

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

**Caracterização físico-química da foliculotrofina humana (hFSH) recombinante e de suas subunidades, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa: comparação com a preparação de referência de hFSH de origem hipofisária do “National Hormone and Pituitary Program” dos EUA.**

**RENAN FERNANDES LOUREIRO**

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

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

**SÃO PAULO**  
**2006**

*“Quando a mente das pessoas está fechada e a sabedoria não pode lá entrar, as pessoas permanecem amarradas à doença.  
No entanto os seus sentimentos e seus desejos deviam ser investigados e dados a conhecer a sua vontade, e suas idéias deviam ser respeitadas.  
Torna-se, pois aparente serem robustos e prósperos aqueles que alcançaram vigor e energia, enquanto os que perdem vigor e energia perecem”.*

*Chi Po em diálogo com o Imperador Huan Ti*

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos que sempre acreditaram em mim, e que nos momentos mais difíceis que passei, estavam sempre por perto e com palavras amigas!*

*Em especial...*

*À minha doce avó Ilka “in memoriam”.  
Lembranças maravilhosas de minha vida... Obrigado por tudo!*

*Aos meus pais Vasco & Regina.*

*Aos meus irmãos Ralf & Rovená.*

*Às minhas primas Patrícia & Renata.*

*A toda minha Família.*

*Aos meus melhores amigos e quase irmãos, Felipe Boni & Leonardo Mussi.*

*Às minhas melhores amigas Betty Cheung & Marija Stojkovic.*

*Aos meus amigos e irmãos de Ordem Nélio Malta & Jorge Jarjura.*

*À Joyce Parkins, alguém muito especial, que para a minha felicidade já faz parte da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, “O Grande Cientista do Universo”, por tudo o que recebi e pelo que receberei.*

*Agradeço os meus pais, Vasco e Regina, por tudo o que fizeram por mim, pelo que sou e por todo amor, carinho e dedicação durante todos os meus anos de vida.*

*Aos meus irmãos Ralf e Rovena por todo apoio, amor e igual carinho.*

*Em especial, à minha orientadora, Dra. Maria Teresa C. P. Ribela, pela dedicação e orientação dadas, sem as quais a realização de um sonho não seria possível.*

*Ao Dr. Paolo Bartolini, Dr. Carlos Roberto J. Soares, Dra. Cibele N. Peroni e Dra. Kayo Okazaki, pela atenção e co-orientação.*

*Ao Dr. Patrick J. Spencer e a Dra. Nanci do Nascimento pela igual atenção e ajuda sempre que requisitado.*

*Em especial aos amigos do Departamento de Biotecnologia: Johnny, Zé Maria, Eric, Cláudia, Susana, Renata, Cristiane, Miriam, Fernanda, Beatriz, Taís, Flávia, Edilson, Jana, Alberto, Murilo e Júnior.*

*Aos demais amigos e pesquisadores do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e demais colegas da Universidade de São Paulo.*

**Caracterização físico-química da foliculotrofina humana (hFSH) recombinante e de suas subunidades, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa: comparação com a preparação de referência de hFSH de origem hipofisária do “National Hormone and Pituitary Program” dos EUA.**

**Renan Fernandes Loureiro**

## **RESUMO**

Um método de cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-HPLC) para análise qualitativa e quantitativa do hormônio folículo estimulante humano íntegro (hFSH), foi estabelecido e validado quanto à exatidão, precisão e sensibilidade. O FSH humano é um hormônio glicoprotéico dimérico largamente utilizado em medicina reprodutiva tanto para diagnóstico quanto para terapia. A metodologia desenvolvida preserva a integridade da proteína, permitindo a análise da forma heterodimérica intacta, e não somente de suas subunidades, como é normalmente obtida na maioria das condições geralmente empregadas. Esta técnica foi também utilizada para a comparação da hidrofobicidade relativa de preparações de hFSH hipofisária, urinária e derivadas de células de ovário de hamster chinês (CHO) bem como de outros dois hormônios glicoprotéicos, sintetizados na hipófise anterior: hormônio humano estimulante da tireóide (hTSH) e hormônio luteinizante humano (hLH). O menos hidrofóbico dos três hormônios analisados foi o hFSH, seguido do hTSH e do hLH. Uma diferença significativa ( $p < 0,005$ ) foi observada entre o tempo de retenção ( $t_R$ ) das preparações hipofisária e recombinante de hFSH, refletindo diferenças estruturais nas suas cadeias de carboidratos. Duas isoformas principais foram detectadas no hFSH urinário, incluindo uma forma que foi significativamente diferente ( $p < 0,005$ ) das preparações hipofisária e recombinante. Foram demonstradas linearidade da curva dose-resposta ( $r = 0,9965$ ,  $n = 15$ ) para esta metodologia de RP-HPLC, bem como uma precisão inter-ensaio, cujo coeficiente de variação é menor que 4%, para a quantificação de diferentes preparações de hFSH e uma sensibilidade da

ordem de 40 ng. Foram também analisados o comportamento cromatográfico e a hidrofobicidade relativa das subunidades individuais das preparações recombinantes e hipofisária de hFSH. Além disso, a exata massa molecular das subunidades individuais de hFSH e do heterodímero foram simultaneamente determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. A presente metodologia representa, em nossa opinião, uma ferramenta essencial para a caracterização e controle de qualidade deste hormônio, que ainda não consta das principais farmacopéias.

**Physico-chemical characterization of human recombinant follicle-stimulating hormone (hFSH) and its subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC): comparison with pituitary hFSH reference preparation from “National Hormone and Pituitary Program” from USA.**

**Renan Fernandes Loureiro**

**ABSTRACT**

A reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the qualitative and quantitative analysis of intact human follicle-stimulating hormone (hFSH) was established and validated for accuracy, precision and sensitivity. Human FSH is a dimeric glycoprotein hormone widely used as a diagnostic analyte and as therapeutic product in reproductive medicine. The technique developed preserves the protein integrity, allowing the analysis of the intact heterodimeric form rather than just of its subunits, as it is the case for the majority of the conditions currently employed. This methodology has also been employed for comparing the relative hydrophobicity of pituitary, urinary and two Chinese hamster ovary (CHO)-derived hFSH preparations, as well as of two other related glycoprotein hormones of the anterior pituitary: human thyroid-stimulating hormone (hTSH) and human luteinizing hormone (hLH). The least hydrophobic of the three glycohormones analyzed was hFSH, followed by hTSH and hLH. A significant difference ( $p < 0.005$ ) was observed in  $t_R$  between the pituitary and recombinant hFSH preparations, reflecting structural differences in their carbohydrate moieties. Two main isoforms were detected in urinary hFSH, including a form which was significantly different ( $p < 0.005$ ) for the pituitary and recombinant preparations. The linearity of the dose-response curve ( $r = 0.9965$ ,  $n = 15$ ) for this RP-HPLC methodology, as well as an inter-assay precision with relative standard deviation less than 4% for the quantification of different hFSH preparations and a sensitivity of the order of 40 ng, were demonstrated. The chromatographic behavior and relative hydrophobicity of the individual subunits of the pituitary and recombinant preparations were also analyzed. Furthermore, the accurate molecular mass of the individual hFSH subunits and of the heterodimer

were simultaneously determined by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectral analysis (MALDI-TOF-MS). The present methodology represents, in our opinion, an essential tool for characterization and quality control of this hormone that is not yet described in the main pharmacopoeias.



## SUMÁRIO

	Página
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 – MATERIAIS e MÉTODOS</b>	
2.1 – Materiais	
2.1.1 – Preparações hormonais utilizadas	
2.1.1.1 – Preparações de hFSH utilizadas	
2.1.1.1.a – De natureza hipofisária (pit-hFSH) .....	10
2.1.1.1.b – De natureza recombinante (r-hFSH) .....	10
2.1.1.1.c – De natureza urinária (u-hFSH) .....	10
2.1.1.2 – Preparações de hTSH	
2.1.1.2.a – De natureza hipofisária (pit-hTSH) .....	11
2.1.1.2.b - De natureza recombinante (r-hTSH) .....	11
2.1.1.3 – Preparações de hLH	
2.1.1.3.a - De natureza hipofisária (pit-hLH) .....	11
2.1.2 – Reagentes utilizados .....	12
2.1.3 – Equipamentos e acessórios .....	13
2.2 – Métodos	
2.2.1 – Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC .....	15
2.2.1.1 – HPLC de fase reversa (RP-HPLC) .....	15
2.2.1.2 – HPLC de exclusão molecular (HPSEC) .....	15
2.2.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE .....	16
2.2.3 – Espectrometria de massa MALDI-TOF .....	17
2.2.4 – Determinação da quantidade de proteína total .....	18
2.2.5 – Dissociação do heterodímero de hFSH em subunidades $\alpha$ e $\beta$ .....	18

2.2.6 – Validação da metodologia de RP-HPLC padronizada para o hFSH	
2.2.6.1 – Exatidão .....	19
2.2.6.2 – Linearidade de resposta .....	19
2.2.6.3 – Precisão .....	19
2.2.6.4 – Sensibilidade .....	20
<b>3 – RESULTADOS</b>	
3.1 – Padronização da metodologia de RP-HPLC .....	21
3.2 – Validação da técnica de RP-HPLC .....	25
3.3 – Análise qualitativa e caracterização de preparações de hFSH .....	30
3.3.1 – Análise em RP-HPLC .....	30
3.3.2 – Análise em HPSEC .....	32
3.3.3 – Determinação da massa molecular.....	34
3.3.3.1 – SDS-PAGE .....	34
3.3.3.2 – HPSEC.....	36
3.3.3.3 – MALDI-TOF-MS .....	37
3.4 – Análise e caracterização das subunidades de hFSH .....	39
<b>4 – DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47

## 1 – INTRODUÇÃO

O hormônio folículo-estimulante ou foliculotrofina (FSH), objeto de estudo do presente trabalho, pertence à família dos hormônios glicoprotéicos, que inclui também o hormônio estimulante da tireóide ou tireotrofina (TSH) e o hormônio luteinizante ou luteotrofina (LH), que são produzidos e sintetizados na hipófise anterior.

O FSH é um importante regulador da função gonadal. No homem, o hormônio é importante para a espermatogênese e na mulher, é responsável pelo crescimento e maturação dos folículos ovarianos. Este hormônio possui ampla utilização no diagnóstico e terapia em medicina reprodutiva, sendo um componente chave no tratamento da infertilidade. Ele é usado em tecnologia de reprodução assistida para o tratamento de várias condições anovulatórias, incluindo síndrome do ovário policístico e estímulo de folículos múltiplos em relação a, por exemplo, fertilização *in vitro* (1, 34, 38, 41, 52, 55, 64, 71).

As preparações de hFSH disponíveis atualmente são ou purificadas a partir de urina humana (u-hFSH) ou de origem recombinante (r-hFSH), derivadas de células de ovário de hamster chinês (CHO), e são muito semelhantes ao hFSH natural (pit-hFSH). O hFSH purificado de urina de mulheres menopausadas está disponível no mercado desde a década de 60. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante foi introduzido também no mercado, a partir de 1996, o FSH recombinante. Este apresenta vantagens sobre o FSH urinário, uma vez que pode ser obtido em quantidades ilimitadas e com alta consistência de lote para lote. Outra vantagem é não apresentar a potencial presença e infectividade de prions como ocorre na preparação hipofisária. Uma desvantagem é com relação aos custos de produção, sendo que o produto recombinante apresenta custo em média três vezes superior ao urinário (80). Embora possuam naturezas diferentes, ambas as preparações não apresentam diferenças quanto à sua eficácia clínica no que se refere à taxa de gravidez no tratamento da infertilidade (1, 23, 44). Atualmente, somente duas preparações de natureza recombinante estão

disponíveis comercialmente e utilizadas clinicamente: Gonal-f<sup>®</sup>, da indústria farmacêutica Serono (32) e Puregon<sup>®</sup>, da Organon (18, 78). Estas preparações são obtidas a partir de células CHO transfectadas com os genes das subunidades do FSH humano (39). É bem descrita na literatura a caracterização destas preparações com relação à biopotência *in vivo* e *in vitro*, imunopotência, distribuição de isômeros de cargas e complexidade de carboidratos. As preparações recombinantes, quanto à carga, são muito semelhantes às formas encontradas no sangue no decorrer do ciclo menstrual, mas diferem completamente com relação à complexidade dos carboidratos, com predominância de formas de complexidade intermediária nas preparações recombinantes, ao passo que durante o ciclo menstrual, há predominância de formas mais complexas (3, 4, 22, 29, 51, 68, 75, 83).

O hFSH é uma glicoproteína heterodimérica formada por duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ) não ligadas covalentemente. A seqüência de aminoácidos que compõe a subunidade  $\alpha$  do hFSH é comum aos outros hormônios glicoprotéicos (TSH e LH) enquanto aquela que forma a subunidade  $\beta$  é única, específica de cada hormônio e responsável por conferir a função fisiológica específica. A correta estrutura terciária de cada subunidade é mantida por pontes dissulfeto. Antes da formação do dímero  $\alpha\beta$ , cadeias de oligossacarídeos são adicionadas a cada uma das subunidades. As estruturas das cadeias de carboidratos diferem entre os hormônios glicoprotéicos e acredita-se que participam na definição da especificidade biológica de cada um deles. No hFSH, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam duas cadeias de oligossacarídeos de ligação-N, que se ligam nas asparaginas 52 e 78, no caso da subunidade  $\alpha$  e às asparaginas 07 e 24, no caso da subunidade  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  é composta por 92 resíduos de aminoácidos e sua molécula é estabilizada por cinco ligações dissulfeto, enquanto a subunidade  $\beta$  é composta por 111 resíduos de aminoácidos e apresenta seis ligações dissulfeto (32, 42) (Fig. 1 e Tab. 1).

<u>Subunidade alfa</u>	
Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys	10
Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln	20
Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly	30
Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro	40
Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln	50
Lys <b>Asn</b> 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 <b>Asn</b> His Thr	80
Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His	90
Lys Ser	92
<u>Subunidade beta</u>	
Asn Ser Cys Glu Leu Thr <b>Asn</b> Ile Thr Ile	10
Ala Ile Glu Lys Glu Glu Cys Arg Phe Cys	20
Ile Ser Ile <b>Asn</b> Thr Thr Trp Cys Ala Gly	30
Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys	40
Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr	50
Cys Thr Pro Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr	60
Val Arg Val Pro Gly Cys Ala His His Ala	70
Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr	80
Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp	90
Ser Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly	100
Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys	110
Glu	111

**Figura 1 – Sequência de aminoácidos das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do FSH.**

**Tabela 1 – Características do hFSH.**

Propriedade	Subunidade $\alpha$	Subunidade $\beta$
Estrutura primária	92 aa	111 aa
Aminoácido N-terminal	Ala	Asn
Pontes dissulfeto (Cys-Cys)	7-31	3-51
	10-60	17-66
	28-82	20-104
	32-84	28-82
	59-87	32-84
Sítios de N-glicosilação	Asn 52	Asn 7
	Asn 78	Asn 24

O FSH é eliminado do organismo via filtração glomerular (45).

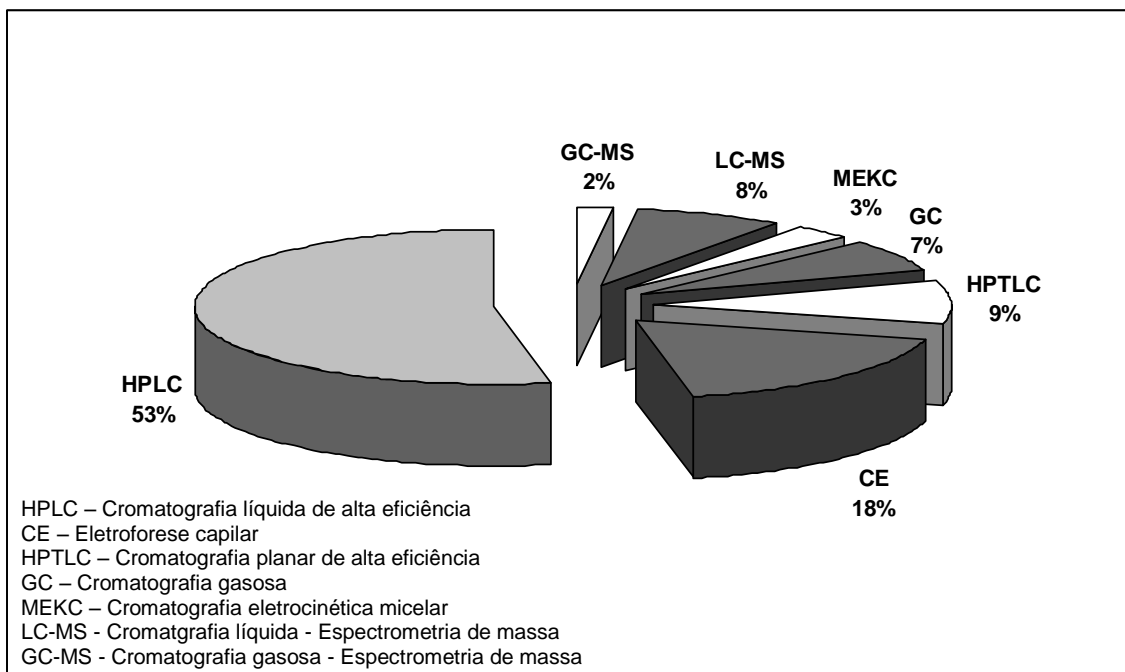
Este hormônio possui muitas isoformas resultantes de diferenças na glicosilação e associadas com a variação do conteúdo de ácido siálico. Isto resulta em heterogeneidade de carga, com formas acídicas, com mais ácido siálico do que as formas básicas, que diferem quanto à meia vida plasmática e quanto à atividade biológica. As isoformas com alto conteúdo de ácido siálico tem um baixo ponto isoelétrico, são carregadas negativamente em pH fisiológico, e não são facilmente filtradas pelos glomérulos, permanecendo mais tempo na corrente sanguínea, o que permite afirmar que isoformas mais acídicas têm uma meia vida mais longa do que as mais básicas, mostrando uma maior atividade biológica in vivo (10, 29, 55).

Um estrito controle da consistência de diferentes lotes de hFSH utilizados clinicamente como agente terapêutico, se faz necessário face a considerável heterogeneidade associada a diferentes preparações de hFSH, principalmente relacionada à presença de diferentes glicoformas (2, 4, 5, 11, 15, 22, 24, 25, 42, 56, 66, 74). Sua identificação e análise são principalmente obtidas por técnicas como imunoensaio (15), bioensaio (67), SDS-PAGE e Western blotting (28, 42, 66, 78) cujas limitações são bem conhecidas (49, 57) e por determinações mais

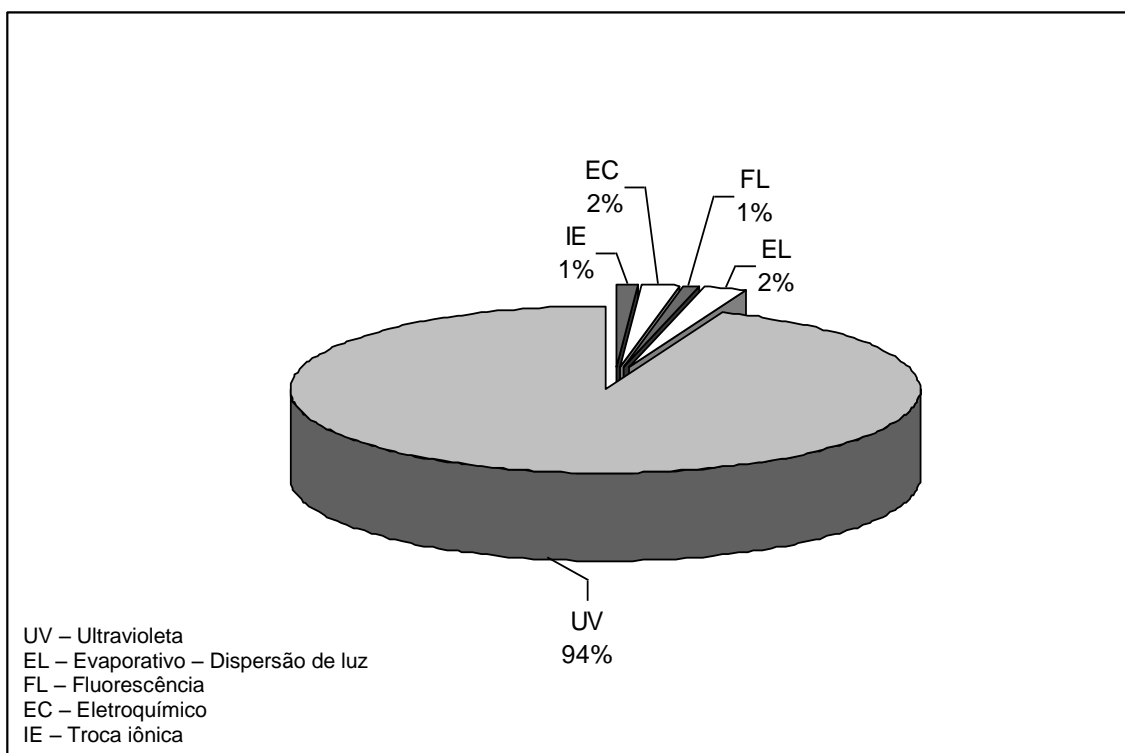
precisas como focalização isoelétrica (11, 18, 42, 47, 78) e eletroforese capilar (68).

Uma técnica que também tem sido empregada freqüentemente para a detecção, determinação e em estratégias de controle dos hormônios hipofisários, incluindo o do hFSH é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (59).

A HPLC é uma técnica bem estabelecida e tem sido utilizada com sucesso em diversos campos de aplicações. Devido à sua alta eficiência de separação, seletividade e especificidade, tem sido uma ferramenta extremamente útil para a obtenção de informações quanto à pureza, identidade, potência segurança e estabilidade dos hormônios hipofisários. A HPLC tem sido, entre as principais técnicas cromatográficas, a mais empregada na análise de impurezas de drogas, como mostrado por Rao e colaboradores em recente revisão (58) (Fig. 2). A absorvância em luz ultravioleta (UV) é o principal sistema de detecção utilizado nesta técnica (Fig. 3), que assegura adequada confiabilidade, reprodutibilidade, sensibilidade e velocidade de análise (58).



**Figura 2 – Principais técnicas cromatográficas utilizadas para a análise de impurezas em fármacos: extraído de Rao e col. (58).**



**Figura 3 – Principais sistemas de detecção utilizados na HPLC para a análise de impurezas em fármacos: extraído de Rao e col. (58).**



Vários são os princípios em que se baseia a separação (“modos”) por HPLC utilizados para o controle de qualidade dos hormônios hipofisários, incluindo o de fase reversa (RP-HPLC), interação hidrofóbica (HI-HPLC), exclusão molecular (HPSEC) e troca iônica (IE-HPLC), baseados em diferentes propriedades das moléculas como hidrofobicidade, tamanho e carga. Alterações físico-químicas e modificações pós-traducionais na estrutura das proteínas que comprometem sua integridade, podem ser de fato avaliadas por estes tipos de cromatografia (19, 35). RP-HPLC, HI-HPLC e IE-HPLC são potencialmente úteis para identificação de, por exemplo, formas desamidadas. A RP-HPLC é praticamente a única ferramenta capaz de identificar formas alteradas originadas por oxidação da metionina ou pela troca de ligações dissulfeto. A HI-HPLC e a HPSEC podem ser úteis para a determinação de formas clivadas proteoliticamente. A HPSEC é a melhor opção analítica para avaliar a provável presença de impurezas resultantes de fragmentação, agregação ou oligomerização. Variantes da glicosilação podem ser identificadas por IE-HPLC.

Até o momento, a quantificação do hFSH, tem sido principalmente obtida pelo bioensaio clássico *in vivo* de Steelman & Pohley (67), modificado por Van Hell e colaboradores (77), por meio de bioensaios *in vitro* (16, 36, 73, 76) ou por imunoenaios (9, 15, 29, 50, 62, 63, 69). Uma alternativa viável aos bioensaios *in vivo*, cuja variabilidade intrínseca é superior a 20%, para a quantificação do produto final, é a determinação do conteúdo de hFSH através de HPLC por exclusão molecular (HPSEC), com variabilidade menor que 2% (20, 33). Esta estratégia de quantificação pela massa permite uma estimativa mais precisa do conteúdo de FSH em diferentes lotes, sendo um importante passo em direção à minimização da variabilidade que pode influenciar a resposta ao tratamento com o hFSH.

A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) é o modo de análise por HPLC mais utilizado em uma grande variedade de campos analíticos, incluindo o controle de qualidade de biofármacos. Procedimentos rápidos, alta seletividade, eficiência e resolução juntamente com consumo

reduzido de solvente têm sido possível com a utilização de colunas cromatográficas de fase reversa de alta estabilidade química e térmica (13). A RP-HPLC é uma metodologia robusta que explora as diferenças na hidrofobicidade e polaridade das moléculas alvo.

Esta técnica tem sido freqüentemente utilizada para a caracterização e controle de qualidade dos hormônios hipofisários humanos, sendo uma ferramenta bastante útil para detectar e quantificar discretas modificações na estrutura molecular do produto analisado, tanto dos hormônios glicoproteicos (43, 46, 49, 59) como daqueles sem glicosilação (8, 17, 37, 48, 59, 65, 72). É reportado na literatura que o hTSH e o hLH, tanto derivados da hipófise (7, 12) quanto derivados de células CHO (14, 49), quando em ambiente ácido, eluem como subunidades separadas ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Estes hormônios permanecem porém intactos quando as condições de sua eluição são em pH neutro, com gradiente baseado em acetonitrila e utilizando colunas de sílica tipo C<sub>4</sub> (14, 31, 49). Estas mesmas condições porém mostraram-se inapropriadas para o hFSH, sendo observada a dissociação parcial deste hormônio.

Na literatura, a maioria dos trabalhos que empregaram a RP-HPLC para a caracterização do hFSH hipofisário (26, 30, 31, 54) e recombinante (32, 42) sempre identificaram individualmente as subunidades separadas ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Apenas um trabalho, o de Hiyama e colaboradores (31) mostrou o hFSH hipofisário intacto. Neste trabalho foi proposto o uso de duas colunas de RP-HPLC de diferentes hidrofobicidades, em série, uma com ligante de capacidade de retenção menor (C<sub>1</sub>) e a outra mais hidrofóbica (C<sub>4</sub>), operando a pH neutro. O uso simultâneo dessas colunas com diferentes hidrofobicidades permitiu a separação dos três hormônios glicoprotéicos (hFSH, hTSH e hLH) de origem hipofisária com manutenção de sua integridade. Além da complexidade, estas condições não conseguiram porém diferenciar claramente a subunidade  $\beta$  do hFSH do heterodímero.

Face ao acima exposto e considerando a larga utilização terapêutica do hFSH, é de extremo interesse poder identificá-lo, caracterizá-lo e analisá-lo em sua forma íntegra, bem como caracterizar suas subunidades.

## **OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia original de análise por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) para o FSH (heterodímero) de diferentes origens e suas subunidades em comparação com o hFSH natural (preparação de origem hipofisária do “National Hormone and Pituitary Program”), visando sua aplicação na caracterização e controle de qualidade deste hormônio. Esta metodologia poderá também ser de grande interesse para a definição da monografia deste hormônio, a ser incluída nas principais farmacopéias.

## **2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 - Materiais**

#### **2.1.1 - Preparações hormonais utilizadas**

##### **2.1.1.1 - Preparações de hFSH utilizadas**

###### **2.1.1.1. a - De natureza hipofisária (pit-hFSH):**

- pit-hFSH NIDDK (NIDDK-hFSH-I-SIAFP-2)
- $\alpha$ -hFSH NIDDK ( $\alpha$ -hFSH, NIDDK-h $\alpha$ FSH-I-3)
- $\beta$ -hFSH NIDDK ( $\beta$ -hFSH, NIDDK-h $\beta$ FSH-I-SIAFP-2)

Estas preparações hormonais foram fornecidas pelo "National Hormone and Pituitary Program" (Torrance, CA, EUA).

- pit-hFSH Nor fornecido pelo Dr. Peter A. Torjesen - "Aker University Hospital" (Oslo, Noruega).

###### **2.1.1.1. b - De natureza recombinante (r-hFSH):**

- GONAL-f<sup>®</sup> 75 UI, produzida por "Laboratories Serono S.A." (Aubonne, Suíça).
- Puregon<sup>®</sup> 100 UI, produzido por "N.V. Organon" (Oss, Holanda).

Estes produtos foram adquiridos no SAR - Serviço de Atendimento Rápido (São Paulo, SP, Brasil).

###### **2.1.1.1.c - De natureza urinária (u-hFSH):**

- Metrodin HP<sup>®</sup> 75 UI, produzida por "Laboratories Serono S.A." (Aubonne, Suíça).

Esta preparação foi gentilmente doada pela Serono na pessoa do Sr. Orlando V. Silva.

#### 2.1.1.2 - Preparações de hTSH:

##### 2.1.1.2.a – De natureza hipofisária (pit-hTSH)

- pit-hTSH NIDDK (p-hTSH NIDDK, NIDDK-hTSH-SIAFP-B2)
- $\alpha$ -hTSH NIDDK ( $\alpha$ -hTSH NIDDK, NIDDK-h $\alpha$ TSH-I-SIAFP)
- $\beta$ -hTSH NIDDK ( $\beta$ -hTSH NIDDK, NIDDK-h $\beta$ TSH-I-3-SIAFP)

Estas preparações foram produzidas e fornecidas pelo "National Hormone and Pituitary Program" (Torrance, CA, EUA).

##### 2.1.1.2.b – De natureza recombinante

- Thyrogen<sup>®</sup>, produzida por "Genzyme Corporation" (Cambridge, USA).

Esta preparação foi adquirida na Collect (São Paulo, SP, Brasil).

#### 2.1.1.3 - Preparações de hLH

##### 2.1.1.3.a – De natureza hipofisária

- pit-hLH (pit-hLH NIDDK, NIDDK-hLH-I-SIAFP-2)

Este produto foi fornecido pelo "National Hormone and Pituitary Program" (Torrance, CA, EUA).

### 2.1.2 - Reagentes utilizados

- Acetonitrila grau HPLC, MALLINCKRODT, Phillipsburg, EUA.
- Ácido acético, LABSYNTH, São Paulo, Brasil.
- Ácido clorídrico, MERCK, São Paulo, Brasil.
- Acrilamida, MERCK, São Paulo Brasil.
- Álcool metílico, MERCK, São Paulo, Brasil.
- Bisacrilamida, MERCK, São Paulo Brasil.
- Cloreto de sódio, MERCK, São Paulo Brasil.
- Coomassie Brilliant Blue G 250, GE HEALTHCARE, São Paulo, Brasil.
- Dodecil sulfato de sódio (SDS), GE HEALTHCARE, São Paulo, Brasil.
- Fosfato de amônio bibásico, LABSYNTH, São Paulo, Brasil.
- Fosfato de sódio monobásico p.a., MERCK, São Paulo Brasil.
- Fosfato de sódio dibásico p.a., MERCK, São Paulo Brasil.
- Glicerol, MERCK, São Paulo Brasil.
- Glicina, MERCK, São Paulo Brasil.
- Kit MICRO BCA para dosagem de proteína total, PIERCE, Rockford, EUA.
- Padrões de peso molecular, GE HEALTHCARE, São Paulo, Brasil.
- Persulfato de amônio, MERCK, São Paulo Brasil.
- Sulfato de amônio p.a., MERCK, São Paulo Brasil.
- TEMED (N, N, N', N' tetrametietilenodiamina), SIGMA, St. Louis, EUA.
- TRIS, SIGMA, St. Louis, EUA.

### 2.1.3 - Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético modelo 258, FANEM, São Paulo, Brasil.
- Agitador tipo rotatório tipo vórtex modelo 162, MARCONI, São Paulo, Brasil.
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) modelo SCL-10A, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e a um programa de computador Class VP, SHimadzu, MD, EUA.
- Autoclave vertical modelo 103, FABBE-PRIMAR, São Paulo, Brasil.
- Balanças analíticas, METTLER, Zurich, Suíça, modelos: H20T, P100N e M5AS.
- Centrífuga modelo LS-3 PLUS, CELM, São Paulo, Brasil.
- Centrífuga refrigerada automática modelo SUPER SPEED RC-2B, SORVALL, Newtown, Connecticut, EUA.
- Coluna para HPLC de exclusão molecular TSK G 2000 SW (60 cm X 7,5 mm D.I.), tamanho das partículas 10  $\mu\text{m}$  e poros de 125 Å, acoplada a uma pré-coluna SW (7,5 cm X 7,5 mm D.I.), TOSOHAAS, Montgomeryville, PA, EUA.
- Coluna para HPLC de fase reversa C<sub>4</sub> VYDAC, 214 TP 54 (25 cm X 4,6 mm D.I.), tamanho das partículas 5  $\mu\text{m}$ , diâmetro dos poros de 300 Å, acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5  $\mu\text{m}$ , 1,0 cm X 4,6 mm D.I.), SEPARATIONS GROUP, Hesperia, CA, 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, Ohio, EUA.
- Leitor de micro placas modelo MR 4000, DYNATECH LABORATORIES, INC., Sullyfield Circle, USA.
- Medidor digital de pH modelo 420 A, ORION, Boston, EUA.
- Membranas para filtração de 0,22  $\mu\text{m}$ , MILLIPORE, Bedford, MA, EUA.

- Placas para microtitulação, 96 poços, com fundo em “U”, DYNATECH, Chantilly, EUA.
- Refrigerador duplex modelo 320 CLEAR, BRASTEMP, São Paulo, Brasil.
- Sistema de eletroforese vertical HOEFER MINI VE, GE HEALTHCARE, São Paulo, Brasil.
- Sistema de purificação de água, MILLIPORE MILLI-Q PLUS, Bedford, EUA.



## **2.2 - Métodos**

### **2.2.1 - Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC**

#### **2.2.1.1 – HPLC de fase reversa (RP-HPLC)**

A RP-HPLC foi realizada utilizando uma coluna C<sub>4</sub> acoplada a uma pré-coluna e esta acoplada a uma segunda pré-coluna de sílica, localizada entre a bomba e o injetor. Esta última serve como um saturador de sílica para proteger a coluna principal de separação da dissolução da sílica, provocada pela fase móvel (60). A temperatura da coluna foi mantida a 25° C. A detecção foi feita por absorvância em luz ultravioleta (UV), em um comprimento de onda de 220 nm.

A quantificação da amostra desconhecida foi obtida através da análise da área do pico, comparada à área de uma preparação referência. Neste trabalho foi utilizada como preparação referência o hFSH pituitário (pit-hFSH Nor).

Foram utilizadas fases móveis diferentes para os hormônios estudados neste trabalho. No caso do hTSH e hLH a fase móvel foi: gradiente linear de 25 a 100% de eluente B, sendo o eluente B 50% de acetonitrila mais 50% de eluente A, onde o eluente A é o tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0. No caso do hFSH as condições utilizadas foram: gradiente linear de 30 a 100% de eluente B, sendo o eluente B 50% de acetonitrila mais 50% de eluente A, onde o eluente A é o tampão fosfato de amônio 0,05 M, pH 8,6.

Para os três hormônios o tempo de corrida foi de 40 minutos, com fluxo de 0,5 ml/min.

Em geral foram processadas alíquotas de 150 – 250 µl de r-hFSH e de u-hFSH e de 5 – 10 µl do pit-hLH, pit-hTSH e pit-hFSH.

#### **2.2.1.2 – HPLC de exclusão molecular (HPSEC)**

Para a cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC) foi empregada uma coluna TSKG 2000 SW acoplada a uma pré-coluna.

A fase móvel utilizada foi fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0, cloreto de sódio 0,15 M. A corrida durou 30 minutos, a um fluxo de 1,0 ml/min. A detecção foi por absorvância em UV, em um comprimento de onda de 220 nm.

### **2.2.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 15%, na presença de 0,1% de SDS, em condições não redutoras e redutoras, esta última utilizando  $\beta$ -mercapto-etanol como agente redutor.

Em ambas as condições as amostras foram adicionadas ao tampão de amostra, específico para cada condição, na proporção de 3:1.

Embora classicamente em SDS-PAGE, em condições redutoras e não redutoras, as amostras sejam fervidas, para analisar o hFSH em condições não redutoras não fervemos as amostras, pois estas, quando submetidas à fervura, sofreram dissociação parcial. Esta estratégia foi também reportada na literatura por Perlman e colaboradores (55). Em condições redutoras, as amostras foram fervidas durante 20 minutos e adicionadas ao tampão de amostra.

Em condições não redutoras o tampão de amostra utilizado foi: 2 ml de glicerol 20%, 3 ml de SDS 20% contendo 10 mg de azul de bromofenol (0,1%), 2,5 ml de tris HCl pH 6,8 e qsp 10 ml de água.

Em condições redutoras o tampão de amostra utilizado foi: 1 ml de  $\beta$ -mercapto-etanol, 2 ml de glicerol 20%, 3 ml de SDS 20% contendo 10 mg de azul de bromofenol (0,1%), e 2,5 ml de tris HCl pH 6,8 e qsp 10 ml de água.

O tampão de empilhamento foi: 6,06 g de tris HCl pH 6,8 e 2 ml de SDS 20% e qsp 100 ml de água. O tampão de resolução foi: 18,17 g de tris HCl pH 8,8 e 2 ml de SDS 20% e qsp 100 ml de água. Para o tampão de corrida foram utilizados: 3 g de tris, 14,4 g de glicina e 5 ml de SDS 20% e qsp 1000 ml de água.

O gel de empilhamento utilizado foi preparado a 5% e composto de: 0,17 ml de solução A:B; 0,13 ml de tris HCl 1,5M pH 6,8; 0,01 ml de SDS 20%; 0,01 ml de

persulfato de amônio; 0,001 ml de TEMED e qsp 1 ml de água. O gel de resolução foi preparado a 15%, contendo: 2,5 ml de solução A:B; 1,3 ml de tris HCl 1,5 M pH 8,8; 0,05 ml de SDS 20%; 0,05 ml de persulfato de amônio; 0,002 ml de TEMED e qsp 5 ml de água.

A solução A:B foi: 30 g de acrilamida (A) e 0,8 g de bis-acrilamida (B) e qsp 100 ml de água.

A corrida foi realizada com intensidade de corrente de 25 mA e o tempo de corrida foi de cerca de 2 horas. As amostras foram fixadas por 30 minutos imersas em solução fixadora, contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água. A coloração foi realizada com o gel imerso em solução corante composta por 0,25% de Coomassie Brilliant Blue G 250", 45% de metanol, 8% de ácido acético e 47% de água, em agitação durante aproximadamente 30 minutos. O gel foi descorado utilizando 10% de ácido acético em água até visualização bem definida das bandas e posteriormente conservado em água.

A mobilidade das proteínas desconhecidas foi comparada à de padrões protéicos (GE HEALTHCARE) de pesos moleculares conhecidos, que variaram de 14,4 a 94 kDa.

### **2.2.3 - Espectrometria de massa MALDI-TOF**

As massas moleculares de diferentes preparações de hFSH foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight). Como matriz foi utilizado o ácido sinapínico (SA).

A análise foi realizada em um sistema "Voyager-DE BioSpectrometry Workstation", Applied Biosystems, no laboratório da University of Califórnia at Riverside - Division of Biomedical Sciences , CA, USA.

#### **2.2.4 - Determinação da quantidade de proteína total**

A concentração de proteína total foi estimada usando o método “Micro BCA”. Este ensaio consiste basicamente na detecção colorimétrica e quantificação de proteína total em solução diluída após reação com ácido bicinonínico (BCA). A concentração de proteína total de uma amostra desconhecida é determinada a partir de uma curva de calibração que relaciona diferentes concentrações de soro albumina bovina pura (BSA), no intervalo de 0,5 a 200  $\mu\text{g/ml}$ , com a absorbância correspondente, no comprimento de onda de 540 nm.

#### **2.2.5 - Dissociação do heterodímero de hFSH em subunidades alfa e beta**

Para esse estudo de dissociação foram utilizadas amostras contendo 5  $\mu\text{g}$  de FSH.

Os seguintes agentes dissociadores foram testados: ácido trifluoracético (TFA), guanidina, uréia e ácido acético.

No caso do TFA, a amostra foi incubada durante 30 minutos à 25°C com 0,1% de TFA, pH 2,3 (31).

Quando foi usada a guanidina, o hFSH foi incubado com guanidina 6M, em tris HCl 0,05 M, pH 8,0 por 16 horas à 37°C (31).

Uréia 8M, em fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 foi usada para incubar a amostra de hFSH, durante 16 horas, à temperatura de 37°C (53).

O ácido acético 3M em fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 foi usado para incubar a amostra de hFSH, durante 16 horas à 37°C (70).

## 2.2.6 – Validação da metodologia de RP-HPLC padronizada para o hFSH

### 2.2.6.1 – Exatidão

Amostras com quantidades conhecidas de hFSH (0,55 µg; 1,10 µg; 2,21 µg; 5,52 µg e 11,04 µg) foram quantificadas em triplicata por RP-HPLC. A razão entre a quantificação por RP-HPLC e o valor real da amostra, permite avaliar a exatidão do método.

### 2.2.6.2 – Linearidade de resposta

Foi determinada uma curva dose-resposta relacionando a área do pico (unidades arbitrárias, u.a.) X quantidades conhecidas de hFSH (µg). A preparação utilizada para a determinação da curva de calibração foi pit-hFSH NIDDK. A linearidade de resposta, no intervalo de 0,55 a 11,04 µg, foi confirmada através do coeficiente de correlação.

### 2.2.6.3 – Precisão

A precisão das medidas das amostras de hFSH efetuadas por RP-HPLC foi avaliada intra-dia (n=4) e inter-dia (n=3) pelos desvios padrões relativos (RSD) calculados por:

$$RSD = \frac{\delta}{\bar{M}} \times 100$$

onde:

$\bar{M}$  = média das determinações

$\delta$  = desvio padrão da média

#### 2.2.6.4 – Sensibilidade

O limite de detecção (sensibilidade) da metodologia de RP-HPLC estabelecida para o hFSH, foi calculada com base nos desvios padrões das respostas relativas à menor dose aplicada (0,55 µg) e à dose zero (apenas o tampão), usando o teste "t" de Student (p=0,05), de acordo com a formulação de Rodbard (61):

$$y_{\min} = y_0 + t s_p \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_1}}$$

$$s_p = \sqrt{\frac{s_0^2 (n_0 - 1) + s_1^2 (n_1 - 1)}{n_0 + n_1 - 2}}$$

onde:

$y_{\min}$  = resposta mínima detectável (área do pico)

$y_0$  = resposta da dose zero

$n_0$  = número de replicatas da dose zero

$s_0$  = desvio padrão da dose zero

$n_1$  = número de replicatas da menor dose aplicada

$s_1$  = desvio padrão da menor dose aplicada

$t$  = valor do "t" de Student correspondente a  $n_0 + n_1 - 2$

A dose mínima detectável ( $X_{\min}$ ) foi então calculada pela curva de calibração estabelecida.

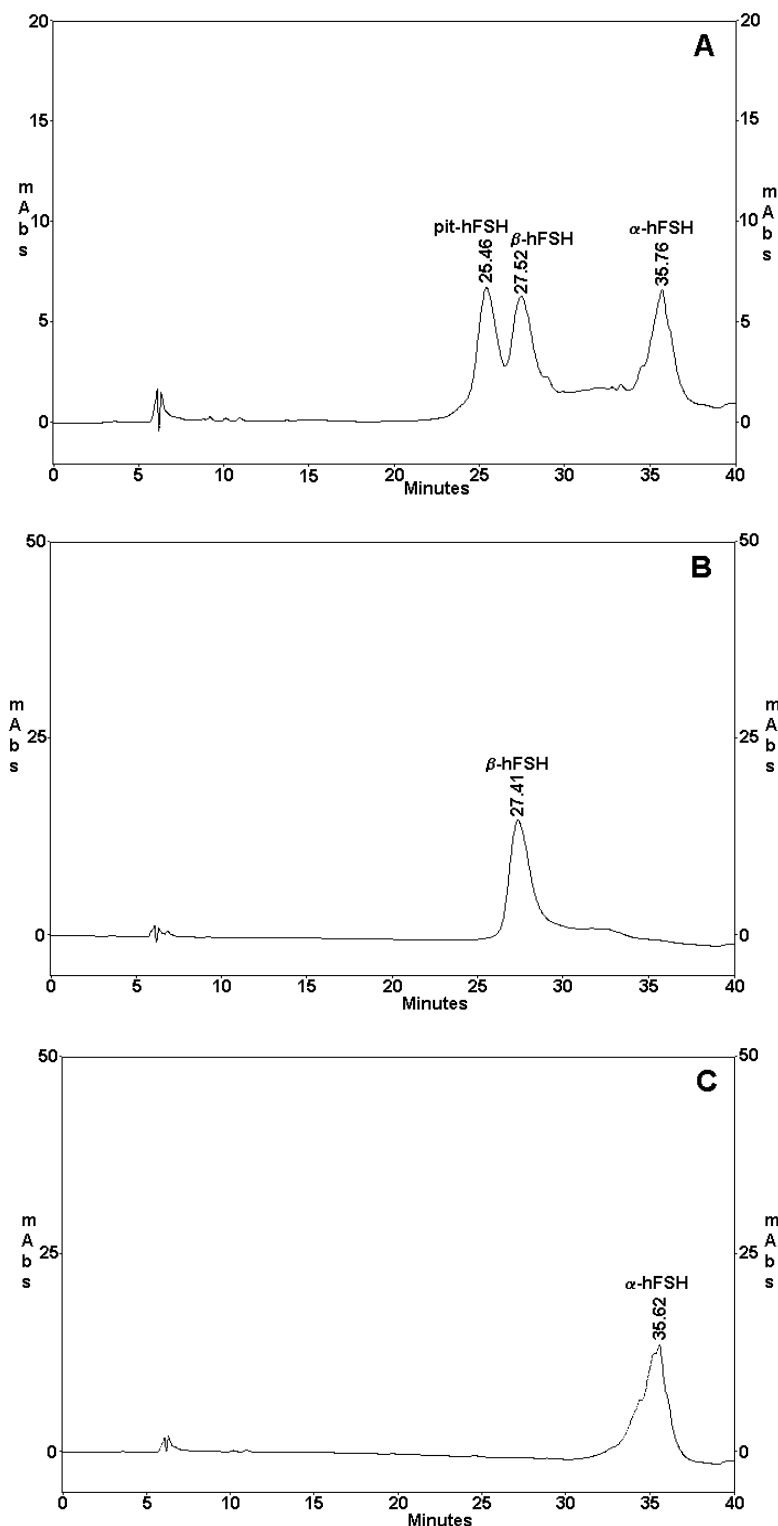
### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 – Padronização da metodologia de RP-HPLC para análise do hFSH

Inicialmente utilizou-se como condição de trabalho, para analisar o hFSH em RP-HPLC, aquela previamente estabelecida em nosso laboratório para o hTSH (49). Esta condição utiliza um gradiente linear de 25 a 100% de eluente B, durante 40 minutos, com um fluxo de 0,5 ml/min, sendo o eluente A: tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 e o eluente B: 50% de acetonitrila mais 50% eluente A.

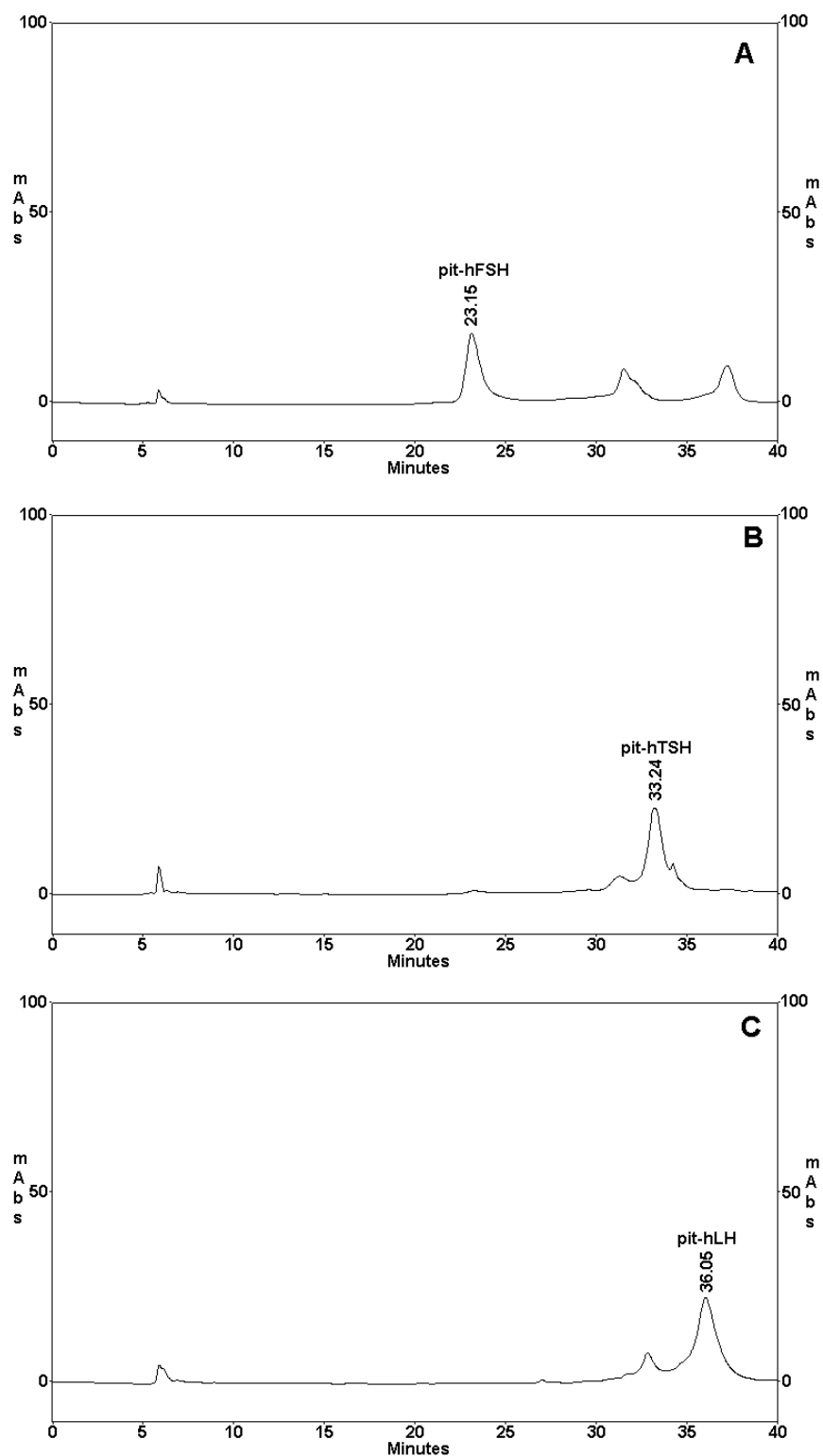
Nestas condições obteve-se um perfil como o da figura 4A, onde observa-se que cerca de 70% do heterodímero dissocia-se em subunidades. As subunidades foram identificadas comparando-se os seus tempos de retenção com aqueles observados para cada uma das subunidades puras aplicadas separadamente (Fig. 4B e 4C), sendo que a subunidade  $\beta$  elue com  $t_R$  de 27,52 minutos e é menos hidrofóbica que a subunidade  $\alpha$  cujo  $t_R$  é de 35,76 minutos. Esta condição foi útil também para analisar a hidrofobicidade relativa dos três hormônios glicoprotéicos secretados pela hipófise anterior, sendo o hFSH o menos hidrofóbico dos três hormônios (menor tempo de retenção), seguido do hTSH e do hLH (Fig. 5).

Uma vez que nesta condição de trabalho a integridade do hFSH não é mantida, foram necessários estudos para adequação desta técnica às características do hFSH. O primeiro parâmetro modificado foi o início do gradiente. Foram realizadas análises em RP-HPLC, mantendo a mesma fase móvel e variando o início do gradiente de 25 a 32% B, e avaliada a formação da subunidade  $\alpha$  (Tab. 2). A medida que o início do gradiente aumentou, foi observada uma menor dissociação do heterodímero. A menor dissociação ocorreu com início do gradiente em 30% B. Sendo que uma dissociação parcial do heterodímero ainda ocorre nestas condições, passamos a estudar a influência da força iônica do eluente A nesta dissociação.



**Figura 4 – Perfil cromatográfico em RP-HPLC de uma preparação hipofisária pura de hFSH (pit-hFSH NIDDK) e suas subunidades. Coluna: C4 Vydac, 214 TP54, 25 cm X 4.6 mm D.I., diâmetro das partículas 5  $\mu$ m. A eluição foi realizada à temperatura de 25°C, com um fluxo de 0.5 mL/min e a detecção foi feita em UV a 220nm. Eluente A: 0.05 M tampão fosfato de sódio (pH 7.0); Eluente B: 50% acetonitrila + 50% eluente A. Eluição, durante 40 min, com gradiente linear de 25 a 100% B. (A) 5 $\mu$ g de hFSH hipofisário; (B) 5 $\mu$ g de  $\beta$ -hFSH hipofisário; (C) 5 $\mu$ g de  $\alpha$ -hFSH hipofisário. O painel A tem uma escala diferente comparado aos painéis B e C.**





**Figura 5 - Perfil cromatográfico em RP-HPLC de diferentes hormônios glicoprotéicos. (A) 8,5  $\mu$ g de pit-hFSH NIDDK; (B) 5  $\mu$ g de pit-hTSH NIDDK; (C) 5  $\mu$ g de pit-hLH NIDDK. Foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas da Figura 4.**

**Tabela 2 – Formação de subunidade alfa em diferentes condições de gradiente.**

Condição inicial do gradiente (% B)	Subunidade $\alpha$ (%)
25	31
28	26
29	18
30	14
32	18

Fixando o início do gradiente em 30% B e variando a molaridade do eluente A, observou-se que o hFSH apresentou menor dissociação em tampão fosfato de sódio 0,05 M, confirmando a molaridade utilizada para o hTSH (Tab. 3).

**Tabela 3 - Formação de subunidade alfa com diferentes molaridades do eluente A.**

Molaridade do eluente A (M)	Subunidade $\alpha$ (%)
0,02	23
0,05	14
0,08	18

Nas condições acima fixadas, foi avaliada a influência do pH do eluente A na dissociação do hFSH (Tab. 4). Os resultados mostraram que a dissociação do hFSH diminui quanto mais básico é o eluente A. Em pH 8,6 não ocorreu mais dissociação do hFSH.

**Tabela 4 - Formação de subunidade  $\alpha$  observada com o eluente A em diferentes pH.**

pH do eluente A	Subunidade $\alpha$ (%)
7,0	14
7,7	14
8,0	10
8,3	4,8
8,6	zero

Durante estes estudos por RP-HPLC foi observado um pico interferente na mesma posição de eluição do heterodímero, o que comprometia uma análise exata do hFSH. Os picos interferentes, referidos na literatura como “picos fantasmas”, podem ser originados, por exemplo, por impurezas dos reagentes ou pela natureza do tampão de eluição (82). De fato, a eliminação completa desta interferência foi conseguida substituindo o eluente A, fosfato de sódio, por fosfato de amônio, sem alterar os parâmetros anteriormente estabelecidos.

Com base nestes estudos, estabeleceu-se a seguinte condição de trabalho para a análise de FSH em RP-HPLC: gradiente linear de 30 a 100% B, durante 40 minutos. Eluente A: fosfato de amônio 0,05M pH 8,6; eluente B: 50% de acetonitrila + 50% do eluente A.

O hFSH hipofisário analisado em RP-HPLC utilizando a condição acima padronizada apresentou o perfil da Figura 6A, onde é detectado apenas um pico: o heterodímero. Os perfis cromatográficos das subunidades  $\beta$  e  $\alpha$ , na condição estabelecida, são mostrados nas Figuras 6B e 6C respectivamente.

### **3.2 – Validação da técnica de RP-HPLC para determinação quantitativa de hFSH.**

Para a quantificação do hFSH, utilizou-se a preparação pit-hFSH Nor como padrão interno de referência. O conteúdo nominal declarado de 520  $\mu\text{g}$ / ampola,

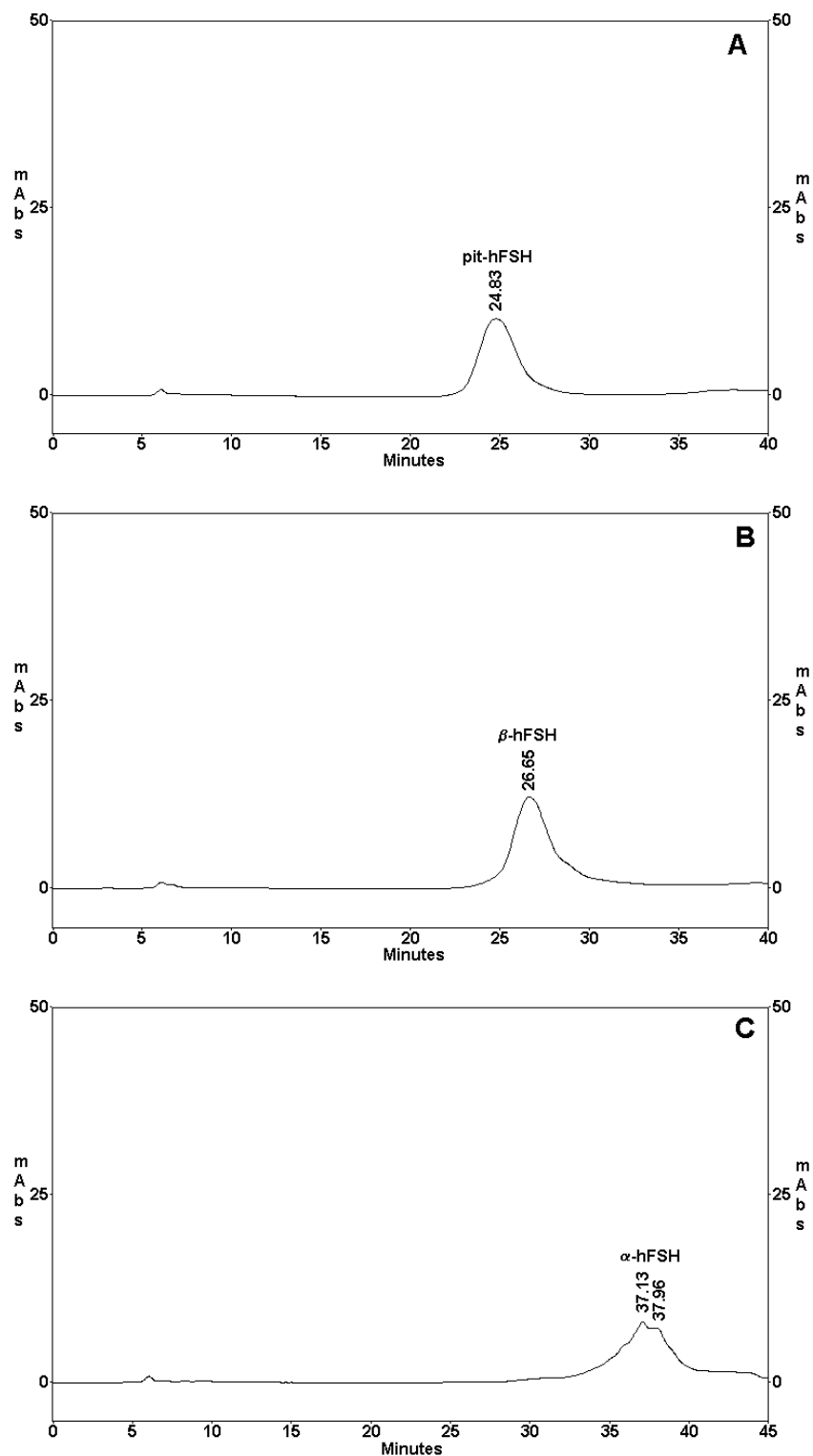
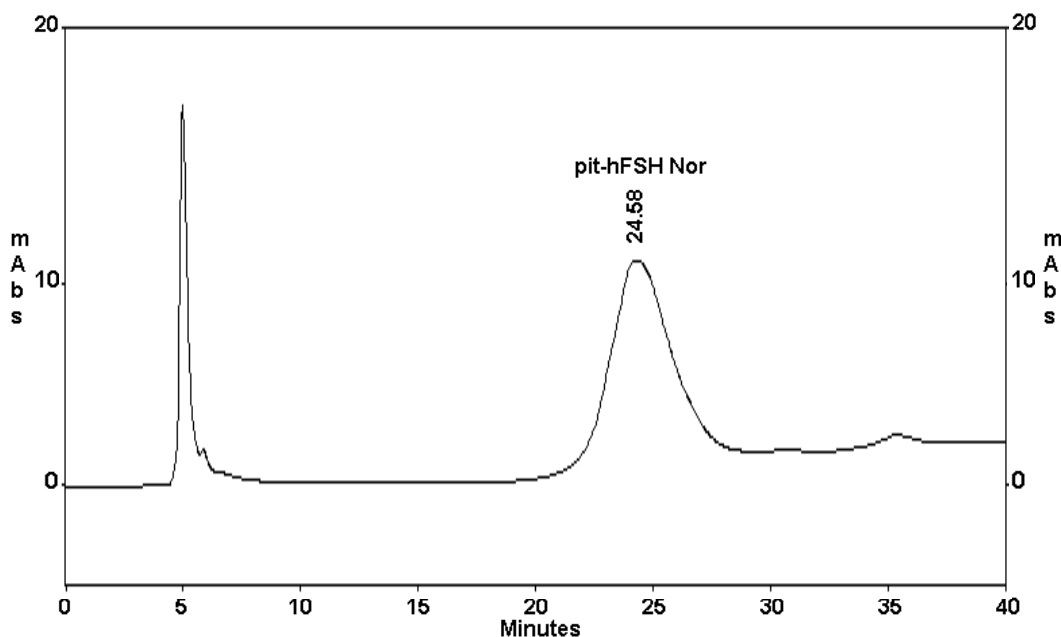


Figura 6 – Perfil cromatográfico em RP-HPLC do hFSH hipofisário puro (pit-hFSH NIDDK) e de suas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Coluna: C4 Vydac, 214 TP54, 25 cm X 4.6 mm D.I., diâmetro das partículas de 5  $\mu$ m. A eluição foi realizada à temperatura de 25°C, com um fluxo de 0.5 ml/min e a detecção foi feita em UV a 220nm. Eluente A: 0.05 M tampão fosfato de amônio (pH 8.6); Eluente B: 50% acetonitrila + 50% eluente A. Eluição, durante 40 min, com um gradiente linear de 30 a 100% B. (A) 5 $\mu$ g de hFSH hipofisário; (B) 5 $\mu$ g de  $\beta$ -hFSH hipofisário; (C) 5 $\mu$ g de  $\alpha$ -hFSH hipofisário.

baseado na determinação de absorvância, foi também confirmado pela determinação de proteína total através do ensaio Micro BCA, tendo sido obtido um conteúdo de hFSH de  $574,4 \pm 40,7 \mu\text{g/ ampola}$ , ( $n=4$ ). A qualidade cromatográfica desta preparação foi confirmada por RP-HPLC, tendo sido obtido um único pico sem a presença de contaminantes (Fig. 7).



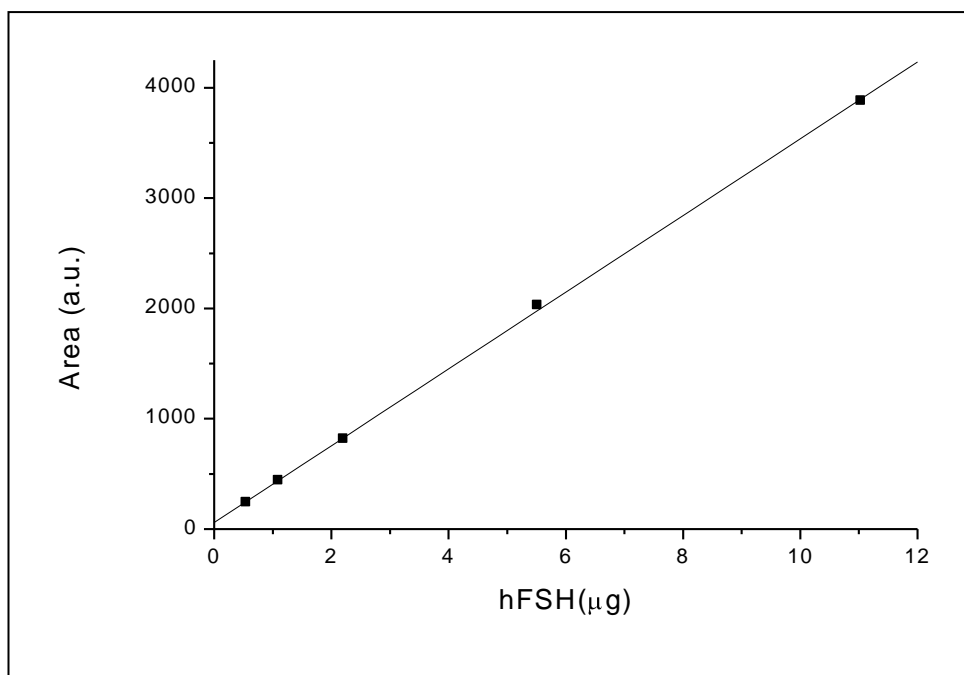
**Figura 7 – Perfil cromatográfico em RP-HPLC de 5  $\mu\text{g}$  da preparação hipofisária pura de hFSH (pit-hFSH Nor).**

A presente metodologia de RP-HPLC foi validada quanto à exatidão, linearidade de resposta, precisão e sensibilidade.

A Tabela 5 mostra o teste de recuperação realizado com quantidades conhecidas de hFSH, onde foi obtida uma recuperação média de  $98,9 \pm 2,93\%$  com desvio padrão relativo (RSD) de 3%. Foi também demonstrada uma exatidão perfeitamente aceitável para a determinação do hFSH, a correlação entre quantidades do hormônio adicionadas e recuperadas sendo altamente significativa ( $r= 0,9998$ ;  $p<0,0001$ ;  $n=5$ ), com um “bias” bem menor do que 1%:  $Y_{\text{recup.}} = 0,999X_{\text{adic.}} + 0,0003$ .

Uma curva de calibração para a quantificação do hFSH por RP-HPLC, relacionando área do pico com quantidades conhecidas de hFSH, foi estabelecida

no intervalo de 0,55 a 11,04  $\mu\text{g}$  (Fig.8). A equação da curva de calibração obtida foi:  $Y_{\text{u.a.}} = 347,85X_{\mu\text{g}} + 59,53$ , onde “u.a.” corresponde a unidades arbitrárias de área. O coeficiente de correlação altamente significativo ( $r=0,9965$ ;  $p<0,0001$ ;  $n=15$ ) demonstrou a linearidade de resposta no intervalo analisado.



**Figura 8 – Curva de calibração para n=15 determinações de hFSH por RP-HPLC, relacionando área do pico com quantidades de hFSH hipofisário (pit-hFSH NIDDK) conhecidas adicionadas.**

Com base nesta calibração, a quantificação de quatro diferentes preparações de hFSH foi realizada mediante 3 ensaios independentes (Tab.6). A precisão inter-dias da quantificação de pit-hFSH NIDDK, r-hFSH Gonal-f, r-hFSH Puregon e u-hFSH Metrodin variou de 1,3% a 3,9%. Um bom acordo entre as determinações por RP-HPLC e o conteúdo declarado (nominal) foi encontrado apenas para as preparações pit-hFSH NIDDK e u-hFSH Metrodin. Para as duas preparações recombinantes, foi observado um alto “bias” de 114% e 22% respectivamente para Gonal-f e Puregon. Para o r-hFSH Gonal-f, uma grande diferença em relação ao valor nominal (+75%) foi também observada quando o conteúdo de proteína total foi determinado pelo ensaio de BCA, obtendo-se o valor de  $9,6 \pm 1,43 \mu\text{g/ampola}$  ( $n=4$ ). Um melhor acordo (+6%) entre a determinação

por BCA ( $10,6 \pm 1,19$   $\mu\text{g}$ / ampola,  $n=4$ ) e o conteúdo declarado ( $10$   $\mu\text{g}$ / ampola) foi obtido para o r-hFSH Puregon.

A metodologia de RP-HPLC desenvolvida neste trabalho mostrou-se bastante sensível, a dose mínima detectável calculada de acordo com a formulação de Rodbard sendo de  $40$  ng. A exatidão desta determinação foi confirmada experimentalmente. De fato, quando uma quantidade conhecida de  $40$  ng de pit-hFSH NIDDK foi analisada por RP-HPLC, obteve-se um valor médio de  $0,041$   $\mu\text{g}$  ( $n=2$ ) diretamente determinado a partir da curva de calibração.

**Tabela 5 - Recuperação de quantidades conhecidas de hFSH hipofisário quantificado por RP-HPLC.**

Quantidade de hFSH adicionada ( $\mu\text{g}$ )	Área do pico (u.a.)	Quantidade média de hFSH determinada ( $\mu\text{g}$ )	Recuperação (%)
0,55	$239 \pm 15,7$	0,52	95
1,10	$439 \pm 4,0$	1,09	100
2,21	$816 \pm 18,1$	2,17	98
5,52	$2028 \pm 108,0$	5,66	103
11,04	$3879 \pm 283,0$	10,98	100

**Tabela 6 – Quantificação de preparações puras de FSH por RP-HPLC.**

Preparação	Conteúdo nominal de hFSH <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}/\text{ampola}$ )	Conteúdo determinado de hFSH <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}/\text{ampola}$ )	RSD <sup>c</sup> (%)	Diferença com relação ao valor nominal (%)
pit-hFSH NIDDK	103,0	$109 \pm 1,7^{\text{d}}$	1,5	+ 6
r-hFSH Puregon	10,0	$12,2 \pm 0,2$	1,3	+ 22
r-hFSH Gonal-f	5,5	$11,8 \pm 0,5$	3,9	+ 114
u-hFSH Metrodin	5,5	$5,4 \pm 0,2$	3,2	- 2

<sup>a</sup> baseado no conteúdo declarado da ampola

<sup>b</sup> determinado por RP-HPLC

<sup>c</sup> RSD expresso como porcentagem da média

<sup>d</sup> desvio padrão de  $n=3$  determinações interensaios

### 3.3 – Análise qualitativa e caracterização de diferentes preparações de hFSH

Neste trabalho foram analisadas preparações de hFSH de diferentes origens: uma hipofisária (pit-hFSH NIDDK), uma urinária (u-hFSH Metrodin<sup>®</sup>) e duas recombinantes (r-hFSH Gonal-f<sup>®</sup> e r-hFSH Puregon<sup>®</sup>).

#### 3.3.1 – Análise por RP-HPLC

Os perfis de eluição obtidos para as preparações recombinantes (Fig. 9A e 9B) e urinária (Fig. 9C) mostram que estas preparações são mais heterogêneas que a preparação hipofisária (Fig. 6A). Enquanto as duas preparações recombinantes apresentam uma única forma praticamente idêntica ( $t_R = 25,26$  min), a preparação urinária apresenta duas formas predominantes com tempos de retenção de 23,78 e 24,88 minutos. Alguns picos foram observados entre 5 e 10 minutos, que se devem aos diferentes excipientes presentes. Os tempos de retenção obtidos para as diferentes preparações de hFSH, em quatro determinações, são mostrados na Tabela 7. Uma excelente reprodutibilidade interensaio nas determinações do  $t_R$  foi observada, com desvio padrão relativo  $\leq 1\%$ . Os tempos de retenção das preparações recombinantes foram significativamente mais altos ( $p < 0,005$ ) do que o da preparação hipofisária. Por outro lado, o pico 1 da preparação urinária apresenta um tempo de retenção significativamente menor ( $p < 0,001$ ) do que a preparação hipofisária, enquanto o pico 2 não diferiu significativamente nem da preparação hipofisária que da recombinante ( $p > 0,05$ ). A diferença entre o pico 1 urinário e o pico principal do hFSH recombinante ou hipofisário ( $\sim 6\%$  e  $\sim 3\%$ ) provavelmente indica importantes diferenças na estrutura de carboidratos destas preparações.



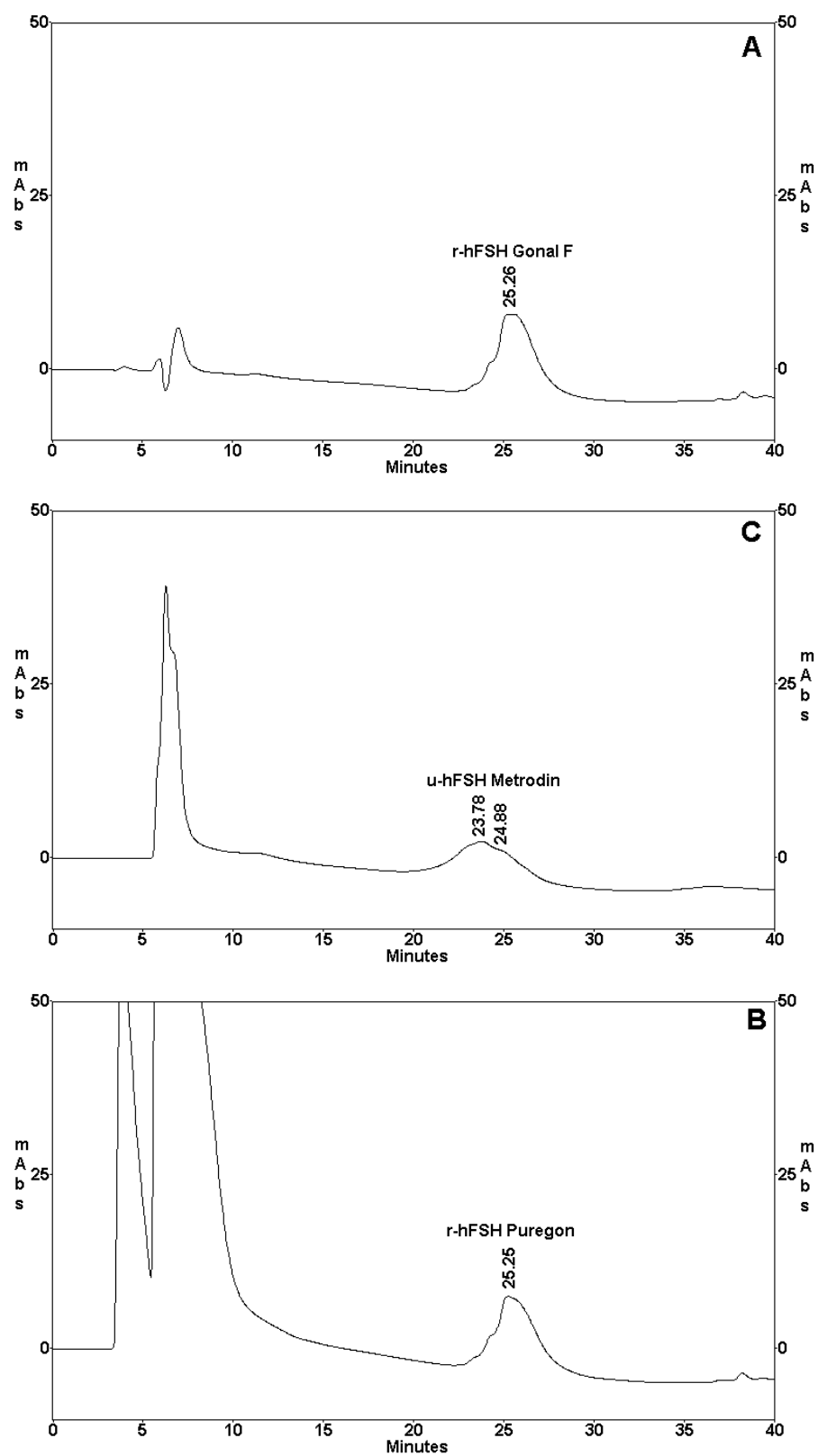


Figura 9 - Perfil cromatográfico em RP-HPLC de diferentes preparações comerciais de hFSH. (A) 2,75  $\mu\text{g}$  de r-hFSH Gonal-f; (B) 3,4  $\mu\text{g}$  de r-hFSH Puregon; (C) 2,75  $\mu\text{g}$  de u-hFSH Metrodin. Foram empregadas as mesmas condições cromatográficas da Figura 6.

**Tabela 7 - Variação interensaio dos tempos de retenção obtidos para as preparações de hFSH hipofisária, recombinantes e urinária, analisadas em RP-HPLC.**

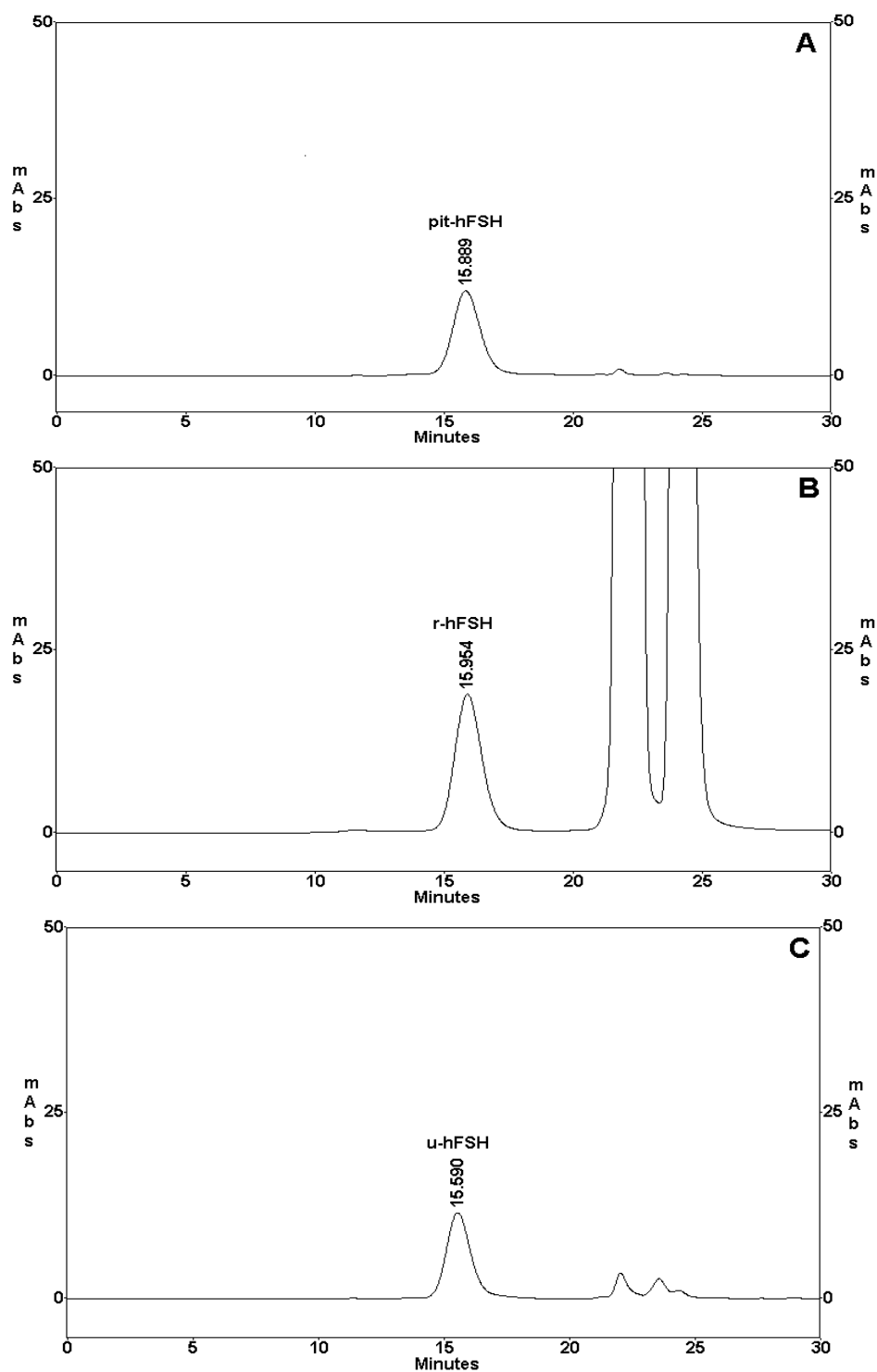
Preparação	$t_R \pm SD^a$ (min)	RSD <sup>b</sup> (%)	Diferença da preparação hipofisária (%)	n° de determinações
Hipofisária	24,62 ± 0,192	0,8	-	4
Recombinante (Gonal-f)	25,22 ± 0,062	0,3	+ 2,4	4
Recombinante (Puregon)	25,33 ± 0,106	0,4	+ 2,9	4
Urinária PICO 1	23,77 ± 0,226	1,0	- 3,5	4
Urinária PICO 2	25,02 ± 0,280	1,1	+ 1,6	4

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão

<sup>b</sup>RSD desvio padrão relativo (%)

### 3.3.2 – Análise por HPSEC

Os perfis cromatográficos obtidos em HPSEC para preparações de hFSH de diferentes naturezas são mostrados na Figura 10. Os picos que aparecem à direita do pico principal, entre 20 e 25 minutos, referem-se aos excipientes presentes nas diferentes amostras. A alta precisão e reprodutibilidade da metodologia de HPSEC pode ser observada na Tabela 8. Em quatro determinações, o desvio padrão relativo dos tempos de retenção das diferentes preparações de hFSH foi menor ou igual a 0,6%. A amostra urinária apresentou um tempo de retenção estatisticamente diferente ( $p < 0,001$ ) com relação às preparações recombinantes e hipofisária.



**Figura 10 - Perfil cromatográfico em HPSEC de diferentes preparações comerciais de hFSH. Coluna: TSKG 2000 SW, 60 cm X 7,5 mm D.I., tamanho das partículas 10  $\mu\text{m}$  e poros de 125  $\text{\AA}$ . A eluição foi realizada à temperatura ambiente, com um fluxo de 1,0 ml/min e a detecção foi feita em UV a 220 nm. Eluente: 0,02 M fosfato de sódio (pH 7,0), 0,15 M cloreto de sódio. Eluição, durante 30 minutos. (A) 3  $\mu\text{g}$  de pit-hFSH NIDDK; (B) 5  $\mu\text{g}$  de r-hFSH Puregon; (C) 2,75  $\mu\text{g}$  de u-hFSH Metrodin.**

**Tabela 8 - Variação interensaio dos tempos de retenção obtidos para as preparações de hFSH hipofisária, recombinante e urinária, analisadas por HPSEC.**

Preparação	$t_R \pm SD^a$ (min)	RSD <sup>b</sup> (%)	Diferença da preparação hipofisária (%)	n° de determinações
Hipofisária	15,94 ± 0,050	0,3	-	4
Recombinante (Gonal-f)	16,00 ± 0,044	0,3	+ 0,4	4
Recombinante (Puregon)	15,96 ± 0,097	0,6	+ 0,1	4
Urinária (Metrodin)	15,72 ± 0,012	0,1	- 1,4	4

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão

<sup>b</sup>RSD desvio padrão relativo (%)

### 3.3.3 – Determinação da massa molecular de diferentes preparações de hFSH.

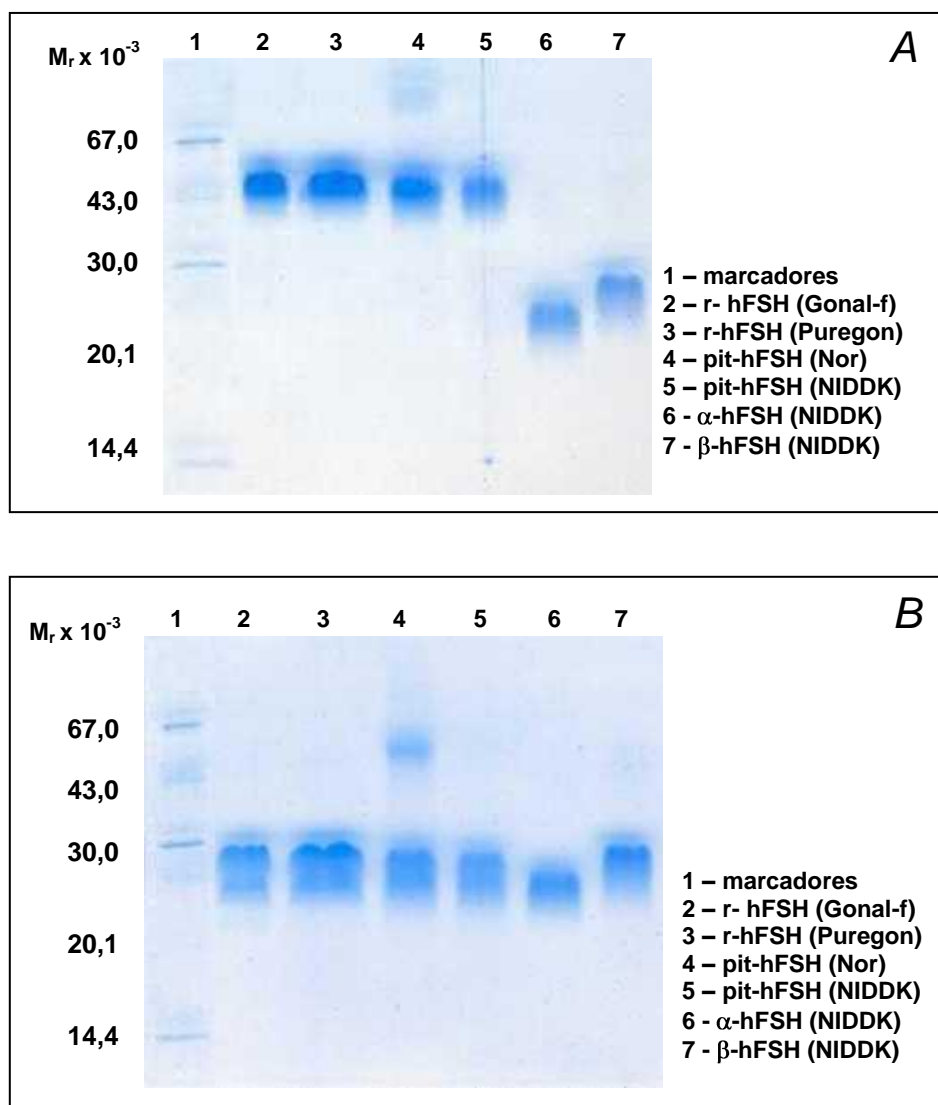
A massa molecular de preparações de hFSH de diferentes origens foi estimada por técnicas diferentes:

#### 3.3.3.1 - SDS-PAGE

A mobilidade eletroforética de preparações de hFSH de diferentes origens foi analisada por SDS-PAGE, em condições redutoras e não redutoras (Fig. 11). Em virtude da pequena quantidade de hFSH urinário disponível, esta preparação não foi analisada por esta técnica.

Em condições não redutoras (Fig. 11A) observou-se uma única banda, com massa molecular aparente ( $M_r$ ) entre 43000 e 67000 Da, para as quatro preparações. As preparações hipofisárias (poços 4 e 5) apresentaram uma migração discretamente maior que as recombinantes (poços 2 e 3). Nestas condições não ocorreu dissociação do heterodímero como ficou demonstrado pela migração observada para as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (poços 6 e 7). Já sob condições redutoras (Fig. 11B), os perfis eletroforéticos das diferentes preparações de hFSH

(poços 2, 3, 4 e 5) e das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (poços 6 e 7) mostraram duas bandas distintas. A posição de cada subunidade foi confirmada através da análise das respectivas subunidades puras de hFSH. No caso do pit-hFSH Nor (poço 4), foi observada uma dissociação apenas parcial, com uma banda correspondente à sua forma heterodimérica evidenciada entre 43.000 e 67.000 Da, semelhantemente ao observado na Figura 11A.

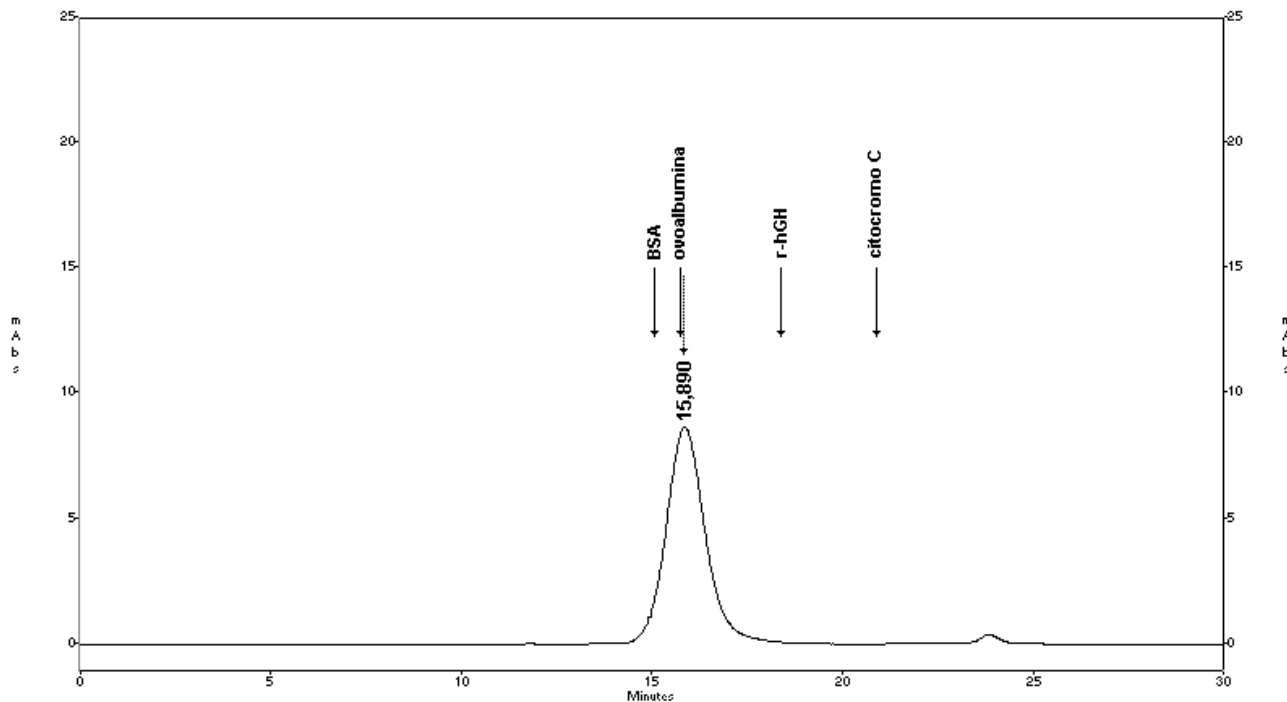


**Figura 11 – SDS-PAGE de diferentes preparações de hFSH e das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ -hFSH NIDDK. (A) condição não redutora; (B) condição redutora.**

A partir destes dados eletroforéticos fez-se uma estimativa da massa molecular aparente destas preparações e de suas subunidades obtendo cerca de 52 kDa e 48,5 kDa respectivamente para r-hFSH e pit-hFSH e de 26,5 kDa e 30,4 kDa respectivamente para as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Estes valores de massa molecular aparente estão relativamente de acordo com os valores relatados na literatura (18, 27, 29, 55).

### **3.3.3.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC)**

A massa molecular aparente (MM) de diferentes preparações de hFSH foi também avaliada por HPSEC, a partir de uma curva de calibração relacionando os tempos de retenção de quatro proteínas com suas massas moleculares (Fig. 12). A partir da equação:  $\log MM = - 0,1117 t_R + 3,4261$ ,  $r = - 0,9979$  ( $n = 4$ ), as massas moleculares estimadas para r-hFSH Gonaf, r-hFSH Puregon, pit-hFSH Nor e u-hFSH Metrodin foram de respectivamente 45,3, 45,6, 44,8 e 48,4 kDa.



**Figura 12 – Perfil cromatográfico do pit-hFSH (Nor) na HPSEC. As flechas indicam a posição de diferentes proteínas: BSA (66,2 kDa), Ovoalbumina (42,7 kDa), r-hGH (22,4 kDa) e Citocromo C (12,4 kDa).**

### 3.3.3.3 – Espectrometria de massa MALDI-TOF-MS

A Figura 13 mostra o espectro de massa obtido por MALDI-TOF para três preparações de hFSH. As massas moleculares destas preparações e de suas subunidades são apresentadas na Tabela 9. A maior massa foi encontrada para a preparação urinária, enquanto as preparações recombinante e hipofisária apresentaram massas bem próximas. Um acordo aceitável foi encontrado entre os valores experimentais para o heterodímero e aqueles calculados pela soma das massas moleculares das suas respectivas subunidades.

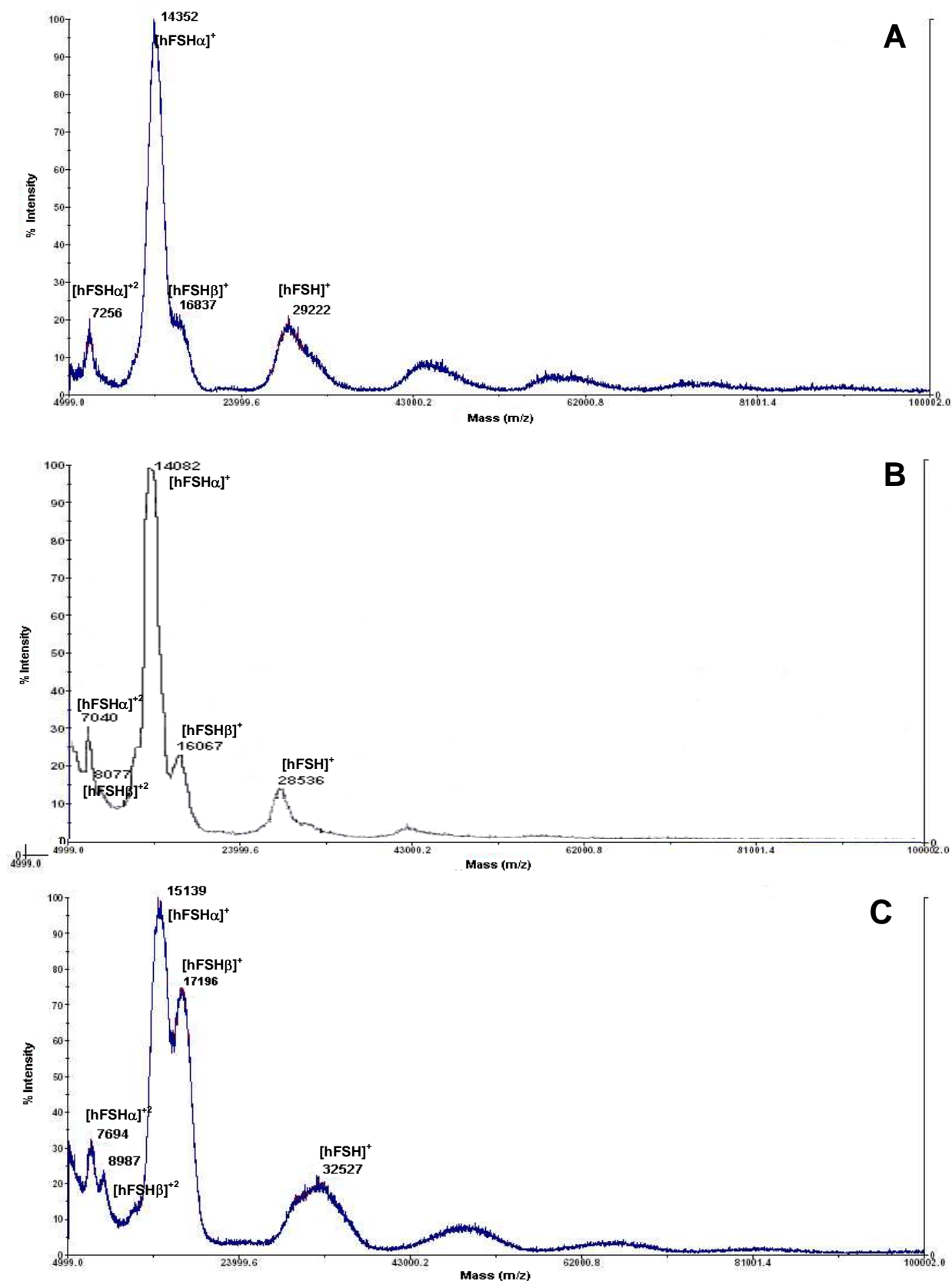


Figura 13 – Espectrometria de massa MALDI-TOF de diferentes preparações de hFSH. (A) pit-hFSH Nor; (B) r-hFSH Gonalf; (C) u-hFSH Metrodin.



**Tabela 9 – Massa molecular relativa ao heterodímero ( $\alpha+\beta$ ) e às respectivas subunidades de diferentes preparações de hFSH, determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF.**

Preparação	subunidade $\alpha$	subunidade $\beta$	Heterodímero		
			Experimental	Calculado ( $\alpha+\beta$ )	Calc./exp.
pit-hFSH Nor	14467 <sup>a</sup>	16509 <sup>a</sup>	29176 <sup>a</sup>	30976 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>
r-hFSH Gonal-f	14082	16067	28536	30149	1,06
u-hFSH Metrodin	15139	17196	32527	32335	0,99

<sup>a</sup> média de duas determinações

### 3.4 – Análise e caracterização das subunidades de diferentes preparações de hFSH

Diferentes agentes dissociadores, classicamente utilizados na literatura, foram testados para dissociar o hFSH.

Foram utilizados ácido trifluoracético (TFA), guanidina, uréia e ácido acético. O hFSH foi incubado com cada um destes agentes de acordo com protocolos reportados na literatura (31, 53, 70) que estão descritos com maiores detalhes no capítulo Material e Métodos. A análise da dissociação foi feita por RP-HPLC (Tab. 10).

A porcentagem de subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  calculada, com base nas massas aqui determinadas por MALDI-TOF é de 46,7% para a subunidade  $\alpha$  e 53,3% para a subunidade  $\beta$ .

A guanidina e o ácido acético foram eficazes para a dissociação do FSH heterodimérico. Para estudar a dissociação de diferentes preparações de hFSH foi escolhido o ácido acético por ser este um agente não desnaturante. Quando expostas a 3M de ácido acético, overnight, a 37°C, estas preparações dissociaram-se completamente em suas subunidades (recuperação ~ 98,2%) como é exemplificado na Figura 14 para o pit-hFSH Nor. Os tempos de retenção dos heterodímeros foram significativamente diferentes ( $p<0,01$ ) dos tempos de retenção das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (Tab. 11). A reprodutibilidade na separação entre a forma heterodimérica e as subunidades correspondentes para as diferentes

preparações pode ser observada pelo tempo de retenção relativo ( $t_{RR}$ ) altamente constante. Foi observado para a subunidade  $\alpha$  um  $t_{RR}$  médio de  $1,517 \pm 0,02$  (RSD = 1,5%) e para a subunidade  $\beta$  um  $t_{RR}$  médio de  $1,100 \pm 0,004$  (RSD = 0,4%).

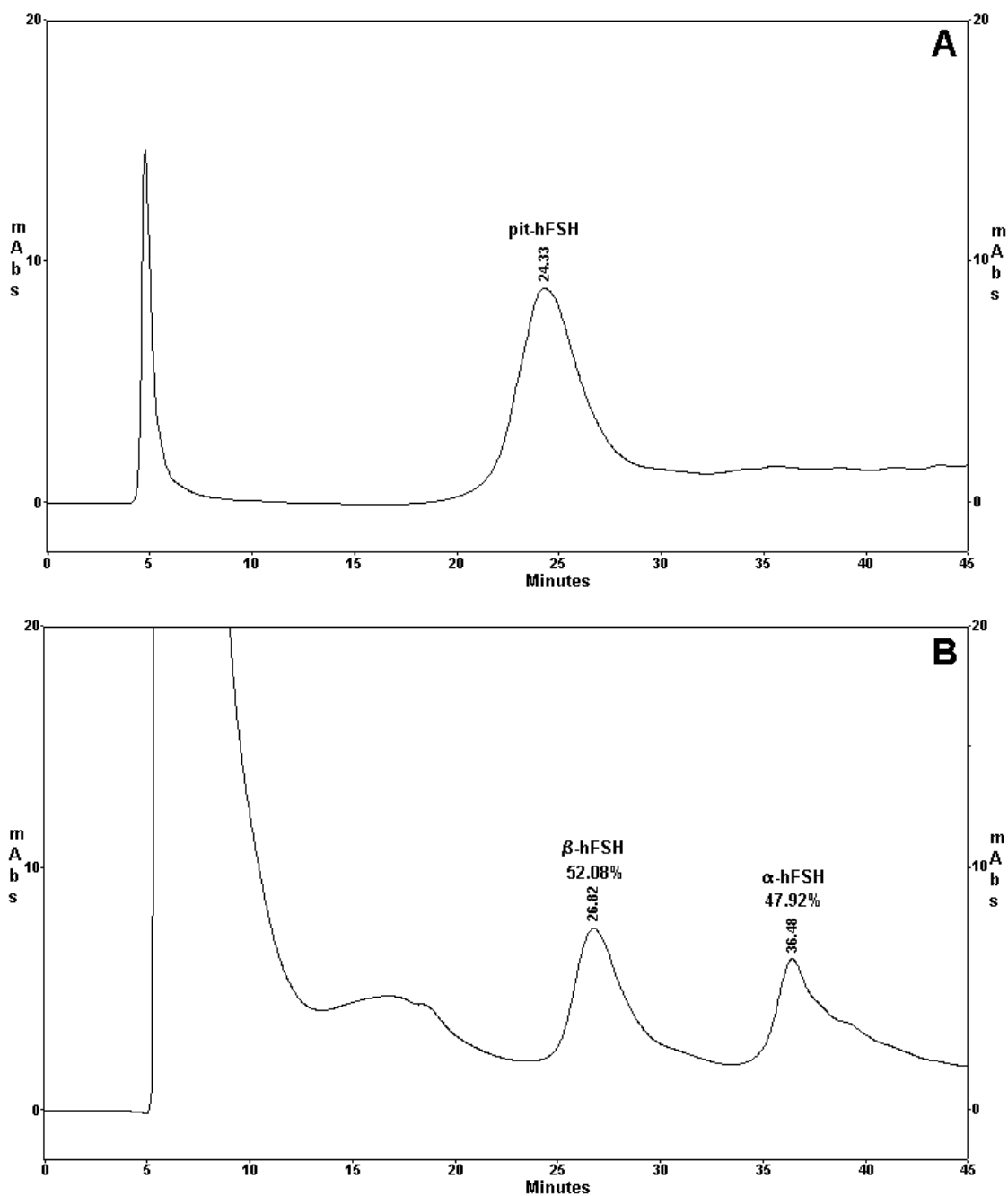


Figura 14 – Perfil cromatográfico em RP-HPLC do pit-hFSH (Nor) antes (A) e após (B) a incubação com ácido acético 3M, “overnight”, a 37°C.

**Tabela 10 – Avaliação por RP-HPLC da porcentagem de formação de subunidades alfa e beta após a incubação do pit-hFSH Nor com diferentes agentes dissociadores.**

Agente dissociador	$\alpha$ -hFSH formada (%)	$\beta$ -hFSH formada (%)
ácido trifluoracético	53	47
guanidina	45	55
uréia	38	62
ácido acético	48	52

**Tabela 11 - Tempo de retenção ( $t_R$ ) obtido em RP-HPLC para o hFSH heterodimérico antes da dissociação, tempo de retenção ( $t_R$ ) das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  após a dissociação e tempo de retenção relativo ( $t_{RR}$ ) das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  em relação ao hFSH heterodimérico.**

Preparação	$t_R$ heterodímero (min)	$t_R$ subunidade $\beta$ (min)	$t_R$ subunidade $\alpha$ (min)	$t_{RR}^a$ subunidade $\beta$ (min)	$t_{RR}^a$ subunidade $\alpha$ (min)
pit-hFSH NIDDK	24,43 $\pm$ 0,156	26,98 $\pm$ 0,160	36,63 $\pm$ 0,198	1,104	1,499
r-hFSH Gonal-f	25,19 $\pm$ 0,129	27,62 $\pm$ 0,235	38,86 $\pm$ 0,214	1,096	1,543
r-hFSH Puregon	25,29 $\pm$ 0,070	27,85 $\pm$ 0,131	38,16 $\pm$ 0,127	1,101	1,509

<sup>a</sup> $t_{RR}$  tempo de retenção relativo determinado em relação ao  $t_R$  do heterodímero

## 4 - DISCUSSÃO

No presente trabalho foi estabelecida uma metodologia de HPLC baseada em interação hidrofóbica (RP-HPLC) que preserva o heterodímero, para análise qualitativa e quantitativa de preparações de hFSH de diferentes origens, duas hipofisárias, uma urinária e duas preparações comerciais recombinantes.

Iniciamos as análises de hFSH, via RP-HPLC, utilizando as condições cromatográficas descritas previamente por Oliveira e colaboradores (49) para a análise de hTSH em meio condicionado de células CHO. Estas condições, embora levando a uma dissociação do hFSH, foram úteis para determinar uma escala de hidrofobicidade para os hormônios glicoproteicos hipofisários, sendo classificados na seguinte ordem decrescente de hidrofobicidade: pit-hLH > pit-hTSH > pit-hFSH, confirmando dados da literatura (30, 31).

Entretanto para manter o hFSH intacto foi necessário alterar a composição da fase móvel e as condições de eluição. O pH da fase móvel e a concentração de acetonitrila foram variáveis importantes que afetaram a dissociação do hFSH. A alteração da condição inicial do gradiente de 25% para 30% B e a mudança de pH do eluente A de 7,0 para 8,6 foram mudanças essenciais para alcançar este objetivo. Trata-se de condições originais, sendo que condições de RP-HPLC anteriormente descritas na literatura que permitem a avaliação de outros hormônios glicoproteicos como hTSH, hLH e hCG, evitando a dissociação do heterodímero, utilizam colunas C4 em pH neutro, não tendo entretanto sucesso quando aplicadas ao hFSH (12, 31). Uma única condição que evita a dissociação do heterodímero do hFSH foi apontada na literatura (31) utilizando duas colunas com diferentes hidrofobicidades e eluição em pH neutro. A metodologia descrita no presente trabalho utilizou apenas uma coluna (C4), operada em pH básico e conseguiu, pela primeira vez, uma boa separação entre a subunidade  $\beta$  e o heterodímero ( $t_{RR} = 1,10$ ).

As novas condições foram capazes de detectar diferentes graus de heterogeneidade nas preparações analisadas. A preparação urinária em particular, exibiu dois picos predominantes, um deles com  $t_R$  significativamente diferente da forma principal presente nas outras três preparações. Isto pode ser devido a uma isoforma diferente ou a uma forma oxidada do hormônio presente nesta preparação em quantidades significativas, o que está de acordo com o relatado por Bergh e colaboradores, que observaram na mesma preparação urinária de hFSH uma porcentagem de formas oxidadas quatro vezes maior do que no Gonal-f (6). O pico principal das duas preparações recombinantes mostrou-se também significativamente diferente daquele observado para o hormônio hipofisário. Essa heterogeneidade é provavelmente causada pela presença de diferentes glicofomas, como descrito por diversos autores (11, 15, 68, 79).

O método aqui descrito mostrou-se extremamente sensível para detectar diferenças estruturais mínimas. Segundo El Rassi e colaboradores há evidências de que a micro heterogeneidade dos carboidratos contribui de alguma forma nas interações moleculares em RP-HPLC (21). O tempo de retenção, um parâmetro de hidrofobicidade, poderia portanto ser usado como um teste de identidade e qualidade rápido e altamente sensível ligado à variabilidade na composição de carboidratos. Na Tabela 7 podemos observar uma diferença significativa ( $p < 0,005$ ) no  $t_R$ , comparando a preparação pituitária hFSH (NIDDK) e as duas preparações recombinantes de hFSH, 2,44% e 2,88% respectivamente para Gonal-f e Puregon. Discretas diferenças de hidrofobicidade foram também observadas entre preparações hipofisárias e recombinantes de hTSH, cujas diferenças estruturais devem ser também apenas relacionadas com diferenças de carboidratos (49).

A validação da metodologia de RP-HPLC desenvolvida neste trabalho mostrou um alto grau de exatidão, precisão, linearidade de resposta e sensibilidade. Este último parâmetro é de interesse particular uma vez que indica um limite de detecção dificilmente obtido para o hFSH por técnicas físico-químicas. Este limite, estabelecido teoricamente pela formulação de Rodbard (61) foi confirmado, na prática, por um teste de recuperação. Quanto à quantificação

por RP-HPLC das quatro preparações de hFSH sob análise (Tab. 6), houve acordo aceitável em relação ao conteúdo declarado para pit-hFSH e u-hFSH, mas um grande “bias” foi encontrado no caso das duas preparações recombinantes. Embora não seja clara a razão para este “bias”, talvez possa existir uma interferência devido a excipientes específicos presentes nas preparações recombinantes.

Entre as várias condições dissociadoras testadas, uma relativamente suave, ácido acético 3M, mostrou-se eficiente para a completa dissociação do heterodímero em subunidades, com uma recuperação de aproximadamente 98%. Este método, prático e flexível, pode ser aplicado, após oportuna adaptação, à dissociação de qualquer hormônio glicoprotéico heterodimérico, recombinante ou nativo, permitindo a caracterização direta das subunidades individuais. A caracterização em RP-HPLC das subunidades individuais das preparações recombinantes ou hipofisária de hFSH revelaram diferenças de hidrofobicidade na seguinte ordem: subunidade  $\alpha$  > subunidade  $\beta$  e, pela primeira vez, o heterodímero e a subunidade  $\beta$  puderam ser discriminados, tornando possível uma identificação direta destas impurezas, cuja ausência precisa ser demonstrada em produtos farmacêuticos.

Graças às condições utilizadas neste trabalho para a análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF) de diferentes preparações de hFSH, foi possível detectar simultaneamente o heterodímero e as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Isto foi também observado anteriormente para o hTSH, como descrito por Mendonça e colaboradores (46). A obtenção direta da massa do heterodímero, sem a necessidade de se efetuar uma ligação química para impedir sua dissociação, aumenta ainda mais o potencial desta técnica de determinação de massa molecular cuja exatidão é bem conhecida. Isto foi confirmado pelo acordo encontrado entre os valores experimentais das massas dos heterodímeros e aqueles calculados pela soma das massas das respectivas subunidades.

A preparação urinária foi a que apresentou maior massa molecular, +11,5% em relação ao pit- hFSH e +14,0% relativamente ao r-hFSH. Esta tendência foi também confirmada via HPSEC, uma técnica menos exata de determinação de massa molecular. Diferenças estatisticamente significativas entre o  $t_R$  das preparações recombinantes ou pituitária e a preparação urinária foram também encontradas por HPSEC, refletindo diferenças de massa molecular (Tabela 8). As massas das várias preparações de hFSH, estimadas por esta última técnica, apresentaram valores bem mais altos daqueles obtidos por MALDI-TOF e comparáveis às estimativas feitas via SDS-PAGE. Uma diferença semelhante foi também observada por Mendonça e colaboradores para o hTSH (46). As glicoproteínas comportam-se anormalmente em SDS-PAGE, provavelmente por não ligarem a mesma quantidade de SDS que as outras proteínas não glicoproteicas, o SDS ligando-se apenas à parte protéica das moléculas. A carga líquida reduzida resultante de menor ligação ao SDS diminui a mobilidade eletroforética do polipeptídeo durante a eletroforese, produzindo artificialmente massas moleculares sobrestimadas (40, 42). Comportamento anômalo semelhante é também observado para estimativas de massas moleculares por exclusão molecular provavelmente relacionado com as propriedades hidrodinâmicas das moléculas.

A massa aparente obtida por SDS-PAGE, para as preparações de hFSH pituitário e recombinante estão de acordo com os valores declarados na literatura por Hakola e colaboradores (27) e Perlman e colaboradores (55), respectivamente 40 e 45 kDa. Também os valores das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  obtidos no presente trabalho estão próximos dos declarados por Hakola e colaboradores (26 kDa e 28 kDa, respectivamente) (27).

As massas moleculares, determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF e reportadas na literatura para a preparação recombinante Gonal-f (31271,6) (42) e para uma preparação pituitária (27827,1) (81) apresentaram-se razoavelmente de acordo com as nossas determinações, sendo observadas diferenças da ordem de 5% e ~10%. Ressaltamos que os valores reportados na literatura referem-se à soma das massas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , o valor do

heterodímero sendo calculado por nós, e que a preparação hipofisária analisada por nós é oriunda de diferentes laboratórios e que as recombinantes, embora da mesma firma, podem não ser idênticas.

Em conclusão, o alto poder de resolução, especificidade química, sensibilidade, robustez e simplicidade do método de RP-HPLC aqui padronizado podem ser extremamente úteis para o controle de qualidade de preparações de hFSH e de suas subunidades, especialmente visando o controle farmacêutico deste hormônio já amplamente utilizado, mas cuja monografia ainda não consta das principais farmacopéias. Além disso, este método pode ser uma potencial alternativa para a redução ou substituição do uso de animais na avaliação da potência de produtos biológicos.



## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-INANY, H.; ABOULGHAR, M.; MANSOUR, R.; SEROUR, G. Meta-analysis of recombinant versus urinary-derived FSH: an update. ***Hum. Reprod.***, v.18, p.305-313, 2003.
2. AMORESANO, A.; SICILIANO, R.; ORRU, S.; NAPOLEONI, R.; ALTAROCCHA, V.; DE LUCA, E.; SIRNA, P.; PUCCI, P. Structural characterization of human recombinant glycohormones follitropin, lutropin and choriogonadotropin expressed in Chinese hamster ovary cells. ***Eur. J. Biochem.***, v.242, p.608-618, 1996.
3. ANDERSEN, C.Y.; WESTERGAARD, L.G.; VAN WELY, M. FSH isoform composition of commercial gonadotrophin preparations: a neglected aspect? ***Reprod. Biomed. Online***, v.9, p.231-236, 2004.
4. BARRIOS-DE-TOMASSI, J.; TIMOSSO, C.; MERCHANT, H.; QUINTANAR, A.; AVALOS, J.M.; ANDERSEN, C.Y.; ULLOA-AGUIRRE, A. Assessment of the in vitro and in vivo biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. ***Mol. Cell. Endocrinol.*** v.186, p.189-198, 2002.
5. BASSET, R. Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. ***Reprod. Biomed. Online*** v.10, p.169-177, 2005.
6. BERGH, C.; HOWLES, C.M.; BORG, K.; HAMBERGER, L.; JOSEFSSON, B.; NILSSON, L.; WICKLAND, M. Recombinant human FSH (Gonal-F(R)) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP(R)): results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. ***Hum. Reprod.***, v.12, p.2133-2139, 1997.
7. BRISTOW, A.F.; WILSON, C.; SUTCLIFFE, N. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of human thyroid-stimulating hormone. ***J. Chromatogr.***, v.270, p.285-292, 1983.
8. 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.220-231, 1992.
9. BURGON, P.; ROBERTSON, D.; STANTON, P.G.; HEARN, M. Immunological activities of highly purified isoforms of human FSH correlate with *in vitro* bioactivities. ***J. Endocrinol.*** v.139, p.511-518, 1993.

10. CATZEL, D.; CHIN, D.Y.; STANTON, P.G.; GRAY, P.P.; MAHLER, S.M. Fractionation of follicle stimulating hormone charge isoforms in their native form by preparative electrophoresis technology. *J. Biotechnol.*, v.122, p.73-85, 2006.
11. CERPA-POLJAK, A.; BISHOP, L.A.; HORT, Y.J.; CHIN, C.K.H.; DEKROON, R.; MAHLER, S.M.; SMITH, G.M.; STUART, M.C.; SCHOFIELD, P.R., Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinology*, v.132, p.351-356, 1993.
12. CHLENOV, M.A.; KANDYBA, E.I.; NAGORNAYA, L.V.; ORLOVA, I.L.; VOLGIN, Y.V. High-performance liquid chromatography of human glycoprotein hormones. *J. Chromatogr.*, v.631 p.261-267, 1993.
13. CLAESSENS, H.A.; VAN STRATE, M.A. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v.1060, p.23-41, 2004.
14. COLE, E.S.; LEE, K.; LAUZIERE, K.; KELTON, C.; CHAPPEL, S.; WEINTRAUB, B.; FERRARA, D.; PETERSON, P.; BERNASCONI, R.; EDMUNDS, T.; RICHARDS, S.; DICKRELL, L.; KLEEMAN, J.M.; Mc PHERSON, J.M.; PRATT, B.M. Recombinant human thyroid-stimulating hormone - development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid-carcinoma. *BioTechnol.*, v.11, p.1014-1023, 1993.
15. CREUS, S.; CHAIA, Z.; PELLIZZARI, E.H.; CIGORRAGA, S.B.; ULLOA-AGUIRRE, A.; CAMPO, S., Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.174, p.41-49, 2001.
16. DAHL, K.D.; JIA, X.; HSUEH, A. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone. *Meth. Enzymol.*, v.168, p.414-422, 1989.
17. 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.
18. DE BOER, W.; MANNAERTS, B. Recombinant human follicle stimulating hormone II. Biochemical and biological characteristics. In: Crommelin D.J.A., Schellekens (Editors). *Clone to Clinic*, Kluwer, Dordrecht, 1990, p.253-259.
19. DiPAOLO, B.; PENNETTI, A.; NUGENT, L.; VENKAT, K. Monitoring impurities in biopharmaceuticals produced by recombinant technology. *Pharm. Sci. Technol. Today*, v.2, p.70-82, 1999.

20. 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.
21. EI-RASSI, Z. Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. ***J. Chromatogr. A***, v.720, p.93-118, 1996.
22. GERVAIS, A.; HAMMEL, Y-A.; PELLOUX, S.; LEPAGE, P.; BAER, G.; CARTE, N.; SOROKINE, O.; STRUB, J-M., KOERNER, R.; LEIZE, E.; DORSSELAER, A.V. Glycosylation of human recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency. ***Glycobiology***, v.13, p.179-189, 2003.
23. GLEICHER, N.; VIETZKE, M.; VIDALI, A. Bye-bye urinary gonadotrophins? Recombinant FSH: A real progress in ovulation induction and IVF? ***Hum. Reprod.*** v.18, p.476-482, 2003.
24. GREEN, E.D.; BAEZINGER, J.U. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. I. Structural elucidation of the sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. ***J. Biol. Chem.***, v.263, p. 25-35, 1988-A.
25. GREEN, E.D.; BAEZINGER, J.U. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones ***J. Biol. Chem.***, v.263, p.36-44, 1988-B.
26. GREGO, B.; BALDWIN, G.S.; KNESSEL, J.A.; SIMPSON, R.J.; MORGAN, F.J.; HEARN, M.T.W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to the separation of tyrosine-specific phosphorylated polypeptides related to human growth hormone. ***J. Chromatogr.***, v.297, p.21-29, 1984.
27. HAKOLA, K.; VAN DER BOOGAART, P.; MULDER, J.; DE LEEUW, R.; SCHOONEN, W.; VAN HEYST, J.; SWOLFS, A.; VAN CASTEREN, J.; HUHTANIEMI, I.; KLOOSTERBOER, H. Recombinant rat follicle-stimulating hormone; production by chinese hamster ovary cells, purification and functional characterization. ***Mol. Endocrinol.***, v.127, p.59-69, 1997.
28. HEUM, N.A.K.; KIM, S.C.; SEO, K.S.; LEE, S.H.; KIM, W.B.; LEE, K.C. Purification and characterization of recombinant human follicle stimulating hormone produced by chinese hamster ovary cells. ***J. Microbiol. Biotechnol.***, v.15, p.395-402, 2005.

29. 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.
30. HIYAMA, J.; SURUS, A.; RENWICK, A.G.C. Purification of human pituitary LH and thyrotrophin by hydrophobic chromatography. *J. Endocrinol.*, v.125, p.493-500, 1990 A.
31. HIYAMA, J.; SURUS, A.; RENWICK, A.G.C. Separation of human glycoprotein hormones and their subunits by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v.529, p.33-41, 1990 B.
32. HOWLES, C.M., Genetic engineering of the human FSH molecule. *Hum. Reprod.*, v.2, p.172-191, 1996.
33. HUGUES, J.N.; DURNERIN, I.C., Gonadotrophins - filled-by-mass versus filled-by-bioassay. *Reprod. Biomed. Online*, v.10, p.11-17, Suppl.3, 2005.
34. ISAZA, V.; REQUENA, A.; GARCIA-VELASCO, J.A.; REMOHI, J.; PELLICER, A.; SIMON, C. Recombinant versus urinary follicle-stimulating hormone in couples undergoing intrauterine insemination – A randomized study. *J. Reprod. Med.*, v.48, p.112-118, 2003.
35. JANIS, L.J.; KOVACK, P.M.; RIGGIN, R.M.; TOWNS, J.K., Protein liquid chromatographic analysis in biotechnology. *Methods Enzymol.*, v.271, p.86-113, 1996.
36. JIA, X.C.; HSUEH, A.J.W. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology*, v.119, p.1570-1577, 1986.
37. 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.
38. KECK, C.; BASSETT, R.; LUDWIG, M. Factors influencing response to ovarian stimulation. *Reprod. Biomed.*, v.11, p.562-569, 2005.
39. KEENE, J.L.; MATZUK, M.M.; OTANI, T.; FAUSER, B.C.J.M.; GALWAY, A.B.; HSUEH, A.J.W.; BOIMES, I. Expression of biologically active human follitropin in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, v.264, p. 4769-4775, 1989.
40. LÅÅS, T. Electrophoresis in gels In: JANSON, J.C.; RYDÉN, L. *Protein Purification*, Wiley-Liss, 1997, p.481-485.

41. LOUMAYE, E.; MARTINEAU, I.; PIAZZI, A.; O'DEA, L.; DECOSTERD, G.; VAN LOON, K.; GALASKA, A. Clinical assessment of human gonadotrophins produced by recombinant DNA technology. *Hum. Reprod.*, v.11, p.95-107, 1996.
42. LOUMAYE, E.; DREANO, M.; GALASKA, A.; HOWLES, C.; HAM, L.; MUNAFO, A.; ESHKOL, A.; GIUDICE, 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.*, v. 4, p. 862-881, 1998.
43. 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*, aceito para publicação.
44. MATORRAS, R.; RODRIGUES-ESCUADERO, F.J. Bye-bye urinary gonadotrophins? The use of urinary gonadotrophins should be discouraged. *Hum. Reprod.*, v.17, p.1675-1683, 2002.
45. MELMED, S. Anterior pituitary In: LARSEN, P.R.; KRONENBERG, H.M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.S. *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders, 2002, p.212-219.
46. MENDONÇA, F.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotrophin and its immunological, biological, physico-chemical and mass spectral characterization. *J. Chromatogr. A*, v.1062, p.103-112, 2005.
47. MULDER, 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.
48. 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.
49. OLIVEIRA, J.E.; MENDONÇA, F.; PERONI, C.N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Determination of Chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v.787, p. 345-355, 2003.

50. OLIVER, R.L.; KANE, J.W.; WAITE, A.; MULDER, J.W.; ROBERTSON, W.R. Do immunoassays differentially detect different acidity glycoforms of FSH? *Clin. Endocrinol.*, v.51, p.681-686, 1999.
51. OUT, H.J.; MANNAERTS, B.M.J.L.; DRIESSEN, S.G.A.J.; BENNINK, H.J.T.C. A prospective, randomized, assessor-blind, multicentre study comparing recombinant and urinary follicle stimulating hormone (Puregon versus Metrodin) in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, v.10, p.2534-2540, 1995.
52. OUT, H.J.; DRIESSEN, S.G.A.J.; MANNAERTS, B.M.J.L.; BENNINK, H.J.T.C. Recombinant follicle-stimulating hormone (follicle-stimulating hormone, Puregon) yields higher pregnancy rates in vitro fertilization than urinary gonadotropins. *Fert. Ster.*, v. 68, p.138-142, 1997.
53. PARLOW, A.F.; SHOME, B. Specific, homologous radioimmunoassay (RIA) of highly purified subunits of human pituitary follicle stimulating hormone (hFSH). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.39, p.195-198, 1974.
54. PARSONS, T.F.; STRICKLAND, T.W.; PIERCE, J.G. Rapid and easy separation of the subunits of bovine and human glycoprotein hormones by use of high performance liquid chromatography. *Endocrinology*, v.114, p.2223-2227, 1984.
55. PERLMAN, S.; VAN DER HAZEL, B.; CHRISTIANSEN, J.; GRAM-NIELSEN, S.; JEPPESEN, C.B.; ANDERSEN, K.V.; HALKIER, T.; OKKELS, S.; SCHAMBYE, H.T. Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in vivo activity of follicle stimulating hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.88, p.3227-3235, 2003.
56. RAFFERTY, B.; MOWER, J.A.; WARD, H.L.; ROSE, M. Differences in carbohydrate-composition of FSH preparations detected with lectin-ELISA systems. *J. Endocrinol.*, v.145, p.527-533, 1995.
57. RAFFERTY, B.; DAS, R.G. Comparison of pituitary and recombinant human thyroid-stimulating hormone (rhTSH) in a multicenter collaborative study: Establishment of the first World Health Organization reference reagent for rhTSH. *Clin. Chem.*, v.45, p.2207-2215, 1999.
58. RAO, R.N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.33, p.335-377, 2003.
59. RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. *Curr. Pharm. Anal.*, v.2, p.103-126, 2006.

60. RIGGIN, R.M.; DORULLA, G.K.; MINER, D.J. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for characterization of biosynthetic human growth hormone. *Anal. Biochem.*, v.167, p.199-209, 1987.
61. RODBARD, D. Statistical estimation of minimal detectable concentration (sensitivity) for radioligand assays. *Anal. Biochem.*, v.90, p.1-12, 1978.
62. ROSE, M.P. Follicle stimulating hormone international standards and reference preparations for the calibration of immunoassays and bioassays. *Clin. Chem. Acta*, v.273, p.103-117, 1998.
63. SETH, J.; HANNING, I.; BACON, R.R.A.; HUNTER, W.M., Progress and problems in immunoassays for serum pituitary gonadotrophins: evidence from the UK external quality assessment schemes (EQAS) 1980–1988. *Clin. Chim. Acta*, v.186, p.67-82, 1989.
64. SILVERBERG, K.; DAYA, S.; AURAY, J.P.; DURU, G.; LEDGER, W.; WIKLAND, M.; BOUZAYEN, R.; O'BRIEN, M.; FALK, B.; BERESNIAK, A. Analysis of the cost effectiveness of recombinant versus urinary follicle-stimulating hormone in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programs in United States. *Fert. Ster.*, v.77, p.107-113, 2002.
65. 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.
66. STANTON, P.G.; ROBERTSON, D.M.; BURGON, P.G.; SHMAUCK-WHITE, B.; HEARN, M.T.W. Isolation and physicochemical characterization of human follicle-stimulating hormone isoforms. *Endocrinology*, v.130, p. 2820-2832, 1992.
67. STEELMAN, S.M.; POHLEY, F.M. Assay of follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, v.53, p.604-616, 1953.
68. 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.
69. TAYLOR, A.E.; KHOURY, R.H.; CROWLEY, W.F. A comparison of 13 different immunometric assay kits for gonadotropins - implications for clinical investigation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.79, p.240-247, 1994.

70. TORJESEN, P.A. [Mensagem pessoal]. Mensagem fornecida por <e-mail> em 2003.
71. TULPALLA, M.; AHO, M.; TUURI, T.; VILSKA, S.; FOUJILA, T.; HAKALA-ALA-PIETILÄ, T.; MOILANEN, J.; BÜTZOW, T.; KAUKORANTA, S.; SÖRDERSTRÖM-ANTTILA, V.; SIEGBERG, R.; SUIKKARI, A.M.; HOVATTA, O. Comparison of two recombinant follicle-stimulating hormone preparations in in-vitro fertilization: a randomized clinical study. *Hum. Reprod.*, v.14, p.2709-2715, 1999.
72. 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.
73. ULLOA-AGUIRRE, A.; MIDGLEY, A.R.; BEITINS, I.Z.; PADMANABHAN, V. Follicle stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr. Rev.*, v.16, p.765-787, 1995.
74. ULLOA-AGUIRRE, A.; MALDONADO, A.; DAMIÁN-MATSUMURA, P.; TIMOSSI, C. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch. Med. Resear.*, v.32, p.520-532, 2001.
75. ULLOA-AGUIRRE, A.; TIMOSSI, C.; BARRIOS-DE-TOMASSI, C.; 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.
76. VAN DAMME, M.P.; ROBERTSON, D.M.; MARANA, R.; RITZEN, E.M. A sensitive and specific in vitro bioassay method for the measurement of follicle-stimulating hormone activity. *Acta Endocrinol.*, v.91, p.224-237, 1979.
77. VAN HELL, H.; MATTHIJSSEN, R.; OVERBEEK, G.A., Effects of human menopausal gonadotrophin preparations in different bioassay methods. *Acta Endocrinol.*, v.47, p.409-418, 1964.
78. VAN WEZENBEEK, P.; DRAAIJER, J.; VAN MEEL, F.; OLIJVE, W. Recombinant follicle stimulating hormone I. Construction, selection and characterization of a cell line. In: Crommelin D.J.A., Schellekens (Editors). *Clone to Clinic*, Kluwer, Dordrecht, 1990, p.245-251.
79. VITT, U.A.; KLOOSTERBOER, H.J.; ROSE, U.M.; MULDER, J.W.M.; KIESEL, P.S.; BETE, S.; NAYUDU, P.L. Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: Comparison of effects on murine follicle development in vitro. *Biol. Reprod.*, v.59, p.854-861, 1998.



80. ZWART-VAN RIJKOM, J.E.F.; BROEKMANS, F.J.; LEUFKENS, H.G.M. From HMG through purified urinary FSH preparations to recombinant FSH: a substitution study. *Hum. Reprod.*, v.17, p.857-865, 2002.
81. WALTON, W.J.; NGUYEN, V.T.; BUTNEV, V.Y.; SINGH, V.; MOORE, W.T.; BOUSFIELD, G.R. Characterization of human FSH isoforms reveals a nonglycosylated beta-subunit in addition to the conventional glycosylated beta-subunit. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.86, p.3675-3685, 2001.
82. WILLIAMS, J. Ghost peaks in reversed-phase gradient HPLC: a review and update. *J. Chromatogr. A.*, v.1052, p.1-11, 2004.
83. WOLFENSON, C.; GROISMAN, J.; COUTO, A.S.; HEDENFALK, M.; CORTVRINDT, R.G.; SMITZ, J.E.J.; JESPERSEN, S. Batch-to-batch consistency of human-derived gonadotrophin preparations compared with recombinant preparations. *Reprod. Biomed. Online*, v.10, p.442-454, 2005.