..	29
3.3.4.2 SDS-PAGE	30
3.3.4.3 Focalização Isoelétrica (IEF)	32
3.3.4.4 Espectrometria de massa (MALDI-TOF)	33
4 RESULTADOS	34
4.1 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF	34
4.2 DISSOCIAÇÃO DOS HORMÔNIOS GLICOPROTEICOS	38
4.3 ISOLAMENTO DAS SUBUNIDADES	44
4.4 REASSOCIAÇÃO DAS SUBUNIDADES α E β	47

4.5 ANÁLISE POR HPSEC	50
4.6 ANÁLISE POR RP-HPLC	52
4.7 ANÁLISE EM SDS-PAGE	55
4.8 DISTRIBUIÇÃO DOS ISÔMEROS DE CARGA	61
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

A foliculotrofina (hFSH), luteotrofina (hLH) e tireotrofina (hTSH) humanas são hormônios glicoprotéicos produzidos e secretados pela glândula pituitária anterior, em diferentes células. FSH e LH são sintetizados nos gonadotopos e controlam a reprodução, enquanto o TSH é sintetizado nos tireotopos e controla a função tireoideana.

O hFSH está envolvido na regulação de várias funções reprodutivas incluindo a gametogênese, o crescimento folicular e a ovulação e, portanto, tem um papel fisiológico importante tanto no homem como na mulher. O hLH estimula os ovários e os testículos a sintetizarem esteróides, e portanto, também tem um papel importante no controle da função reprodutiva. Já o hTSH controla a diferenciação morfológica e a atividade biológica das células tireoideanas.

A utilização destes hormônios como agentes terapêuticos tem sido amplamente descrita na literatura (Loumaye, 1998; Howles, 2000; Luster, 2006; Choi, 2007). As principais estratégias utilizadas para a síntese e purificação destes hormônios recombinantes foram amplamente discutidas em revisão que aborda este assunto (Ribela, 2003).

Os hormônios glicoprotéicos hipofisários são heterodímeros formados de duas subunidades (α e β), que são cadeias polipeptídicas com carboidratos acoplados a cada subunidade, em um ou mais sítios. Estudos relativos à síntese das subunidades sugerem que estes carboidratos facilitam a formação de pontes dissulfeto próprias durante o “folding” das cadeias peptídicas e evitam proteólises e agregação das subunidades (Hartree, 1992; Galet, 2004). As pontes dissulfeto formadas são cinco na subunidade α e seis na subunidade β , sendo as posições

de ligação das cisteínas nas duas subunidades, para cada hormônio, indicadas na Tabela 1.

As cadeias de carboidratos no hFSH recombinante constituem 28% de seu peso e introduzem considerável micro heterogeneidade (isohormônios) (Horsman, 2000). No hLH os carboidratos constituem 21% do seu peso total (Hara, 1978) e no hTSH 15 a 25% (Skudlinski, 2000; 2002).

Os oligossacarídeos das subunidades β destes hormônios têm um papel fundamental no “clearance” metabólico e, portanto, na atividade biológica “in vivo” dos hormônios. Os oligossacarídeos das subunidades α por sua vez, são essenciais na ação do hTSH durante a transdução de sinal pós-receptor, participam do “folding” da subunidade β e da estabilização do heterodímero (Skudlinski, 2002; Ulloa-Aguirre A, 2003; Bousfield, 2007).

Tabela 1 Propriedades dos hormônios glicoprotéicos hFSH, hLH e hTSH (De: Ribela, 2006)

Hormônio	Estrutura Primária	Aminoácido N-Terminal	Pontes Dissulfeto Cys - Cys	Sítio de Glicosilação
hFSH	α : 92 aa β : 111 aa	α : Alanina β : Asparagina	7 – 31 10 – 60 α : 28 – 82 32 – 84 59 – 87 3 – 51 17 – 66 β : 20 – 104 28 – 82 32 – 84 87- 94	α : Asn 52 Asn 78 β : Asn 7 Asn 24
hLH	α : 92 aa β : 121 aa	α : Alanina β : Serina	7 – 31 10 – 60 α : 28 – 82 32 – 84 59 – 87 9 – 57 23 – 72 β : 26 – 110 34 – 88 38 – 90 93 - 100	α : Asn 52 Asn 78 β : Asn 30
hTSH	α : 92 aa β : 118 aa	α : Alanina β : Fenilalanina	7 – 31 10 – 60 α : 28 – 82 32 – 84 59 – 87 2 – 52 17 – 67 β : 19 – 105 27 – 83 31 – 85 88 - 95	α : Asn 52 Asn 78 β : Asn 23

As subunidades α dos três hormônios são glicosiladas na porção C-terminal da molécula, em dois sítios, na asparagina 52 e 78, enquanto as subunidades β são glicosiladas na porção amino terminal, em uma ou duas posições, isto é, na asparagina 7 e 24 no hFSH β , na asparagina 30 no hLH β e na asparagina 23 no hTSH β (Tabela 1). Os oligossacarídeos de ligação N das cadeias α são do tipo complexo e consistem essencialmente de estruturas di- e triantenárias, mono- e disialiladas. Entretanto, existem diferenças na quantidade relativa destes componentes na cadeia α . Por exemplo, na subunidade α FSH, os oligossacarídeos triantenários são bastante raros, enquanto no α LH eles são tão abundantes quanto as estruturas biantenárias. Também foram observadas diferenças nas estruturas diantenárias e triantenárias fucosiladas: no α LH estas estruturas não são detectadas, enquanto no α hFSH elas aparecem (Amoresano, 1996).

A seqüência de aminoácidos que compõe a subunidade α dos três hormônios glicoprotéicos é comum, enquanto aquela que forma a subunidade β é específica de cada hormônio e responsável por conferir a função fisiológica específica (Figuras 1, 2 e 3). A subunidade α dos três hormônios contém 92 aminoácidos e cinco pontes dissulfeto contribuindo para a sua estrutura terciária. Já as subunidades β do hFSH, hTSH, e hLH contém respectivamente 111, 118 e 121 aminoácidos, sendo suas moléculas estabilizadas por seis ligações dissulfeto.

Subunidade alfa

Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	10
Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	Ser	Gln	20
Pro	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu	Gln	Cys	Met	Gly	30
Cys	Cys	Phe	Ser	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr	Pro	40
Leu	Arg	Ser	Lys	Lys	Thr	Met	Leu	Val	Gln	50
Lys	Asn ↓ 52	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Cys	Cys	60
Val	Ala	Lys	Ser	Tyr	Asn	Arg	Val	Thr	Val	70
Met	Gly	Gly	Phe	Lys	Val	Glu	Asn ↓ 78	His	Thr	80
Ala	Cys	His	Cys	Ser	Thr	Cys	Tyr	Tyr	His	90
Lys	Ser									92

Subunidade beta

Asn	Ser	Cys	Glu	Leu	Thr	Asn ↓ 07	Ile	Thr	Ile	10
Ala	Ile	Glu	Lys	Glu	Glu	Cys	Arg	Phe	Cys	20
Ile	Ser	Ile	Asn ↓ 24	Thr	Thr	Trp	Cys	Ala	Gly	30
Tyr	Cys	Tyr	Thr	Arg	Asp	Leu	Val	Tyr	Lys	40
Asp	Pro	Ala	Arg	Pro	Lys	Ile	Gln	Lys	Thr	50
Cys	Thr	Pro	Lys	Glu	Leu	Val	Tyr	Glu	Thr	60
Val	Arg	Val	Pro	Gly	Cys	Ala	His	His	Ala	70
Asp	Ser	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Val	Ala	Thr	80
Gln	Cys	His	Cys	Gly	Lys	Cys	Asp	Ser	Asp	90
Ser	Thr	Asp	Cys	Thr	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	100
Pro	Ser	Tyr	Cys	Ser	Phe	Gly	Glu	Met	Lys	110
Glu										111

Figura 1 - Sequência de aminoácidos do hFSH (De: Howles, 1996)

Subunidade alfa

Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	10
Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	Ser	Gln	20
Pro	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu	Gln	Cys	Met	Gly	30
Cys	Cys	Phe	Ser	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr	Pro	40
Leu	Arg	Ser	Lys	Lys	Thr	Met	Leu	Val	Gln	50
Lys	Asn ↓ 52	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Cys	Cys	60
Val	Ala	Lys	Ser	Tyr	Asn	Arg	Val	Thr	Val	70
Met	Gly	Gly	Phe	Lys	Val	Glu	Asn ↓ 78	His	Thr	80
Ala	Cys	His	Cys	Ser	Thr	Cys	Tyr	Tyr	His	90
Lys	Ser									92

Subunidade beta

Ser	Arg	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Trp	Cys	His	10
Pro	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Gln	Lys	20
Glu	Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Ile	Thr	Val	Asn ↓ 30	30
Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr	40
Met	Met	Arg	Val	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Pro	50
Pro	Leu	Pro	Gln	Val	Val	Cys	Thr	Tyr	Arg	60
Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro	70
Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Val	Asp	Pro	Val	Val	80
Ser	Phe	Pro	Val	Ala	Leu	Ser	Cys	Arg	Cys	90
Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Ser	Asp	Cys	100
Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	His	Pro	Leu	Thr	Cys	110
Asp	His	Pro	Gln	Leu	Ser	Gly	Leu	Leu	Phe	120
Leu										121

Figura 2 - Sequência de aminoácidos do hLH (De: Pierce, 1981)

Subunidade alfa

Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	10
Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	Ser	Gln	20
Pro	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu	Gln	Cys	Met	Gly	30
Cys	Cys	Phe	Ser	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr	Pro	40
Leu	Arg	Ser	Lys	Lys	Thr	Met	Leu	Val	Gln	50
Lys	Asn	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Cys	Cys	60
Val	⁵² ↓ Ala	Lys	Ser	Tyr	Asn	Arg	Val	Thr	Val	70
Met	Gly	Gly	Phe	Lys	Val	Glu	Asn	His	Thr	80
Ala	Cys	His	Cys	Ser	Thr	Cys	⁷⁸ ↓ Tyr	Tyr	His	90
Lys	Ser									92

Subunidade beta

Phe	Cys	Ile	Pro	Thr	Glu	Tyr	Thr	Met	His	10
Ile	Glu	Arg	Arg	Glu	Cys	Ala	Tyr	Cys	Leu	20
Thr	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	30
Cys	Met	²³ ↓ Thr	Arg	Asp	Ile	Asn	Gly	Lys	Leu	40
Phe	Leu	Pro	Lys	Tyr	Ala	Leu	Ser	Gln	Asp	50
Val	Cys	Thr	Tyr	Arg	Asp	Phe	Ile	Tyr	Arg	60
Thr	Val	Glu	Trp	Pro	Gly	Cys	Pro	Leu	His	70
Val	Ala	Pro	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Pro	Val	Ala	80
Leu	Ser	Cys	Lys	Cys	Gly	Lys	Cys	Asn	Thr	90
Asp	Tyr	Ser	Asp	Cys	Ile	His	Glu	Ala	Ile	100
Lys	Thr	Asn	Tyr	Cys	Thr	Lys	Pro	Gln	Lys	110
Ser	Tyr	Leu	Val	Gly	Phe	Ser	Val			118

Figura 3 - Sequência de aminoácidos do hTSH (De: Szkudlinski, 2002)

No hormônio intacto, as subunidades são unidas por ligações não covalentes e a associação delas é mandatória para a expressão da atividade biológica destes hormônios. Há evidências que a associação das subunidades α e β começa no retículo endoplasmático rugoso (Hartree, 1992). De fato, foi mostrado na literatura que não só o heterodímero formado pela associação das subunidades é biologicamente ativo. Quando moléculas heterodiméricas foram convertidas em seus derivados de cadeia única, os análogos resultantes também mostraram-se funcionais (Fares, 1998; Setlur, 2007).

As subunidades α e β podem ser também encontradas na forma dissociada (subunidades α e β livres), com atividades independentes dos hormônios heterodiméricos. Estudos na literatura mostraram que a produção de prolactina em culturas de miométrio humano foi estimulada por subunidades α livres do TSH, assim como as subunidades α livres do LH estimularam a diferenciação dos lactotrofos da hipófise de rato (Blithe, 1995). Com relação à subunidade β livre, há relatos da utilização da presença de β -LH, após administração de TRH, como um marcador da existência de tumores pituitários não funcionantes (NFT), uma vez que o nível de β -LH tem um aumento significativo sob o estímulo de TRH em pacientes com NFT, o que não acontece em sujeitos normais (Popovic, 1998). A presença de subunidades livres é, entretanto, indesejável nas preparações farmacêuticas utilizadas em humanos.

As subunidades podem ser obtidas pela dissociação do hormônio íntegro, após exposição a agentes tais como ácido propiônico, ácido trifluoracético (TFA), hidrocloreto de guanidina ou uréia, e purificação por técnicas cromatográficas (Jacobson, 1978; Parsons, 1984; Hyama, 1990; Chlenov, 1993; Loumaye, 1998). Na literatura, os rendimentos das subunidades isoladas dos

hormônios glicoproteicos variam de acordo com o hormônio e com o método utilizado para sua dissociação. Um rendimento de 60% para as subunidades alfa e beta foi relatado por Chlenov e col. (Chlenov, 1993) após incubação do hTSH e hLH, ambos hipofisários, com 6M de hidrocloreto de guanidina ou com 10% de ácido trifluoroacético (TFA) e purificação por RP-HPLC. Hiyama e col. (Hiyama, 1990), também utilizando RP-HPLC para isolar as subunidades, descreveram rendimentos da mesma ordem quando estes dois hormônios foram incubados com guanidina 6M e quando o hFSH foi incubado com 0,1% TFA. Estes autores relatam rendimentos de 52 a 69% para as subunidades α do hLH, hTSH e hFSH e da ordem de 67 a 77% para as subunidades β . Rendimentos bem mais baixos, entre 10 a 50%, foram relatados em trabalho mais antigo (Parson, 1984) referindo-se a esses três hormônios tratados com guanidina 6M. Enfatizamos que todas as reações de dissociação descritas foram realizadas sempre com quantidades de hormônio da ordem de miligramas.

A preparação e caracterização de cada subunidade dos hormônios glicoprotéicos humanos hipofisários e recombinantes é muito importante especialmente considerando que estes hormônios são produtos farmacêuticos com alto valor clínico e agregado. Também importante é a possibilidade de comparação entre as propriedades físico-químicas das subunidades, sejam elas de origem hipofisária que derivadas de células CHO.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é a obtenção de subunidades α e β dos três hormônios glicoproteicos recombinantes (hFSH, hLH e hTSH) e sua comparação com aquelas preparadas a partir de produtos hipofisários, realizando sua caracterização e controle de qualidade.

Para atingir estes objetivos foram realizadas as seguintes etapas:

- Estudo das condições ideais para uma dissociação eficiente dos três hormônios glicoproteicos recombinantes e de origem hipofisária, utilizando como agente dissociador o ácido acético
- Purificação das subunidades α e β por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)
- Caracterização físico-química das subunidades α e β quanto à massa molecular, hidrofobicidade, distribuição de isômeros de carga e migração eletroforética
- Comparação entre subunidades de origem recombinante e hipofisária

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Preparações hormonais utilizadas

3.1.1.1 Preparações de natureza hipofisária

- Preparações de origem hipofisária, produzidas e fornecidas pelo National Hormone and Pituitary Program (Torrance, EUA):

- pit-hFSH (NIDDK – hFSH – SIAFP - B3);
- pit- α hFSH (NIDDK –hFSH Alpha – I - SIAFP - 1);
- pit- β hFSH (NIDDK –h Beta FSH – I - SIAFP - 2);
- pit-hLH (NIDDK – hLH – B - SIAFP - 2);
- pit- α hLH (NIDDK –Human Alpha LH – AFP-3294B);
- pit- β hLH (NIDDK – Beta Subunit hLH – AFP-3282B);
- pit-hTSH (NIDDK – hTSH –SIAFP B - 2);
- pit- α hTSH (NIDDK –hTSH Alpha – AFP4099A);
- pit- β hTSH (NIDDK –Human Beta TSH – AFP-4105A-SIAFP).

- Preparações de origem hipofisária, produzidas e fornecidas pelo Dr. Peter A. Torjesen do Aker University Hospital (Oslo, Noruega):

- pit-hFSH NOR;
- pit-hLH NOR;
- pit-hTSH NOR.

3.1.1.2 Preparações de natureza recombinante

- Preparações recombinantes, derivadas de células de ovário de Hamster Chinês (CHO), fornecidas pela Expomed Comércio de Produtos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil):

- Gonal-f[®] (hFSH), produzido pelos Laboratórios Serono S. A. (Bari, Itália);
- Puregon[®] (hFSH), produzido por N. V. Organon (Oss, Holanda);
- Luveris[®] (hLH), produzido pelos Laboratórios Serono S. A. (Aubonne,

Suíça);

- Thyrogen[®] (hTSH), produzido por Genzyme Corporation (Cambridge, EUA).

3.1.2 - Reagentes utilizados

- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Acetato de sódio p. a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Ácido acético glacial p.a., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Ácido clorídrico p. a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Ácido fosfórico, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Acrilamida p. a., Sigma (St. Louis, EUA).
- Álcool metílico p. a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Álcool n-propílico, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Anfolina, indicador de pH 3,5 - 9,5, GE Healthcare (Uppsala, Suécia).
- Azida Sódica, Sigma (St. Louis, EUA).
- Azul de bromofenol, Sigma (St. Louis, EUA).
- Bisacrilamida (N, N' – Methylene – bis – acrylamida), Bio-Rad (Richmond, EUA).
- 2-mercaptoetanol, DDH Chemicals (Poole, Inglaterra).
- Coomassie Brilliant Blue G 250, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Coomassie Brilliant Blue R 250, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Cloreto de Sódio p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Diclorometilsilene, Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Fosfato de amônio bibásico p. a., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio monobásico p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Fosfato de sódio bibásico p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).

- Glicerol p. a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Glicina p. a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Hidróxido de sódio p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Isopropanol p. a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Marcador de peso molecular, 14,4 a 97kDa, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Marcador de ponto isoelétrico, pH 3 – 10, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Metanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Metanol p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Persulfato de amônio p. a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Phenolrot, indicador de pH, Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Sulfato de amônio p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- TEMED (N, N, N', N' tetrametietilenodiamina), Sigma (St. Louis, EUA).
- Tris p. a., GE Healthcare, (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Tris-hidroximetil aminometano, grau HPLC, Sigma (St. Louis, EUA).
- Tris-hidroximetil aminometano, p. a., GE Healthcare (Uppsala, Suécia).

3.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS PRINCIPAIS

- Agitador magnético, modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil).
- Agitador rotatório de tubos (tipo “rotator”), fornecido pelo laboratório NETRIA, North East Thames Region Immunoassay Unit (Londres, Inglaterra).
- Agitador rotatório (tipo vortex), modelo AP-56, Phoenix (Araraquara, Brasil).
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10A, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e a um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD, EUA).
- Autoclave horizontal, modelo Speedclave 12L, Odontobrás (São Paulo, Brasil).
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo P100N, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich, Suíça).
- Banho-maria, modelo 146, Fanem (São Paulo, Brasil).
- Centrifuga, modelo 5415D, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).
- Centrifuga refrigerada, modelo 5810R, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).
- Coluna de aço inoxidável utilizada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de exclusão molecular TSK G 2000 SW (60cm X 7,5mm D.I.), tamanho das partículas 10 μm e poros de 125 Å, acoplada a uma pré-coluna SW (7,5cm X 7,5mm D.I.), Tosohaas (Montgomeryville, EUA).
- Coluna de aço inoxidável utilizada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa C₄ Vydac, 214 TP 54 (25cm X 4,6mm D.I.), tamanho das

partículas 5 μm , diâmetro dos poros de 300Å, acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5 μm , 1,0cm X 4,6mm D.I.), Vydac Separations Group (Hesperia, EUA).

- Dispositivos de centrifuga, modelo Amicon[®] Ultra, 5.000 MW CO, Millipore (Corrigtwhill, Irlanda).
- Dispositivos de centrifuga, modelo Microcon[®] YM-3, 3.000 MW CO, Millipore (Corrigtwhill, Irlanda).
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Fitas medidoras de pH, Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Freezer -20°C, modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil).
- Freezer -40°C, modelo AB 240, Metalfrio (São Paulo, Brasil).
- Freezer -80°C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, EUA).
- Medidor digital de pH, modelo 420A, Thermo Electron Corporation (Bervely, EUA).
- Membrana para diálise, modelo Snakeskin[®] Pleated Dialysis, 3.500 MW CO, Pierce (Rockford, EUA).
- Membranas de filtração de 0,22 μm , Millipore (Bedford, EUA).
- Membrana de PVDF (0,2 μm), Sequi-Blot – Biorad (Hercules, EUA).
- Pipetas de alta precisão, volumes 10, 20, 100, 200, 1000 μL , Gilson (Rio de Janeiro, Brasil).
- Ponteiras sem filtro, volumes 10 a 1000 μL , Axygen (Union, EUA).

- Refrigerador duplex, modelo 320 Clean, Brastemp (São Paulo, Brasil).
- Refrigerador com porta de vidro, modelo VE 730, Metalfrio (São Paulo, Brasil).
- Refrigerador para cromatografia com duas portas de vidro, modelo 2201 Combicoldrac II, LKB (Bromma, Suécia).
- Seringa para injeção de amostra, volume 10 a 500 μ L, Hamilton (Nevada, EUA)
- Sistema de eletroforese vertical Hoefer[®] miniVE, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Sistema de focalização isoeletrica, modelo Multiphor II, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Sistema de transferência semi-seco Hoefer TE 70, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA).
- Tubos de poliestireno (7,5 x 1,2cm) para Radioensaio, EMTEL (São Paulo, Brasil).
- Tubos para centrífuga de 15 e 50mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Tubos Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Dissociação dos heterodímeros de hFSH, hLH e hTSH

Para dissociar os hormônios hFSH, hLH e hTSH foi usado, como agente dissociador, ácido acético em diferentes concentrações.

As reações de dissociação foram realizadas incubando a 37°C, durante 16 horas, 10 a 60µg de hormônio, com diferentes concentrações de ácido acético.

Para o hTSH foram testadas as concentrações de ácido acético de: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 e 1,0M. Para o hFSH, as condições estudadas foram: 0,5, 1,0 e 3,0M. No caso do hLH, as concentrações de ácido acético testadas foram: 0,8, 1,5, 3,0 e 5,0M.

3.3.2 Purificação das subunidades α e β

Após a reação de dissociação com ácido acético, as subunidades foram isoladas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC).

A coluna utilizada nesta cromatografia foi uma C₄ acoplada a uma pré-coluna e esta acoplada a uma segunda pré-coluna de sílica, localizada entre a bomba e o injetor. Esta última serve como um saturador de sílica para proteger a coluna principal de separação da dissolução da sílica, provocada pela fase móvel (Riggin, 1987).

Na eluição dos diferentes hormônios foram utilizadas diferentes fases móveis. Um gradiente linear de solução A (fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0) e solução B (acetonitrila) foi estabelecido, durante 40 minutos, com um fluxo de trabalho de 0,5 mL/min. Para o hFSH e hTSH o gradiente foi de 12,5% (B) e 87,5% (A) a 50% (B) e 50% (A) e para o hLH de 12,5% (B) e 87,5% (A) a 70% (B) e 30% (A). A detecção foi realizada por absorvância em luz ultravioleta (UV), no comprimento de onda de 220nm. A temperatura da coluna foi mantida a 25°C.

3.3.3 Reassociação das subunidades α e β

As subunidades α (28 μ g) e β (42 μ g), em um volume de 1,1 mL, resultantes da dissociação do heterodímero de hTSH, foram dialisadas contra o tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,0 utilizando membranas Snakeskin[®] Pleated Dialysis Tubing e incubadas durante 2 a 4 dias sob agitação, a temperatura ambiente (25°C). Após esse período, a amostra foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e também, em exclusão molecular (HPSEC).

3.3.4 Caracterização das subunidades α e β purificadas

3.3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC)

A pureza das subunidades isoladas foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC).

Empregou-se uma coluna de exclusão molecular Tosohaas TSK2000 acoplada a uma pré-coluna. A técnica de eluição foi isocrática tendo sido utilizada como fase móvel o tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,0 contendo 0,15M de cloreto de sódio. Cada corrida teve duração de trinta minutos e o fluxo de trabalho foi de 1,0mL/min. A detecção foi feita mediante luz ultravioleta (UV), no comprimento de onda de 220nm.

3.3.4.2 SDS-PAGE

As subunidades isoladas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, na presença de 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) sob condições não redutoras e redutoras, sendo que nesta última condição o agente redutor utilizado foi o β -mercapto-etanol.

Nas duas condições, as preparações foram adicionadas ao tampão de amostra específico de cada condição, na proporção de 3:1 (tampão:amostra) e testadas após ser submetidas a fervura, por quinze minutos, ou sem ferver.

O tampão de amostra utilizado nas condições não redutoras foi: 2mL de glicerol 20%, 3mL de SDS 20%, 10mg de azul de bromofenol (0,1%), 2,5mL de tris-HCl pH 6,8 e qsp 10mL de água Milli-Q. Em condições redutoras o tampão de amostra utilizado foi: 1mL de 2-mercapto-etanol, 2mL de glicerol 20%, 3mL de SDS 20%, 10mg de azul de bromofenol (0,1%), 2,5mL de tris-HCl pH 6,8 e qsp 10mL de água Milli-Q.

O gel de resolução foi preparado a 15%, contendo: 2,5mL de solução A:B (30g de acrilamida (A), 0,8g de bis-acrilamida (B) e qsp 100mL de água), 1,3mL de

tris-HCl 1,5M pH 8,8, 0,05mL de SDS 10%; 0,05mL de persulfato de amônio 10%, 0,002mL de TEMED e qsp 5mL de água Milli-Q. Adicionou-se isopropanol para a retirada de bolhas e também para manter o gel bem linear. Quando o gel de resolução estava totalmente polimerizado, o isopropanol foi retirado e o gel de empilhamento a 5% foi adicionado com a seguinte composição: 0,17mL de solução A:B, 0,13mL de tris-HCl 1,5M pH 6,8, 0,01mL de SDS 10%, 0,01mL de persulfato de amônio 10%, 0,001mL de TEMED e qsp 1mL de água Milli-Q. Os seguintes tampões foram utilizados nos géis: tampão de empilhamento (6,06g de tris-HCl pH 6,8, 2mL de SDS 20% e qsp 100mL de água Milli-Q); tampão de resolução (18,17g de tris-HCl pH 8,8, 2mL de SDS 20% e qsp 100mL de água) e tampão de corrida (3g de tris, 14,4g de glicina, 5mL de SDS 20% e qsp 1000mL de água).

A corrida foi realizada com intensidade de corrente de 35 mA, 500 V e 100W de potência, durante uma hora e trinta minutos. As amostras foram então fixadas, por 30 minutos e imersas em solução fixadora (50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água Milli-Q). O gel foi então imerso em solução corante composta por 0,25% de Coomassie Brilliant Blue G 250", 45% de metanol, 10% de ácido acético e 45% de água Milli-Q, em agitação contínua, durante aproximadamente 30 minutos. O gel foi descorado utilizando 10% de ácido acético em água Milli-Q até visualização bem definida das bandas e posteriormente conservado em água Milli-Q.

A mobilidade das proteínas estudadas no presente trabalho foi comparada àquelas dos seguintes padrões protéicos de massa molecular da GE Healthcare: phosphorylase b (97kDa), albumin (66kDa), ovalbumin (45kDa), carbonic anhydrase (30kDa), trypsin inhibitor (20,1kDa) e α -lactalbumin (14,4kDa).

3.3.4.3 Focalização Isoelétrica (IEF)

Esta técnica eletroforética utiliza um gel de poliacrilamida 6% e anfólitos com pH entre 3,5 a 9,5. Tal metodologia é realizada em duas etapas. Na primeira etapa, pré-corrida, é estabelecido no gel um gradiente de pH, a partir de uma diferença de potencial elétrico (ddp) de 500V, 50 mA de corrente elétrica e com uma potência de 25W, durante 30 minutos. O gradiente foi realizado com duas soluções: ácido fosfórico 10mM, que funciona como o ânodo e hidróxido de sódio 20mM representando o cátodo. Na segunda etapa, a corrida propriamente dita, foi estabelecida uma ddp de 1500V, durante uma hora. Em todas as corridas foi utilizado um marcador de ponto isoeletrico no intervalo de 3,5 a 10,0. Após a corrida o gel foi mergulhado em uma solução chamada de tampão de transferência (1,45g de glicina, 2,9g de tris-base, 925µL de SDS 20%, 100mL de metanol e 500mL de água Milli-Q) e as bandas resultantes no gel da focalização foram transferidas, por duas horas, com uma ddp de 500V, para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) previamente mergulhada em solução de metanol e no tampão de transferência. A visualização das bandas foi conseguida mergulhando a membrana, durante dois minutos, em solução corante de Comassie Brilliant Blue R250, 0,05%.

Para a focalização isoeletrica, as subunidades purificadas por RP-HPLC tiveram que ser dialisadas e concentradas. A diálise foi feita contra o tampão fosfato de sódio 0,3mM pH 7,0 utilizando o sistema de membranas Snakeskin® Pleated Dialysis Tubing, com trocas a cada quatro horas totalizando quatro trocas. A concentração para um volume final de aproximadamente 30µL foi feita utilizando

dispositivos de centrifuga Amicon[®] Ultra (“cut off” 5 kDa) e dispositivo Microcon[®] YM-3 (“cut off” 3kDa).

3.3.4.4 Espectrometria de massa (MALDI-TOF)

As massas moleculares dos hormônios hFSH, hLH e hTSH de origem hipofisária e também de natureza recombinante (aproximadamente 20 a 30pmoles de cada amostra) foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry) em um sistema Voyager DE BioSpectrometry Workstation (Applied Biosystems), operado no modo linear do íon positivo, utilizando o ácido sinapínico (AS) como matriz (solução saturada de AS em 50% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético). Estas análises foram feitas no laboratório Commonwealth Biotechnologies Inc. (Richmond, EUA) e nos laboratórios da University of California at Riverside (Riverside, EUA), com a qual colaboramos.

4 RESULTADOS

4.1 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

As massas moleculares (M_r) do heterodímero e das subunidades α e β do hFSH, hLH e hTSH, de origem hipofisária e recombinante, determinadas por MALDI-TOF-MS, são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 Massas moleculares relativas (M_r), determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF, dos heterodímeros e das subunidades α e β dos hormônios glicoproteicos

Preparação	Subunidade α	Subunidade β	Heterodímero		
			Experimental	$(\alpha+\beta)$	$(\alpha+\beta) / \text{Exp.}$
p-hFSH ^a	14467	16509	29176	30976	1,06
p-hLH	13707	14221	27790	27928	1,00
p-hTSH ^b	13019	14476	27829	27495	0,99
r-hFSH ^a	14082	16067	28536	30149	1,06
r-hLH	13762	15225	28795	28987	1,01
r-hTSH ^b	13860	15580	29612	29440	0,99

^a Loureiro e col., 2006

^b Mendonça e col., 2005

Nestas determinações foi possível identificar simultaneamente no mesmo experimento a massa do heterodímero e das subunidades α e β . Para os hormônios hLH e hTSH, observou-se uma diferença mínima (0,5 a 1,2%) entre a massa molecular determinada diretamente (experimental) para o heterodímero e

aquela resultante da soma de suas respectivas subunidades ($\alpha + \beta$), enquanto para o hFSH essa diferença resultou mais elevada ($\sim 6\%$).

A preparação heterodimérica recombinante é maior do que a hipofisária no caso do hLH (+ 3,6%) e do hTSH (+ 6,4%), o inverso acontecendo para o hFSH (- 2,2%).

Com relação às subunidades α das preparações hipofisárias e recombinantes observou-se diferenças entre as suas massas moleculares sendo de + 2,7% para o α -hFSH, -0,4% para o α -hLH e - 6,5% para α -hTSH. No caso das subunidades β , as massas moleculares das preparações hipofisárias e recombinantes apresentaram diferenças ainda maiores, da ordem de + 2,7% para o β -hFSH, - 6,6% para o β -hLH e - 7,6% para β -hTSH.

Comparando o heterodímero dos três hormônios, observou-se que para as preparações de origem hipofisária é o hFSH quem apresenta maior massa molecular relativa, enquanto o hLH e o hTSH apresentam massas moleculares similares, sendo o hLH o de menor massa molecular. No caso das preparações recombinantes, o hTSH apresentou a maior massa molecular relativa enquanto o hFSH e o hLH apresentaram massas muito próximas, sendo o hFSH o de menor massa.

Entre as subunidades β , a do hFSH é a que apresenta maior massa, enquanto a subunidade β do hLH é a que apresenta menor massa tanto para as preparações recombinantes quanto para as nativas. Isto também acontece no caso das subunidades α recombinantes. No caso das subunidades α hipofisárias, a subunidade α do hFSH é a maior e a do hTSH a menor.

As determinações de massa por MALDI-TOF do hFSH e do hTSH foram realizadas anteriormente em nosso laboratório e já publicadas (Loureiro,

2006; Mendonça, 2005), enquanto que a determinação da massa molecular do hLH foi realizada no presente trabalho, sendo os espectros de massa obtidos para o hLH de origem hipofisária e recombinante mostrados na Figura 4.

Figura 4 – Espectrometria de massa MALDI-TOF das preparações p-hLH NIDDK (A) e r-hLH (B)

4.2 DISSOCIAÇÃO DOS HORMÔNIOS GLICOPROTEICOS

Após testar diferentes agentes dissociadores e protocolos, a condição de dissociação mais eficiente e menos prejudicial à proteína foi a incubação dos hormônios com ácido acético, durante 16 horas, a 37°C. Para uma ótima dissociação dos três hormônios, entretanto, foram necessárias diferentes concentrações de ácido acético.

A Tabela 3 mostra que para o hFSH, com 3M de ácido acético os rendimentos de dissociação das subunidades α e β estão concordantes com aqueles calculados com base nas massas determinadas por MALDI-TOF (Tabela 2), respectivamente, de 46,7% e 53,3%. Nestas condições também foi alcançada uma boa recuperação (~ 98%).

Tabela 3 – Dissociação de r-hFSH em subunidades α e β quando incubado durante 16 horas, a 37°C, com diferentes concentrações de ácido acético

Concentração de ácido acético (M)	Recuperação $\alpha + \beta$ (%)	Rendimento da dissociação	
		Rendimento α (%)	Rendimento β (%)
0,5	98,6	37,7	62,3
1,0	100,0	39,2	60,8
3,0 ^a	98,2	47,4	52,6

^a Condição escolhida

Para a dissociação completa do hLH foi necessária uma concentração mais elevada de ácido acético do que para o hFSH. A Tabela 4 mostra que com 5M de ácido acético obtém-se uma boa recuperação (100%) e os rendimentos das subunidades α e β estão concordantes com aqueles calculados com base nas massas determinadas por MALDI-TOF (Tabela 2), respectivamente, de 47,5% e 52,5%.

Tabela 4 – Dissociação de r-hLH em subunidades α e β quando incubado durante 16 horas, a 37°C, com diferentes concentrações de ácido acético

Concentração de ácido acético (M)	Recuperação $\alpha + \beta$ (%)	Rendimento da dissociação	
		Rendimento α (%)	Rendimento β (%)
0,8	81,0	80,8	19,2
1,5	98,0	65,0	35,0
3,0	100,0	48,8	51,2
5,0 ^a	100,0	48,1	51,9

^a Condição escolhida

A Tabela 5 mostra que a concentração ideal de ácido acético para uma completa dissociação do hTSH foi 0,4M, concentração esta doze vezes menor do que a necessária para dissociar o hLH. Uma ótima recuperação (100%) foi obtida nesta condição e os rendimentos das subunidades α e β estão concordantes com aqueles calculados com base nas massas determinadas por MALDI-TOF (Tabela 2), respectivamente, de 47,1% e 52,9%.

Tabela 5 – Dissociação de r-hTSH em subunidades α e β quando incubado durante 16 horas, a 37°C, com diferentes concentrações de ácido acético

Concentração de ácido acético (M)	Recuperação $\alpha + \beta$ (%)	Rendimento da Dissociação	
		Rendimento α (%)	Rendimento β (%)
0,1	61,1	69,4	30,5
0,2	54,2	58,0	42,0
0,3	82,3	56,3	43,7
0,4 ^a	100,0	46,6	53,4
0,5	81,2	43,6	56,4
1,0	78,0	42,8	57,2

^a Condição escolhida

Uma eficiência média de dissociação de $98,8 \pm 0,1\%$ foi alcançada quando amostras de r-hFSH, r-hLH e r-hTSH foram submetidas à dissociação nas condições otimizadas (Figura 5 e Tabela 6). Resultados análogos foram encontrados para as preparações hipofisárias (Figura 6 e Tabela 7).

Tabela 6 - Dissociação dos glicohormônios derivados de células CHO em subunidades α e β quando incubados, durante 16 horas, a 37°C, com a concentração ótima de ácido acético

Hormônio	Concentração de ácido acético (M)	Rendimentos de dissociação		Composição estequiométrica		Eficiência da dissociação (%)
		% α	% β	% α	% β	
r-hFSH	3,0	47,4	52,6	46,7	53,3	98,7
r-hLH	5,0	48,1	51,9	47,5	52,5	98,8
r-hTSH	0.4	46,6	53,4	47,1	52,9	98,9

Figura 5 – Separação das subunidades α e β dos hormônios glicoproteicos recombinantes via RP-HPLC (A) r-hFSH após incubação com ácido acético 3M, (B) r-hLH após incubação com ácido acético 5M, (C) r-hTSH após incubação com ácido acético 0,4M. As condições cromatográficas para cada hormônio são descritas em Material e Métodos. As setas indicam o t_R das subunidades α e β do NIDDK, determinadas em corridas cromatográficas separadas.

Tabela 7 - Dissociação dos glicohormônios de origem hipofisária em subunidades α e β quando incubados, durante 16 horas, a 37°C, com a concentração ótima de ácido acético

Hormônio	Concentração de ácido acético (M)	Rendimentos de dissociação		Composição estequiométrica		Eficiência da dissociação (%)
		% α	% β	% α	% β	
p-hFSH	3,0	45,7	54,3	46,7	53,3	98,2
p-hLH	5,0	47,1	52,9	49,1	50,9	95,9
p-hTSH	0.4	46,6	53,4	47,4	52,6	98,3

Nas Figuras 5 e 6, as posições de eluição das subunidades purificadas de origem hipofisária, obtidas do NHPP, são indicadas por setas confirmando a identidade das subunidades α e β resultantes da dissociação dos três hormônios glicoproteicos recombinantes e nativos.

A soma dos picos correspondentes às subunidades α e β foi sempre maior que 95% da quantidade de material original não dissociado, o que mostra que a reação de dissociação e as condições empregadas não causaram nenhuma perda significativa em virtude de degradação ou agregação.

Figura 6 – Separação das subunidades α e β dos hormônios glicoproteicos hipofisários via RP-HPLC (A) p-hFSH após incubação com ácido acético 3M, (B) p-hLH após incubação com ácido acético 5M, (C) p-hTSH após incubação com ácido acético 0,4M. As condições cromatográficas para cada hormônio são descritas em Material e Métodos. As setas indicam o t_R das subunidades α e β do NIDDK, determinadas em corridas cromatográficas separadas.

4.3 ISOLAMENTO DAS SUBUNIDADES

Rendimentos em geral acima de 80% (Tabela 8) foram obtidos quando as subunidades α e β foram isoladas por RP-HPLC, em coluna C₄. Para as subunidades assim isoladas foi observada uma elevada pureza, como exemplificado para o r-hTSH (Figura 7) e para o p-hTSH (Figura 8), analisados em HPSEC e RP-HPLC. Observamos picos mais estreitos, em geral, para os produtos recombinantes, o que indica a presença de uma maior heterogeneidade no caso dos produtos naturais.

Tabela 8 - Recuperação das subunidades α e β após dissociação dos hormônios glicoprotéicos derivados de células CHO com ácido acético e separação via RP-HPLC (n = 4)

Hormônio	Recuperação da subunidade α (%)	Recuperação da subunidade β (%)
hFSH	81,3 $\pm$ 14,4	92,5 $\pm$ 12,1
hLH	92,4 $\pm$ 13,3	78,7 $\pm$ 11,1
hTSH	84,5 $\pm$ 11,3	87,4 $\pm$ 7,7

Figura 7 – Análise das subunidades α -rhTSH e β -rhTSH purificadas por RP-HPLC (A) HPSEC; (B) RP-HPLC. A condição de eluição empregada para esta comparação é descrita em Materiais e Métodos.

Figura 8 - Análise das subunidades α -phTSH e β -phTSH purificadas por RP-HPLC (A) HPSEC; (B) RP-HPLC. A condição de eluição empregada para esta comparação é descrita em Materiais e Métodos.

4.4 REASSOCIAÇÃO DAS SUBUNIDADES α E β

Para avaliar se ocorreram alterações na estrutura das glicoproteínas após a dissociação com ácido acético, subunidades α e β de hTSH recombinante foram incubadas juntas, durante 4 dias, a temperatura ambiente, sob agitação.

O perfil cromatográfico em RP-HPLC das subunidades obtidas após a reação de dissociação é mostrado na Figura 9A. Enquanto após dois dias de incubação observa-se uma recombinação parcial (~ 60%) das subunidades, com heterodímero de $t_R=33,4$ (Figura 9B), já no quarto dia de incubação foi observada uma reassociação total (~ 100%) das subunidades α e β (Figura 9C). O tempo de retenção do heterodímero formado após 4 dias é menor do que o tempo de retenção da preparação recombinante padrão (33,10 min) tratando-se possivelmente de uma forma desamidada. Isto provavelmente se deve ao fato da incubação das subunidades ter ocorrido a temperatura ambiente e sob agitação, ambas condições propícias à formação de formas desamidadas (Ribela, 2006).

A reassociação das subunidades pode também ser observada na análise por HPLC de exclusão molecular (Figura 10), uma associação parcial no segundo dia (Figura 10A) e praticamente total após quatro dias de incubação (Figura 10B). O pico que apresenta tempo de retenção > 23 min corresponde ao ácido acético (Figura 10C). O tempo de retenção observado para o heterodímero após associação é maior de ~ 1 minuto com relação ao tempo de retenção (18,0 min) da preparação de referência. Isto pode estar relacionado com alguma alteração fina na estrutura do heterodímero.

Figura 9 – Perfis cromatográficos em RP-HPLC: (A) Dissociação do r-hTSH com 0,4M de ácido acético; (B) Subunidades α e β do r-hTSH incubadas juntas durante dois dias; (C) Subunidades α e β do r-hTSH incubadas juntas durante quatro dias. As condições cromatográficas são descritas em Material e Métodos. O tempo de retenção da preparação heterodimérica recombinante padrão, nestes experimentos foi de 33,10 minutos.

Figura 10- Perfil cromatográfico em HPSEC: (A) Subunidades α e β do r-hTSH incubadas juntas durante dois dias; (B) Subunidades α e β do r-hTSH incubadas juntas durante quatro dias; (C) Ácido acético. As condições cromatográficas são descritas em Material e Métodos. O tempo de retenção da preparação heterodimérica recombinante padrão, nestes experimentos foi de 18,01 minutos.

4.5 ANÁLISE POR HPSEC

A Figura 11 mostra as posições de eluição em HPSEC das subunidades α e β e dos heterodímeros dos três hormônios glicoproteicos hipofisários estudados nesse trabalho. A HPSEC, sendo uma ferramenta cujo princípio de separação é baseado nas diferenças de tamanho molecular, permitiu uma avaliação aproximada comparativa das massas das diferentes preparações.

Entre os heterodímeros, o que apresentou o maior tempo de retenção (t_R) foi o hTSH e aquele que apresentou o menor foi o hFSH. O hFSH foi portanto, o maior dos três hormônios e o hTSH, o menor deles.

Enquanto as subunidades α apresentaram aproximadamente os mesmos valores de t_R , as subunidades β mostraram uma variação maior. A subunidade β do hFSH é a que apresenta o menor tempo de retenção e, portanto, a maior massa molecular, enquanto a subunidade β do hTSH é a que apresenta a menor massa molecular relativa.

Diferenças significativas na massa molecular relativa (M_r) entre as subunidades recombinantes e hipofisárias foram também detectadas por HPSEC como é exemplificado para o hTSH (Tabela 9). Diferenças análogas tinham sido observadas também para o heterodímero em trabalho anterior do nosso laboratório (Oliveira, 2003).

Tabela 9 Subunidades α e β de hTSH hipofisário e recombinante, analisadas em HPSEC

Amostra	$t_R \pm DP^a$ (min)	DPR ^b (%)	Diferença relativa à preparação nativa (%)	Nível de significância
pit α -hTSH	$18,53 \pm 0,03$	0,16	—	
rec α -hTSH	$18,09 \pm 0,03$	0,17	- 2,40	$p < 0,001$
pit β -hTSH	$20,34 \pm 0,03$	0,15	—	
rec β -hTSH	$20,16 \pm 0,10$	0,50	-0,90	$p < 0,05$

^aMédia $\pm$ desvio padrão (n=3)

^bDPR, desvio padrão relativo, expresso em porcentagem da média

Figura 11 - Perfis cromatográficos dos heterodímeros e das subunidades α e β dos três hormônios glicoproteicos hipofisários determinados por HPSEC. A condição de eluição empregada para esta comparação é descrita em Materiais e Métodos.

4.6 ANÁLISE POR RP-HPLC

A RP-HPLC, uma ferramenta cuja separação baseia-se em diferenças de hidrofobicidade, permitiu comparar a hidrofobicidade relativa das subunidades purificadas. Enquanto as subunidades α apresentaram aproximadamente os mesmos valores de t_R (ou hidrofobicidade), as subunidades β mostraram uma variação bem maior (Figura 12). A diferença entre β -hLH, a subunidade mais hidrofóbica, e β -hFSH, a subunidade menos hidrofóbica, é notável. Quando as subunidades recombinantes e hipofisárias de hTSH foram comparadas, observaram-se diferenças altamente significativas entre as subunidades α e diferenças menores, embora significativas ($p < 0,2$), para as subunidades β (Tabela 10).

Tabela 10 Subunidades α e β -hTSH hipofisárias e recombinantes analisadas em RP-HPLC

Amostra	$t_R \pm DP^a$ (min)	DPR ^b (%)	Diferença relativa à preparação nativa (%)	Nível de significância
pit α -hTSH	$32,64 \pm 0,05$	0,15	—	
rec α -hTSH	$31,62 \pm 0,11$	0,35	- 3,10	$p < 0,001$
pit β -hTSH	$35,42 \pm 0,15$	0,42	—	
rec β -hTSH	$35,66 \pm 0,18$	0,51	+ 0,68	$p < 0,20$

^aMédia $\pm$ desvio padrão (n=4)

^bDPR, desvio padrão relativo, expresso em porcentagem da média

Também para os heterodímeros, o hormônio mais hidrofóbico foi o hLH como mostra a Figura 13, onde os heterodímeros dos três hormônios são analisados sob as mesmas condições. Nessas condições, o hFSH heterodimérico dissocia-se (Loureiro, 2006).

Figura 12 - Hidrofobicidade relativa das subunidades α e β dos três hormônios glicoproteicos recombinantes determinada por RP-HPLC em diferentes corridas. A condição de eluição empregada para esta comparação é descrita em Materiais e Métodos.

Figura 13 - Hidrofobicidade relativa dos três hormônios glicoproteicos hipofisários (p) determinada por RP-HPLC em diferentes corridas. A condição de eluição empregada para esta comparação é descrita em Materiais e Métodos.

4.7 ANÁLISE EM SDS-PAGE

A mobilidade eletroforética das glicoproteínas de origem hipofisária e derivada de células CHO foi analisada por SDS-PAGE, em condições redutoras e não redutoras.

Os protocolos usuais utilizados para esta técnica prevêm a fervura da amostra a ser analisada. Entretanto, ao realizar o SDS-PAGE em condições não redutoras observou-se que os heterodímeros se dissociam em suas subunidades α e β , como é mostrado na Figura 14A, B e C, respectivamente, para hFSH, hLH e hTSH, o mesmo não acontecendo quando a amostra não era fervida. Por essa razão, nas análises posteriores de SDS-PAGE, os hormônios glicoproteicos heterodiméricos não foram fervidos. Já as subunidades α e β quando submetidas à SDS-PAGE em condições não redutoras não apresentaram diferenças quando submetidas à fervura, como é mostrado na Figura 15 para as subunidades do hLH de origem hipofisária.

Os heterodímeros dos três hormônios, de origem hipofisária e recombinante, não fervidos foram então analisados em condições não redutoras (Figura 16). Tanto para os hormônios nativos quanto para os hormônios recombinantes a maior taxa de migração foi observada para o hLH e a menor para o hTSH. O hFSH apresentou uma massa molecular aparente (M_r) entre 45 e 66kDa, o hLH entre 30 e 45kDa e o hTSH entre 66 e 97kDa.

A identidade das subunidades α e β hipofisárias por nós preparadas foi avaliada correndo em um mesmo gel, em condições não redutoras, as subunidades já purificadas do NIDDK. Já para os hormônios recombinantes não existem disponíveis subunidades purificadas dos três hormônios recombinantes. A identidade das subunidades recombinantes por nós preparadas foi então

verificada correndo em um mesmo gel, em condições redutoras, as subunidades preparadas e o heterodímero de cada hormônio, uma vez que sob condições redutoras o heterodímero se dissocia (Figura 17).

Na Figura 18 são apresentados os perfis eletroforéticos das subunidades α e β preparadas neste trabalho, tanto de origem hipofisária como recombinante.

A migração eletroforética observada para as subunidades α dos três hormônios é praticamente a mesma, sejam elas hipofisárias ou recombinantes. No caso das subunidades β , observou-se que as hipofisárias e recombinantes de hFSH são as que têm uma menor taxa de migração e portanto, a maior massa molecular aparente (M_r).

Tanto no caso das subunidades α quanto das subunidades β observou-se uma diferença de migração entre as preparações hipofisárias e recombinantes.

Figura 14 - SDS-PAGE em condições não redutoras do p-hFSH (A), p-hLH (B) e p-hTSH (C) heterodiméricos, fervidos (F) e não fervidos (NF), em comparação com as subunidades purificadas do NIDDK. Padrões de massa molecular são indicados nos poços 1, 2 e 7.

Figura 15 - SDS-PAGE em condições não redutoras das subunidades α e β do p-hLH, fervidas (F) e não fervidas (NF). Padrões de massa moleculares são indicados nos poços 1,2 e 7.

Figura 16 - SDS-PAGE, em condições não redutoras, das preparações hipofisárias (A) e recombinantes (B) dos heterodímeros hFSH, hLH e hTSH, não fervidos. Padrões de massa moleculares são indicados nos poços 1, 2 e 6.

Figura 17 – SDS-PAGE em condições redutoras de preparações recombinantes de hFSH (A) e hTSH (B) e de subunidades recombinantes por nós preparadas. Padrões de massa moleculares são indicados nos poços 1, 2 e 6.

Figura 18 - SDS-PAGE em condições não redutoras das subunidades α (A) e β (B), hipofisárias (p) e recombinantes (r), dos hormônios glicoproteicos coletados da RP-HPLC após dissociação com ácido acético. Padrões de massa moleculares são indicados nos poços 1 e 2.

4.8 DISTRIBUIÇÃO DOS ISÔMEROS DE CARGA

A análise dos isômeros de carga das preparações de origem hipofisária das três glicoproteínas e suas subunidades foi feita mediante focalização isoeletrica (IEF), sendo os perfis encontrados mostrados na Figura 19. Uma grande heterogeneidade de cargas foi observada para as preparações analisadas.

As preparações hipofisárias do hFSH apresentaram cinco bandas, distribuídas entre pH 4,01 e pH 5,20 para o heterodímero. Para a subunidade α , três bandas foram visualizadas no intervalo de 4,26 a 5,85 e para a subunidade β , quatro bandas no intervalo de 4,26 a 5,20.

As preparações hipofisárias do hLH apresentaram três bandas distribuídas no intervalo de pH de 7,35 a 8,33 para a forma heterodimérica. Para a subunidade α , duas bandas foram visualizadas no intervalo de pH de 5,30 a 5,85, e para a subunidade β foram visualizadas duas bandas no intervalo de pH de 7,35 a 8,15.

As preparações hipofisárias do hTSH apresentaram oito bandas, distribuídas entre pH 5,20 e pH 7,35 para o heterodímero. Para a subunidade α , quatro bandas foram visualizadas no intervalo de 5,76 a 8,15 e para a subunidade β foram visualizadas quatro bandas no intervalo de 5,39 a 6,55.

A distribuição dos isômeros de carga das formas heterodiméricas e das subunidades α e β dos três hormônios glicoproteicos hipofisários foi predominantemente na região ácida para o hFSH, na região básica para o hLH, e em ambas as regiões (ácida e básica) para o hTSH.

Figura 19 – Focalização isoelétrica (IEF) dos três hormônios glicoproteicos hipofisários: p-hFSH (A); p-hLH (B); p-hTSH (C). Marcadores de ponto isoelétrico: poços 1 e 5; h: heterodímero; α : subunidade α ; β : subunidade β .

A Figura 20 mostra a distribuição de isômeros de carga para as preparações hipofisárias e recombinantes de hTSH e das suas subunidades α e β . Para a forma heterodimérica pituitária foram encontrados dois isômeros de carga a mais do que na preparação recombinante, em uma região ácida. A subunidade α da glicoproteína recombinante apresentou uma banda a menos que a preparação nativa enquanto que, a subunidade β recombinante apresentou o mesmo número de bandas distribuídas, entretanto, em uma região mais básica, entre pH 5,85 e pH 8,65.

Figura 20 – Focalização isoelétrica (IEF) das preparações hipofisárias (A) e recombinantes (B) dos heterodímeros hTSH e suas subunidades. Marcadores de ponto isoelétrico: poços 1 e 5; α : subunidade α ; β : subunidade β .

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi estabelecida uma metodologia simples e prática para a completa e efetiva dissociação dos hormônios glicoprotéicos hipofisários hFSH, hLH e hTSH. A técnica padronizada apresentou uma eficiência de dissociação de quase 100%, calculada com base na composição estequiométrica das subunidades α e β de cada hormônio, cujas massas foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. Com modificações apropriadas, esta técnica poderá ser aplicada às proteínas heterodiméricas em geral, permitindo a obtenção de subunidades puras, recombinantes e hipofisárias, para serem utilizadas em pesquisa ou aplicações clínicas, e especialmente úteis para uma melhor caracterização da composição de carboidratos de cada uma das subunidades.

A utilização de ácido acético como agente dissociador, em concentrações diferentes para cada hormônio, permitiu a obtenção de subunidades α e β , sem maiores alterações da estrutura das glicoproteínas, como ficou demonstrado pela reassociação das mesmas, uma vez incubadas juntamente. A maior parte dos trabalhos reportados na literatura para a dissociação destes glicohormônios utilizou compostos orgânicos com alta força iônica, tal como a guanidina 6M (Chlenov, 1993, Hyama, 1990, Parson, 1984). Pelo que é de nosso conhecimento, o ácido acético foi utilizado para estes fins, pela primeira vez no presente trabalho, embora haja referência do uso de ácido propiônico para a obtenção das subunidades do hTSH (Jacobson, 1978), um ácido com características semelhantes ao ácido acético. Os hormônios hFSH e

hLH foram os mais difíceis de serem dissociados sob a ação do ácido acético, sendo necessária uma concentração bastante alta, 3M e 5M respectivamente, para uma efetiva dissociação. Estas concentrações foram aproximadamente dez vezes maior do que a necessária para a obtenção das subunidades do hTSH (0,4M).

A purificação realizada após a reação de dissociação, em HPLC de fase reversa, com uma coluna C₄, em condições de eluição adaptadas a cada hormônio, permitiu o isolamento de subunidades α e β puras dos três hormônios hipofisários com recuperações mais altas daquelas relatadas na literatura (Parson, 1984; Hyama, 1990; Chlenov, 1993). Enfatizamos ainda que, nos trabalhos publicados, foram usadas quantidades bem maiores de material daquelas utilizadas no presente trabalho, bem como em nenhum deles foram analisados produtos recombinantes. Nossos dados permitiram realizar, além de uma extensiva caracterização das subunidades, também uma comparação direta entre as propriedades físico-químicas de cada subunidade, seja ela de origem recombinante ou hipofisária.

A espectrometria de massa MALDI-TOF tem se mostrado uma ferramenta muito útil para estabelecer a identidade, ou as diferenças principais entre preparações recombinantes e nativas. Para os três hormônios estudados no presente trabalho foram observadas diferenças nas massas moleculares das subunidades α e β e dos heterodímeros de origens diferentes (derivados de células CHO ou derivados da hipófise). As maiores diferenças entre as massas do hormônio recombinante e do hormônio nativo (~ 6-8%) foram encontradas para as

formas heterodiméricas e para as subunidades do hTSH. Estas diferenças de massa resultam em diferenças significativas do raio molecular e, portanto, das propriedades hidrodinâmicas da molécula (Ribela, 1988). De fato, pela análise das taxas de migração em SDS-PAGE e tempo de retenção em HPSEC, técnicas que refletem estas propriedades da molécula, foi possível também detectar diferenças entre preparações recombinantes e hipofisárias. Estes parâmetros são particularmente interessantes em termos de caracterização farmacêutica de drogas biossintéticas. Salientamos ainda a importância da detecção simultânea das massas do heterodímero e das subunidades, nas análises de MALDI-TOF, sem a necessidade de se efetuar uma ligação química para impedir sua dissociação.

Uma comparação direta das propriedades hidrofóbicas das seis subunidades recombinantes isoladas, realizada através de RP-HPLC, usando a mesma condição de eluição, permitiu definir uma escala de hidrofobicidade para a subunidade β : β -hFSH < β -hTSH < β -hLH. Uma escala semelhante foi anteriormente obtida para os heterodímeros (Loureiro, 2006). Este mesmo tipo de enfoque analítico por RP-HPLC pode também ser útil para a detecção de subunidades livres, indesejáveis em preparações farmacêuticas. O tempo de retenção da RP-HPLC, utilizado neste trabalho como um índice de hidrofobicidade, permitiu também detectar pequenas diferenças estruturais, provavelmente relacionadas às diferenças de carboidratos entre preparações recombinantes e hipofisárias. Isto está de acordo com a afirmação de El-Rassi (El-Rassi, 1996) de que a micro heterogeneidade dos carboidratos contribui de alguma forma nas interações moleculares em RP-HPLC.

A distribuição dos isômeros de carga do heterodímero e das subunidades α e β do hFSH e do hLH foi determinada apenas para os hormônios nativos, isto é derivados de células hipofisárias, considerando especialmente o alto custo das preparações comerciais de hFSH e de hLH recombinantes. Na comparação feita para o hTSH, com preparações recombinantes e hipofisárias, foram observadas algumas diferenças, como era de se esperar considerando que a heterogeneidade de carga da molécula reflete diferenças na glicosilação e em particular a variação do conteúdo de ácido siálico (Oliveira, 2008). É interessante comentar que as 4-5 bandas visualizadas para as subunidades α e β do hTSH (Figura 16) podem ser comparadas com os dados de Jacobson e col. (1978) e Parson e col. (1984) que encontraram este mesmo número de isômeros de carga para o mesmo hormônio em seus experimentos realizados respectivamente via eletroforese de zona livre e eletroforese convencional em gel de poliacrilamida. Os resultados por nós obtidos para o hFSH hipofisário são similares aos dados de Loumaye e col. (Loumaye, 1998) que encontraram para o hFSH urinário seis bandas, no intervalo de pH de 4,0-5,2. Enfatizamos que o conhecimento e controle da distribuição de isoformas é, sem dúvida, um controle farmacêutico fundamental, especialmente para produtos injetáveis em humanos.

Salientamos que a maioria dos dados aqui apresentados foram incluídos em trabalho submetido à Journal of Chromatography A (Carvalho e col., submetido).

6 CONCLUSÕES

- Os hormônios hFSH, hLH e hTSH, de origem hipofisária ou recombinante, foram dissociados em suas subunidades α e β , quando incubados com respectivamente 3, 5 e 0,4M de ácido acético, a 37°C, durante 16 horas.
- A eficiência de dissociação destes hormônios, calculada com base nas massas determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF, foi > 98%.
- Nenhuma mudança irreversível, capaz de impedir sua reassociação, ocorreu nas estruturas das subunidades α e β quando incubadas juntamente.
- Subunidades α e β puras dos três hormônios foram obtidas via RP-HPLC, com recuperações da ordem de 80-90%.
- Subunidades α , quando analisadas com relação à hidrofobicidade, mostraram valores muito próximos, enquanto as subunidades β mostraram a seguinte escala de hidrofobicidade: β -hFSH < β -hTSH < β -hLH. Esta mesma escala de hidrofobicidade tinha sido encontrada também para os heterodímeros.
- Entre as subunidades α e β dos três hormônios, as do hFSH apresentaram a maior massa molecular enquanto as subunidades do hLH foram as menores.

- A distribuição dos isômeros de carga das subunidades dos três hormônios, bem como dos heterodímeros, ocorreu em uma região ácida, para o hFSH, em uma região básica, para o hLH e em ambas as regiões, para o hTSH.

- As subunidades α dos três hormônios quando analisadas via SDS-PAGE apresentaram praticamente a mesma mobilidade eletroforética, enquanto as subunidades β apresentaram diferentes taxas de migração (m_R) sendo $m_R \beta\text{-hFSH} < m_R \beta\text{-hTSH} < m_R \beta\text{-hLH}$.

- Diferenças na massa molecular, na hidrofobicidade, na migração eletroforética e na distribuição de carga foram observadas entre as preparações recombinantes e hipofisárias dos três hormônios.

- É nossa opinião que a FDA e as agências reguladoras em geral estabeleçam documentos específicos relativos à análise e a critérios de aceitabilidade das estruturas de carboidratos presentes em bioterapêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORESANO, A.; SICILIANO, R.; ORRU, S.; NAPOLEONI, R.; ALTAROCCA, V.; DE LUCA, E.; SIRNA, A.; PUCCI, P. Structural characterization of human recombinant glycohormones follitropin, lutropin and choriogonadotropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Biochem.*, v. 242, p. 608-618, 1996.

BLITHE, D.L.; LIES R.K. The role of glycosylation in regulating the glycoprotein hormone free α -subunit and free β -subunit combination in the extraembryonic coelomic fluid of early pregnancy. *Endocrinology*, v. 136, p. 903-909, 1995.

BOUSFIELD, G.R.; BUTNEV, V.Y.; WALTON, W.J.; NGUYEN, V.T.; HUNEIDI, J.; SINGH, V.; KOLLI, V.S.K.; HARVEY, D.J.; RANCE, N.E. All-or-none N-glycosylation in primate follicle-stimulating hormone β subunits. *Mol. Cel. Endocrinol.*, v. 260, p. 40–48, 2007.

CARVALHO, C.M.; OLIVEIRA, J.E.; ALMEIDA, B.E.; UEDA, E.K.M.; TORJESEN, P.A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Efficient subunit isolation of recombinant and pituitary glycoprotein hormones. *Submetido*.

CHLENOV, M.A.; KANDYBA, E.I.; NAGORNAYA, L.V.; ORLOVA, I.L.; VOLGIN, Y.V. High-performance liquid chromatography of human glycoprotein hormones. *J. Chromatogr.*, v. 631, p. 261-267, 1993.

CHOI, J.H.; WONG, A.S.T.; HUANG H.F.; LEUNG P.C.K. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endo. Rew.*, v. 28, p. 440-461, 2007.

EI-RASSI, Z. Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. *J. Chromatogr. A*, v. 720, p. 93-118, 1996.

FARES, F.A.; YAMABE, S.; MENAHEN, D.B.; PIXLEY, M.; HSUCH, A.J.W.; BOIME, I. Conversion of thyrotropin heterodimer to a biologically active single-chain. **Endocrinology**, v. 139, p. 2459-2464, 1998.

GALET, C.; LECOMPTE, F.; COMBARNOUS, Y. Association/dissociation of gonadotropin subunits involves disulfide bridge disruption which is influenced by carbohydrate moiety. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 324, p. 868-873, 2004.

HARA, K.; RATHANAM, P.; SAXENA, B. B. Structure of the carbohydrate moieties of α subunits of human follitropin, lutropin and thyrotropin. **J. Biol. Chem.**, v. 253, p. 1582-1591, 1978.

HARTREE, A.S.; RENWICK, A.G.C. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. **Biochem. J.**, v. 287, p. 665-679, 1992.

HIYAMA, J.; RENWICK, A.G.C. Separation of human glycoprotein hormones and their subunits by reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 529, p. 33-41, 1990.

HORSMAN, G.; TALBOT, J.A.; McLOUGHLIN, J.D.; LAMBERT, A.; ROBERTSON, W.R. A biological, immunological and physico-chemical comparison of the current clinical batches of the recombinant FSH preparations Gonal-F and Puregon. **Hum. Reprod.**, v. 15, p. 1898-1902, 2000.

HOWLES, C.M., Genetic engineering of the human FSH molecule. **Hum. Reprod.**, v. 2, p. 172-191, 1996.

HOWLES, C.M. Role of LH and FSH in ovarian function. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 161, p. 25-30, 2000.

JACOBSON, G.; ROOS, P.; WIDE, L. Human pituitary thyrotropin isolation of α and β subunits by hydrophobic interaction chromatography. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 536, p. 363-375, 1978.

LOUMAYE, E.; DREANO, M.; GALAZKA, A.; HOWLES, C.; HAM, L.; MUNAFO, A.; ESHKOL, A.; GIUDICE, E.; DE LUCA, E.; SIRNA, A.; ANTONETTI, F.; GIARTOSIO, C.E.; SCAGLIA, L.; KELTON, C.; CAMPBELL, R.; CHAPPEL, S.; DUTHU, B.; CYMBALISTA, S.; LEPAGE, P. Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. **Hum. Reprod. Update**, v. 4, p. 862-881, 1998.

LOUREIRO, R.F.; OLIVEIRA, J.E.; TORJESSEN, P.A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Analysis of intact human follicle-stimulating hormone preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1136, p. 10-18, 2006.

LUSTER, M. Present status of the use of recombinant human TSH in thyroid cancer management. **Acta Oncol.**, v. 45, p. 1018-1030, 2006.

MENDONÇA, F.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotropin and its immunological, biological, physico-chemical and mass spectral characterization. **J. Chromatogr. A**, v. 1062, p. 103-112, 2005.

OLIVEIRA, J.E.; MENDONÇA, F.; PERONI C.N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Determination of Chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 787, p. 345-355, 2003.

OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; VORAUER-UHL, K.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Influence of a reduced CO₂ environment on the secretion yield, potency

and N-glycan structures of recombinant thyrotropin from CHO cells. **Mol. Biotechnol.**, v. 39, p. 159-166, 2008.

PARSONS, T.F.; STRICKLAND, T.W.; PIERCE, J.G. Rapid and easy separation of the subunits of bovine and human glycoprotein hormones by use of high performance liquid chromatography. **Endocrinology**, v. 114, p. 2223-2226, 1984.

PIERCE, J. G.; PARSONS, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 50, p. 465-495, 1981.

POPOVIC, V.; DAMJANOVIC, S. The effect of thyrotropin-releasing hormone on gonadotropin and free α -subunit secretion in patients with acromegaly and functionless pituitary tumors. **Thyroid** 8, p. 935-939, 1998.

RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Stokes radius determination of radioiodinated polypeptide hormones by gel filtration. **Anal. Biochem.**, v. 174, p. 693-697, 1988.

RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. **J. Chromatogr. B**, v. 790, p. 285-316, 2003.

RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Curr. Pharm. Anal.**, v. 2, p. 103-126, 2006.

RIGGIN, R.M.; DORULLA, G.K.; MINER, D.J. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for characterization of biosynthetic human growth hormone. **Anal. Biochem.**, v. 167, p. 199-209, 1987.

SETLUR, S.R.; DIGHE, R.R. Single chain human chorionic gonadotropin, hCG $\alpha\beta$: effects of mutations in the α subunit on structure and bioactivity. **Glycoconj. J.**, v. 106, p. 24-97, 2007.

SZKUDLINSKI M.W.; GROSSMANN M.; LEITOLF H.; WEINTRAUB B.D. Human thyroid-stimulating hormone: structure-function analysis. **Methods**, v. 21, p. 67-81, 2000.

SZKUDLINSKI, M.W.; FREMONT, V.; RONIN, C.; WEINTRAUB, B.D. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure - Function relationships. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 473-502, 2002.

ULLOA-AGUIRRE, A.; TIMOSSI, C.; BARRIOS-DE-TOMASI, J.; MALDONADO, A.; NAYUDU, P. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 379-389, 2003.