INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DETERMINAÇÃO DE POTÊNCIA DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE
FOLICULOTROFINA, LUTEOTROFINA E TIREOTROFINA: COMPARAÇÃO
ENTRE A QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE
REVERSA E POR BIOENSAIO *IN VIVO***

BEATRIZ ELANE DE ALMEIDA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações.**

**Orientadora:
Profa. Dra. Maria Teresa C. P. Ribela**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

SÃO PAULO
2013

*Aos meus pais Erclia e Pedro, ao meu
noivo Emerson, aos seus pais Geni e José e a
toda minha família e amigos, pelo constante amor e
apoio. Em especial aos meus afilhados Karina e
Luan, pela doçura de seus olhares.*

Agradecimentos

A Deus, por Seu amor incondicional.

À Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, pela orientação e confiança, mais uma vez o meu reconhecimento e gratidão.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela atenção e contribuição neste trabalho.

Ao amigo Johnny, por todo ensinamento e companheirismo.

À Dra. Cibele N. Peroni, Dra. Kayo Okazaki e Dr. Carlos R. J. Soares, pelo incentivo e colaboração.

Às amigas, Arlete, Cláudia, Dani, Ednéia, Eliana, Eliza, Fernanda, Flávia, Geiza, Gi, Giuliana, Ivete, Juliana, Karina, Keli, Larissa, Marina, Mariana, Márcia, Miriam, Natália, Neide, Patrícia, Regina, Renata, Rosa, Rosângela, Rute, Susana, Taís, Thais, e Tamara, pelo incentivo, ajuda e pelas boas risadas. Valeu meninas!

Aos amigos, Bruno, Flávio, Herbert, José Maria, Junqueira, Marcos, Nélcio, Perez, Roberto, Rodrigo, Patrick, Vicent companheiros sempre prontos a ajudar.

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

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

***“ Viver é como andar de bicicleta:
É preciso estar em constante
movimento para manter
o equilíbrio.”***

(Albert Einstein)

**DETERMINAÇÃO DE POTÊNCIA DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE
FOLICULOTROFINA, LUTEOTROFINA E TIREOTROFINA: COMPARAÇÃO
ENTRE A QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE
REVERSA E POR BIOENSAIO *IN VIVO***

Beatriz Elane de Almeida

RESUMO

Com a intenção de estabelecer métodos físico-químicos como uma alternativa ao bioensaio *in vivo* para determinação de atividade biológica, o conteúdo de hFSH, hTSH e hLH de diferentes preparações, nativas e recombinantes, foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e comparado ao dado obtido pelo clássico bioensaio *in vivo* em camundongos ou ratos (BA). Para estes hormônios foi encontrada uma relação linear entre os dois métodos: hFSH $BA_{UI} = 0,9925 RP-HPLC_{UI} - 1,3165$, $r = 0,9371$, $p < 0,001$, $n = 24$; hTSH $BA_{\mu g} = 0,9790 RP-HPLC_{\mu g} - 0,052$, $r = 0,8725$, $p < 0,001$, $n = 14$; hLH $BA_{UI} = 0,8771 RP-HPLC_{UI} + 12,41$; $r = 0,9786$, $p < 0,01$, $n = 5$. Para outras nove preparações de hFSH e onze preparações de hTSH foi determinada a diferença média ($\bar{d}$) entre a bioatividade predita pela RP-HPLC através destas equações e da média das bioatividades obtidas com os dois métodos. Para o hLH não foi possível determinar esta diferença em virtude das poucas amostras disponíveis. No caso do hFSH, $\bar{d} \pm DP = -2,11 \pm 3,49 \%$ sendo a precisão de 1,16% e no caso do hTSH, $\bar{d} \pm DP = -2,01 \pm 5,56 \%$ com precisão de 1,68%. Amostras parcialmente alteradas apresentaram diferentes graus de atividade de hFSH, hTSH e hLH que puderam ser preditas por RP-HPLC com uma aceitável concordância com os bioensaios *in vivo*. Estes resultados demonstraram que o emprego de um ensaio físico-químico sem o uso de animais, tal como a RP-HPLC, é uma alternativa viável ao uso do bioensaio *in vivo* para a determinação da potência de hFSH e hTSH, reduzindo assim o número de animais em geral utilizados para assegurar a qualidade e eficácia de um produto farmacêutico.

**POTENCY DETERMINATION OF FOLLITROPIN, LUTROPIN AND
THYROTROPIN: A COMPARISON BETWEEN THE QUANTIFICATION BY
REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
AND IN VIVO BIOASSAY**

Beatriz Elane de Almeida

ABSTRACT

With the intention of setting up physico-chemical methods as an alternative to *in vivo* bioassay for determining biological activity, the hFSH, hTSH and hLH content of native and recombinant preparations was determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and compared with the data obtained by the classical mouse or rat *in vivo* bioassays (BA). A linear relationship between the two methods was found for these hormones: $\text{hFSH BA}_{\text{IU}} = 0.9925 \text{ RP-HPLC}_{\text{IU}} - 1.3165$, $r = 0.9371$, $p < 0.001$, $n = 24$; $\text{hTSH BA}_{\mu\text{g}} = 0.9790 \text{ RP-HPLC}_{\mu\text{g}} - 0.052$, $r = 0.8725$, $p < 0.001$, $n = 14$; $\text{hLH BA}_{\text{IU}} = 0.8771 \text{ RP-HPLC}_{\text{IU}} + 12.41$, $r = 0.9786$, $p < 0.01$, $n = 5$. For nine other hFSH and eleven hTSH preparations, the mean difference ($\bar{d}$) between the bioactivity predicted from RP-HPLC data via these equations and the mean of the bioactivities obtained with the two methods was as follows. For hLH this difference could not be estimated due to lack of different samples. In the case of hFSH, $\bar{d} \pm \text{SD} = -2.11 \pm 3.49\%$ with a precision of 1.16% and in the case of hTSH, $\bar{d} \pm \text{SD} = -2.01 \pm 5.56\%$, with precision of 1.68%. Partly-degraded hFSH, hTSH and hLH samples presented different activity degrees that could be predicted by RP-HPLC, with an acceptable agreement with the *in vivo* bioassays. These results demonstrate that the employment of a non-animal physico-chemical assay, such as RP-HPLC, is a viable alternative to the use of an *in vivo* bioassay for hFSH and hTSH potency determination, thus reducing the number of animals currently used for assuring quality and efficacy of a pharmaceutical product.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 <i>Material.....</i>	<i>27</i>
3.1.1 <i>Preparações hormonais.....</i>	<i>27</i>
3.1.2 <i>Preparações hormonais potencialmente alteradas.....</i>	<i>28</i>
3.1.3 <i>Animais.....</i>	<i>28</i>
3.1.4 <i>Reagentes.....</i>	<i>29</i>
3.1.5 <i>Equipamentos e acessórios principais.....</i>	<i>29</i>
3.2 <i>Métodos.....</i>	<i>31</i>
3.2.1 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC).....</i>	<i>31</i>
3.2.2 <i>HPLC de exclusão molecular (HPSEC).....</i>	<i>32</i>
3.2.3 <i>Ensaio biológico.....</i>	<i>33</i>
3.2.3.a <i>Ensaio biológico de preparações de hFSH.....</i>	<i>33</i>
3.2.3.b <i>Ensaio biológico de preparações de hTSH.....</i>	<i>33</i>
3.2.3.c <i>Ensaio biológico de preparações de hLH.....</i>	<i>34</i>
3.3 <i>Método Estatístico aplicado para validar a comparação entre dois métodos analíticos.....</i>	<i>34</i>
3.4 <i>Parâmetros de uma separação cromatográfica.....</i>	<i>36</i>
4 RESULTADOS.....	37
4.1 <i>Determinação da potência de hFSH.....</i>	<i>37</i>
4.1.a <i>Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC).....</i>	<i>37</i>
4.1.b <i>Ensaio Biológico.....</i>	<i>43</i>
4.1.c <i>Comparação entre as quantificações de hFSH por RP-HPLC e por</i>	

<i>Ensaio Biológico in vivo</i>	44
4.1.d Validação da RP-HPLC para quantificação de hFSH.....	45
4.1.e Análise das preparações potencialmente alteradas de hFSH.....	49
4.2 Determinação da potência de hTSH.....	53
4.2.a Comparação entre as determinações de hTSH por RP-HPLC e por <i>Ensaio Biológico in vivo</i>	53
4.2.b Validação da RP-HPLC para quantificação de hTSH.....	57
4.2.c Análise das preparações potencialmente alteradas de hTSH.....	61
4.3 Determinação da potência de hLH.....	69
4.3.a Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC).....	69
4.3.b Quantificação de amostras íntegras e potencialmente alteradas por RP- HPLC e por <i>Ensaio Biológico in vivo</i>	75
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Características químicas dos hormônios glicoprotéicos hFSH, hLH e hTSH (Ribela, 2006).....	19
TABELA 2 - Condições experimentais empregadas na RP-HPLC para análise do hFSH, hTSH e do hLH.....	31
TABELA 3 - Condições experimentais empregadas na HPSEC para análise do hFSH, hTSH e do hLH.....	32
TABELA 4 - Determinação inter-dias do conteúdo de hFSH em preparações de diferentes origens, por RP-HPLC.....	39
TABELA 5 - Determinação da potência do hFSH por ensaio biológico in vivo...	43
TABELA 6 - Comparação entre a quantificação de preparações de hFSH por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....	44
TABELA 7 - Comparação entre a atividade biológica do hFSH determinada por Bioensaio in vivo e predita pela equação por análise em RP-HPLC.....	46
TABELA 8 - Parâmetros estatísticos, determinados de acordo com Bland e Altman, comparando o valor da bioatividade in vivo com aquela predita por RP- HPLC.....	48
TABELA 9 - Comparação entre a quantificação por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC de preparações de hFSH fora do prazo de validade.....	49
TABELA 10 - Comparação entre a quantificação de preparações de hTSH por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....	54
TABELA 11 - Comparação entre a atividade biológica do hTSH determinada por Bioensaio in vivo e por análise em RP-HPLC.....	58
TABELA 12 - Parâmetros estatísticos, determinados de acordo com Bland e	

<i>Altman, comparando o valor da bioatividade in vivo com aquela predita por RP-HPLC.....</i>	<i>60</i>
<i>TABELA 13 - Comparação entre a atividade de preparações alteradas de hTSH por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....</i>	<i>63</i>
<i>TABELA 14 - Condições estudadas para análise por RP-HPLC da preparação de LH.....</i>	<i>71</i>
<i>TABELA 15 - Condições experimentais a serem empregadas na RP-HPLC para análise de hLH.....</i>	<i>72</i>
<i>TABELA 16 - Parâmetros de desempenho de separação HSA-LH em diferentes condições de RP-HPLC.....</i>	<i>74</i>
<i>TABELA 17 - Parâmetros de qualidade da separação HSA-LH.....</i>	<i>74</i>
<i>TABELA 18 - Comparação entre a quantificação de preparações de hLH íntegras e alteradas por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....</i>	<i>75</i>
<i>TABELA 19 - Comparação entre a atividade de preparações alteradas de hLH por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....</i>	<i>76</i>

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<i>FIGURA 1: Esquema de validação de um método alternativo proposto pelo ECVAM (Leist, 2012).....</i>	15
<i>FIGURA 2: Uso de ensaio in vivo para controle de qualidade de produtos farmacêuticos (Metz, 2007).....</i>	16
<i>FIGURA 3 - Sequência de aminoácidos da subunidade α dos hormônios glicoproteicos.....</i>	20
<i>FIGURA 4 - Sequência de aminoácidos da subunidade β dos hormônios glicoproteicos.....</i>	21
<i>FIGURA 5 - Perfil em HPLC de 2 μg do padrão de referência para ensaios biológicos hFSH recombinante (WHO 92/642). (A) RP-HPLC. (B) HPSEC....</i>	38
<i>FIGURA 6 - Perfil em RP-HPLC de diferentes preparações de hFSH recombinante: rhFSH-A ; rhFSH-B</i>	40
<i>FIGURA 7 - Perfil em RP-HPLC de diferentes preparações de hFSH hipofisário: phFSH-C; phFSH-D.....</i>	41
<i>FIGURA 8 - Perfil em RP-HPLC de diferentes preparações de hFSH urinário: uhFSH-E; uhFSH-F.....</i>	42
<i>FIGURA 9 - Comparação entre a bioatividade predita e in vivo.....</i>	47
<i>FIGURA 10 - Perfil em RP-HPLC de preparações de hFSH recombinante (A) rhFSH-M (B) rhFSH-N</i>	50
<i>FIGURA 11 - Perfil em RP-HPLC da preparação hFSH-O. (A) hFSH-O (B) hFSH-O submetida a aquecimento a 80 °C</i>	52
<i>FIGURA 12 - Perfil em RP-HPLC de 5 μg do padrão de referência para ensaios biológicos hTSH recombinante (WHO 03/192). (A) RP-HPLC; (B) HPSEC.....</i>	55

<i>FIGURA 13 - Perfil em RP-HPLC de preparações de hTSH. (A) preparação rhTSH-O; (B) preparação phTSH-A.....</i>	<i>56</i>
<i>FIGURA 14 - Comparação entre a bioatividade predita e in vivo de preparações de hTSH.....</i>	<i>59</i>
<i>FIGURA 15 - Perfil em RP-HPLC da preparação rhTSH-T. (A) rhTSH-T Controle (B) rhTSH-T fora do prazo de validade (C) rhTSH-T submetida a 5 ciclos de congelamento-descongelamento.....</i>	<i>64</i>
<i>FIGURA 16 - Perfil em RP-HPLC da preparação rhTSH-U. (A) rhTSH-U Controle (B) rhTSH-U submetida a aquecimento a 100°C.....</i>	<i>65</i>
<i>FIGURA 17 - Perfil em RP-HPLC da preparação de hTSH recombinante U. (A) rhTSH-U Controle (B) rhTSH-U submetida a aquecimento a 50°C.....</i>	<i>66</i>
<i>FIGURA 18 - Perfil em RP-HPLC da preparação de hTSH recombinante U. (A) rhTSH-U Controle (B) rhTSH-U submetida a aquecimento a 65°C.....</i>	<i>67</i>
<i>FIGURA 19 - Perfil em HPSEC de 2 µg do padrão de referência para ensaios biológicos hLH recombinante (WHO 96/602).....</i>	<i>69</i>
<i>FIGURA 20 - Perfil em RP-HPLC do padrão de referência para ensaios biológicos hLH recombinante (WHO 96/602) nas condições experimentais descritas por Almeida e colaboradores (2010).....</i>	<i>70</i>
<i>FIGURA 21 - Perfil em RP-HPLC do padrão de referência para ensaios biológicos hLH recombinante (WHO 96/602). (A) condições experimentais descritas por Almeida e colaboradores (2010); (B) novas condições estabelecidas.....</i>	<i>73</i>
<i>FIGURA 22 - Perfil em RP-HPLC da preparação rhLH-C. (A) rhLH-C Controle (B) rhLH-C após aquecimento a 70°C.....</i>	<i>77</i>
<i>FIGURA 23 - Perfil em RP-HPLC da preparação phLH-B. (A) phLH-B Controle (B) phLH-B após aquecimento a 70°C.....</i>	<i>78</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

BP - Farmacopeia Britânica

CHO - Células de Ovário de Hamster Chinês

ECVAM - Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos

EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines

EP - Farmacopeia Europeia

EPO - Eritropoietina

FDA - Food and Drug Administration

FRTL-5 - Células de Tireóide de Rato

FSH - Foliculotrofina

G-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Granulócito

GH - Hormônio de Crescimento

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

HPSEC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Exclusão Molecular

HSA - Albumina de Soro Humano

JP - Farmacopeia Japonesa

LH - Luteotrofina

PTH - Hormônio Recombinante da Paratireóide

RIA - Radioimunoensaio

T3 - 3,3', 5-Triiodo-L-Tironina

T4 - Tiroxina

TRH - Hormônio Liberador da Tireotrofina

TSH - Tireotrofina

USP - Farmacopeia Americana

WHO - World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

Um aspecto importante no controle de qualidade de hormônios utilizados terapeuticamente é a determinação da sua atividade biológica. Para esta finalidade, os modelos animais são amplamente utilizados. Os bioensaios *in vivo* fornecem uma medida adequada da bioatividade bem como da farmacocinética ou farmacodinâmica do hormônio, porém são em geral demorados, trabalhosos, caros, apresentam alto grau de variabilidade inerente aos organismos vivos e utilizam um grande número de animais para obter dados estatisticamente válidos. Em virtude da baixa precisão destes ensaios e da pressão ética e política sobre o uso de animais há, atualmente, uma forte tendência mundial de reduzir e/ou substituir os bioensaios *in vivo* para estimar a potência de produtos farmacêuticos. Diversas agências reguladoras tais como, “European Directorate for the Quality of Medicines” (EDQM), “Food and Drug Administration” (FDA) e “World Health Organization” (WHO), recomendam recorrer a um ensaio *in vivo* apenas naqueles casos em que não é disponível informação suficiente e que esta não pode ser obtida por outros testes (Madden, 2012).

Métodos alternativos ao uso de animais que atendam ao princípio dos “Três Rs” (Reduction, Refinement, Replacement), definido por Russel e Burch (1959), tem sido pesquisados (Miethé, 2002; Hendriksen; 2004; Fenwick, 2005; Fabre, 2008; Obora, 2009). Estes parâmetros são entendidos como: “Reduction”, redução do número de animais ao mínimo; “Refinement”, minimização do dano aos animais tanto na criação quanto nos procedimentos experimentais e “Replacement”, substituição total dos modelos animais por modelos não-animais.

Estes métodos devem ser validados segundo a orientação do ECVAM "Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos", que define a validação de um novo método alternativo como a avaliação da fidedignidade (reprodutibilidade e exatidão) e da capacidade preditiva do método alternativo (correlação com o método clássico) para um determinado fim (Figura 1) (Worth, 2004; Hartung, 2013).

FIGURA 1: Esquema de validação de um método alternativo proposto pelo ECVAM (Leist, 2012)

Neste contexto, várias estratégias alternativas, incluindo os métodos físico-químicos, têm sido relatados na literatura como potenciais ensaios alternativos para a determinação, com maior precisão e exatidão, da atividade biológica de diferentes proteínas. Enquanto alguns defendem a possibilidade de equivalência, ou pelo menos complementaridade, entre métodos físico-químicos e métodos *in vivo* (Halder, 2002; Arora, 2011), outros acreditam que não é possível correlacionar um parâmetro derivado de uma medida sistêmica global com uma determinação mais específica de um analito (Spieser, 2008). Na nossa opinião, sistemas de qualidade para glicohormônios deveriam combinar ambos os enfoques, isto é, utilizar ensaios *in vivo* e ensaios alternativos, aplicados em diferentes etapas do processo de produção e controle de qualidade e, dessa forma, limitar e reduzir significativamente o uso de ensaios com animais.

Para garantir uma alta qualidade do produto final que atenda as especificações para uso farmacêutico é pré-requisito monitorar a consistência da produção, o que deve ser feita através de métodos que estudem propriedades do produto como identidade, estrutura, pureza, sequência de aminoácidos e antigenicidade. Uma combinação de várias técnicas independentes pode fornecer a identidade do produto, que então poderá ser comparado a uma preparação de referência de potência comprovada (Hendriksen, 2009). Enquanto atualmente a proporção de animais utilizados na indústria farmacêutica no controle de qualidade de um biofármaco é muito grande, especialmente nas etapas finais do seu processo, no futuro a tendência é utilizar, seguindo a filosofia dos 3 Rs, um número bem menor de ensaios *in vivo*, sendo a maior proporção de animais utilizada nas etapas iniciais do desenvolvimento do fármaco (Figura 2) (Metz, 2007).

FIGURA 2: Uso de ensaio *in vivo* para controle de qualidade de produtos farmacêuticos (Metz, 2007)

Entre os vários ensaios desenvolvidos que evitam o uso de animais, a cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC) (Riggin, 1988; Bristow, 1992) mostrou-se uma alternativa adequada ao bioensaio *in vivo* realizado em camundongos anões ou hipofisectomizados, para a determinação da potência do hormônio de crescimento humano (hGH), sendo inclusive este ensaio

adotado pelas principais farmacopeias (Wilhelmi, 1973; Bellini, 1993; EP, 2011). Da mesma forma, um método de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em combinação com HPSEC mostrou correlação significativa com os bioensaio *in vivo* para avaliar a potência do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) (Dalmora, 2006) e do hormônio recombinante da paratireóide (rhPTH) (Stamm, 2013).

A substituição de bioensaios por métodos físico-químicos no caso de glicoproteínas é particularmente difícil, principalmente levando em conta a complexidade destas moléculas e a heterogeneidade da sua glicosilação. RP-HPLC, bem como HPSEC, foram propostos como uma possível alternativa para o bioensaio em camundongos normocitêmicos para a determinação da potência de eritropoietina humana recombinante (rhEPO) (Barth, 2007; Ferreto, 2009; Schutkoski, 2013). Utilizando métodos quantitativos de separação baseados em carga, tais como eletroforese capilar e focalização isoelétrica foi possível estimar a atividade *in vivo* do hormônio foliculotrofina (hFSH) puro. Uma correlação altamente significativa entre a distribuição de isoformas e a bioatividade *in vivo* foi demonstrada por Mulder e colaboradores (1997, 1999) e por Storrington e Das (2002). Ainda com relação ao hFSH, a HPSEC, com uma variabilidade menor do que 2%, foi também utilizada com sucesso como alternativa para bioensaios *in vivo*, especialmente durante a fase de produção deste hormônio, para controle da consistência entre diferentes lotes e para a definição do conteúdo das ampolas utilizadas na prática clínica (Driebergen, 2003; Bassett, 2005).

No presente trabalho focamos nossos estudos nos hormônios humanos glicoprotéicos hipofisários, hFSH, luteotrofina (hLH) e tireotrofina (hTSH). Estes hormônios são produzidos e secretados pela glândula hipofisária anterior, em diferentes células, nos gonadotrofos (FSH e LH) em resposta ao estímulo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e nos tireotrofos (TSH) em resposta ao estímulo do hormônio liberador da tireotrofina (TRH) e inibido pelos hormônios da tireóide (T_3 e T_4), em um clássico mecanismo de feedback negativo.

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 (Loumaye, 1998)

Com relação ao LH, na literatura são reportadas várias funções: o hLH participa na regulação ovariana e testicular, tem um papel crítico na maturação folicular, na ovulação, no desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo e intervem na síntese de esteróides, de fatores de crescimento e de citocinas (Rao, 2001; Perera-Marín, 2007).

Além do controle das funções tireoideanas, o TSH está também envolvido na diferenciação morfológica das células da tireóide, na produção e liberação de iodotironinas, na promoção do crescimento da glândula, além de atuar protegendo as células tireoideanas da apoptose e ocupar um papel fundamental na ontogenia (Szkudilinski, 2002).

Os hormônios glicoprotéicos hipofisários são heterodímeros formados por 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 enovelamento (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.

TABELA 1 - Características químicas dos hormônios glicoprotéicos hFSH, hLH e hTSH (Ribela, 2006)

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

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). As massas moleculares destes hormônios recombinantes são 28,5 kDa, 28,8 kDa e 29,6 kDa, respectivamente, para o hFSH, hLH e hTSH (Mendonça, 2005; Loureiro, 2006; Carvalho, 2009).

Os oligossacarídeos das subunidades β destes hormônios têm um papel fundamental na depuração metabólica 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 (Szkudlinski, 2002; Ulloa-Aguirre 2003; Bousfield, 2007).

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 sequência 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 3 e 4). 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.

Ala	Pro	Asp	Va	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	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	Tyr	Tyr	His	90
Lys	Ser									92

FIGURA 3 - Sequência de aminoácidos da subunidade α dos hormônios glicoproteicos

Subunidade beta do hFSH										
Asn	Ser	Cys	Glu	Leu	Thr	Asn	Ile	Thr	Ile	10
Ala	Ile	Glu	Lys	Glu	Glu	Cys	Arg	Phe	Cys	20
Ile	Ser	Ile	Asn	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
Subunidade beta do hLH										
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
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
Subunidade beta do hTSH										
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	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 4 - Sequência de aminoácidos da subunidade β dos hormônios glicoprotéicos

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).

A utilização destes hormônios como agentes terapêuticos tem sido amplamente descrita na literatura (Loumaye, 1998; Howles, 2000; Luster, 2006; Choi, 2007; Shoham, 2008; Zhao, 2011; De Leo, 2012; Bonnema, 2012; Lisi, 2013; Fraietta, 2013).

As principais estratégias utilizadas para a síntese e purificação destes hormônios recombinantes foram amplamente discutidas em revisão que aborda este assunto (Ribela, 2003; Muralidhar, 2008).

A avaliação meticulosa da segurança, eficácia e qualidade destes hormônios têm sido também reportada. Vários bioensaios são utilizados na caracterização biológica destes hormônios.

O ensaio utilizando modelo animal mais usado para estimar a biopotência *in vivo* do hFSH é o clássico bioensaio de Steelman e Pohley, que determina o aumento do peso do ovário de ratas, sob o estímulo do FSH (Steelman, 1953). Este foi o ensaio escolhido, no presente trabalho, para a quantificação de diferentes preparações de hFSH. Vários ensaios baseados em células também têm sido desenvolvidos para medir a atividade de FSH. Van Damme e colaboradores descreveram um bioensaio *in vitro* baseado na produção de estrogênio pelas células de Sertoli, enquanto Jia e colaboradores determinaram o FSH baseando-se na produção de estrogênio, pelas células da granulosa (Van Damme, 1979; Jia, 1986 A e B). Outro ensaio *in vitro* também usado baseia-se na produção de inibina pelas células de Sertoli ou por células granulosas, sob o estímulo de FSH (Groome, 1996). Ensaio baseados em receptores são também utilizados. Quando o FSH se liga ao seu receptor de membrana, o AMP cíclico aumenta através da interação com proteínas G associadas à membrana. Este aumento pode ser quantificado usando genes repórter contendo em seu promotor elementos cAMP responsivos (Minegishi, 1991; Christin-Maitre, 1996).

Para o hTSH o método *in vivo* mais antigo desenvolvido e amplamente utilizado é o bioensaio em camundongos, baseado na captação do ^{131}I pela tireóide, seguida da medida do aumento subsequente da radioatividade na circulação, sob o estímulo de TSH (McKenzie, 1958). Um bioensaio *in vivo* desenvolvido posteriormente, que não administra radioatividade, foi reportado na literatura (East-Palmer, 1995; Mattaliano, 1995), no qual T4 induzido pelo TSH é medido, mediante imunoensaio, após supressão do TSH endógeno pela administração de T3. Este tem sido o ensaio biológico adotado em nosso laboratório para estimar a atividade biológica das preparações de hTSH aqui sintetizadas (Peroni, 2002; Mendonça, 2005; Oliveira, 2007 e 2008; Damiani, 2009 e 2013) e será também utilizado no presente trabalho. Bioensaios *in vitro* baseados na elevação dos níveis de cAMP, em células de tireóide de rato (FRTL-5) e em células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com receptor de TSH ou em membranas de tireóide bovina e humana tem sido descritos para medir a atividade de hTSH (Canone, 1995; Szkudlinski, 2000; Sendak, 2002).

Para o hLH, o bioensaio *in vivo* em geral adotado na literatura (Van Hell, 1964) é o que estima o aumento do peso da vesícula seminal de ratos aos quais foi administrado o hLH. Este foi o ensaio escolhido, no presente trabalho, para a quantificação de diferentes preparações de hLH. Bioensaios *in vitro* baseados na produção de testosterona pelas células de Leydig de camundongos e ratos são também descritos na literatura para medir a atividade de LH (Van Damme, 1974; Dufau, 1974).

A HPLC tem se mostrado uma ferramenta bastante útil na análise qualitativa e quantitativa dos hormônios hipofisários humanos (Ribela, 2006; Carvalho, 2009). Características da técnica de HPLC, tais como automação, alta resolução, sensibilidade e reprodutibilidade fazem desta metodologia uma opção analítica bastante utilizada, especialmente na indústria farmacêutica, para a identificação e quantificação de impurezas presentes nos fármacos. As principais farmacopéias (USP, EP, BP, JP) recomendam extensivo uso da HPLC durante a validação dos processos de fabricação e controle de qualidade de fármacos, sendo determinante no desenvolvimento de novos produtos (Basak, 2007; Kovalski, 2007; Ahuja, 2007; Zacharis, 2009; Staub, 2011; Li, 2012).

Esta técnica também tem sido freqüentemente utilizada para a caracterização e controle de qualidade destes hormônios, sendo capaz de detectar e quantificar discretas modificações na estrutura molecular do produto analisado, tanto dos hormônios glicoproteicos (Oliveira, 2003; Mendonça, 2005; Loureiro, 2006; Ribela, 2006; Carvalho, 2009; Almeida, 2010) como daqueles sem glicosilação (Bristow, 1992; Dalmora, 1997; Oliveira, 1999; Ueda, 2001; Soares, 2002; Jung, 2005; Ribela, 2006).

Um dos modos de HPLC mais utilizados nestas análises é o de fase reversa (RP-HPLC), que se baseia na ligação do soluto à fase estacionária mediada predominantemente por interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos não polares dos peptídeos ou proteínas e dos ligantes imobilizados. Os solutos são eluídos por gradiente, em ordem crescente de hidrofobicidade molecular, adicionando-se solvente orgânico à fase móvel, em concentrações crescentes, ao longo de um período de tempo. A retenção das proteínas é fortemente dependente das pequenas variações da força do solvente, uma mudança muito pequena (<1%) no teor do modificador orgânico podendo levar a uma significativa mudança na retenção da proteína.

A separação de uma proteína por RP-HPLC pode ser ajustada alterando a inclinação do gradiente, a temperatura de funcionamento, os aditivos, o pH ou os modificadores orgânicos. A melhor abordagem para melhorar a seletividade e, portanto, a resolução é alterar a natureza química ou a concentração do modificador orgânico (por exemplo, acetonitrila, metanol, ou isopropanol) (Fekete, 2012). Em virtude de sua versatilidade, flexibilidade e robustez, a RP-HPLC é um dos enfoques dominantes utilizados para análise de peptídeos e proteínas (Nikitas, 2009; Fekete, 2012). Esta foi a metodologia escolhida no presente trabalho para a quantificação de diferentes preparações de hFSH, hTSH e hLH.

Diferentes condições de eluição em RP-HPLC foram estabelecidas por diversos autores, nos últimos 30 anos, para o isolamento e a análise de subunidades e de formas heterodiméricas do TSH, FSH e LH (Ribela, 2006). Os trabalhos pioneiros de Bristow e colaboradores (1983), que descreveram pela primeira vez a detecção do hTSH heterodimérico por RP-HPLC, e de Parson e colaboradores (1984), que estabeleceram as condições de eluição para a análise

das subunidades dissociadas destes hormônios, serviram de base para trabalhos posteriores em que foram estudados diferentes tipos de gradientes para detectar também as formas heterodiméricas de FSH e LH (Hiyama, 1990; Chlenov, 1993; Oliveira, 2003; Loureiro, 2006; Carvalho, 2009; Almeida, 2010).

Face ao exposto ao longo deste capítulo, fica claro o desafio que se apresenta com relação à utilização de ensaios com animais no controle de produtos farmacêuticos. Nesta direção, para contornar tal desafio e aprimorar o controle de qualidade de produtos biotecnológicos, o presente trabalho estabeleceu seus objetivos.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- ✓ Avaliar estratégia de quantificação físico-química, alternativa ao bioensaio *in vivo*, para estimar a potência de diferentes preparações de foliculotrofina humana (hFSH), tireotrofina humana (hTSH) e luteotrofina humana (hLH), visando sua aplicação na caracterização e controle de qualidade farmacêutica destes hormônios.

Objetivos Específicos

- ✓ Quantificar diferentes preparações íntegras e alteradas de hFSH, recombinantes e naturais, por RP-HPLC e comparar com a potência determinada pelo bioensaio *in vivo* baseado no aumento de peso do ovário de ratas.
- ✓ Quantificar diferentes preparações íntegras e alteradas de hTSH, recombinantes e naturais, por RP-HPLC e comparar com a potência determinada pelo bioensaio *in vivo* baseado no estímulo do T4 pelo TSH.
- ✓ Quantificar diferentes preparações íntegras e alteradas de hLH, recombinantes e naturais, por RP-HPLC e comparar com a potência determinada pelo bioensaio *in vivo* baseado no aumento de peso da vesícula seminal de ratos.
- ✓ Estabelecer e validar a correlação entre os métodos físico-químico e biológico de acordo com a estatística de Bland-Altman.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Preparações hormonais

No estudo referente ao hFSH foram analisadas 15 preparações, sendo 8 preparações recombinantes, derivadas de Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), (rhFSH-A, rhFSH-B, rhFSH-J, rhFSH-K, rhFSH-L, rhFSH-M, rhFSH-N, rhFSH-O), 2 hipofisárias (phFSH-C, phFSH-D) e 5 preparações urinárias (uhFSH-E, uhFSH-F, uhFSH-G, uhFSH-H, uhFSH-I). Três Padrões Internacionais da Organização Mundial de Saúde (WHO) foram utilizados neste estudo: o Padrão Internacional de FSH recombinante humano para bioensaio (rhFSH-WHO 92/642 e rhFSH-WHO 08/282) e o Padrão Internacional de FSH hipofisário humano para bioensaio (phFSH-WHO 83/575).

No estudo referente ao hTSH foram analisadas 21 preparações, sendo 19 preparações recombinantes derivadas de CHO (rhTSH- C a U) e 2 hipofisárias (phTSH-A, phTSH-B). Neste estudo foi utilizado o Padrão Internacional de TSH recombinante humano para bioensaio (rhTSH-WHO 03/192).

No estudo referente ao hLH foram analisadas 3 preparações, sendo 1 preparação recombinante derivada de CHO (rhLH- C) e 2 hipofisárias (phLH-A, phLH-B). Neste estudo o padrão utilizado foi o Padrão Internacional de LH recombinante humano para bioensaio (rhLH-WHO 96/602) e o Padrão Internacional de LH hipofisário humano para bioensaio (phLH-WHO 80/552).

As preparações citadas foram obtidas de: Aker University Hospital (Oslo, Noruega), Dong-A Pharmaceutical Co. (Daegu, Coreia do Sul), Ferring GmbH (Kiel, Alemanha), Genzyme Corporation (Cambridge, EUA), Institut Biochimique S.A. (IBSA) (Lugano, Suíça), IPEN-CNEN (São Paulo, Brasil), National Hormone and Pituitary Program (Torrance, EUA) e N.V. Organon (Oss, Holanda). Os Padrões Internacionais foram obtidos do National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC, South Mimms, Reino Unido).

3.1.2 Preparações hormonais potencialmente alteradas

- Fora do prazo de validade:
 - rhFSH-M e rhFSH-N (10 meses após o vencimento)
 - rhTSH-T (2 anos após o vencimento)
- Tratamento com ciclos de congelamento e descongelamento:
 - rhTSH-T (5 ciclos)
- Tratamento térmico:
 - rhFSH-O (80 °C, durante 5 minutos)
 - rhTSH-U (100 °C, durante 5 minutos)
 - rhTSH-U (65 °C, durante 10 minutos)
 - rhTSH-U (50 °C, durante 12 horas)
 - pH-LH-B (70 °C, durante 10 minutos)
 - rhLH-C (70 °C, durante 10 minutos)

3.1.3 Animais

Todos os ensaios utilizando animais foram conduzidos de acordo com a Legislação Nacional de Proteção do Bem-Estar Animal.

Foram utilizados:

- Camundongos machos da linhagem isogênica *Balb-C*, com peso de 22 - 30g, oriundos do Biotério de Criação e Manutenção de Animais de Laboratório do IPEN/CNEN – SP.

- Ratos machos e ratas fêmeas Sprague-Dawley oriundos do Biotério de Criação e Manutenção de Animais de Laboratório da UFSM-RS.

3.1.4 Reagentes

- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Ácido acético glacial p.a., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Cloreto de Sódio p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- 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).
- Hidróxido de amônio p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Metanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA)
- Sal de sódio de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T_3), Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Sistema de radioimunoensaio para dosagem de tiroxina total (T_4), *RIA Coat-A-Count® Total T_4* , Diagnostic Products Corporation (DPC) (Los Angeles, CA, EUA).

3.1.5 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético, modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil).
- 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 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 P1000N, Mettler (Zurich, Suíça).

- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich, Suíça).
- Bomba de vácuo, modelo Nevoni, NSR (Barueri, Brasil).
- 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 Grace 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.), Grace Vydac Separations Group (Hesperia, EUA).
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- 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 de celulose para diálise, modelo D9277-100 FT, Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).
- Membrana filtrante, modelo GVWP 04700, Millipore (São Paulo, Brasil)
- Microtubos estéreis, Eppendorf (São Paulo, Brasil)
- Microtubos de homo-polímero, de 1,5mL, Axygen (Union City, CA, EUA).
- Pipetas de alta precisão, volumes 10, 20, 100, 200, 1000 μL , Gilson (Rio de Janeiro, Brasil).
- Pipeta Pasteur de vidro, Corning (New York, EUA).
- 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).
- Seringa para injeção de amostra, volume 10 a 500 μL , Hamilton (Nevada, EUA)
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA).

3.2 Métodos

3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)

As análises por RP-HPLC dos hormônios hFSH, hTSH e hLH foram realizadas nas condições experimentais mostradas na Tabela 2.

TABELA 2 - Condições experimentais empregadas na RP-HPLC para análise do hFSH, hTSH e do hLH

Características	Descrição
Coluna	C ₄ Grace Vydac 214 TP 54 (5µm, 25cm X 4,6mm D.I.)
Pré-coluna	C ₄ Grace Vydac 214 FSK 54 (5µm, 1cm X 4,6mm D.I.)
Temperatura da coluna	25°C
Comprimento de onda	220nm
Sistema de detecção	Absorbância em luz ultravioleta UV
Fluxo da fase móvel	0,5 mL/min
Fase Móvel	Solução A (FSH): Fosfato de Amônio 0,05M pH 8,6 Solução A (TSH e LH): Fosfato de Sódio 0,05M pH 7,0 Solução B: Acetonitrila
Modo de eluição	Gradiente Linear FSH: 15 - 50% B TSH: 12,5 - 50% B LH 1º = 27 - 42% B; 2º = 42 - 65% B
Duração da corrida	FSH e TSH: 40 minutos LH: 1º = 60 minutos; 2º = 20 minutos
Volume injetado	Alíquotas de 5 – 10 µL de phFSH, phTSH e phLH 20 – 100 µL de rhFSH, uhFSH, rhTSH e r-hLH

3.2.2 HPLC de exclusão molecular (HPSEC)

As análises por HPSEC dos hormônios hTSH, hFSH e hLH foram realizadas nas condições experimentais mostradas na Tabela 3.

TABELA 3 - Condições experimentais empregadas na HPSEC para análise do hFSH, hTSH e do hLH

Características	Descrição
Coluna	TSK G2000 SW (60cm X 7,5mm D.I.)
Pré-coluna	TSK SW (7,5cm X 7,5mm D.I.)
Temperatura da coluna	Ambiente
Comprimento de onda	220nm
Sistema de detecção	Absorbância em luz ultravioleta UV
Fluxo da fase móvel	1,0 mL/min
Fase Móvel	Fosfato de Sódio 0,05M pH 7,0 Cloreto de Sódio 0,15 M
Modo de eluição	Isocrático
Duração da corrida	30 minutos
Volume injetado	Alíquotas de 20 – 100 µL de rhTSH, rhFSH e rhLH

3.2.3 Ensaio biológico

3.2.3.a Ensaio biológico de preparações de hFSH

A atividade de hFSH foi determinada pelo método de Steelman e Pohley (1953). Resumidamente, 42 ratas fêmeas Sprague-Dawley entre 19 e 22 dias foram distribuídas em grupos de 6 animais por dose e o grupo controle e receberam, por via subcutânea, durante três dias, 0,5, 1 e 3 UI de hFSH do padrão e da amostra, respectivamente. A autópsia foi realizada no quarto dia (72 horas após a primeira injeção). Os ovários foram retirados, dissecados livres de tecidos circundantes e pesados. A bioatividade *in vivo* de hFSH foi avaliada em comparação com o padrão de referência internacional de hFSH recombinante (WHO 96/642) ou com o padrão de referência internacional de hFSH hipofisário (phFSH-WHO 83/575). Estes ensaios foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria, em colaboração com o Dr. Sérgio Luiz Dalmora.

3.2.3.b Ensaio biológico de preparações de hTSH

A avaliação da atividade biológica das preparações de hTSH foi realizada por um ensaio *in vivo*, utilizando camundongos machos com peso variando entre 22-30g. O ensaio baseia-se na capacidade que o TSH tem de estimular a produção de tiroxina (T_4). Visando suprimir o TSH endógeno dos animais, foi administrada oralmente, durante 4-5 dias, uma solução de triiodotironina (T_3), pH 7,5, com uma concentração final de $3\mu\text{g/mL}$. Após a supressão do TSH endógeno, as amostras a serem analisadas foram administradas intraperitonealmente ($10\mu\text{g/animal}$), em um volume de $200\mu\text{L}$, após diluição em solução salina. Para cada preparação foram utilizados 10 animais, bem como para o controle (salina). Após 6 horas da administração das amostras, foi realizada a coleta de sangue, via plexo retro-orbital e o nível de T_4 circulante foi mensurado por radioimunoensaio (RIA).

3.2.3.c Ensaio biológico de preparações de hLH

Para a atividade de hLH, 42 ratos machos Sprague-Dawley entre 19 e 22 dias foram distribuídas em grupos de 6 animais por dose e o grupo controle e receberam, por via subcutânea, durante três dias, 1, 2 e 4 UI de hLH do padrão e da amostra, respectivamente. A autópsia foi realizada no quarto dia (72 horas após a primeira injeção). As vesículas seminais foram retiradas, dissecadas livres de tecidos circundantes e pesadas. A bioatividade *in vivo* de hLH foi avaliada em comparação com o padrão de referência internacional de hLH (WHO 96/602) ou o padrão de referência internacional de hLH hipofisário (phLH-WHO 80/552) (Van Hell, 1964). Estes ensaios foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria, em colaboração com o Dr. Sérgio Luiz Dalmora.

3.3 Método Estatístico aplicado para validar a comparação entre dois métodos analíticos

A comparação entre os dados obtidos por ensaio biológico e por RP-HPLC das diferentes preparações de hFSH, hTSH e hLH, foi realizada por análise de regressão linear. O acordo entre os resultados obtidos por bioatividade *in vivo* estimada por RP-HPLC, a partir da equação estabelecida, e aquela estimada pelo Bioensaio *in vivo* foi avaliado seguindo a estatística de Bland e Altman (1986) que consiste de:

- a) Calcular para cada preparação, a média entre os resultados do método proposto (bioatividade *in vivo* estimada por RP-HPLC, a partir da equação estabelecida) e o método tradicional (Bioensaio *in vivo*); esta média reflete o valor que mais se aproxima do valor real.
- b) Calcular para cada preparação, a diferença (d) entre os resultados obtidos com os dois métodos, (d = resultado do método proposto - resultado da média entre o método proposto e o método tradicional).

c) Plotar o valor da diferença d contra cada valor da média. Idealmente, os pontos variarão em torno de um valor médio de 0.

d) Calcular o desvio padrão (DP) de d , e o limite de confiança de 95%, $(d + 2 \text{ DP})$ e $(d - 2 \text{ DP})$, e traçar linhas horizontais no gráfico correspondente a estes valores, e também ao valor médio de d ($\bar{d}$).

e) O intervalo de $(\bar{d} - 2\text{DP})$ a $(\bar{d} + 2\text{DP})$, indica o intervalo de 95% de confiança onde os valores de d podem estar.

f) Calcular o erro padrão da diferença média usando a fórmula:

$$\sqrt{\text{DP}^2/n}$$

Onde: DP = desvio padrão e n = o número de valores de d .

g) Calcular o erro padrão do desvio padrão usando a fórmula:

$$\sqrt{3\text{DP}^2/n}$$

h) O intervalo $(\bar{d} + t \sqrt{\text{DP}^2/n})$ a $(\bar{d} - t \sqrt{\text{DP}^2/n})$ indica a precisão que $\bar{d}$ é determinado, onde t = “ t ” Student’s com $n-1$ graus de liberdade.

i) Calcular o intervalo de confiança (95%) para o limite inferior (LI) de concordância $(\text{LI} \pm t \sqrt{3\text{DP}^2/n})$ e para o limite superior (LS) de concordância $(\text{LS} \pm t \sqrt{3\text{DP}^2/n})$.

Este procedimento permite analisar o grau de concordância entre dois métodos.

3.4 Parâmetros de uma separação cromatográfica

Os parâmetros de eficiência de separação entre o LH e o excipiente (HSA) considerado neste estudo foram:

✓ Fator de resolução (Rf): determinado de acordo com a definição que considera assimetria do pico (Song, 2003). Em geral $R_f > 1,5$ é indicativo de resolução completa, admitindo uma integração precisa dos picos individuais e sua quantificação.

$$R_f = \frac{2 (t_2 + w_2 / 2 (1 - 1/Tf_2)) - t_1 - w_1 / 2 (1 - 1/Tf_1))}{w_1 + w_2}$$

Onde t_2 e t_1 são os tempos de retenção da HSA e do hLH, respectivamente; w_2 e w_1 são as larguras dos picos de HSA e de hLH, medidas na linha de base e Tf_2 e Tf_1 são os fatores de assimetria dos picos de HSA e de hLH, respectivamente.

✓ Grau de assimetria do pico (*tailing factor*): determinado de acordo com a definição.

$$Tf = \frac{(a + b)}{2a}$$

Onde a e b são as larguras dos picos dos lados esquerdo e direito, respectivamente, medidos na linha de base, com $w = a + b$. O pico é simétrico quando Tf é 1.

✓ Índice de retenção relativo HSA-LH: determinado pelo tempo de retenção relativo (t_{RR}).

$$t_{RR} = \frac{\text{tempo de retenção da albumina}}{\text{tempo de retenção do hLH}}$$

4 RESULTADOS

4.1 Determinação de potência de hFSH

4.1.a Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)

Considerando a falta de padrões oficiais para ensaios físico-químicos, foi utilizado para as determinações da potência do hFSH o padrão de referência internacional para ensaios biológicos rhFSH(WHO 92/642), que apresentou o perfil cromatográfico em RP-HPLC mostrado na Figura 5 A. É importante ressaltar que este padrão de referência somente pôde ser utilizado para análise quantitativa em RP-HPLC, uma vez que o alto conteúdo de Albumina de Soro Humano (HSA) presente nesta amostra (200:1) não elui nas condições estabelecidas para esta metodologia. Entretanto, em cromatografia líquida de exclusão molecular (HPSEC), o pico do HSA elui sobrepondo-se ao pico do hFSH, o que inviabiliza a análise por esta técnica (Figura 5 B).

FIGURA 5 - Perfil em HPLC de 2 µg do padrão de referência para ensaios biológicos hFSH recombinante (WHO 92/642). (A) RP-HPLC. (B) HPSEC. O tempo de retenção da preparação de rhFSH sem HSA, analisada nas mesmas condições, é indicado pela seta.

O conteúdo de hFSH em 6 preparações de diferentes origens, recombinante (A e B), hipofisária (C e D) e urinária (E e F) foi determinado utilizando a técnica descrita em nosso laboratório por Loureiro e colaboradores (2006) (Tabela 4). Uma variação inter-ampola e inter-dias < 6% foi observada para estas preparações.

TABELA 4 - Determinação inter-dias do conteúdo de hFSH em preparações de diferentes origens, por RP-HPLC

Preparação	Conteúdo de FSH^a (µg/ampola)	DPR^b (%)
rhFSH-A	5,5 ± 0,32	5,8
rhFSH-B	9,8 ± 0,41	4,2
phFSH-C	4,8 ± 0,03	1,7
phFSH-D	6,7 ± 0,12	1,6
uhFSH-E	5,2 ± 0,30	5,8
uhFSH-F	10,3 ± 0,27	2,6

^aMédia ± desvio padrão (n=4)

^bDesvio padrão relativo, expresso como % da média

Os perfis em RP-HPLC dos três grupos de preparações de hFSH são mostrados nas Figuras 6, 7 e 8. Foi encontrada uma diferença altamente significativa ($p < 0,001$) entre os tempos de retenção de hFSH recombinante ($t_R = 26,42 \pm 0,23$, $n=8$), hipofisário ($t_R = 25,19 \pm 0,15$, $n=8$) e urinário ($t_R = 24,46 \pm 0,22$, $n=8$). Os picos com t_R de ~ 7 minutos correspondem aos diferentes excipientes presentes nas preparações analisadas.

FIGURA 6 - Perfil em RP-HPLC de diferentes preparações de hFSH recombinante: rhFSH-A; rhFSH-B

FIGURA 7 - Perfil em RP-HPLC de diferentes preparações de hFSH hipofisário: phFSH-C; phFSH-D

FIGURA 8 - Perfil em RP-HPLC de diferentes preparações de hFSH urinário: uhFSH-E; uhFSH-F

4.1.b Ensaio Biológico

As estimativas de potência (Unidades Internacionais, UI/ampola) de preparações de hFSH recombinante e urinária, através de ensaio biológico *in vivo* (Steelman, 1953), foram realizadas em relação ao padrão de referência internacional de hFSH recombinante (WHO 92/642), enquanto as preparações hipofisárias foram determinadas em relação ao padrão de referência internacional de hFSH hipofisário (WHO 83/575) (Tabela 5).

TABELA 5 - Determinação da potência do hFSH por ensaio biológico *in vivo*

Preparação	Conteúdo de FSH^a (UI/ampola)
rhFSH-A	77,0
rhFSH-B	117,2
phFSH-C	80,7
phFSH-D	116,9
uhFSH-E	76,1
uhFSH-F	161,7

^a Considerando 13.800 UI/mg a potência de rhFSH(WHO 92/642) e 19.184 UI/mg a potência de phFSH-WHO 83/575.

4.1.c Comparação entre as quantificações de hFSH por RP-HPLC e por Ensaio Biológico *in vivo*

Para facilitar a comparação, o conteúdo de hFSH determinado pela RP-HPLC em µg foi expresso em UI, devido a este sistema de unidade ser o mais utilizado na prática clínica (Tabela 6). Com base no bioensaio foi observada uma recuperação média com relação ao conteúdo nominal de hFSH de $108,3 \pm 11,63\%$, enquanto com base na RP-HPLC, a recuperação média foi de $111,9 \pm 20,09\%$. Uma relação linear foi encontrada quando a determinação da potência do hFSH pelo Bioensaio (BA_{UI}) foi comparada com a determinação pela RP-HPLC ($RP-HPLC_{UI}$), com um coeficiente de correlação (r) altamente significativo: $BA_{UI} = 0,9925 RP-HPLC_{UI} - 1,3165$; $r = 0,9371$, $p < 0,001$, $n = 24$.

TABELA 6 - Comparação entre a quantificação de preparações de hFSH por Bioensaio *in vivo* e por RP-HPLC

Preparação	Conteúdo nominal de hFSH ^a (UI/ampola)	Determinação de hFSH por Bioensaio <i>in vivo</i> (UI/ampola)	Determinação de hFSH por RP-HPLC (UI/ampola)
rhFSH-A	75	77,0	75,9
rhFSH-B	100	117,2	135,2
phFSH-C	85,6	80,7	92,1
phFSH-D	92,9	116,9	128,5
uhFSH-E	75	76,1	70,4
uhFSH-F	150	161,7	142,1

^a Baseado no conteúdo declarado.

4.1.d Validação da RP-HPLC para quantificação de hFSH

Para avaliar o potencial da RP-HPLC de estimar com precisão a bioatividade *in vivo*, foi utilizada a análise estatística de Bland-Altman (1986). A bioatividade estimada por RP-HPLC, a partir da equação estabelecida, e aquela estimada pelo Bioensaio *in vivo* de nove amostras de hFSH que não tinham sido utilizadas para análise de correlação, sendo 3 delas potencialmente alteradas, foram analisadas e comparadas (Tabela 7).

TABELA 7 - Comparação entre a atividade biológica do hFSH determinada por Bioensaio *in vivo* e predita pela equação por análise em RP-HPLC

Preparação	Atividade Biológica determinada por RP-HPLC (UI/ampola)	Atividade Biológica predita por RP-HPLC (1) (UI/ampola)	Atividade Biológica determinada por Bioensaio <i>in vivo</i> (2) (UI/ampola)	Média Atividade Biológica (1) e (2) (UI/ampola)	Diferença entre Atividade Biológica predita e média d (UI)	Diferença entre Atividade Biológica predita e média d (%)
uhFSH-G	59,8	58,0	68,0	63,0	-5,0	-7,9
uhFSH-H	167,0	164,2	150,3	157,3	6,9	4,4
uhFSH-I	72,2	70,3	74,0	72,2	-1,9	-2,6
rhFSH-J	118,5	116,4	119,0	117,7	-1,3	-1,1
rhFSH-K	116,5	114,2	116,6	115,4	-1,2	-1,0
rhFSH-L	118,1	116,1	115,8	116,0	0,1	0,09
rhFSH-M (10 meses após o vencimento)	57,9	56,1	62,9	59,5	-3,4	-5,7
rhFSH-N (10 meses após o vencimento)	118,4	116,2	123,9	120,1	-3,9	-3,2
rhFSH-O (80 °C, 5 min)	52,0	50,3	52,4	51,4	-0,8	-2,1

Foi observada uma diferença percentual média ($\bar{d}$), entre a bioatividade predita pela equação e a média das bioatividades obtidas pelos dois métodos de $-2,11 \pm 3,49$ %, com limites de confiança de 95 % ($\bar{d} \pm 2DP$) de -9,1 a +4,9 % (Figura 9).

FIGURA 9 - Comparação entre a bioatividade predita-RP-HPLC e *in vivo*.

□ Amostras alteradas ; ■ Amostras íntegras

O teste “t-Student”, realizado entre as determinações de atividade biológica do hFSH *in vivo* e predita pela equação, indica que o valor de t-calculado (0,20) é muito menor do que o valor de t-teórico de 2,31, no limite de significância de 0,05, com 8 graus de liberdade, indicando que os resultados das duas metodologias não foram significativamente diferentes.

Para avaliar a precisão das determinações foram calculados o erro padrão de $\bar{d}$, definido como $(\sqrt{DP^2/n})$ e o erro padrão de $\bar{d} \pm 2DP$, definido como $(\sqrt{3DP^2/n})$, sendo 1,16% e 2,01%, respectivamente. O intervalo de 95% de

confiança para o “bias” ($\bar{d} \pm t \sqrt{DP^2/n}$), para o limite inferior de concordância (LI) e para o limite superior de concordância (LS) foram também calculados. Todos estes parâmetros estatísticos são apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 - Parâmetros estatísticos, determinados de acordo com Bland e Altman, comparando o valor da bioatividade *in vivo* com aquela predita por RP- HPLC

Parâmetros	Valor Determinado (%)
Diferença Média ($\bar{d}$)	-2,11
Desvio Padrão (DP)	3,49
<i>Intervalo</i> ($\bar{d} \pm 2DP$)	-9,1 a + 4,9
$\sqrt{DP^2/n}$	1,16
$\sqrt{3DP^2/n}$	2,01
<i>Intervalo</i> ($\bar{d} \pm t \sqrt{DP^2/n}$)	-4,79 a +0,57
<i>Intervalo</i> (LI $\pm t \sqrt{3DP^2/n}$)	-13,73 a -4,45
<i>Intervalo</i> (LS $\pm t \sqrt{3DP^2/n}$)	+0,23 a +9,51

Os resultados obtidos permitem concluir que a RP-HPLC pode ser um ensaio alternativo ao Bioensaio *in vivo* para a determinação da potência de hFSH de amostras íntegras e alteradas.

4.1.e Análise das preparações potencialmente alteradas de hFSH

As estimativas de potência de duas preparações recombinantes comerciais (M e N) de 75 UI e 150 UI respectivamente, que estavam fora do prazo de validade declarado pelo fabricante (10 meses após o vencimento), foram avaliadas por ensaio biológico e por RP-HPLC utilizando o padrão de referência internacional de hFSH recombinante WHO 92/642 (Tabela 9). Para ambas as amostras foi observada uma perda de atividade de hFSH com relação ao conteúdo nominal de ~17 % com base no bioensaio, enquanto com base na RP-HPLC, a perda de atividade detectada foi de ~22 %.

TABELA 9 - Comparação entre a quantificação por Bioensaio *in vivo* e por RP-HPLC de preparações de hFSH fora do prazo de validade

Preparação	Conteúdo nominal de hFSH ^a (UI/ampola)	Determinação de hFSH por Bioensaio <i>in vivo</i> (UI/ampola)	Determinação de hFSH por RP-HPLC (UI/ampola)
rhFSH-M (10 meses após o vencimento)	75	62,9	57,9
rhFSH-N (10 meses após o vencimento)	150	123,9	118,4

a Declarado pelo fabricante

Os perfis em RP-HPLC das preparações M e N são mostrados na Figura 10. Os tempos de retenção de hFSH recombinante rhFSH-M ($t_R = 26,28 \pm 0,05$, $n=3$) e rhFSH-N ($t_R = 26,22 \pm 0,03$, $n=3$) foram similares aos das outras preparações recombinantes analisadas no presente estudo. Os picos com t_R de ~ 9 minutos correspondem aos diferentes excipientes presentes nas preparações analisadas.

FIGURA 10 - Perfil em RP-HPLC de preparações de hFSH recombinante fora do prazo de validade. (A) rhFSH-M (B) rhFSH-N

A potência de uma outra preparação de FSH (rhFSH-O), na qual induzimos uma alteração térmica, foi determinada por ensaio biológico e por RP-HPLC. Esta preparação foi submetida a uma temperatura de 80 °C, durante 5 minutos. O perfil em RP-HPLC da preparação de hFSH e do controle (mesma preparação sem sofrer tratamento térmico) é mostrado na Figura 11. Observa-se que após o aquecimento há formação de dois picos. Conforme trabalho anterior realizado em nosso laboratório por Carvalho e colaboradores (2009), a dissociação total do FSH heterodímero forma 46,7 % de subunidade α e 53,3 % de β , sendo a subunidade β menos hidrofóbica que a subunidade α e com hidrofobicidade semelhante ao do heterodímero. Com base neste estudo, observa-se que no caso da presente amostra, (após o seu aquecimento) houve formação de 27,4 % de subunidade α . Não é possível visualizar diretamente a subunidade β , pois ela elui em um tempo de retenção muito próximo ao do heterodímero, sobrepondo-se suas áreas. Entretanto, estequiometricamente é possível calcular a % desta subunidade com base na % do que se formou de α . No caso da presente amostra houve formação de 31,3 % da subunidade β . Logo, a fração correspondente ao heterodímero é de 41,3 %. O conteúdo de FSH determinado por RP-HPLC foi de 4,13 μ g/ampola ou 52 UI/ampola. Foi, portanto, detectada via RP-HPLC, uma perda de atividade em relação à amostra controle de 59%.

A estimativa de potência da preparação de FSH aquecida, através de ensaio biológico *in vivo*, em relação ao padrão de referência internacional de hFSH recombinante (WHO 08/282) foi de 52,4 UI/ampola. A perda de atividade detectada em relação ao conteúdo nominal por este método foi de 58%.

Salientamos que os dados referentes ao hFSH aqui apresentados foram publicados no ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v.54, p.681-686, 2011; “A pilot study on potency determination of human follicle-stimulating hormone: A comparison between reversed-phase high-performance liquid chromatography method and the *in vivo* bioassay”.

FIGURA 11 - Perfil em RP-HPLC da preparação de rhFSH-O. (A) rhFSH-O Controle (B) rhFSH-O submetida a aquecimento a 80 °C

4.2 Determinação de potência de hTSH

4.2.a Comparação entre as determinações de hTSH por RP-HPLC e por Ensaio Biológico *in vivo*

Na Tabela 10 é apresentado o conteúdo de hTSH ($\mu\text{g}/\text{ampola}$) de 14 diferentes preparações, determinado por RP-HPLC utilizando técnica descrita em nosso laboratório por Oliveira e colaboradores (2003) e por ensaio biológico *in vivo* (East-Palmer, 1995; Mattaliano, 1995). Como padrão de referência para estas determinações foi utilizado o Padrão Internacional de TSH recombinante humano para bioensaio (rhTSH WHO 03/192), cujo perfil em RP-HPLC e em HPSEC são mostrados na Figura 12. Na Figura 13 são mostrados os perfis típicos em RP-HPLC de hTSH recombinante (Figura 13 A) e hipofisário (Figura 13 B). Uma relação linear foi encontrada entre as determinações de hTSH por Bioensaio ($\text{BA}_{\mu\text{g}}$) e por RP-HPLC ($\text{RP-HPLC}_{\mu\text{g}}$), com um coeficiente de correlação (r) altamente significativo: $\text{BA}_{\mu\text{g}} = 0,9790 \text{ RP-HPLC}_{\mu\text{g}} - 0,052$; $r = 0,8725$, $p < 0,001$, $n = 14$.

TABELA 10 - Comparação entre a quantificação de preparações de hTSH por Bioensaio *in vivo* e por RP-HPLC

Preparação	Determinação de hTSH por Bioensaio <i>in vivo</i> (µg/ampola)	Determinação de hTSH por RP-HPLC (µg/ampola)
phTSH-A	5,2	3,7
rhTSH-C	11,3	10,0
rhTSH-D	11,1	10,7
rhTSH-E	9,0	9,3
rhTSH-F	7,6	9,7
rhTSH-G	4,4	5,8
rhTSH-H	4,4	4,0
rhTSH-I	8,8	8,6
rhTSH-J	8,2	9,9
rhTSH-K	7,9	8,8
rhTSH-L	10,0	8,0
rhTSH-M	3,6	5,4
rhTSH-N	9,5	9,0
rhTSH-O	4,0	5,1

FIGURA 12 - Perfil em HPLC de 5 µg do padrão de referência para ensaios biológicos hTSH recombinante (WHO 03/192). (A) RP-HPLC (B) HPSEC

FIGURA 13 - Perfil em RP-HPLC de preparações de hTSH. (A) preparação rhTSH-O; (B) preparação phTSH-A.

4.2.b Validação da RP-HPLC para quantificação de hTSH

Para avaliar o potencial da RP-HPLC de estimar com precisão a bioatividade *in vivo*, foi utilizada a análise estatística de Bland-Altman (1986), assim como anteriormente demonstrada para o estudo do hFSH. Neste estudo foram analisadas sete amostras íntegras de TSH, sendo seis recombinantes (rhTSH- P a U), e uma hipofisária (phTSH-B). Também foram consideradas quatro outras amostras potencialmente alteradas: um lote comercial de hTSH com prazo de validade expirado (2 anos após o vencimento), uma amostra que sofreu ciclos de congelamento-descongelamento e duas amostras que sofreram aquecimento a diferentes temperaturas (Tabela 11).

TABELA 11 - Comparação entre a atividade biológica do hTSH determinada por Bioensaio *in vivo* e predita pela equação por análise em RP-HPLC

Preparação	Atividade Biológica determinada por RP-HPLC (µg/ampola)	Atividade Biológica predita por RP-HPLC (1) (µg/ampola)	Atividade Biológica determinada por Bioensaio <i>in vivo</i> (2) (µg/ampola)	Média Atividade Biológica (1) e (2) (µg/ampola)	Diferença entre Atividade Biológica predita e média d (µg)	Diferença entre Atividade Biológica predita e média d (%)
phTSH- B	5,3	5,1	5,8	5,5	-0,4	-7,3
rhTSH- P	11,3	11,0	9,7	10,4	0,6	5,8
rhTSH-Q	8,8	8,6	7,5	8,1	0,5	6,2
rhTSH-R	4,1	4,0	3,7	3,9	0,1	2,3
rhTSH-S	7,9	7,7	8,2	8,0	-0,3	-3,8
rhTSH-T	10,3	10,0	9,6	9,8	0,2	2,0
rhTSH-T (2 anos após o vencimento)	9,7	9,4	10,1	9,8	-0,4	-4,1
rhTSH-T (5 ciclos de congela-descongela)	10,2	9,9	10,4	10,2	-0,3	-2,9
rhTSH-U	9,7	9,4	10,5	10,0	-0,6	-6,0
rhTSH-U (50°C, 12 h)	8,5	8,3	10,4	9,4	-1,1	-11,7
rhTSH-U (65°C, 10 min)	7,6	7,4	7,8	7,6	-0,2	-2,6

Foi observada uma diferença percentual média ($\bar{d}$), entre a bioatividade predita pela equação estabelecida e a média da bioatividade obtida pelos dois métodos de $-2,01 \pm 5,56\%$, com limites de confiança de 95% ($\bar{d} \pm 2DP$) de $-13,13$ a $+9,11\%$ (Figura 14).

FIGURA 14 - Comparação entre a bioatividade predita e *in vivo* de preparações de hTSH. □ Amostras alteradas ; ■ Amostras íntegras

O teste “t-Student”, realizado entre as determinações de atividade biológica do hTSH *in vivo* e predita pela equação, indica que o valor de t-calculado (0,29) é muito menor do que o valor de t-teórico de 2,23, no limite de significância de 0,05, com 10 graus de liberdade, indicando que os resultados das duas metodologias não foram significativamente diferentes.

Para avaliar a precisão das determinações foram calculados o erro padrão de $\bar{d}$ e o erro padrão de $\bar{d} \pm 2DP$ sendo 1,68 % e 2,90 %, respectivamente. O intervalo de 95% de confiança para o “bias” ($\bar{d} \pm t \sqrt{DP^2/n}$), para o limite inferior de concordância (LI) e para o limite superior de concordância (LS) foram também calculados (Tabela 12).

TABELA 12 - Parâmetros estatísticos, determinados de acordo com Bland e Altman, comparando o valor da bioatividade *in vivo* com aquela predita por RP-HPLC

Parâmetros	Valor Determinado (%)
Diferença Média ($\bar{d}$)	-2,01
Desvio Padrão (DP)	5,56
<i>Intervalo</i> ($\bar{d} \pm 2DP$)	-13,13 a +9,11
$\sqrt{DP^2/n}$	1,68
$\sqrt{3DP^2/n}$	2,90
<i>Intervalo</i> ($\bar{d} \pm t \sqrt{DP^2/n}$)	-5,76 a +1,4
<i>Intervalo</i> (LI $\pm t \sqrt{3DP^2/n}$)	-19,60 a -6,65
<i>Intervalo</i> (LS $\pm t \sqrt{3DP^2/n}$)	+2,64 a +15,58

Os resultados obtidos permitem concluir que a RP-HPLC pode ser um ensaio alternativo ao Bioensaio *in vivo* para a determinação da potência de hTSH de amostras íntegras e alteradas.

4.2.c Análise das preparações potencialmente alteradas de hTSH

O método por nós proposto foi também utilizado para determinar a potência de amostras de hTSH potencialmente alteradas.

Um lote de hTSH-T recombinante comercial, com prazo de validade expirado há 2 anos, mostrou um perfil de RP-HPLC idêntico ao obtido para um lote dentro do prazo de validade (Figura 15 A e B). A quantificação do produto vencido, por ensaio biológico e por RP-HPLC, mostrou um conteúdo/potência de hTSH de 10,1 µg e 9,7 µg respectivamente, equivalente ao obtido para o produto dentro do prazo de validade (Tabela 13).

Foi testada também uma amostra de rhTSH-T que sofreu 5 ciclos de congelamento-descongelamento. Neste caso também não foi detectada qualquer alteração (Figura 15 A e C). O conteúdo/potência de hTSH da amostra que sofreu congelamento e descongelamento foi de 10,2 µg por RP-HPLC e 10,4 µg por bioensaio, equivalente ao da amostra que não sofreu este processo (Tabela 13).

Outra preparação (rhTSH-U) foi aquecida a 100°C, por um tempo de 5 minutos, a 50°C, por 12 horas e a 65°C, por 10 minutos. Os perfis em RP-HPLC destas preparações de hTSH submetidas a aquecimento e do controle (mesma preparação sem sofrer tratamento térmico) são mostrados nas Figuras 16, 17 e 18.

Observa-se que após o aquecimento a 100°C da preparação rhTSH-U ocorreu dissociação total do heterodímero (Figura 16). Conforme trabalho anterior realizado em nosso laboratório por Carvalho e colaboradores (2009), quando ocorre dissociação total do hTSH heterodímero há formação de 47,4 % e 52,6 % de subunidade α e β respectivamente, sendo a subunidade α menos hidrofóbica que a subunidade β e com hidrofobicidade semelhante ao do heterodímero. No caso da presente amostra, as porcentagens obtidas para as subunidades α e β confirmam a dissociação total do heterodímero. Ao analisar esta amostra no bioensaio in vivo não foi detectada qualquer bioatividade o que

era de se esperar uma vez que o hormônio só é ativo quando está na forma heterodimérica (Tabela 13).

Quando a preparação rhTSH-U foi aquecida a 50°C, ocorreu uma dissociação parcial sendo observada a formação de 6,5% de subunidade β (Figura 17). Não é possível visualizar diretamente a subunidade α , pois ela elui em um tempo de retenção muito próximo ao do heterodímero, sobrepondo-se suas áreas. Entretanto, estequiometricamente foi possível calcular a % desta subunidade com base na % do que se formou de β . No caso da presente amostra houve formação de 5,9% da subunidade α . Logo, a fração correspondente ao heterodímero é de 87,6%. Ao analisar esta amostra no bioensaio *in vivo*, não foi observada perda de atividade com relação ao controle, enquanto com base na RP-HPLC, a perda de atividade detectada foi de ~12 % (Tabela 13).

Quando a amostra rhTSH-U foi aquecida a 65°C ocorreu também uma dissociação parcial. Observa-se a formação de 11,5 % de subunidade β e de 10,4% de subunidade α , sendo portanto a fração correspondente ao heterodímero de 78,1% (Figura 18). Ao analisar esta amostra no bioensaio *in vivo*, foi observada uma perda de atividade de ~26 % com relação ao controle, enquanto com base na RP-HPLC, a perda de atividade detectada foi de ~22 % (Tabela 13).

TABELA 13 - Comparação entre a atividade de preparações alteradas de hTSH por Bioensaio *in vivo* e por RP-HPLC

Preparação	Determinação de TSH por RP-HPLC (µg/ampola) (% recuperação)		Determinação de TSH por Bioensaio <i>in vivo</i> (µg/ampola) (% recuperação)	
rhTSH-T Controle	10,3	—	9,6	—
rhTSH-T (2 anos após o vencimento)	9,7	94,2	10,1	105,2
rhTSH-T (5 ciclos de congela-descongela)	10,2	99,0	10,4	108,3
rhTSH-U Controle	9,7	—	10,5	—
rhTSH-U (50°C, 12 h)	8,5	87,6	10,4	99,0
rhTSH-U (65°C, 10 min)	7,6	78,1	7,8	74,3
rhTSH-U (100°C, 5 min)	N.D. ^a	0	N.D. ^a	0

^a N.D.= Não Detectável

FIGURA 15 - Perfil em RP-HPLC da preparação rhTSH-T. (A) rhTSH-T Controle (B) rhTSH-T fora do prazo de validade (C) rhTSH-T submetida a 5 ciclos de congelamento-descongelamento.

FIGURA 16 - Perfil em RP-HPLC da preparação rhTSH-U. (A) rhTSH-U Controle (B) rhTSH-U submetida a aquecimento a 100°C

FIGURA 17 - Perfil em RP-HPLC da preparação de hTSH recombinante U. (A) rhTSH-U Controle (B) rhTSH-U submetida a aquecimento a 50°C

FIGURA 18 - Perfil em RP-HPLC da preparação de hTSH recombinante U. (A) rhTSH-U Controle (B) rhTSH-U submetida a aquecimento a 65°C

Um manuscrito com os dados aqui apresentados para o hTSH está sendo preparado para ser submetido ao ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***: “Potency determination of human thyrotropin via RP-HPLC in comparison with the in vivo bioassay: analysis of different and of partly-degraded preparations against the International Standard of Recombinant Thyrotropin (WHO-03/192)”.

4.3 Determinação de potência de hLH

4.3.a Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)

Devido a falta de padrões oficiais para ensaios físico-químicos, foi utilizado para as determinações da potência do hLH o padrão de referência internacional para ensaios biológicos rhLH(WHO 96/602). Este padrão contém um alto conteúdo de Albumina de Soro Humano (HSA) a qual elui na condição de análise por RP-HPLC em tempo de retenção diferente do hLH. Entretanto, em cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC), o pico do HSA elui encobrindo o pico do hLH, o que inviabiliza a análise por esta técnica (Figura 19).

FIGURA 19 - Perfil em HPSEC de 2 µg do padrão de referência para ensaios biológicos hLH recombinante (WHO 96/602). O tempo de retenção da preparação de rhLH sem HSA, analisada nas mesmas condições, é indicado pela seta.

A técnica descrita em nosso laboratório por Almeida e colaboradores (2010) para determinar o conteúdo do hLH por RP-HPLC se mostrou inadequada para a análise quantitativa do padrão de referência de ensaio biológico (rhLH WHO 96/602), pois este padrão apresenta um alto conteúdo de HSA e as hidrofobicidades dessas moléculas são semelhantes, dificultando a separação entre elas (Figura 20). Um fator de correção foi então estabelecido levando em conta a perda de área correspondente ao LH que foi coberta pela HSA.

FIGURA 20 - Perfil em RP-HPLC do padrão de referência para ensaios biológicos hLH recombinante (WHO 96/602) nas condições experimentais descritas por Almeida e colaboradores (2010).

Fez-se necessário então realizar estudos para adequação desta técnica às características do padrão. Mantendo-se a mesma fase móvel, modificaram-se os seguintes parâmetros: início e final do gradiente e duração da corrida (Tabela 14).

TABELA 14 - Condições estudadas para análise por RP-HPLC da preparação de LH

Gradiente		rhLH (WHO 96/602)			
Acetonitrila %	Duração Min.	Tempo de Retenção		t_{RR}^a	Fator de Correção %
		LH	HSA		
12,5 - 60	50	38,20	44,80	1,2	18
15 - 60	50	36,00	46,80	1,3	-
20 - 60	50	31,10	44,10	1,4	-
25 - 60	50	25,28	40,63	1,6	-
27 - 60	50	22,43	38,23	1,7	13
28 - 60	50	21,10	38,47	1,8	-
27 - 50	50	21,84	43,76	2,0	8
27 - 45	60	28,65	62,27	2,2	2
27 - 42	60	30,82	70,68	2,3	0

^a Tempo de retenção relativo

Com base nestes estudos estabeleceu-se que a análise do hLH em RP-HPLC deveria ser realizada nas condições experimentais mostradas na Tabela 15, que mostraram a menor interferência do pico da albumina na quantificação do hormônio.

TABELA 15 - Condições experimentais a serem empregadas na RP-HPLC para análise de hLH

Características	Descrição
Coluna	C ₄ Grace Vydac 214 TP 54 (5µm , 25cm X 4,6mm D.I.)
Pré-coluna	C ₄ Grace Vydac 214 FSK 54 (5µm, 1cm X 4,6mm D.I.)
Temperatura da coluna	25°C
Fase Móvel	Solução A: Fosfato de Sódio 0,05M pH 7,0 Solução B: Acetonitrila
Modo de eluição	Gradiente Linear: 1º = 27 - 42% B; 2º = 42 - 65% B
Duração da corrida	1º = 60 minutos; 2º = 20 minutos
Fluxo da fase móvel	0,5 mL/min
Sistema de detecção	Absorbância em luz ultravioleta UV
Comprimento de onda	220nm
Volume injetado	Alíquotas de 5 – 10 µL de phLH e 20 – 100 µL de rhLH

Os perfis cromatográficos do padrão de referência para ensaio biológico rhLH(WHO 96/602) nas condições experimentais, descritas por Almeida e colaboradores (2010) e nas novas condições estabelecidas, bem como os parâmetros de separação nestas condições são mostrados na Figura 21 e na Tabela 16.

FIGURA 21 - Perfil em RP-HPLC do padrão de referência para ensaios biológicos hLH recombinante (WHO 96/602). (A) condições experimentais descritas por Almeida e colaboradores (2010); (B) novas condições estabelecidas.

TABELA 16 - Parâmetros de desempenho de separação HSA-LH em diferentes condições de RP-HPLC

PREPARAÇÃO rhLH (WHO 96/602)	LH			HSA		
	t_{R1}^a (min)	w_1^b (min)	Tf_1^c	t_{R2}^a (min)	w_2^b (min)	Tf_2^c
Condição Nova	30,00	11,40	1,60	72,12	18,28	1,1
Condição Almeida, 2010	38,56	2,45	1,14	47,92	6,40	1,4

^a Tempo de retenção

^b Largura do pico

^c Fator de assimetria

A qualidade da separação entre HSA e hLH foi avaliada, nas duas condições, pelo tempo de retenção relativo (t_{RR}) e pelo fator de resolução (Rf) (Tabela 17). Nas novas condições, uma melhor separação entre os picos de HSA e hLH foi alcançada.

TABELA 17 - Parâmetros de qualidade da separação HSA-LH

Condições de RP-HPLC	t_{RR}^a	Rf^b
Nova	2,40	2,72
Almeida, 2010	1,24	2,28

^a Tempo de retenção relativo

^b Fator de resolução

Salientamos que os dados aqui apresentados com relação à separação entre HSA e hLH foram publicados em ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v.63, p.160-164, 2012; “Qualitative and quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein hormones in the presence of a large excess of human serum albumin.”

4.3.b Quantificação de amostras íntegras e alteradas por RP-HPLC e por Ensaio Biológico *in vivo*

Na Tabela 18 é apresentado o conteúdo/potência de hLH (UI/ampola) de preparações hipofisárias (phLH-A e phLH-B) e recombinante (rhLH-C) determinados por RP-HPLC utilizando a técnica anteriormente estabelecida e por ensaio biológico *in vivo* (Van Hell, 1964). A determinação da preparação recombinante foi realizada em relação ao padrão de referência internacional de hLH recombinante (WHO 96/602), enquanto as preparações hipofisárias foram determinadas em relação ao padrão de referência internacional de hLH hipofisário (WHO 80/552). A recuperação média destas determinações, relativa ao conteúdo nominal, foi de $94,6 \pm 7,88$ % para as estimativas por RP-HPLC e $102,6 \pm 2,80$ % para as estimativas por bioensaio.

TABELA 18 - Comparação entre a quantificação de preparações de hLH íntegras por Bioensaio *in vivo* e por RP-HPLC

Preparação	Conteúdo Nominal ^a (UI/ampola)	Determinação de hLH por RP-HPLC (UI/ampola)	Determinação de hLH por Bioensaio <i>in vivo</i> (UI/ampola)
phLH-A	60,3	53,0	63,5
phLH-B	60,3	62,3	61,9
rhLH-C	75,0	69,5	74,8

a Declarado pelo fabricante

Amostras alteradas de hLH também foram analisadas. Para obter estas amostras as preparações rhLH-C e phLH-B foram aquecidas a 70 °C, por um tempo de 10 minutos. Os perfis em RP-HPLC destas preparações de hLH submetidas a tratamento térmico e do controle (mesma preparação sem sofrer aquecimento) são mostrados nas Figuras 22 e 23. Observa-se que após o aquecimento, em ambas as preparações testadas, foi obtido um pico bastante deslocado com relação à porção do heterodímero com um tempo de retenção relativo ao heterodímero de 1,73 e 1,55 respectivamente para o hLH-C

recombinante e hLH-B hipofisário. Esta posição não corresponde ao tempo de eluição das subunidades α e β (assinalado na Figura por setas), tratando-se de um produto com hidrofobicidade maior que a do heterodímero, que pode apresentar alguma atividade biológica. De fato a atividade biológica destes produtos alterados, determinados por bioensaio ou por RP-HPLC, mostraram uma perda de atividade média com relação à preparação que não sofreu aquecimento de 47 % e 58 %, respectivamente (Tabela 19).

TABELA 19 - Comparação entre a perda de atividade de preparações alteradas de hLH por Bioensaio *in vivo* e por RP-HPLC

Preparação	Determinação de LH por RP-HPLC		Determinação de LH por Bioensaio <i>in vivo</i>	
	(UI/ampola)	(% recuperação)	(UI/ampola)	(% recuperação)
rhLH-C (controle)	69,5	—	74,8	—
rhLH-C (70°C, 10 min)	31,2	44,9	40,4	54,0
phLH-B (controle)	62,3	—	61,9	—
phLH-B (70°C, 10 min)	24,5	39,3	32,6	52,7

Uma relação linear foi encontrada quando a determinação da potência pelo Bioensaio (BA_{UI}) das preparações íntegras e alteradas de hLH foi comparada com a determinação pela RP-HPLC ($RP-HPLC_{UI}$): $BA_{UI} = 0,8771 RP-HPLC_{UI} + 12,41$; $r = 0,9786$, $p < 0,01$, $n = 5$. Para o hLH, não foi possível realizar outros estudos tais como os realizados para o hFSH e o hTSH em virtude das poucas amostras disponíveis.

FIGURA 22 - Perfil em RP-HPLC da preparação rhLH-C (A) rhLH-C Controle (B) rhLH-C após aquecimento a 70°C

FIGURA 23 - Perfil em RP-HPLC da preparação phLH-B (A) phLH-B Controle (B) phLH-B após aquecimento a 70°C

5 DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que a metodologia físico-química por RP-HPLC é certamente uma alternativa viável ao bioensaio *in vivo* para a determinação quantitativa da atividade biológica de hFSH e hTSH.

Mesmo considerando que um método analítico físico-químico não reflete completamente a complexidade estrutural de uma glicoproteína e sua heterogeneidade inerente, sendo o enfoque biológico mais apropriado para a quantificação das mesmas (Bristow, 2011), ainda assim não é menor a importância de ensaios alternativos que possam complementar o clássico bioensaio *in vivo*, diminuindo a dependência do uso de animais para a sua quantificação. Um único tipo de análise físico-química obviamente não pode refletir todos os aspectos da atividade biológica *in vivo* de um hormônio. De acordo com o enfoque de consistência ("consistency approach") (Garthoff, 1995; Hendriksen, 2008 e 2009), que implica na utilização de testes específicos para demonstrar a equivalência de um produto com outro de comprovada eficácia, existe uma tendência de aceitar ensaios alternativos para determinações de rotina, após a validação inicial do processo com o bioensaio *in vivo*.

A metodologia proposta, baseada simplesmente na massa das substâncias administradas, forneceu um indicador útil do seu efeito, sendo capaz de prever as atividades biológicas com precisão razoável. Isto pode ser devido ao fato dos glicanos ou da distribuição das isoformas em geral, não serem notavelmente diferentes entre as preparações testadas ou, alternativamente, que as isoformas com maior influência na bioatividade estarem presentes apenas em quantidades muito pequenas. Isto pode também explicar outros estudos

reportados na literatura em que a avaliação da bioatividade do hFSH também foi com base em determinação de massa, tais como os de Drieberger e Baer (2003) e Basset (2005).

Dentro do contexto de produtos para uso farmacêutico, a quantificação dos mesmos é muito importante, pois a falta de precisão e exatidão nas medidas pode comprometer a eficácia de um tratamento e ter consequências que tanto podem ser discretas como fatais. Ao analisar amostras de hFSH (ver Tabela 6), hTSH (ver Tabela 10) e hLH (ver Tabela 18 e 19), foram encontradas correlações altamente significativas entre as quantificações obtidas por RP-HPLC e por bioensaios *in vivo*.

A validação do modelo de regressão, realizada segundo a estatística de Bland-Altman (1986), utilizando amostras íntegras e alteradas de preparações de hFSH e de hTSH que não tinham sido utilizadas para construir a curva de correlação, mostrou um acordo aceitável entre os dois métodos. No caso do hFSH, a potência estimada pelo método proposto (físico-químico) não foi inferior a 85% e superior a 110% da potência estimada pelo método *in vivo* e no caso do hTSH, não foi inferior a 80% e superior a 115 %, estando portanto dentro dos limites de 80 - 125%, preconizados pela Farmacopeia Europeia para o ensaio biológico referente a estes produtos. Para o hLH, a validação do modelo de regressão não foi possível de ser realizado em virtude das poucas amostras disponíveis.

O “bias” entre as determinações efetuadas pelos dois métodos foi da mesma ordem tanto para o hFSH (-2,11%) quanto para o hTSH (-2,01%). Já a precisão calculada para o hFSH (ver Tabela 8) foi melhor que a encontrada para o hTSH (ver Tabela 12). A maioria dos parâmetros estatísticos calculados para o hFSH e para o hTSH foram da mesma ordem ou mesmo melhores do que os encontrados na literatura para estudos análogos (Mulders, 1997 e 1999). É importante enfatizar que este tipo de validação está em conformidade com as diretrizes do "Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos" (ECVAM) da Comissão Européia. Recomenda-se que este procedimento seja utilizado, sempre que possível, para a comparação de dados obtidos a partir de diferentes métodos (Garthoff, 1995; Mulders, 1999; Storrington, 2002).

A análise de amostras alteradas de hFSH (fora do prazo de validade e termicamente alterada) mostrou uma perda de atividade semelhante, seja estimada via bioensaio *in vivo* que pelo método alternativo por RP-HPLC. Em amostras de hTSH termicamente alteradas (100 °C e 65 °C) também foram detectadas perda de atividade por ambas as metodologias. Entretanto, na amostra de hTSH aquecida a 50°C somente foi possível identificar perda de atividade pelo método alternativo (~12%), enquanto pelo método biológico esta alteração não foi detectada, evidenciando desta forma a sensibilidade superior do método alternativo com relação ao bioensaio *in vivo*. O estudo realizado anteriormente em nosso laboratório por Carvalho e colaboradores, identificando e caracterizando as subunidades α e β dos hormônios hipofisários hFSH, hTSH e hLH por RP-HPLC, foi de grande importância para a análise das amostras alteradas, permitindo a quantificação da porção inalterada após as amostras sofrerem aquecimento (Carvalho, 2009). Salientamos ainda a alta estabilidade encontrada para a amostra comercial de hTSH, que estocada a 4 °C e analisada 2 anos após sua data de expiração não mostrou qualquer diferença detectável, seja pela metodologia físico-química que pelo bioensaio. Esta mesma amostra também permaneceu inalterada após sofrer 5 ciclos de congelamento-descongelamento, avaliada pelas duas metodologias.

Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, foram estabelecidas e validadas quanto à exatidão, precisão, linearidade e sensibilidade, as metodologias de RP-HPLC utilizadas no presente trabalho para o hFSH (Loureiro, 2006), hTSH (Oliveira, 2003) e hLH (Almeida, 2010), na forma heterodimérica ou dissociada (Carvalho, 2009). No caso do hFSH, este método é, tanto quanto sabemos, o único na literatura capaz de analisar o hFSH intacto, isto é, na sua forma heterodimérica (Loureiro, 2006), o que é fundamental para se estabelecer a potência/conteúdo deste hormônio por RP-HPLC, como proposto neste trabalho.

Cabe ainda comentar sobre a grande dificuldade no que se refere à disponibilidade de padrões de referência para estudos físico-químicos. Preparações com pureza adequada, homogeneidade e quantidade de material suficiente são necessárias para o desenvolvimento e a aplicação destes estudos,

que cada vez mais estão sendo introduzidos por Agências Reguladoras e pelas Farmacopeias para a substituição dos ensaios biológicos *in vivo*, cujo custo e imprecisão são bem conhecidos (Miethe, 2002; Longstaff, 2009).

No presente trabalho foram utilizados nos ensaios físico-químicos os Padrões Internacionais recombinantes para ensaio biológico de hTSH (WHO 03/192), hFSH (WHO 92/642 e 08/282) e de hLH (WHO 96/602). Geralmente, os padrões para ensaio biológico apresentam um conteúdo do excipiente Albumina de Soro Humano (HSA) e no presente trabalho apenas o padrão de hTSH não contém este excipiente. A análise do padrão de hFSH, através da RP-HPLC por nós desenvolvida, mostrou que a grande quantidade de HSA presente nas ampolas deste padrão não elui nas condições estabelecidas para esta metodologia, não interferindo assim na determinação do hFSH, numa preparação em que o hormônio representa menos de 1 % da massa total. Ao contrário, para a determinação do hLH em RP-HPLC, a técnica anteriormente estabelecida em nosso laboratório mostrou-se inadequada para a análise quantitativa do Padrão Internacional de hLH recombinante para ensaio biológico (WHO 96/602), pois a HSA presente neste padrão elui interferindo no pico do hLH (Almeida, 2010).

Uma nova metodologia para análise quantitativa e qualitativa do hLH na presença de grande quantidade de HSA foi então estabelecida e uma melhor resolução entre os picos de HSA e hLH foi alcançada. Pela primeira vez, o hLH pode ser analisado simplesmente alterando e otimizando as condições cromatográficas, sem a necessidade de adição de um sal, extração ou remoção de proteína, típicas de outras abordagens na literatura (Bietlot, 1997; Lara-Quitanar, 2007; Liu, 2011), proporcionando assim um poderoso instrumento para identificação e controle de qualidade desta preparação. Nas condições otimizadas foi alcançada uma melhora com relação ao método anteriormente padronizado para o hLH (Almeida, 2010) de aproximadamente 2 vezes no tempo de retenção relativo e de ~20% na resolução. A quantificação das amostras de hLH mostrou uma tendência da RP-HPLC de subestimar as determinações de hLH. Para realizar uma análise estatística semelhante à feita para o hFSH e hTSH e comprovar esta tendência, seria necessário dispor de um número maior de amostras de hLH.

Salientamos ainda que foram observadas diferenças altamente significativas no tempo de retenção das preparações recombinantes, pituitárias e urinárias de hFSH, refletindo provavelmente o efeito de diferenças estruturais na composição de carboidratos e na hidrofobicidade desta glicoproteína. Observações análogas foram obtidas para os outros dois hormônios glicoproteicos hTSH (Oliveira, 2003; Mendonça, 2005; Damiani, 2013) e hLH (Almeida, 2010).

Considerando a obtenção de fármacos pela Internet, um fenômeno que vem crescendo muito na última década, a possibilidade de distribuição de um produto inadequado e inseguro para o consumidor deve ser evitado ao máximo (Baert, 2010). O método alternativo proposto no presente trabalho para avaliar a potência dos glicohormônios, hFSH e hTSH, pode ser uma aplicação viável para avaliar a qualidade destes produtos.

Enfatizamos ainda a importância do presente estudo no controle de qualidade dos hormônios aqui estudados, especialmente os recombinantes, muito utilizados na prática clínica, seja em diagnóstico ou terapia. O estrito controle da potência destes produtos é um pré-requisito para assegurar a sua identidade e eficácia e o presente trabalho está contribuindo nesta direção.

A metodologia alternativa aqui apresentada para a quantificação de hFSH e hTSH claramente contempla os elementos “Refinement e Reduction” dos 3 Rs para um uso responsável de animais de experimentação no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos bioativos.

Por último ressaltamos que o presente estudo é inédito, não tendo sido encontrados relatos na literatura de métodos alternativos ao bioensaio *in vivo* para o hTSH. Para o hFSH, embora haja alternativas descritas na literatura, estas não se referem à cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC) como aqui desenvolvido. Inédita também é a técnica desenvolvida de determinação quantitativa e qualitativa de hLH na presença de altas quantidades de HSA.

6 CONCLUSÕES

Em conclusão, este trabalho demonstra que a análise físico-química por RP-HPLC é uma alternativa potencialmente viável aos bioensaios *in vivo* para a quantificação do hFSH e do hTSH em preparações íntegras e alteradas.

O emprego destes métodos alternativos, utilizados para assegurar a qualidade e a eficácia de um produto farmacêutico, pode reduzir enormemente o número de animais ou mesmo evitar o seu uso. A este respeito, os resultados do presente trabalho caminham para o uso em combinação ou eventual substituição dos bioensaios *in vivo* em protocolos de controle de qualidade para a avaliação da potência do hFSH e do hTSH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, n.1, p.3-11, 2007.

ALMEIDA, B.E.; OLIVEIRA, J.E.; CARVALHO, C.M.; DALMORA, S.L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase highperformance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.53, p.90–97, 2010.

ALMEIDA, B.E.; OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; DALMORA, S.L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. A pilot study on potency determination of human follicle-stimulating hormone: A comparison between reversed-phase high-performance liquid chromatography method and the in vivo bioassay. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.54, p.681-686, 2011.

ALMEIDA, B.E.; OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; DALMORA, S.L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Qualitative and quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein hormones in the presence of a large excess of human serum albumin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.63, p.160-164, 2012.

AMORESANO, A.; SICILIANO, R.; ORRU, S.; NAPOLEONI, R.; ALTAROCCHA, 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, n.3, p.608-618, 1996.

ARORA, T.; MEHTA, A.K.; JOSHI, V.; MEHTA, K.D.; RATHOR, N.; MEDIRATTA, P.K.; SHARMA, K.K. Substitute of animals in drug research: An approach towards fulfillment of 4R's. **Indian J. Pharm. Sci.**, v.73, n.1, p.1-6, 2011.

BAERT, B.DE; SPIEGELEER, B. Quality analytics of internet pharmaceuticals. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.398, n.1, p.125-136, 2010.

BARTH, T.; SANGOI, M.D.; DA SILVA, L.M.; FERRETTO, R.M.; DALMORA, S.L. Assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations by a reversed-phase liquid chromatography method and bioassay. **J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.**, v.30, p.1277-1288, 2007.

BASAK, A.K.; RAW, A.S.; AL HAKIM, A.H.; FURNESS, S.; SAMAN, N.I.; GILL, D.S.; PATEL, H.B.; POWERS, R.F.; YU, L. Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, n.1, p.64-72, 2007.

BASSET, R. Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. **Reprod. Biomed. Online**, v.10, p.169-177, 2005.

BELLINI, M.H.; BARTOLINI, P. In vivo bioassay for the potency determination of human growth hormone in dwarf "little" mice. **Endocrinology**, v.132, p.2051-2055, 1993.

BIETLOT, H.P.; GIRARD, M., Analysis of recombinant human erythropoietin in drug formulations by high-performance capillary electrophoresis, **J. Chromatogr. A**, v. 759, p.177-184, 1997.

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, **Lancet**, v.1, p.307–310, 1986.

BONNEMA, S.J.; HEGEDUS, L. Radioiodine therapy in benign thyroid diseases: Effects, side effects, and factors affecting therapeutic outcome. **Endocr Rev.**, v.33, n.6, p.920-980, 2012.

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. Cell. Endocrinol.**, v.260, p.40–48, 2007.

BRISTOW, A.F.; WILSON, C.; SUTCLIFFE, N. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of human thyroid-stimulating hormone. **J. Chromatogr.**, v.270, p.285-92, 1983.

BRISTOW, A.F.; JEFFCOATE, S.L. Analysis of therapeutic growth hormone preparations: report of an interlaboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies, **Biologicals**, v.20, p.221-231, 1992.

BRISTOW, A.F. Assignment of quantities to biological medicines: An old problem re-discovered. **Phil. Trans. R. Soc.**, v.369, n.1953, p.4004-4013, 2011.

CANONNE, C.; PAPANDREOU, M.J.; MEDRI, G.; VARRIER, B.; RONIN, C. Biological and immunochemical characterization of recombinant human thyrotrophin. **Glycobiology**, v.5, p.473-481, 1995.

CARVALHO, C.M.; OLIVEIRA, J.E.; ALMEIDA, B.E.; UEDA, E.K.M.; TORJESSEN, P.A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Efficient isolation of the subunits of recombinant and pituitary glycoprotein hormones. **J. Chromatogr. A**, v.1216, n.9, p.1431-1438, 2009.

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, n.1-2, p.261-267, 1993.

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

CHRISTIN-MAITRE, S.; TAYLOR, A.E.; KHOURY, R.H.; HALL, J.E.; MARTIN, K. A.; SMITH, P.C.; ALBANESE, C.; JAMESON, J.L.; CROWLEY, W.F.; JRSLUSS, P. M. Homologous in vitro bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH) reveals increased FSH biological signal during the mid- to late luteal phase of the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.81, n.6, p.2080-2088, 1996.

DALMORA, S.; OLIVEIRA, J.E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **J. Chromatogr. A**, v.782, p.199-210, 1997.

DALMORA, S.L.; MASIERO, S.M.K.; OLIVEIRA, P.R.; SANGOI, M.D.; BRUM, L. Validation of an RP-LC method and assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulations by liquid chromatography and biological assay. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, v.29, p.1753-1767, 2006.

DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J.E.; VORAUER-UHL, K.; PERONI, C.N.; VIANNA, E.G.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Stable expression of a human-like sialylated recombinant thyrotropin in a Chinese hamster ovary cell line expressing alpha 2,6-sialyltransferase. **Protein Expr. Purif.**, v.67, p.7-14, 2009.

DAMIANI, R.; ALMEIDA, B.E.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Enhancement of human thyrotropin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.171, p.1658-1672, 2013.

DE LEO, V.; MUSACCHIO, M.C.; DI SABATINO, A.; TOSTI, C.; MORGANTE, G.; PETRAGLIA, F. Present and future of recombinant gonadotropins in reproductive medicine. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v.13, n.3, p.379-391, 2012.

DRIEBERGEN, R.; BAER, G. Quantification of follicle stimulating hormone (folitropin alfa): is *in vivo* bioassay still relevant in the recombinant age? **Curr. Med. Res. Opin.**, v.19, p.41-46, 2003.

DUFAU, M.L.; MENDELSON, C.R.; CATT, K.J. A highly sensitive *in vitro* bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin: Testosterone production by dispersed leydig cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 39, n.3, p.610-613, 1974.

EAST-PALMER, J.; SZKUDLINSKI, M.W.; LEE, J.; THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D. A novel, nonradioactive in vivo bioassay of thyrotropin (TSH). *Thyroid*, v.5, p.5-9, 1995.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 7. ed. Estrasburgo: EDQM, 2011.

FABRE, I. Alternative methods to animal experimentation: regulatory aspects, state of the art, and prospects. *Bull. Academ. Veter. France*, v.161, p.403-407, 2008.

FEKETE, S.; VEUTHEY, J.L.; GUILLARME, D. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.69, p.9-27, 2012.

FENWICK, N.P.; FRASER, D. The three Rs in the pharmaceutical industry: perspectives of scientist and regulators. *Anim. Welfare*, v.14, p.367-377, 2005.

FERRETTO, R.M.; LEAL, D.P.; DA SILVA, L.M.; NOGUEIRA, D.R.; DALMORA, S.L. Validation of a size-exclusion LC method and assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations by liquid chromatography and biological assay. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.*, v.32, n.10, p.1392-1406, 2009.

FRAIETTA, R.; ZYLBERSTEJN, D.S.; ESTEVES, S.C. Hypogonadotropic hypogonadism revisited. *Clinics.*, v.68, p.81-88, 2013.

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.

GARTHOFF, B.; HENDRIKSEN, C.F.M; BAYOL, A.; GONCALVES, D.; GRAUER, A.; DELEEuw, R.; VANNOORDWIJK, J.; PARES, M.; PIROVANO, R.; RIETH, M.; RONNEBERGER, H.; SPIESER, J.M.; STORRING, P.; VOSBECK, K.; WEICHERT, H. Safety and efficacy testing of hormones and related products – the

report and recommendations of ECVAM workshop-9, **ATLA-Altern. Lab. Anim.**, v.23, p.699–712, 1995.

GROOME, N.P.; ILLINGWORTH, P.J.; O'BRIEN, M.; PAI, R.; RODGER, F.E.; MATHER, J.P.; MCNEILLY, A.S. Measurement of dimeric inhibin b throughout the human menstrual cycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.81, n.4, p.1401-1405, 1996.

HALDER, M.; HENDRIKSEN, C.F.M.; CUSSLER, K.; BALLS, M. ECVAM's contributions to the implementation of the Three Rs in the production and quality control of biologicals, **ATLA-Altern. Lab. Anim.**, v.30, p.93-108, 2002.

HARA, K.; RATHNAM, P.; SAXENA, B.B. Structure of carbohydrate moieties of alpha-subunits of human follitropin, Lutropin, and Thyrotropin. **J. Biological Chem.**, v.253, n.5, 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.

HARTUNG, T.; HOFFMANN, S.; STEPHENS, M. Mechanistic validation. **ALTEX**, v.30, n.2, p.119-130, 2013.

HENDRIKSEN, C.F.M. Reduction of numbers of animals used in the quality control of biologicals, **ATLA-Altern. Lab. Anim.**, v.32, p.53-58, 2004.

HENDRIKSEN, C.F.M. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement, **Expert Rev. Vaccines**, v.8, p.313–322, 2009.

HENDRIKSEN, C.F.M.; ARCINIEGA, J.L.; BRUCKNER, L.; CHEVALIER, M.; COPPENS, E.; DESCAMPS, J.; DUCHENE, M.; DUSEK, D.M.; HALDER, M.; KREEFTENBERG, H.; MAES, A.; REDHEAD, K.; RAVETKAR, S.D.; SPIESER,

J.M.; SWAM, H. The consistency approach for the quality control of vaccines, ***Biologicals***, v.36, p.73–77, 2008.

HIYAMA, J.; RENWICK, A.G.C. Separation of human glycoprotein hormones and their subunits by reversed-phase liquid-chromatography. ***J. Chromatogr.***, v.529, n.1, 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. Role of LH and FSH in ovarian function. ***Mol. Cell. Endocrinol.***, v.161, p.25-30, 2000.

JIA, X.C.; KESSEL, B.; YEN, S.S.; TUCKER, E. M.; HSUEH, A.J. Serum bioactive follicle-stimulating hormone during the human menstrual cycle and in hyper- and hypogonadotropic states: Application of a sensitive granulosa cell aromatase bioassay. ***J. Clin. Endocrinol. Metab.***, v.62, n.6, p.1243-1249, 1986.

JIA, X.C.; HSUEH, A.J. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: Validation and application of the method. ***Endocrinology.***, v.119, n.4, p.1570-1577, 1986.

JUNG, C.; LEE, Y.; JEONG, Y.R.; KIM, J.Y.; KIM, Y.H.; KIM, H.S. Characterization of N alpha-acetyl methionyl human growth hormone formed during expression in *Saccharomyces cerevisiae* with liquid chromatography and mass spectrometry. ***J. Chromatogr. B***, v.814, p.53-59, 2005.

KOVALESKI, J.; KRAUT, B.; MATTIUZ, A.; GIANGIULIO, M.; BROBST, G.; CAGNO, W.; KULKARNI, P.; RAUCH, T. Impurities in generic pharmaceutical development. ***Adv. Drug Deliv. Rev.***, v.59, n.1, p.56-63, 2007.

LARA-QUINTANAR, P.; LACUNZA, I.; SANZ, J.; DIEZ-MASA, J.C.; FRUTOS, M. Immunochromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis, **J. Chromatogr. A**, v.1153, p.227-234, 2007.

LEIST, M.; HASIWA, N.; DANESHIAN, M.; HARTUNG, T. Validation and quality control of replacement alternatives - current status and future challenges. **Toxicol. Res.**, v.1, n.1, p.8-22, 2012.

LI, L.; TIAN, D.D.; CHEN, F.; YANG, J.L.; YU, K.; SUN, Y. Strategies for improving the quantitative bioanalytical performance of LC-MS in pharmacokinetic studies. **Curr. Drug Metabol.**, v.13, n.9, p.1206-1212, 2012.

LISI, F. Gonadotropin therapies in assisted reproduction: safety, efficacy and costs evaluation. In: *17th WORLD CONGRESS ON CONTROVERSIES IN OBSTETRICS, GYNECOLOGY & INFERTILITY (COGI)*, Nov 08-11, 2012, Portugal, **Proceedings**, p.61-65, 2013.

LIU, C.; DONG, S.; XU, X.; YIN, Y.; SHRIVER, Z.; CAPILA, I.; MYETTE, J.; VENKATARAMAN, G. Assessment of the quality and structural integrity of a complex glycoprotein mixture following extraction from the formulated biopharmaceutical drug product. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.54, p.27-36, 2011.

LONGSTAFF, C.; WHITTON, C.M.; STEBBINGS, R.; GRAY, E. How do we assure the quality of biological medicines? **Drug Discov. Today**, v.14, n.1-2, p.50-55, 2009.

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.; TORJESEN, 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.

MADDEN, J.C.; HEWITT, M.; PRZYBYLAK, K.; VANDEBRIEL, R.J.; PIERSMA, A.H.; CRONIN, M.T. Strategies for the optimisation of in vivo experiments in accordance with the 3Rs philosophy. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v.63, n.1, p.140-154, 2012.

MATTALIANO, R.J.; WHITTAKER, B.G.; LOSAPIO, N.M.; CHENEY, L.; COLE, E.S.; PRATT, B.M. Analysis of bioactivity of recombinant human thyroid stimulating hormone in T4 suppressed mice. **Thyroid**, v.5, p.S1-S225, 1995.

McKENZIE, J.M. The bioassay of thyrotropin in serum. **Endocrinology**, v.63, p.372-382, 1958.

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.

METZ, B.; BRUNEL, F.; CHAMBERLIN, C.; VAN DER GUN, J.; HALDER, M.; JISKOOT, W.; KERSTEN, G.; VAN OPSTAL, O.; PETERSEN, J.W.; RAVETKAR, S.D.; REDHEAD, K.; SCHWANIG, M.; WILHELMSSEN, E.S.; VANN, W.F.; HENDRIKSEN, C. The potential of physicochemical and immunochemical assays to replace animal tests in the quality control of toxoid vaccines. The report and recommendations of ECVAM workshop 61. **ATLA-Altern. Lab. Anim.**, v.35, p. 323-331, 2007.

MIETHE, G. Possibilities of replacing and reducing animal tests in the pharmacopoeias: an evaluation of unused methods and proposals for change. **Atla-Altern. Lab. Anim.**, v.30, p.229-240, 2002.

MINEGISHI, T.; NAKAMURA, K.; TAKAKURA, Y.; IBUKI, Y.; IGARASHI, M.; MINEGISHI, T. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.175, n.3, p.1125-1130, 1991.

MULDERS, J.W.M.; DERKSEN, M.; SWOLFS, A.; MARIS, F. Prediction of the in vivo biological activity of human recombinant follicle stimulating hormone using quantitative isoelectric focusing. **Biologicals**, v.25, p.269-281, 1997.

MULDERS, J.W.M.; WIJN, H.; THEUNISSEN, F.; MACHIELSEN, P.; JANSSEN, P. Prediction of the in vivo biological activity of human recombinant follicle stimulating hormone using quantitative isoelectric focusing. Optimization of the model. **Pharm. Pharmacol. Commun.**, v.5, p.51-55, 1999.

MURALIDHAR, K.; CHAUDHARY, R. Assessment of current protocols for the production of therapeutic gonadotropins. **Proc. Natl. Acad. Sci. India B**, v.78, p.189-210, 2008.

NIKITAS, P.; PAPPA-LOUISI, A. Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v.1216, n.10, p.1737-1755, 2009.

OBORA, S.; KUROSAWA, T. Implementation of the Three Rs in biomedical research - has the turn of the century turned the tide? **ATLA-Altern. Lab. Anim.**, v.37, p.197-207, 2009.

OLIVEIRA, J.E.; SOARES, C.R.J.; PERONI, C.N.; GIMBO, E.; CAMARGO, I.M.C.; MORGANTI, L.; BELLINI, M.H.; AFFONSO, R.; ARKATEN, R.R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone

secreted in *Escherichia coli* periplasmic space, ***J. Chromatogr. A***, v. 852, p. 441-450, 1999.

OLIVEIRA, J.E.; MENDONCA, 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.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Practical reversed-phase high-performance liquid chromatography method for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. ***J. Chromatogr. A***, v.1164, p.206-211, 2007.

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, n.6, p.2223-2227, 1984.

PERERA-MARIN, G.; MURCIA, C.; GONZALEZ-PADILLA, E. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: Characterization and physiological relevance. ***Anim. Reprod. Sci.***, v.101, n.3-4, p.187-207, 2007.

PERONI, C.N.; SOARES, C.R.J.; GIMBO, E.; MORGANTI, L.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. ***Biotechnol. Appl. Biochem.***, v.35, p.19-26, 2002.

RAO, C.V. Multiple novel roles of luteinizing hormone. **Fertil. Steril.**, v.76, n.6, p.1097-1100, 2001.

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. A review. **Curr. Pharm. Anal.**, v.2, p.103-126, 2006.

RIGGIN, R.M.; SHAAR, C.J.; DORULLA, G.K.; LAFEVER, D.S.; MINER, D.J. High-performance size-exclusion chromatography determination of the potency of biosynthetic human growth hormones products. **J. Chromatogr.**, v.435, p.307-318, 1988.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.I. **The principles of humane experimental technique**, London, UK: Methuen, 1959.

SCHUTKOSKI, R.; SOUTO, R.B.; CALEGARI, G.Z.; ELSENBACH, L.I.; PORTO, L.P.; SCHRAMM, V.; STAMM, F.P.; DALMORA, S.L. Assessment of recombinant human erythropoietin by alternative bioassay and its correlation with liquid chromatography methods. **Anal. Method.**, v.5, n.16, p.4238-4243, 2013.

SEDAK, R.A.; WANG, F.; GEAGAN, L.B.; ARMSTRONG, L.A.; THYNE, C.D.; COLE, E.S.; MATTALIANO, R.J. Comparison of two *in vitro* methods for the measurement of recombinant human TSH bioactivity. **Biologicals**, v.30, p.245-254, 2002.

SHOHAM, Z.; SMITH, H.; YEKO, T.; O'BRIEN, F.; HEMSEY, G.; O'DEA, L. Recombinant LH (lutropin alpha) for the treatment of hypogonadotrophic women with profound LH deficiency: a randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-efficacy study. **Clin. Endocrinol.**, v.69, p.471-478, 2008.

SOARES, C.R.J, CAMARGO, I.M.C.; MORGANTI, L.; GIMBO, E.; OLIVEIRA, J.E.; LEGOUX, R.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. **J. Chromatogr. A**, v.955, p.229-236, 2002.

SONG, D; WANG, J. Modified resolution factor for asymmetrical peaks in chromatographic separation, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.32, p.1105-1112, 2003.

SPIESER, J.M. Alternatives to Animal Testing: New Approaches in the Development and Control of Biologicals, in: **Proceedings of International Symposium organized by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM)**, Council of Europe in close co-operation with the Ministry of Health and Social Welfare of Croatia, Dubrovnik, Croatia, p.37-38, 2008.

STAMM, F.P.; CALEGARI, G.Z.; DE FREITAS, G.W.; SOUTO, R.B.; PORTO, L.P.; CARDOSO Jr, C.D.A.; DALMORA, S.L. Assessment of recombinant human parathyroid hormone: Correlation of LC methods with bioassays. **Analyst**, v.138, n.5, p.1419-1426, 2013.

STAUB, A.; GUILLARME, D.; SCHAPPLER, J.; VEUTHEY, J.L.; RUDAZ, S. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.55, n.4, p.810-822, 2011.

STEELMAN, S.L.; POHLEY, F.M. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. **Endocrinology**, v.53, p.604-616, 1953.

STORRING, P.L.; DAS, R.E.G.; MULDER, J.M.W.; HALDER, M. Physicochemical methods for predicting the biological potency of recombinant follicle stimulating hormone: an international collaborative study of isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis. **Biologicals**, v.30, p.217-234, 2002.

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.

UEDA, E.K.M.; GOUT, P.W.; MORGANTI, L. Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic *Escherichia coli* extracts. **J. Chromatogr. A**, v.922, p.165-175, 2001.

ULLOA-AGUIRRE, A.; TIMOSSO, 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.

VAN DAMME, M.P.; ROBERTSON, D.M.; MARANA, R.; RITZEN, E.M.; DICZFALUSY, E. A sensitive and specific in vitro bioassay method for the measurement of follicle-stimulating hormone activity. **Acta Endocrinol. (Copenh)**, v.91, n.2, p.224-237, 1979.

VAN DAMME, M.P.; ROBERTSON, D.M.; DICZFALUSY, E. An improved in vitro bioassay method for measuring luteinizing hormone (LH) activity using mouse leydig cell preparations. **Acta Endocrinol. (Copenh)**, v.77, n.4, p.655-671, 1974.

VAN HELL, H.; OVERBEEK, G.A.; MATTHIJSEN, R. Effects of human menopausal gonadotrophin preparations in different bioassay methods. **Acta Endocrinol.**, v.47, n.3, p.409-418, 1964.

WILHELM, A.E.; Growth hormone bioassay. In: Berson S.A., Yalow R.S. (Ed.). **Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology**, North Holland, Amsterdam, 1973. p.296-302.

WORTH, A.P.; BALLS, M. The principles of validation and the ECVAM validation process. **Altern. Lab. Anim.**, v.32 Supl 1B, p.623-629, 2004.

ZACHARIS, C.K. Accelerating the quality control of pharmaceuticals using monolithic stationary phases: a review of recent HPLC applications. **J. Chromatogr. Sci.**, v.47, n.6, p.443-51, 2009.

ZHAO, Y.L.; BREZINA, P.; HSU, C.C.; GARCIA, J.; BRINSDEN, P.R.; WALLACH, E. In vitro fertilization: Four decades of reflections and promises. **Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.**, v.1810, n.9, p.843-852, 2011.