



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO DE HPLC EM FASE
REVERSA PARA A DETERMINAÇÃO DE PROLACTINA EM
EXTRATOS BACTERIANO EM SUA FORMA PURIFICADA:
SUA APLICAÇÃO EM ESTUDO COLABORATIVO

ELIZABETH KINUYO GIMBO VIANNA

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

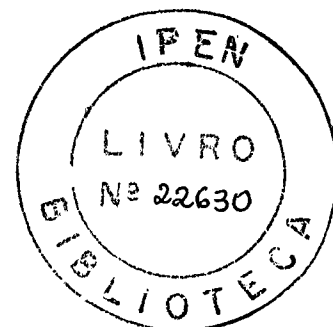
Orientador:
Dr. Paolo Bartolini

São Paulo
2002

**-INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO DE HPLC EM FASE
REVERSA PARA A DETERMINAÇÃO DE PROLACTINA
EM EXTRATOS BACTERIANO E EM SUA FORMA
PURIFICADA: SUA APLICAÇÃO EM ESTUDO
COLABORATIVO INTERNACIONAL
PROMOVIDO PELA O.M.S**

ELIZABETH KINUYO GIMBO VIANNA



**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau
de Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

Orientador: Dr. PAOLO BARTOLINI

São Paulo

2002

**Ao meu marido Estanislau, ao pequeno Lucas
pelo amor, compreensão e incentivo
em todas as horas**

**Aos meus pais, aos meus irmãos
pelo apoio
em todos os momentos**

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paolo Bartolini

À Dra Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares

pela orientação, participação, críticas, sugestões e apoio na realização desta tese

A todos os colegas da TBM

que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho

Ao IPEN pela oportunidade de realização deste trabalho

O meu agradecimento.

**PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO DE HPLC EM FASE REVERSA
PARA A DETERMINAÇÃO DE PROLACTINA EM EXTRATOS
BACTERIANO E EM SUA FORMA PURIFICADA: SUA APLICAÇÃO
EM ESTUDO COLABORATIVO INTERNACIONAL
PROMOVIDO PELA O.M.S**

Elizabeth Kinuyo Gimbo Vianna

RESUMO

Foi padronizada uma técnica de cromatografia líquida em fase reversa para a determinação de prolactina humana no espaço periplásmico bacteriano ou em preparações purificadas. Esta técnica, com base na alta hidrofobicidade da molécula de hPRL, permitiu sua separação do conjunto de proteínas bacterianas. A precisão, no caso da análise dos extratos periplásmicos derivados de choque osmótico, foi caracterizada por um desvio padrão relativo de 3-7% para as determinações intra-dia e de 3-25% para aquelas inter-dia. A exatidão, avaliada mediante testes de recuperação, foi da ordem de 90%, sendo que a curva de calibração foi construída com o uso de um extrato periplásmico liofilizado, que providenciou uma preparação de referência interna estável e de fácil preparação. A sensibilidade foi da ordem de 0,5 µg de hPRL. A metodologia desenvolvida também proporcionou uma ferramenta útil para comparar a hidrofobicidade das moléculas de prolactina glicosilada e não glicosilada obtidas de espécies diferentes e de diferentes preparações de prolactina humana natural ou biossintética. A mesma técnica foi também aplicada com sucesso no Estudo Colaborativo Internacional sobre os Reagentes de Referência propostos pela Organização Mundial de Saúde para a prolactina recombinante e seus componentes glicosilados e não glicosilados, concluída em 2001 e cujos resultados mais significativos são também apresentados

REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DETERMINATION OF PROLACTIN IN BACTERIAL EXTRACTS AND IN ITS PURIFIED FORM: APPLICATION TO A WHO INTERNATIONAL COLLABORATIVE STUDY

Elizabeth Kinuyo Gimbo Vianna

ABSTRACT

Reversed-phase high-performance liquid chromatography methodology for the determination of human prolactin (hPRL) in bacterial periplasmic space or in purified preparations has been developed. The technique, based on the high hydrophobicity of the hPRL molecule, allows its separation from the bulk of bacterial proteins. The precision for periplasmic shock fluid analysis was characterized by relative standard variations of 3-7% for intra-day and of 3-25% for inter-day determinations. Accuracy, evaluated by recovery tests, was of the order of 90%, a calibration curve being constructed with the use of a lyophilized osmotic shock fluid extract, which provided a stable, readily prepared internal reference. Sensitivity was of the order of 0.5 μ g of hPRL. The methodology developed also provided a tool for comparing the hydrophobicity of glycosylated and non-glycosylated prolactin molecules obtained from several different species and of different preparations of native or biosynthetic human prolactin. This technique, moreover, was already successfully applied to the International Collaborative Study of the proposed WHO Reference Reagents for rDNA-derived prolactin and its glycosylated and non-glycosylated components, concluded in 2001 and whose more significant results are also presented..

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. Reagentes químicos e biológicos	11
2.2. Choque osmótico	12
2.3. HPLC em fase reversa (RP-HPLC)	12
2.4. HPLC de exclusão molecular (HPSEC)	13
2.5. Determinação de precisão	13
2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e análise por Western-Blot	14
2.7. Análise de aminoácidos	14
2.8. Radioimunoensaio	15
2.9. Medidas de absorbância em UV	15
3. RESULTADOS	
3.1. Análise de extratos periplásmicos mediante RP-HPLC	16
3.2. Análise de diferentes prolactinas em comparação com hGH	16
3.3. Determinação quantitativa de hPRL mediante RP-HPLC	21
3.4. Validação do método	21
3.5. Análise de diferentes formas de prolactina dentro do Estudo Colaborativo da O.M.S.	24
3.5.1. Análise mediante RP-HPLC das preparações da O.M.S.	24
3.5.2. Análise mediante RP-HPLC da prolactina sintetizada e purificada em nosso laboratório	34
3.5.3. Análise mediante HPSEC das preparações da O.M.S	34

3.5.4. Conclusões do estudo da O.M.S. 47

4. DISCUSSÃO 49

5. REFERÊNCIAS 52

1 INTRODUÇÃO

A Prolactina (PRL), um hormônio polipeptídico de peso molecular 23.000 daltons, apresenta uma cadeia simples de 199 resíduos de aminoácidos (aa) e três pontes dissulfeto. A PRL é melhor conhecida pela sua capacidade em estimular a lactação e pela sua ação reguladora no crescimento e diferenciação da glândula mamária. Contudo, a PRL é um dos hormônios mais versáteis em termos de ações biológicas pois mais de 100 atividades diferentes já foram documentadas em vertebrados [1, 2, 3, 4, 5] incluindo a regulação da reprodução e lactação, a osmorregulação, a modificação do comportamento e maturação de oócitos [6] e a regulação do sistema imunológico [7, 8]. Ao nível celular a PRL pode exercer atividades mitogênica, morfogênica ou secretória [9]. A PRL humana é secretada principalmente pelas células lactotróficas da hipófise anterior, mas também por outros órgãos e tecidos, na forma de um precursor de 227 aa, incluindo seu peptídeo sinalizador de 28 aa, cuja clivagem dá origem a forma nativa da PRL. Nesses últimos 10 anos verificou-se que a PRL humana (hPRL) possui um significativo polimorfismo molecular, resultado de modificações pré- e pós-traducionais (glicosilação, fosforilação, dimerização, processos proteolíticos específicos que promovem alterações no tamanho molecular e na carga da molécula resultante). As formas glicosiladas e fosforiladas da PRL também estão presentes na hipófise [3, 10]. Os significados fisiológicos dessas diferentes formas de hPRL estão sendo melhor estudadas [3]

Na hipófise humana, as duas formas predominantes são a glicosilada (G-hPRL) e a não-glicosilada (NG-hPRL), sendo a forma G-hPRL cerca de 13-25%, similar ao nível encontrado no plasma [3, 11]. O significado biológico dessas diferentes formas ainda não está muito claro, mas diferentes proporções entre elas já foram verificadas durante a gravidez, lactação e estados de hiperprolactemia, podendo estar associadas a algumas condições patológicas [12].

A hPRL está presente na hipófise em quantidades ínfimas (0,1- 0,2 mg) [13, 14], sendo seu processo de purificação altamente laborioso, e o rendimento

final é uma concentração baixíssima de uma proteína altamente lábil [13, 15, 16, 17]. A dificuldade de obtenção dessas isoformas purificadas tem impedido progressos para delinear diferenças funcionais entre essas moléculas, assim como para compreender a regulação da expressão gênica da hPRL.

Somente recentemente foi possível a produção desse hormônio em escala maior utilizando a tecnologia de DNA-recombinante, a qual fornece quantidades maiores e um produto mais homogêneo [12, 18-26]. A hPRL obtida tanto à partir de glândulas hipofisárias quanto de células hospedeiras geneticamente modificadas, é então submetida à purificação e sua quantificação realizada pelo método do imunoensaio ou SDS-PAGE com ou sem *immunoblotting*. A atividade mitogênica da hPRL é verificada em um bioensaio *in vitro* utilizando cultura de células Nb2 [27]. Uma quantificação exata utilizando o imunoensaio de uma mistura de isoformas, contudo, sempre foi bastante crítica, especialmente no que se refere à escolha, disponibilidade e equivalência de padrões adequados, anticorpos e um protocolo de ensaio em geral [28, 29]. No que se refere por exemplo às formas glicosilada e não-glicosilada da hPRL, um estudo colaborativo da WHO envolvendo 15 laboratórios de referência, incluindo o nosso, mostrou que a NG-hPRL apresenta imunoreatividade de 1 a 3 vezes maior que a forma G-hPRL, dependendo do sistema de ensaio empregado [30]. Apesar de extremamente úteis, as técnicas de SDS-PAGE, *Immunoblotting* e o bioensaio utilizando células Nb2, também apresentam graves limitações no que se refere à exatidão e precisão. Até o momento, não temos conhecimento de algum método físico-químico acurado para a determinação de hPRL.

As evidências experimentais de que a hPRL e o hormônio de crescimento humano (hGH) apresentam propriedades hidrofóbicas semelhantes [17] e de que o hGH é mais hidrofóbico que a maioria das proteínas de *E coli*, as quais podem ser facilmente resolvidas por RP-HPLC isocrático [28, 31, 32], sugeriu-nos que esta metodologia poderia ser útil para a quantificação da hPRL em extratos bacteriano e em suas forma purificadas, fornecendo uma rápida identificação e análise qualitativa e quantitativa do hormônio.

O método de RP-HPLC isocrático é o primeiro a descrever uma análise físico-química quali e quantitativa da PRL sob condições não-denaturante. Seguindo o trabalho pioneiro em RP-HPLC, de Karger et al [33], Hancock e col.[34, 35] e Horvath e Melander [36], esta metodologia foi amplamente utilizada na análise e caracterização do hGH [28, 32, 37, 38-44]. A padronização dessa metodologia para a PRL tem apresentado dificuldades principalmente devido à sua limitada disponibilidade. A hPRL hipofisária é extremamente preciosa e lábil [23, 45, 46], enquanto a forma autêntica recombinante desse hormônio, secretada no espaço periplásmico de *E.coli* foi expressa até hoje em níveis muito baixo [22, 23]. O presente projeto só é possível graças à utilização de uma cepa secretora de hPRL, cujo extrato periplásmico contém níveis relativamente altos do hormônio. De fato, mesmo com uma maior disponibilidade de quantidades maiores de hPRL em nosso laboratório, os extratos brutos liofilizados podem fornecer uma preparação de referência interna (IRP) barata, de rápida preparação, estável e reprodutível, a qual apresenta ainda a vantagem adicional de não ter sido submetida aos longos e extenuantes procedimentos de purificação. Esta última característica é bastante importante para a identificação acurada da forma fundamental da hPRL.

O método RP-HPLC é também conhecido por apresentar uma grande eficiência na resolução das formas quimicamente modificadas de hGH [37, 38-40]

Portanto, o **objetivo** do presente trabalho é descrever nossa implementação da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) isocrática, a qual pode ser utilizada para a determinação de PRL humana recombinante (rec hPRL) em extratos periplásmicos de *E.coli*, como também em sua forma purificada. Tal procedimento possibilitará uma rápida análise inicial da qualidade e quantidade da hPRL secretada no espaço periplásmico, imediatamente após, ou mesmo durante o processo de fermentação, assim como durante o processo de purificação, como também em todos os estudos e aplicações envolvendo o hormônio, cuja importância no campo da pesquisa, diagnóstico e terapia está crescendo muito rapidamente (24, 47-50). Salientamos também a utilização dessa metodologia na análise da PRL obtida em

células CHO geneticamente modificadas, após purificação do meio de cultura em coluna de SP-Sepharose Fast-Flow [51].

A aplicação dessa metodologia, com as possíveis modificações, pode ser estendida para a análise de outras proteínas e glicoproteínas, como por exemplo o rec hTSH , cuja caracterização é ainda baseada em técnicas imunológicas e biológicas [52].

Aplicação da presente metodologia ao Estudo Colaborativo Internacional promovido pela O.M.S.

Enquanto o presente trabalho de padronização estava em sua fase conclusiva o nosso laboratório foi convidado a participar do Estudo realizado pela O.M.S. para a definição dos Reagentes de Referência Internacional relativos à Prolactina humana recombinante e aos seus componentes glicosilado e não glicosilado. Meta deste Estudo seria a substituição do 3º Padrão Internacional de Prolactina (WHO 84/500), derivado de hipófises humanas, estabelecido em 1988 e atualmente em fase de esgotamento, com a Prolactina recombinante e seus componentes altamente purificados sintetizados em células murinas C127 geneticamente modificadas (12). Esta padronização deveria ser realizada mediante:

1. Comparação, por imunoensaio e bioensaios, das preparações fornecidas em ampolas, com os padrões usados localmente.
2. Calibração destas mesmas preparações para uso como Reagentes de Referências.
3. Determinação da estabilidade dos Reagentes propostos mediante degradação técnica acelerada.
4. Determinação do conteúdo de prolactina recombinante (rec-hPRL) e de seus componentes glicosilado e não glicosilado mediante técnicas físico-químicas.

5. Caracterização de sistemas de ensaio que possam discriminar o componente glicosilado do não glicosilado.
6. Fornecer provas da validade dos sistemas de ensaios calibrados contra preparações recombinantes.

O nosso método recém padronizado foi portanto utilizado em comparação com a técnica mas estabelecida de HPLC de exclusão molecular, nos mencionados estudos físico-químicos onde somente 3 laboratórios dos 15 participantes (pertencentes a 8 países diferentes) puderam apresentar dados (30).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

A água é obtida do sistema de purificação Millipore “Milli-Q plus” (Bedford, MA, EUA). A acetronitrila e n-propanol grau HPLC, foram fornecidos pela Mallinckrodt (Paris, KY, EUA) Todos os outros reagentes químicos utilizados apresentam grau analítico.

A rec hPRL autêntica liofilizada obtida de extratos periplásmico bacteriano, assim como a rec hPRL glicosilada (G-hPRL) e não-glicosilada (NG-hPRL) produzidas em células de ovário de hamster chinês (CHO) modificadas geneticamente, foram obtidas neste laboratório. O vetor usado para a expressão da hPRL em células CHO, pEDdc, foi gentilmente cedido pelo *Genetics Institute* (Cambridge, MA, EUA), enquanto a construção do vetor de expressão bacteriano da hPRL e a seleção dos clones secretores de hPRL das células CHO, foram realizados em colaboração com a *Sanofi Recherche* (Toulouse, França) [24]. A preparação altamente purificada de hPRL hipofisária (hPRL-RUS), a PRL porcina não-glicosilada (NG-pPRL) e glicosilada (G-pPRL) foram gentilmente fornecidos pelo Dr A. Bulatov (*National Research Center for Endocrinology*, Moscou, Russia). Uma Segunda preparação de hPRL hipofisária altamente purificada (hPRL-NOR) foi gentilmente doada pelo Dr P. Torjensen (*Aker University Hospital*, Oslo, Noruega). Preparações de hPRL do *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK-hPRL-RP-2, NIDDK-hPRL-I-8, e NIDDK-hPRLSIAFP-B-3), antissoro anti-hPRL produzido em coelho (NIDDK-anti-hPRL-3), hPRL e PRL ovina glicosilada (G-oPRL) foram gentilmente cedidas pelo Dr A F.Parlow, do *National Hormone and Pituitary Program*, Torrance, CA, EUA. A oPRL (100 IU/vial) foi adquirida da Sigma (St Louis, MO, EUA). O Padrão Internacional de hGH, para bioensaio, código 80/505, o primeiro Padrão Internacional para Somatotropina (hGH derivado de DNA-recombinante) código 88/624 e o Padrão de Referência Química (CRS) da rec hPRL, foram gentilmente fornecidos pelo *National Institute for Biological Standards and Control* (South Mimms, UK).

2.2. CHOQUE OSMÓTICO

O fluido periplásmico derivado do choque osmótico foi obtido segundo o método de Koshland e Botstein [53]. Um volume da fermentação com $A_{600} = 40.0$ unidades ópticas é centrifugado a 3000g por 5 minutos. Todos os passos subsequentes são realizados a 4 °C em banho de gelo. Os precipitados são ressuspendidos em 0,4 mL de uma solução gelada de 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, contendo 20% de sacarose (m/v); e 13 μ L de EDTA 0,5M, pH 8,0 foram adicionados, a mistura sendo incubada por mais 10 minutos em banho de gelo. As células são então centrifugadas e o precipitado rapidamente ressuspendido através de agitação vigorosa em 0,4 mL de Tris-HCl 1 mM, pH 7,0. A mistura foi incubada por 10 minutos em banho de gelo e centrifugada novamente por 5 minutos. O sobrenadante obtido é separado e armazenado como fluido periplásmico com atividade hormonal.

2.3. HPLC EM FASE REVERSA (RP-HPLC)

O aparelho de HPLC utilizado é o modelo Shimadzu SCL-10A acoplado a um detector SPD-10AV UV (Shimadzu, MD, EUA), empregando o software Class VP, também da Shimadzu. A coluna utilizada é uma C4 Vydac 214 TP 54 (25cmx4,6mm I.D., com poros de diâmetro de 300 Å e diâmetro de partícula de 5 μ m) com uma pré-coluna (Vydac 214 FSK 54) entre o injetor de amostra e a coluna principal e outra coluna de sílica com LiChrosorb Si 60, 7,9-12,4 μ m (Merck, Darmstad, Alemanha) localizada entre a bomba e o injetor. Todas as colunas Vydac foram fornecidas pelo Separation Group (Hesperia, CA, EUA). A fase móvel consiste de 71% de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (grau analítico) e 29% de n-propanol (Mallincrodt, Paris, KY, EUA), como descrito por Dalmora *et al.*, 1997 [32]., com fluxo de 0,5 mL/min, detecção a 220 nm, temperatura de coluna mantida a 45 °C e volume de amostra aplicado de 25-200 μ L. O desvio padrão relativo (RSD) intra-dia para o tempo de retenção (t_R) determinados para

uma certa isoforma de prolactina foi de 0,3-0,8%. Devido à dificuldade na reprodução precisa da fase móvel [37], adotamos o tempo de retenção relativa (t_{RR}), para as comparações inter-dias, calculado com base no valor do t_R do hGH de cada dia, onde $t_{RR-x} = t_{R-x} / t_{R-hGH}$, para uma dada forma x.

2.4. HPLC DE EXCLUSÃO MOLECULAR (HPSEC)

HPLC isocrática também foi no mesmo sistema Shimadzu já utilizado para RP-HPLC. A coluna foi uma TSK G2000 SW (60cm x 7.5mm de diâmetro interno, com poros de 125 Å e partículas de 10µm de diâmetro), acoplada a uma precoluna "SW guard" de 7.5cm x 7.5mm de diâmetro interno, as duas produzidas pela Tosohaas (Montgomeryville, PA, EUA). Como fase móvel foi utilizado 0,025 M bicarbonato de amônio, pH 7,0, com fluxo de 1,0 ml/min, a temperatura ambiente. A leitura no UV foi realizada a 200nm, aplicando um volume de amostra de 5-200µl.

2.5. DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO

A precisão da determinação quantitativa foi calculada utilizando diferentes fluidos periplásmicos de choques osmóticos, nos ensaios intra- e inter-dia. O desvio padrão relativo (DPR) obtido do intra-dia resultará da determinação de triplicatas de uma mesma amostra, com a mesma fase móvel, preparada diariamente. A precisão inter-dia será obtida usando a média dos valores intra-dia, determinados por um período não superior a 1 mês. Os valores em microgramas, foram obtidos contra uma preparação liofilizada calibrada (IRP), analisada no mesmo dia, e cuja estabilidade ao longo do tempo já tinha sido confirmada pela análise contra alíquotas congeladas de preparações de hPRL da NIDDK.

2.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) E ANÁLISE POR WESTERN-BLOT

SDS-PAGE descontínuo empregando gel de poliacrilamida a 12% foi realizado como descrito por Soares *et al.*, 2000 [51], sob condição não-denaturante. Será usado como revelador o reagente GELCODE® Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, IL, EUA) e como marcador de peso molecular, o reagente da Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, EUA).

Para a técnica do *Western-blot* (WB), seguiu-se basicamente a técnica de transferência semi-seca, utilizando o antissoro anti-hPRL produzido em coelho, do NIDDK-NIH (Bethesda, MD, EUA) lote AFP C11580, diluído 1:62.500.

As amostras para serem analisadas por WB foram submetidas a SDS-PAGE, em seguida sendo realizada uma transferência semi-seca para uma membrana de nitrocelulose (22 μ m). A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do seguinte modo: foram colocadas em sequência do polo positivo para o polo negativo, 7 folhas de papel de filtro 3MM pré-umidecidas em tampão de transferência (0,3% glicina, 0,6% Tris-base, 0,04% SDS, 20% metanol). A corrente aplicada (mA) = área (cm²) x 0,85. A duração da transferência foi de 1 hora.

Após a transferência, a membrana foi tratada com tampão fosfato-salina (PBS), contendo 5% de leite em pó desnatado e liofilizado (Molico, S.P., Brasil), sendo incubada por 18 horas a temperatura ambiente com 50 mL de antissoro diluído em PBS contendo 5% de leite em pó. Após a incubação com o antissoro, foram realizadas 5 lavagens com PBS-5% leite. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com 50 mL de uma solução de PBS-5% leite contendo 200.000 cpm/mL de Proteína A marcada com I¹²⁵. Ao final dessa incubação, a membrana foi lavada com PBS contendo 0,01% de *Tween* 20 por pelo menos 6 vezes. A membrana foi deixada a temperatura ambiente até secar, envolta em uma folha fina de PVC, estando pronta para ser submetida a autorradiografia.

2.7. ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS

A Quantificação proteica foi realizada pela análise dos aminoácidos. Alíquotas (100-500 μ g) de hGH, hPRL e BSA (Sigma), esta última usada como

preparação de referência, foram hidrolisados em fase gasosa de HCl 6N a 110°C por 20 horas, os aminoácidos sendo analisados no Sistema Amino Quant (Agilent, Palo Alto, CA, EUA), o qual é baseado na derivatização da pré-coluna de orto-ftalaldeído ou 9-fluorenilmetilcloroformato. A determinação será realizada pela corrida de 3 amostras de cada proteína. As amostras de BSA forneceram uma quantidade de proteína de 95% (\pm 7,3% RSD) em comparação com o valor nominal.

2.8. RADIOIMUNOENSAIO

A determinação da imunoreatividade da hPRL foi realizada conforme descrito previamente [22] usando reagentes NIDDK e hPRL-RUS para a radioiodinação. O reagente Dade® Tri-level (Baxter Diagnostics Inc, Deerfield, IL, EUA) foram usados como amostras sorológicas de Controle de Qualidade, em cada curva-padrão construída.

2.9. MEDIDAS DE ABSORBÂNCIA EM UV

O coeficiente de absorvância ($A^{0,1\%}$) foi determinado em diferentes comprimentos de ondas (λ) usando uma concentração nominal de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($\lambda = 220\text{nm}$) ou de 100 $\mu\text{g/ml}$ ($\alpha = 276, 279$ e 280nm) das *proteínas, em um espectrofotômetro Ultrospec III (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia).

Antes de cada medida, as amostras foram centrifugadas a 16.000g por 5 minutos. As medidas a 220nm foram lidas contra o tampão aquoso ou contra o tampão n-propanol 29% (fase móvel do HPLC-RP) à temperatura ambiente.

3. RESULTADOS

3.1. Análise de extratos periplásmicos mediante RP-HPL

Na Fig.1 podemos observar exemplos de cromatogramas de RP-HPLC relativos a extratos periplásmicos obtidos de uma cepa de E.coli transformada ou não com um vetor de expressão para hPRL. A atividade imunológica é apresentada juntamente com o perfil proteico (A_{220nm}). É evidente que a cepa não transformada não apresenta atividade imunológica de hTSH e que o pico de hPRL está resolvido com relação às proteínas da célula hospedeira. A pureza do pico de hPRL, determinada após eluição de um extrato periplásmico aplicado em RP-HPLC, pode ser confirmada na Fig.2.

3.2. Análise de diferentes prolactinas em comparação com hGH

Na Tabela 1 são apresentados os tempos de retenção (t_R) de diferentes preparações de prolactina (natural e biossintética, glicosilada e não glicosilada incluídas) derivadas de diferentes espécies. Os valores de t_R da tabela, diretamente ligados à hidrofobicidade da molécula, são um exemplo de determinações realizadas no mesmo dia (intra-dia) em comparação com os conhecidos Padrões Internacionais de hGH pituitário e recombinante (rhGH). Como especificado em **Materiais e Métodos**, comparações inter-dia foram realizadas com base nos valores calculados de t_{RR} , para os quais o desvio padrão relativo inter-dia nunca foi maior de 1.5% (n=3) por cada específica isoforma. Na Fig.3 são também apresentados alguns cromatogramas típicos para rhGH, pit-hGH, rhPRL e o PRL. Com exceção de rhPRL oriunda de extrato periplásmico, liofilizado, podemos em geral observar a presença de picos menores relativos a formas de eluição mais rápida.

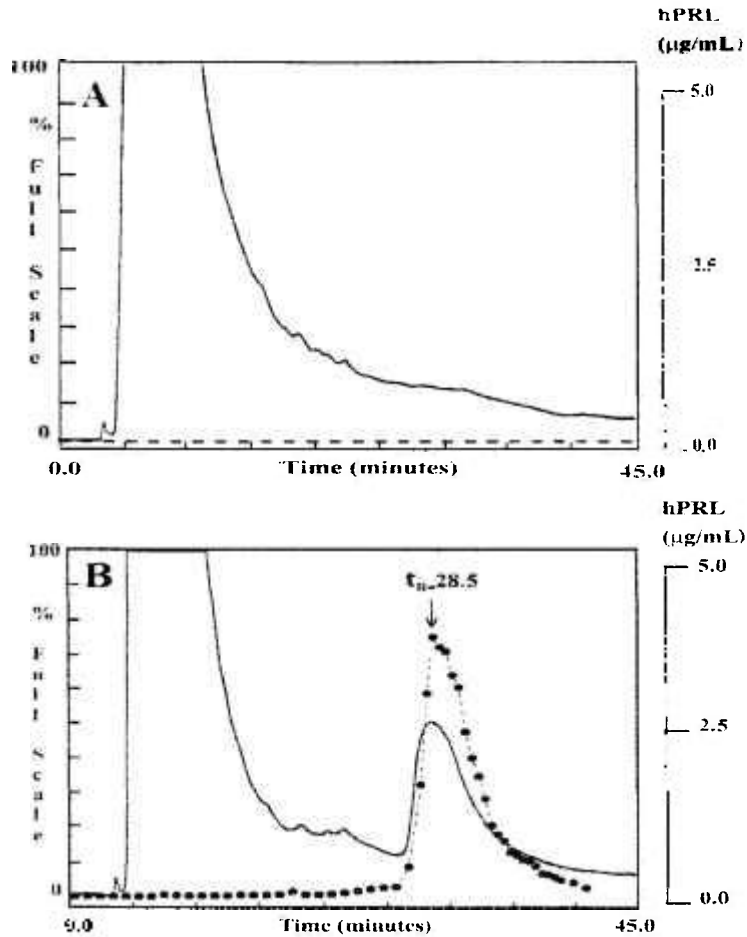


Fig. 1. RP-HPLC isocrática em uma coluna C4 Vydac 214 TP 54 de diferentes fluidos periplasmáticos obtidos de:

(A) E. coli, cepa não-transformada (RB791);

(B) Mesma cepa, transformada com vetor de expressão de hPRL.

Volume da amostra: 200 µL.

— A220, - - - atividade de hPRL determinada por RIA contra NIDDK-HPRL-

RP1

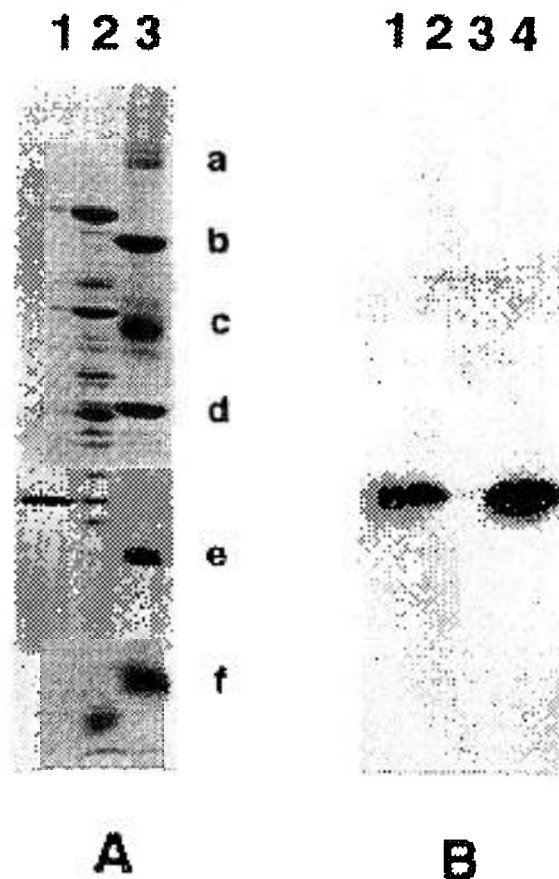


Fig. 2. Análise em SDS/PAGE (A) e Western-blot (B), sob condições não-redutoras, de rec-hPRL extraída do fluido periplasmico (choque osmotico) e purificada por RP-HPLC. (A) Amostra 1, rec-hPRL eluida de RP-HPLC ($t_R = 28.5$ min), $1\mu\text{g}$. Amostra 2, fluido do choque osmotico, $10\mu\text{L}$. Amostra 3, marcador de peso molecular: a, fosforilase b (97 KDa); b, BSA (66 KDa); c, ovoalbumina (45 KDa); d, anidrase carbonica (30KDa); e, inibidor de tripsina (20.1 KDa); f, α -lactoalbumina (14.4 KDa). (B) Amostra 1, hPRL-NIDDK-SIAFP-B3, 500 ng. Amostra 2, fluido do choque osmotico, $5\mu\text{L}$. Amostra 3, 1° pico eluido da RP-HPLC ($t_R \sim 10$ min, ver Fig. 1), $25\mu\text{L}$. Amostra 4, rec-hPRL eluida da RP-HPLC ($t_R = 28.5$ min), $2\mu\text{g}$.

Tabela 1 Tempos de retenção (t_R) de diferentes prolactinas em RP-HPLC isocrática e tempos de retenção relativos (t_{RR}) determinados contra o Padrão Internacional de rhGH.

AMOSTRA	FONTE	t_R (min)	t_{RR}
rhGH	(WHO 88/624)	32,2	—
pit-hGH	(WHO 80/505)	32,3	1,00
pit-hPRL	(NIDDK)	27,6	0,86
pit-G-hPRL	(NIDDK)	23,1	0,72
pit-hPRL	(RUS)	30,2	0,94
pit-hPRL	(NOR)	30,3	0,94
r-hPRL	(<i>E.coli</i>)	30,7	0,95
r-hPRL	(CHO)	30,0	0,93
rG-hPRL	(CHO)	19,9	0,62
oPRL	Sigma	24,0	0,74
G-oPRL	(NIDDK)	19,5	0,60
pPRL	(RUS)	28,1	0,87
G-pPRL	(RUS)	18,3	0,57

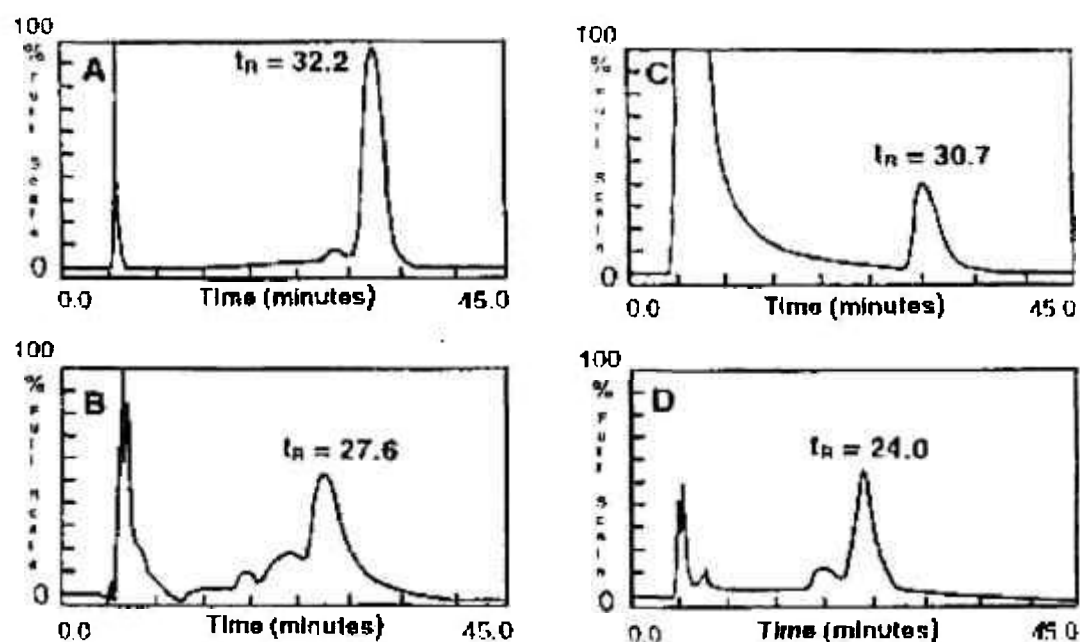


Fig. 3. Cromatogramas típicos (RP-HPLC) de alguns dos produtos cujos t_R são apresentados na Tabela 1. A quantidade de proteína aplicada é baseada no conteúdo nominal do frasco. (A) rec-hGH (WHO 88/624), 10 μ g; (B) pit-hPRL (NIDDK, SIAFP-B-3), 20 μ g; (C) extrato periplasmico liofilizado contendo hPRL bacterial (irp), 6 μ g; (D) PRL ovina (Sigma), 10 μ g

3.3. Determinação quantitativa de hPRL mediante RP-HPLC

Extratos periplásmicos liofilizados obtidos de uma cepa de E.coli transformada com um vetor de expressão para hPRL, foram usadas como “preparações internas de referência (irp)” após calibração contra prolactina pituitária altamente purificada (hPRL). Esta última preparação proporcionou a seguinte curva dose-resposta:

$$Y_A = 672 X_W - 73 \quad (n = 5; r = 0,9987; P < 0,001),$$

onde A é a área do pico em unidades arbitrárias de área (ua) e W representa a dose (μg) de hPRL- NIDDK aplicada à RP-HPLC. Uma das preparações liofilizadas proporcionou, por exemplo, a curva:

$$Y_A = 51,4 X_V - 8,3 \quad (n = 6; r = 0,9995; P < 0,001),$$

onde V representa o volume (μl) retirado de uma solução de $100\mu\text{l}$ em que foi dissolvido todo o conteúdo da ampola. Uma comparação entre as duas curvas forneceu, para esta específica “irp”, um conteúdo de $7,74\mu\text{g}$ de hPRL por ampola. Três diferentes “irp” foram preparados até agora em nosso laboratório, sempre obtendo-se uma precisão e estabilidade comparáveis.

3.4. Validação do método

Para confirmar a exatidão do método foi realizado um teste de recuperação mediante adição de quantidades conhecidas de uma preparação de prolactina recombinante purificada (hPRL-CRS) a extrato periplásmico bacteriano obtido de uma cepa de E.coli não transformada. A recuperação foi da ordem de 94% e a correlação entre hPRL adicionada e recuperada foi altamente significativa, como indicado pela equação de regressão linear:

$$Y_{\text{recup}} = 0,931 X_{\text{adic}} + 0,046 \quad (r = 0,9995; P < 0,001 \text{ para } n = 11)$$

Uma curva dose-resposta análoga foi também determinada para rhGH (Padrão Internacional WHO 88/624), encontrando uma inclinação da curva dose-resposta comparável àquela da hPRL:690ua/ μ g. A absorvância espectrofotométrico das proteínas foi portanto comparada em diferentes comprimentos de onda da luz ultravioleta: 220, 276, 279 e 280nm (Tabela 2). A absorvância a 220nm é a mais utilizada em nossa detecção por RP-HPLC, os coeficientes de absorção declarados a 276nm e 279nm para hGH (54) e para hPRL (45) são respectivamente $A^{1\%}_{276nm} = 8,18$ e $A^{1\%}_{279} = 8,39$; a absorvância a 280nm é a mais comumente usada para a determinação de proteínas.

A quantificação realizada mediante análise da composição em aminoácidos (técnica quantitativa absoluta) indicou relativamente aos valores nominais, um conteúdo de 89% ($\pm 6,5\%$ DPR) para a preparação de hGH e de 58,4% ($\pm 6,1\%$ DPR) para a preparação de hPRL. Os coeficientes de absorção para os dois hormônios foram portanto calculados e encontrados comparáveis, mesmo sendo os valores de 276nm e 279nm maiores com relação aos dados da literatura (Tabela 2).

A precisão do método foi também determinada para extratos periplásmicos com conteúdo entre 0,5 – 3 μ g de hPRL, seja para determinações intra-dia que inter-dia (até um período de 3 meses) (Tabela 3). O valor de 0,5 μ g de hPRL, obtido com um DPR = 25%, foi considerada a sensibilidade de trabalho. Vale lembrar que a maioria deste dados foram obtidos utilizando um extrato periplásmico liofilizado como preparação de referência, cuja estabilidade de longo prazo foi controlada para aproximadamente 6 meses, período em que terminaram as amostras. Isto proporcionou uma resposta inter-dia bastante reprodutível, sem tendência decrescente, de $8,15 \pm 1,17\mu$ g (DPR = 14,3%, n = 22) por ampola. A variação entre preparações, determinada mediante a análise intra-dia de diferentes amostras de 5 μ g de hPRL, foi definida por um DPR de 2,9% (n = 4).

Tabela 2 Determinação de coeficientes de absorvância ($A^{0.1\%}$), em diferentes comprimentos de onda (λ), para a preparação pura de hPRL (NIDDK-SIAFP-B-3), comparada com o Padrão Internacional de rhGH (WHO 88/624).

λ (nm)	hPRL-NIDDK ^a ($A^{0.1\%}$)	rhGH-WHO ^a ($A^{0.1\%}$)
280	0,89	0,90
279	0,89	0,92
276	0,88	0,92
220 (tampão aquoso) ^b	12,92	13,61
220 (29% n-propanol)	13,74	13,72

^aConcentração da amostra determinada por análise de composição de aminoácidos

^b hPRL-NIDDK foi dissolvida em bicarbonato de sódio 0,01 M; rhGH-WHO foi dissolvido em água, levando em conta que o conteúdo da ampola inclui em adição a 2mg de hormônio, 2mg de glicina, 2,5mg de bicarbonato de sódio, 2mg de lactose e 2mg de manitol.

Tabela 3 Determinação de hPRL intra- and inter-dia, por RP-HPLC, em diferentes fluidos periplásmicos.

Choque N ^o	intra-dia ^a (μg)	inter-dia ^a (μg)
1	2.94 \pm 2.9 ^b	3.04 \pm 4.4 ^b
2	2.89 \pm 2.4	2.81 \pm 3.4
3	1.89 \pm 1.7	1.91 \pm 15.1
4	0.72 \pm 6.3	0.66 \pm 8.6
5	0.48 \pm 5.2	0.51 \pm 25.1

^a Todos os dados referem-se a um período de 3 meses e foram obtidos contra o "irp" de hPRL

^b DPR, expresso como porcentagem da média, n = 3.

3.5. Análise de diferentes formas de prolactina dentro do Estudo Colaborativo da O.M.S.

Neste Estudo o nosso laboratório participou oferecendo a utilização da nova técnica, já praticamente padronizada, de RP-HPLC para a análise de prolactina e de suas isoformas. Esta técnica físico-química foi porém comparada, na mesma análise, com a técnica mais estabelecida de HPLC de exclusão molecular (HPSEC).

3.5.1. Análise mediante RP-HPLC das preparações de O.M.S.

Sendo o rec-hGH utilizado em nosso laboratório como preparação de referência seja qualitativa que quantitativa para todas as análises de HPLC, este hormônio sempre foi analisado juntamente com as preparações de prolactina, para confirmar a estabilidade e confiabilidade do nosso método. Na Fig. 4 podemos observar o cromatograma relativo ao Padrão Internacional de rec-hGH (WHO 88/624) em condições otimizadas: $t_R = 30,0$ e área de 7-431 ua.

Em seguida foi analisada a preparação de referência de hPRL (NIDDK, EUA) mais utilizada internacionalmente em testes biológicos, imunológico e físico-químicos, sendo que é distribuída em quantidades de até 1mg (Fig.5). Podemos observar, além de um tempo de retenção (t_R) 30% inferior ao do hGH (indicando uma hidrofobicidade proporcionalmente inferior), também uma área ~50% inferior, considerando que foram aplicados 10 μ g de proteína hormonal, nos dois casos.

Já na Fig.6 podemos avaliar a heterogeneidade do Padrão de Referência Química (CRS) enviado pela O.M.S., disponível em concentração bem maior: 2,2mg/ml e derivado da mesma preparação com a qual foi preparado em ampolas o Padrão Internacional de rec-hPRL (97/714), a principal preparação em exame. Mesmo sendo a análise qualitativa mais complexa, a análise quantitativa (11 μ g aplicados na RP-HPLC) confirmou desta vez uma resposta bem próxima àquela já apresentada pelo hGH (Fig.4) : 7167 ua/10ua/10 μ g, com uma diferença de apenas 3.5%.

RP-HPLC
 Coluna C4 00/4 + Pré 00/4 + Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 Coluna 45° C
 220nm

21

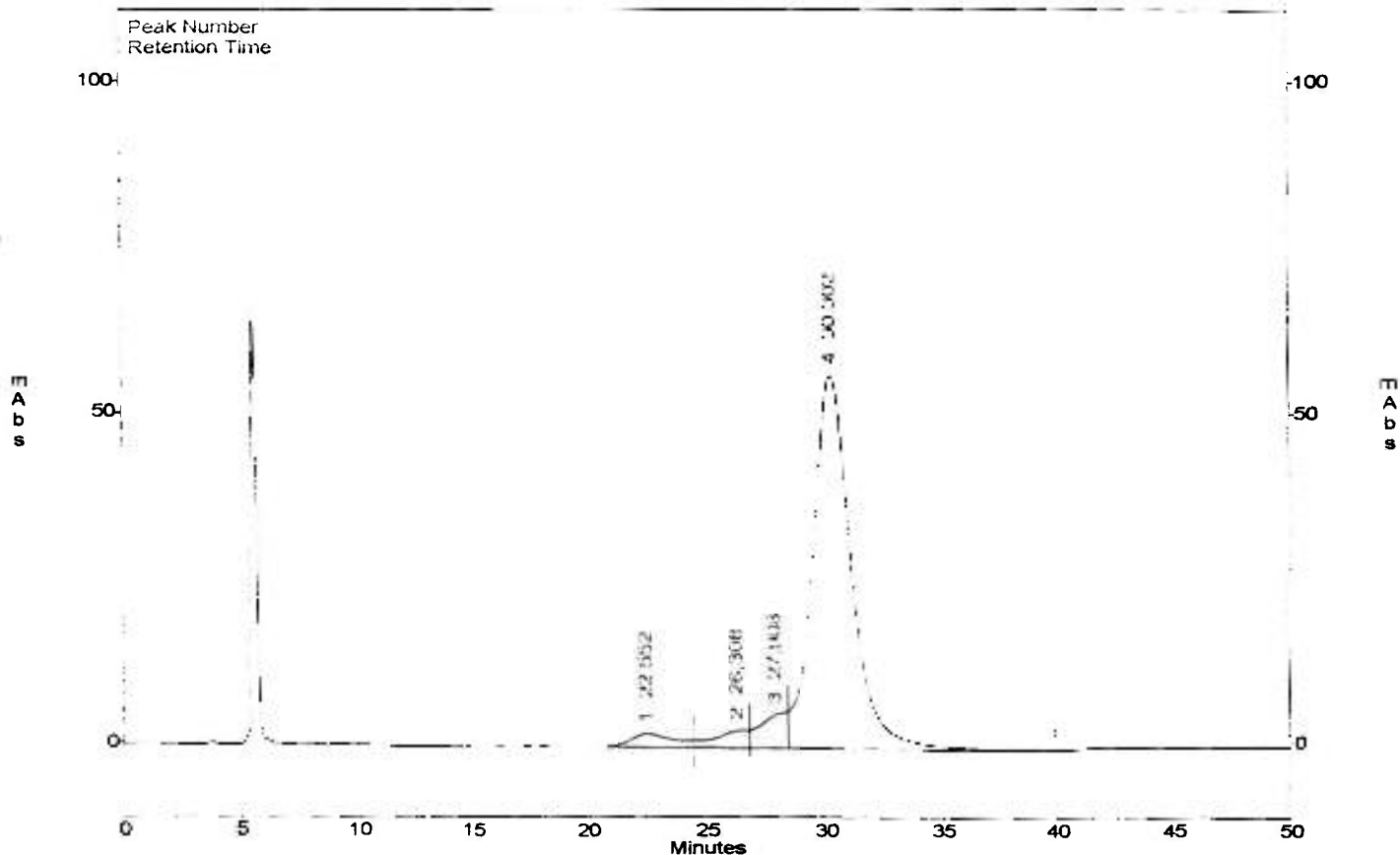
25

Sample ID : rec-hGH-WHO(10ug)

File : c:\class-vp\chrom\2211001

Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

c:\class-vp\chrom\2211001 - Channel A



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	22,55	269420	3,63
2	26,31	255472	3,44
3	27,91	412430	5,55
4	30,30	6493744	87,39

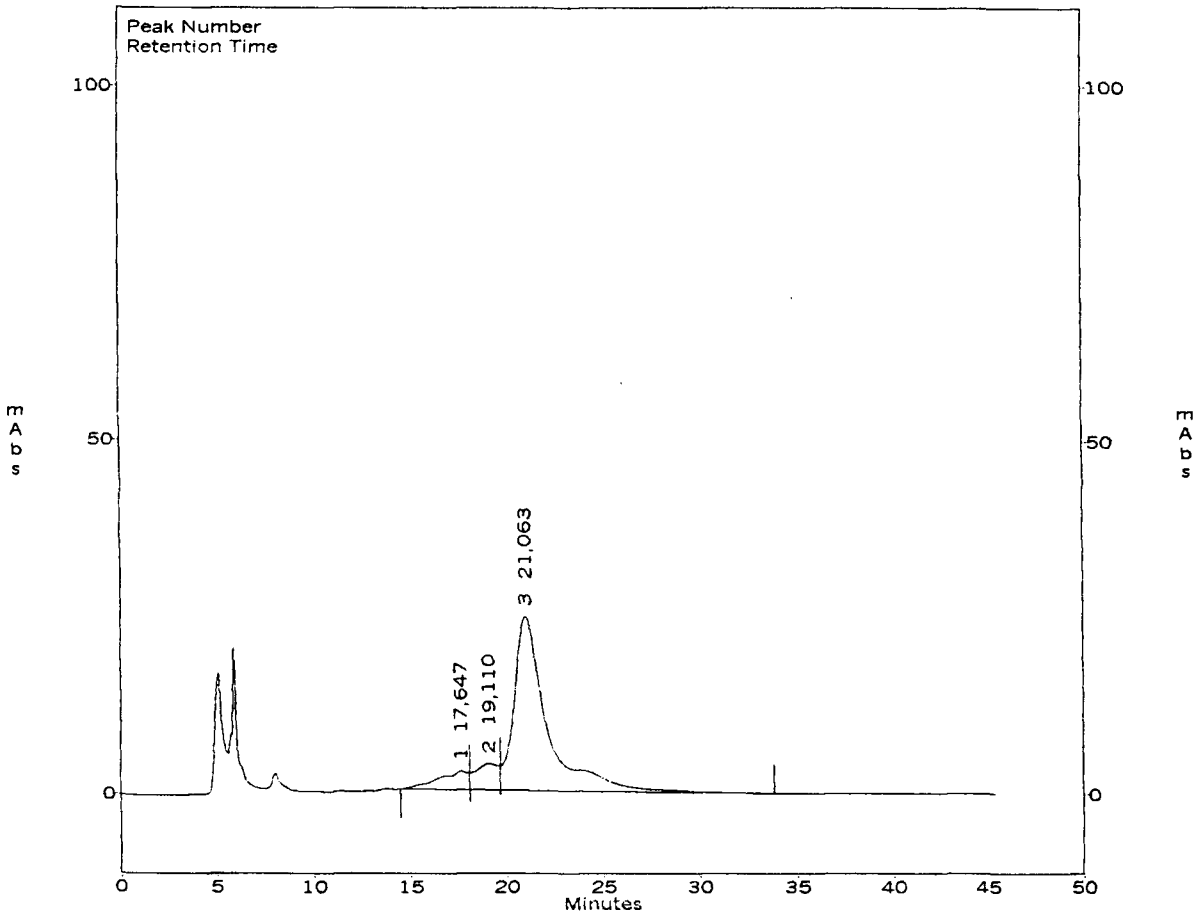
Totals :

7431066 100,00

Fig.4 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 do Padrão Internacional de rec-hGH (WHO 88/624)

RP-HPLC
 Coluna-C4 00/4+Prè 00/4+Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 coluna-45°C
 220nm
 Sample ID : pit-hPRL-NIDDK 10µg
 File : c:\class-vp\chrom\2211006
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

c:\class-vp\chrom\2211006 -- Channel A



Channel A Results

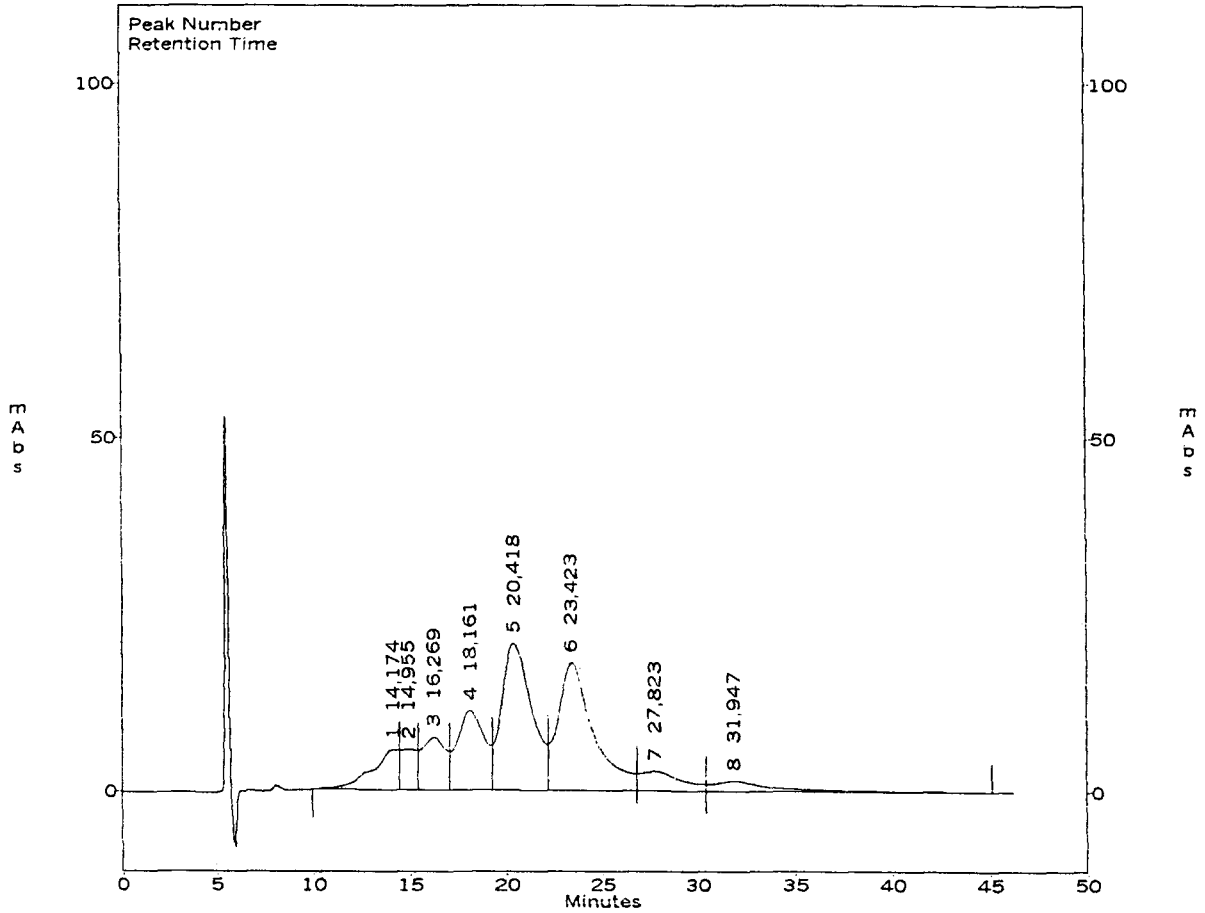
Peak	Time	Area	Area %
1	17,65	287790	8,206
2	19,11	306785	8,747
3	21,06	2912542	83,047

Totals :
 3507117 100,000

Fig.5 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 da preparação de referência de hPRL (NIDDK)

RP-HPLC
 Coluna-C4 00/4+Prè 00/4+Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 coluna-45°C
 220nm
 Sample ID : Rec-hPRL-CRS-Liq. 11µg
 File : c:\class-vp\chrom\2211004
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

c:\class-vp\chrom\2211004 -- Channel A



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	14,17	539621	6,844
2	14,95	318206	4,036
3	16,27	629607	7,985
4	18,16	1097850	13,924
5	20,42	2255997	28,613
6	23,42	2333838	29,600
7	27,82	405691	5,145
8	31,95	303684	3,852

Totals :
 7884494 100,000

Fig.6 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 do padrão de referência química de hPRL (CRS)

A preparação padrão, rec-hPRL (97/714), estocada a -20°C , está apresentada na Fig.7 e mostra qualitativamente os mesmos picos presentes na CRS, porém com uma diferente distribuição quantitativa, que indicaria uma maior alteração ocorrida no caso do CRS que foi enviado em solução e não liofilizado em ampolas fechadas em vácuo. A resposta quantitativa total de 7088 ua ($10\mu\text{g}$) ainda é perfeitamente aceitável.

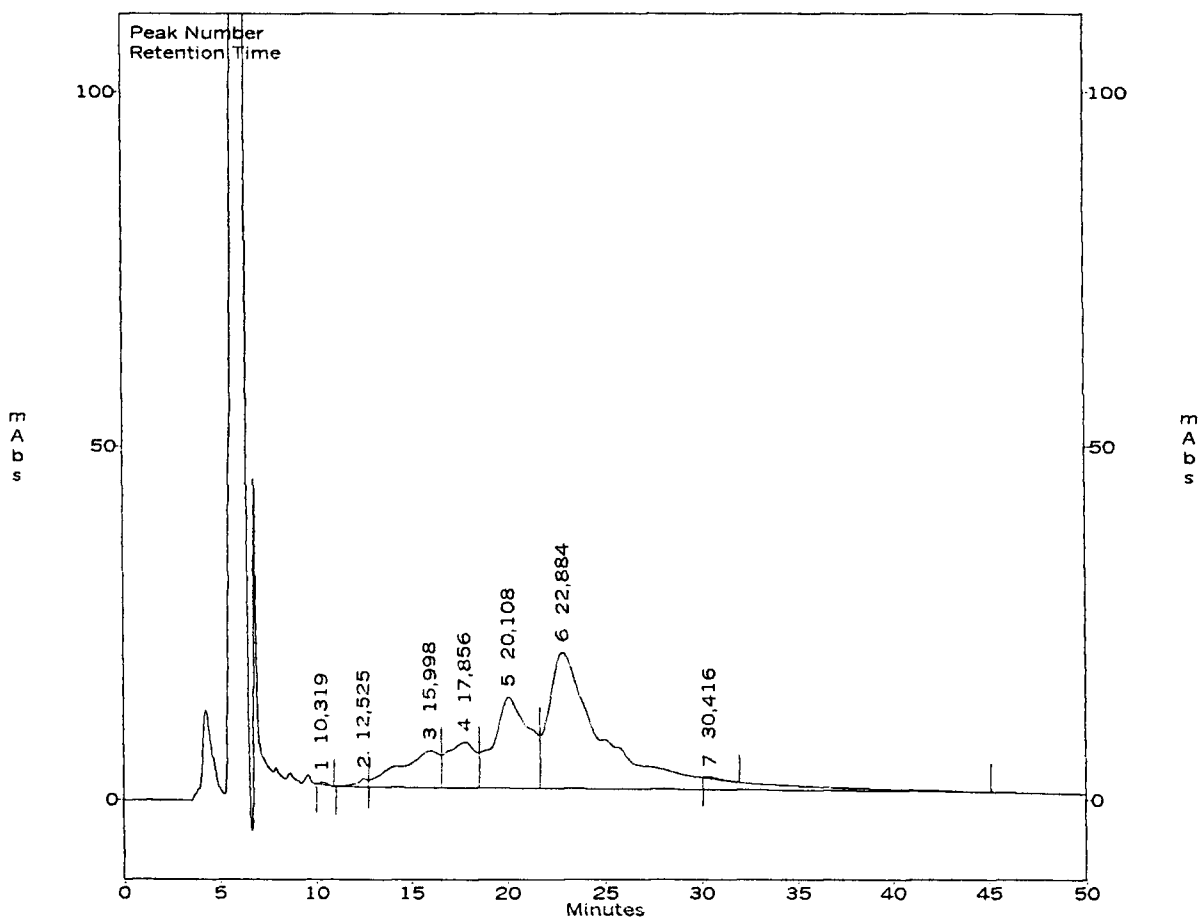
As Figs.8 e 9 se referem a ampolas do padrão proposto (97/714), estocadas durante 25 meses a 37°C e 45°C (degradação acelerada). Podemos observar dois fenômenos com relação à ampola estocada a -20°C : diminuição da área relativa à forma principal ($t_R \cong 22\text{min}$) e diminuição significativa e progressiva da área total: 6.375 au/ $10\mu\text{g}$ (35°C) e 6158 au/ $10\mu\text{g}$ (45°C). Houve também uma limitada alteração (-2.3%) do t_R do pico principal.

No mesmo estudo foram também analisadas as formas de prolactina não glicosilada (NG-hPRL, 98/582) e glicosilada (G-hPRL, 98/580), ambas obtidas a partir de rec-hPRL, 97/714 e liofilizadas em ampolas para serem utilizadas também como Reagentes de Referência Internacional de O.M.S. Na Fig.10 temos um exemplo de NG-hPRL que, apesar de apresentar uma área um pouco superior ao esperado, mostrou claramente a eliminação de vários picos devidos às formas glicosiladas. Estas podem muito bem ser identificadas na Fig.11, pela qual poderíamos sugerir a presença de pelo menos três picos de G-hPRL, respectivamente com t_R de 13,78; 15,42 e 16,91 que estão presentes na preparação heterogênea (Fig.7) e, obviamente, não presentes na preparação não glicosilada (Fig.10). A este ponto do trabalho já é bastante evidente a potencialidade do nosso sistema que não somente detecta a presença da forma glicosilada em produto heterogêneo mas também discrimina entre diferentes formas de glicosilação.

RP-HPLC
 Coluna-C4 00/4+Prè 00/4+Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 coluna-45°C
 220nm
 Sample ID : Rec-hPRL(97/714) -20°C
 File : c:\class-vp\chrom\26100003
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

29

c:\class-vp\chrom\26100003 -- Channel A



Channel A Results

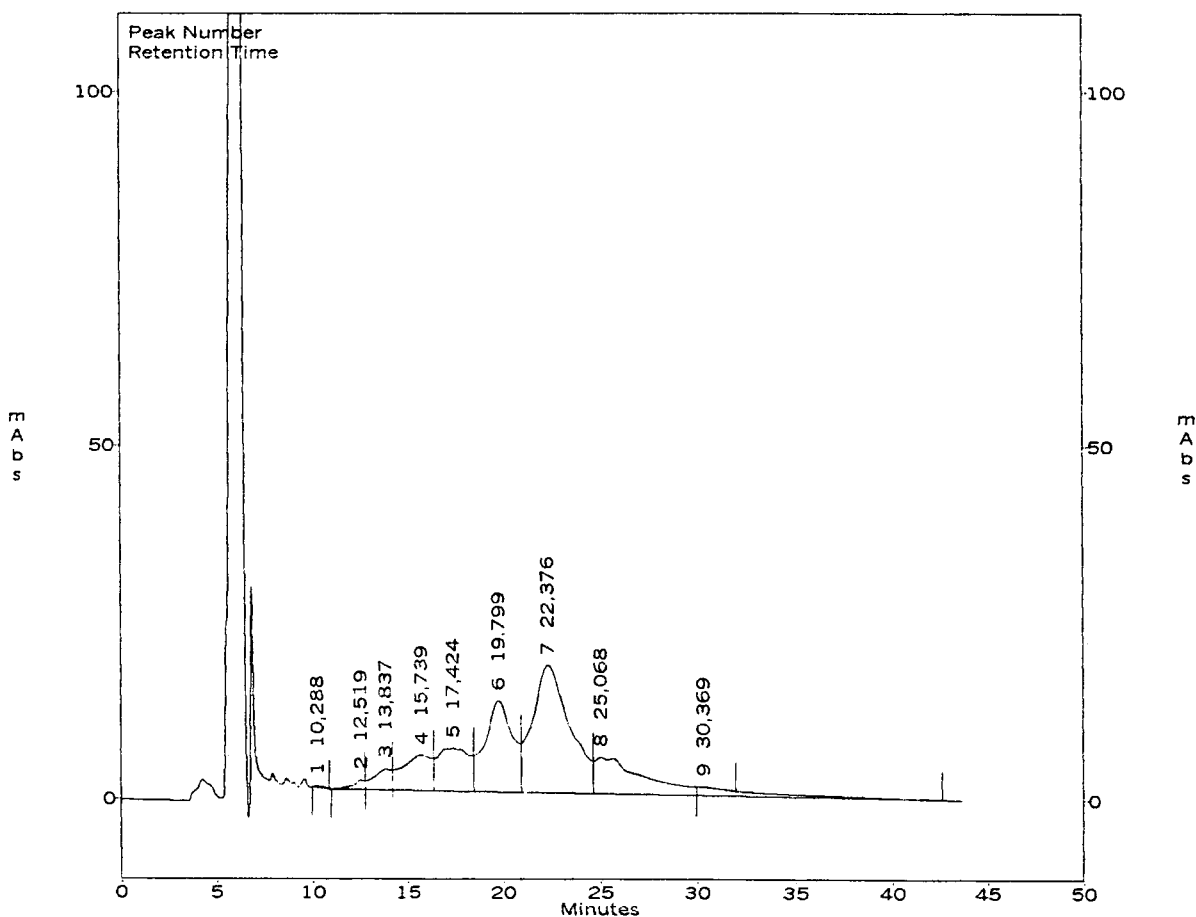
Peak	Time	Area	Area %
1	10,32	9082	0,128
2	12,52	45856	0,647
3	16,00	748315	10,557
4	17,86	670497	9,459
5	20,11	1619795	22,852
6	22,88	3987310	56,253
7	30,42	7297	0,103

Totals :
 7088152 100,000

Fig.7 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 da preparação padrão de rec-hPRL (97/714)

RP-HPLC
 Coluna-C4 00/4+Prè 00/4+Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 coluna-45°C
 220nm
 Sample ID : Rec-hPRL(97/714) +37°C
 File : c:\class-vp\chrom\26100006
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

c:\class-vp\chrom\26100006 -- Channel A



Channel A Results

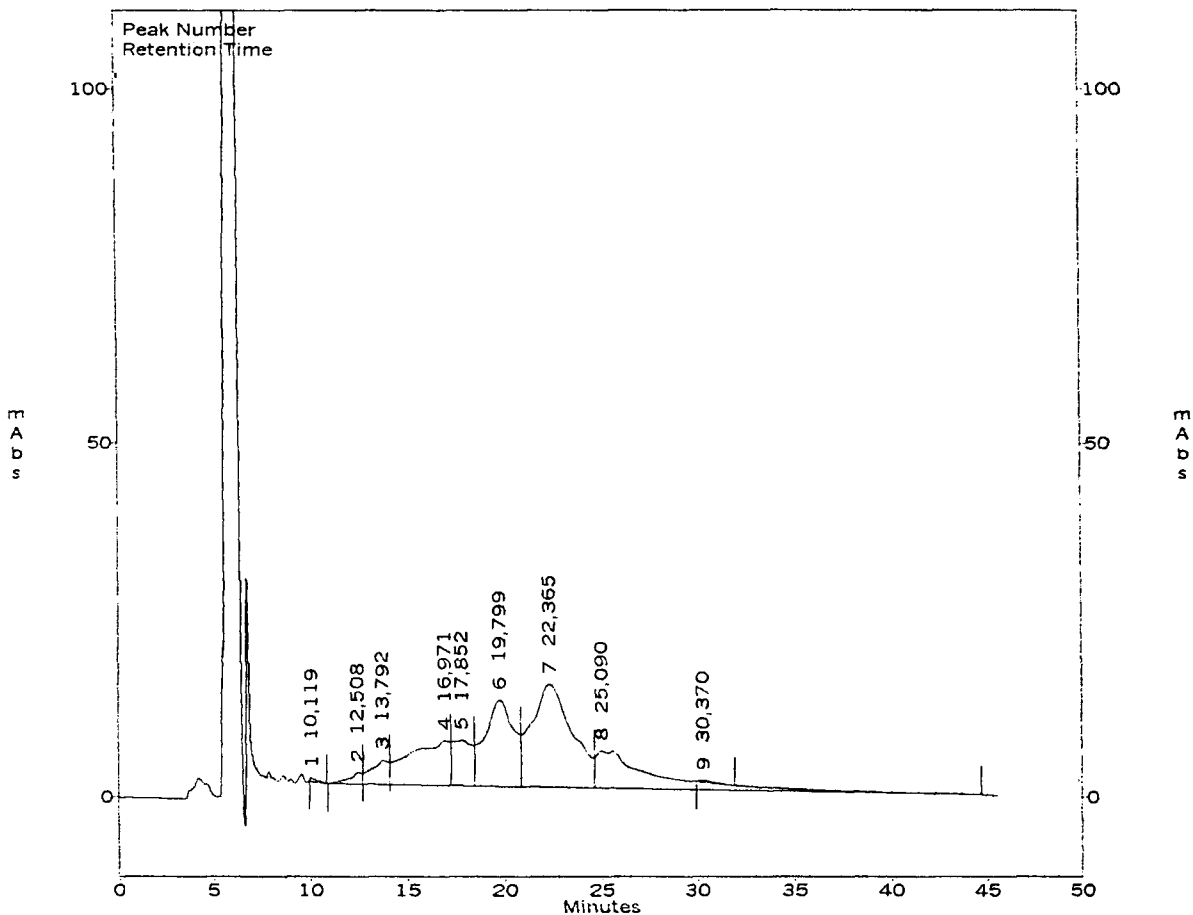
Peak	Time	Area	Area %
1	10,29	9286	0,146
2	12,52	55845	0,876
3	13,84	194175	3,046
4	15,74	541730	8,497
5	17,42	697968	10,948
6	19,80	1305534	20,478
7	22,38	2408169	37,773
8	25,07	1155987	18,132
9	30,37	6596	0,103

Totals :
 6375290 100,000

Fig.8 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 da preparação padrão de rec-hPRL (97/714) após 25 meses de estocagem a 37°C

RP-HPLC
 Coluna-C4 00/4+Prè 00/4+Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 coluna-45°C
 220nm
 Sample ID : Rec-hPRL(97/714) +45°C
 File : c:\class-vp\chrom\26100007
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

c:\class-vp\chrom\26100007 -- Channel A



Channel A Results

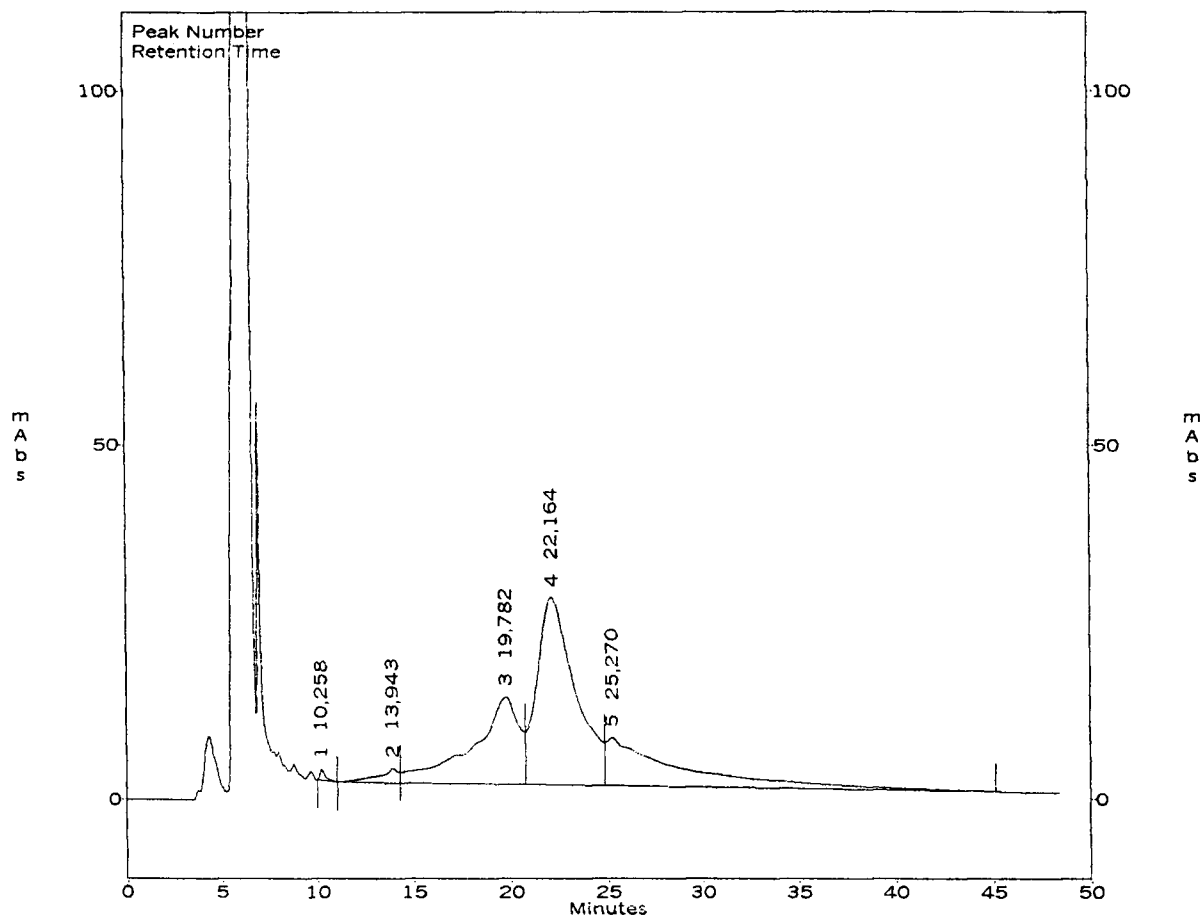
Peak	Time	Area	Area %
1	10,12	10338	0,168
2	12,51	75270	1,222
3	13,79	212297	3,447
4	16,97	910572	14,785
5	17,85	439567	7,137
6	19,80	1264292	20,529
7	22,36	2115715	34,354
8	25,09	1122823	18,232
9	30,37	7755	0,126

Totals :
 6158629 100,000

Fig.9 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 da preparação padrão de rec-hPRL (97/714) após 25 meses de estocagem a 45°C

RP-HPLC
 COLuna-C4 00/4+Prè 00/4+Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 coluna-45°C
 220nm
 Sample ID : NG-Rec-hPRL(98/582) 8µg
 File : c:\class-vp\chrom\26100004
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

c:\class-vp\chrom\26100004 -- Channel A



Channel A Results

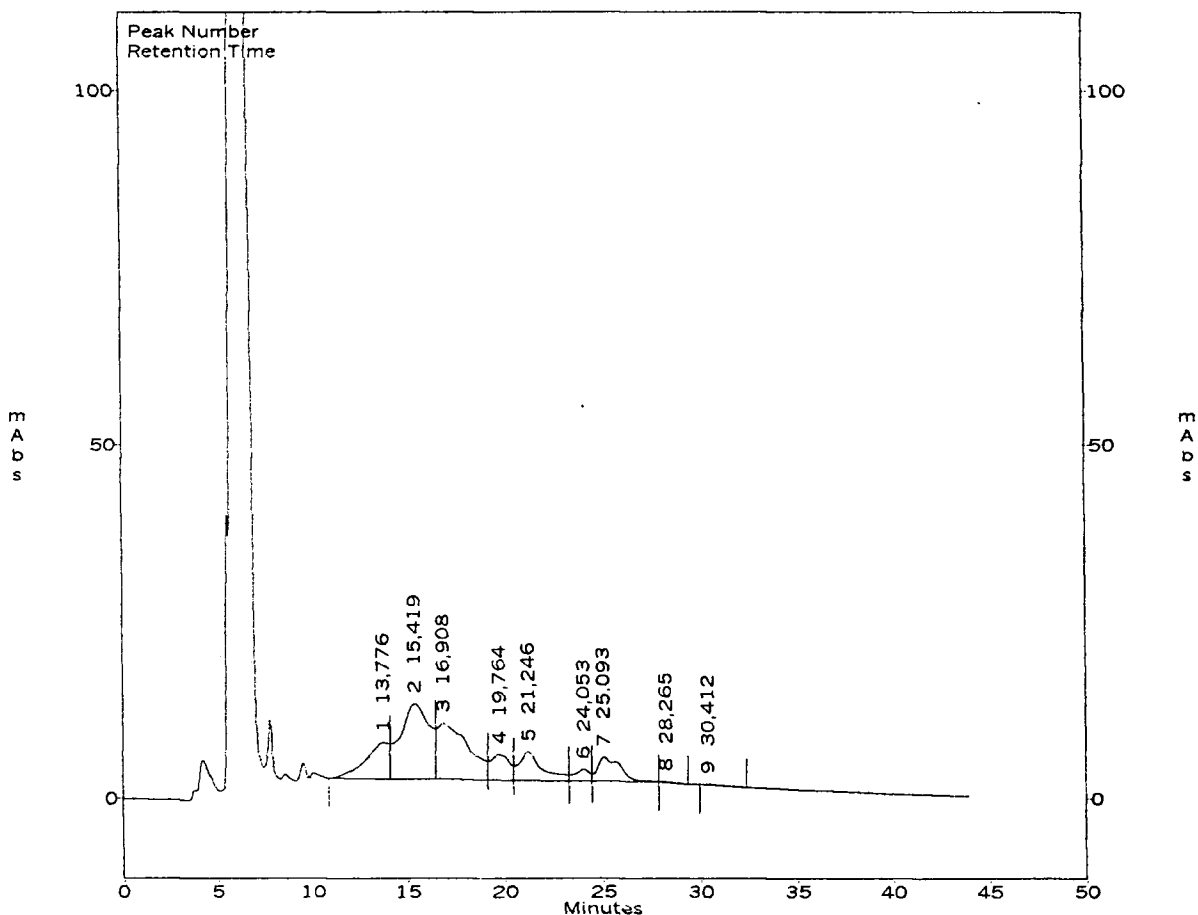
Peak	Time	Area	Area %
1	10,26	29027	0,377
2	13,94	149545	1,943
3	19,78	2051192	26,653
4	22,16	3648927	47,413
5	25,27	1817276	23,613

Totals :
 7695967 100,000

Fig.10 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 da preparação de hPRL não glicosilada (NG-hPRL 98/582)

RP-HPLC
 Coluna-C4 00/4+Prè 00/4+Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 coluna-45°C
 220nm
 Sample ID : G-Rec-hPRL(98/580) 4µg
 File : c:\class-vp\chrom\26100005
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

c:\class-vp\chrom\26100005 -- Channel A



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	13,78	445505	13,180
2	15,42	1120979	33,163
3	16,91	889833	26,325
4	19,76	232726	6,885
5	21,25	324839	9,610
6	24,05	86140	2,548
7	25,09	267092	7,902
8	28,26	5215	0,154
9	30,41	7861	0,233

Totals : 3380190 100,000

Fig.11 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 da preparação de hPRL glicosilada (G-hPRL 98/580)

3.5.2. Análise mediante RP-HPLC da prolactina sintetizada e purificada em nosso laboratório

Aproveitando deste esquema de estudo e padronização, resolvemos analisar também uma preparação de prolactina produzida no IPEN, a partir de extrato periplásmico bacteriano e que, portanto, não possui forma glicosiladas. Na Fig.12 podemos observar o cromatograma de um extrato periplásmico com (choque osmótico) onde são evidentes, à esquerda do pico 1, todas as proteínas contaminantes da célula hospedeira. É interessante ressaltar a pureza da forma fundamental de hPRL bacteriana, pois não há evidência das formas alteradas ou das isoformas presentes em todas as preparações analisadas até agora. Isto foi confirmado pela análise realizada na preparação de prolactina purificada e liofilizada (Fig.13) em que somente há uma pequena porcentagem de forma alterada (7,6%) juntamente com 92,4% de forma fundamental, o que caracteriza esta preparação como a mais pura já analisada por nós. Ressaltamos também a estabilidade dos t_R que, no mesmo dia, apresentaram valores de 23,98 min, 23,55 min e 23,66 min respectivamente para o CRS (OMS), o extrato periplásmico e a prolactina purificada, com média $X = 23,73 \text{ min} \pm 0,94\% \text{ DPR}$, o que proporciona um teste de identidade de alta sensibilidade. De acordo com estes dados é possível verificar que a isoforma de hPRL (NIDDK), $t_R = 21,06$, aparentemente não é a forma fundamental mas corresponde ao pico 5 do CRS, ou seja a um isômero de hidrofobicidade menor.

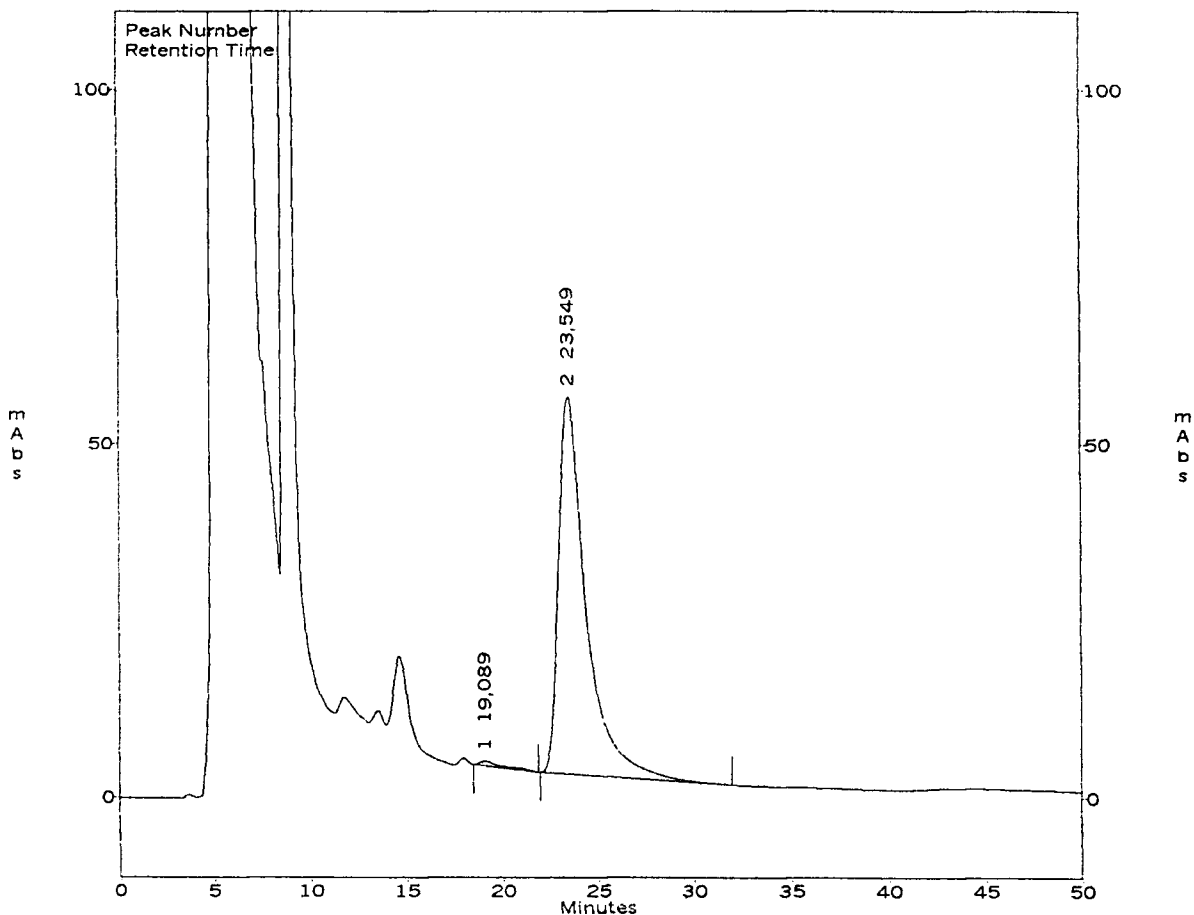
3.5.3. Análise mediante HPSEC das preparações da O.M.S.

As mesmas amostras já analisadas por RP-HPLC foram também analisadas mediante a técnica de exclusão molecular (HPSEC) que separa as várias formas com base em seu peso ou tamanho molecular. Considerando a maior velocidade de eluição (1,0 mL/min contra os 0,5 mL/min utilizados na RP-HPLC) a área dos picos resultou ser a metade, a paridade de quantidade de

RP-HPLC
 Coluna-C4 00/4+Prè 00/4+Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 coluna-45°C
 220nm
 Sample ID : Rec-hPRL-IPEN (osmotic shock)
 File : c:\class-vp\chrom\2311002
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

35

c:\class-vp\chrom\2311002 -- Channel A



Channel A Results

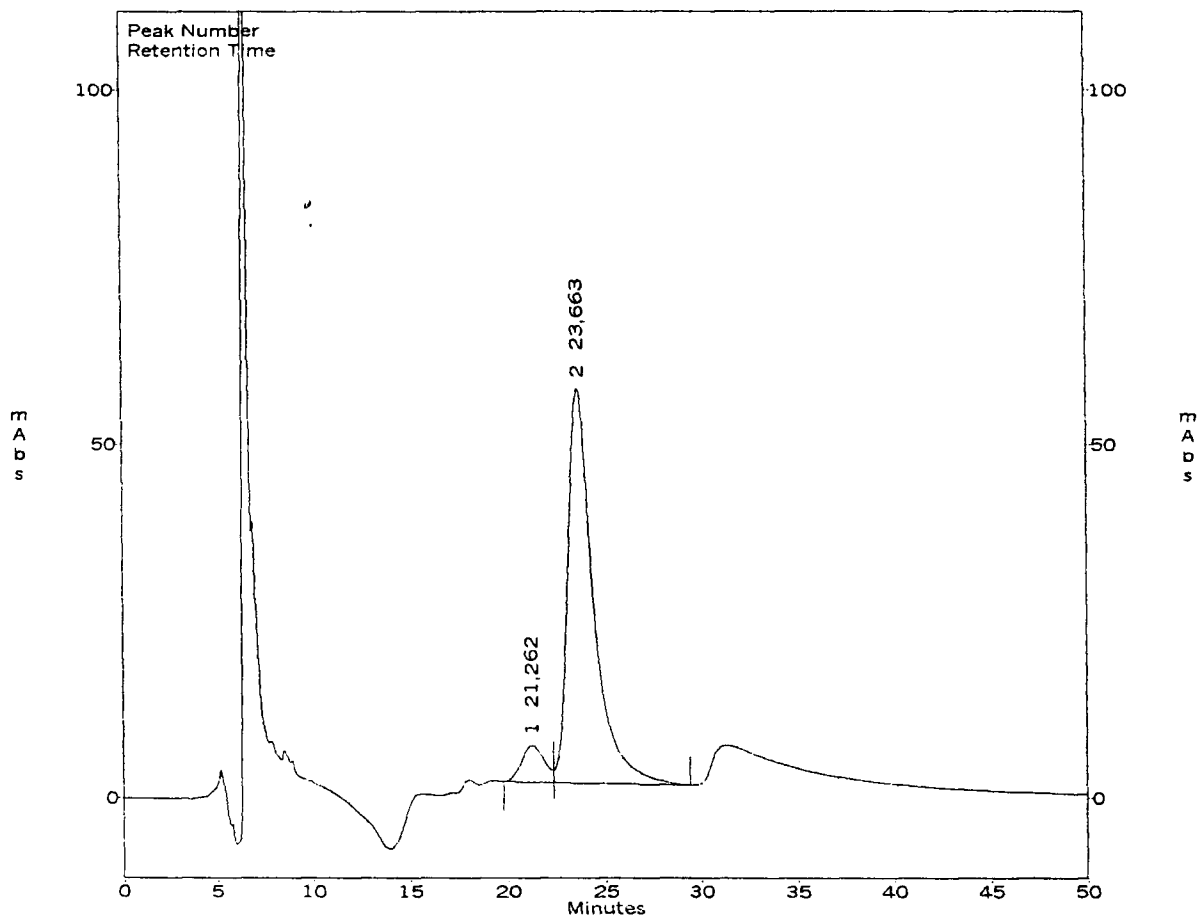
Peak	Time	Area	Area %
1	19,09	55381	1,028
2	23,55	5333224	98,972

Totals :
 5388605 100,000

Fig.12 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 de rec-hPRL-IPEN em extrato periplásmico bacteriano

RP-HPLC
 Coluna-C4 00/4+Prè 00/4+Si60 00/1
 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 + 28,6% n-propanol
 coluna-45°C
 220nm
 Sample ID : NG-Rec-hPRL-IPEN 10µg
 File : c:\class-vp\chrom\2311003
 Method : c:\class-vp\methods\rphplc.met

c:\class-vp\chrom\2311003 -- Channel A



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	21,26	419211	7,589
2	23,66	5104660	92,411

Totals :
 5523871 100,000

Fig.13 RP-HPLC isocrática em coluna C4 Vydac 214 TP 54 da preparação de rec-hPRL-IPEN purificada

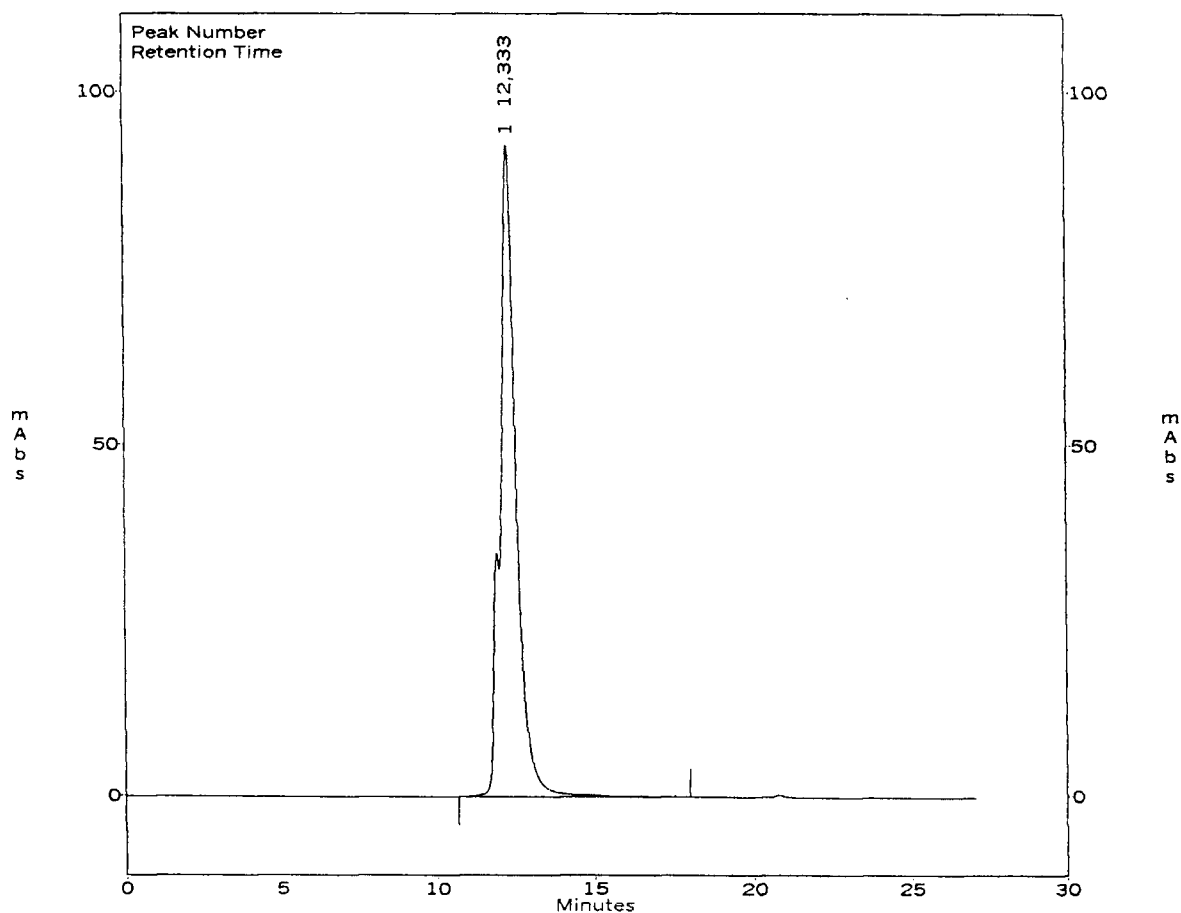
proteína aplicada. Neste estudo utilizou-se também, pela primeira vez, soro albumina bovina cristalina (BSA) que poderá aparentemente muito bem substituir hGH como preparação de controle das condições cromatográficas, lembrando porém que, devido ao seu peso molecular (~69.000 Da) bem maior, sairá bem antes (ou seja terá um t_R inferior) que o hGH. (Fig. 14). Na Fig. 15 podemos de fato observar o cromatograma do hGH, com $t_R = 14,84$ e uma área de 3505 u.a./10 μ g, bem próxima daquela obtida com 10 μ g de BSA.

A hPRL pituitária do NIDDK novamente confirmou uma área muito inferior (64-69% relativamente ao hGH e BSA) pelos mesmos 10 μ g aplicados e um t_R da mesma ordem daquele do hGH (+1,01%), de acordo com a proximidade do tamanho molecular das duas moléculas (Fig. 16).

O CRS, seja líquido que liofilizado (Fig. 17 e 18), confirmou a exatidão da análise quantitativa (3624 u.a. /10 μ g \pm 2,3%), valor bem próximo aos já obtidos com hGH e BSA e uma pequena diminuição de tamanho molecular ($t_R = -2\%$) com relação à hPRL pituitária. Ao mesmo tempo confirmou também a presença de 25-30% de formas alteradas. Estes parâmetros todos foram também confirmados pela análise do padrão proposto (rec-hPRL 97/714), que apresentou um $t_R = 15,43$ min. e uma resposta de 3800 u.a. /10 μ g (Fig. 19) e da forma não glicosilada (NG-hPRL, 98/582) com um $t_R = 15,46$ min. e uma resposta de 3826 u.a. /10 μ g (Fig. 20). Diferentemente, a prolactina glicosilada (G-hPRL, 98/580) apresentou logicamente um tamanho molecular maior (com $t_R = -7,4\%$) com uma resposta de 2656 u.a. /10 μ g, o que indicaria a presença de um erro nesta determinação quantitativa em decorrência provavelmente à presença de um "bias" devido à preparação ou à metodologia (Fig. 21). A NG-rec-PRL-IPEN apresentou novamente um alto nível de pureza e uma resposta quantitativa perfeitamente aceitável (Fig. 22).

Coluna: TosoHaas TSK2000 00/1+Pré 00/1
 Tampão: Bicarbonato de amônio 0,025 M pH 7,0
 220nm
 Sample ID : BSA (10µg)
 File : c:\class-vp\chrom\0702012
 Method : c:\class-vp\methods\se_hplc.met

c:\class-vp\chrom\0702012 -- Channel A



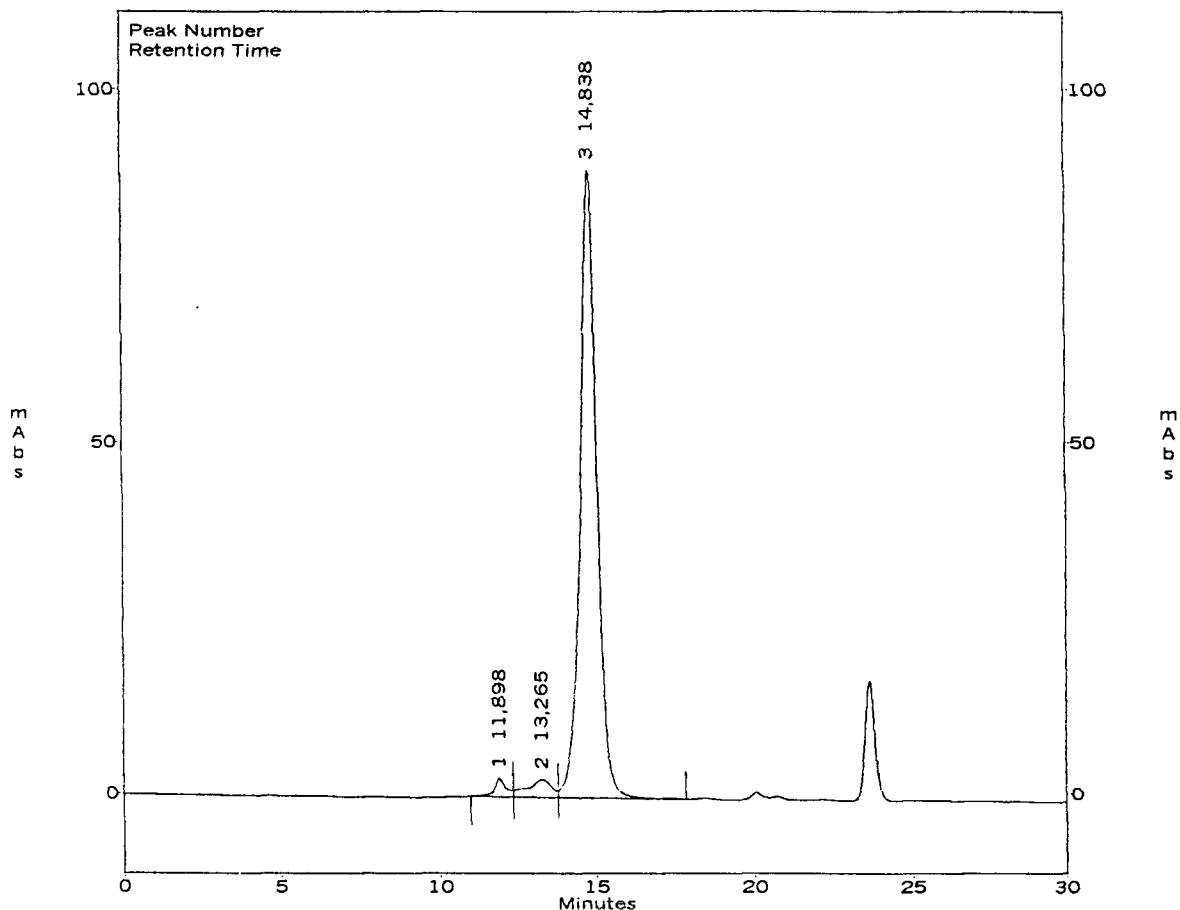
Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	12,33	3281081	100,000
Totals :		3281081	100,000

Fig.14 HPSEC isocrática em coluna Tosohas G 2000 SW da preparação de BSA cristalina

Coluna: TosoHaas TSK2000 00/1+Pré 00/1
 Tampão: Bicarbonato de amônio 0,025 M pH 7,0
 220nm
 Sample ID : Rec-hGH (WHO) 10µg
 File : c:\class-vp\chrom\0702011
 Method : c:\class-vp\methods\se_hplc.met

c:\class-vp\chrom\0702011 -- Channel A



Channel A Results

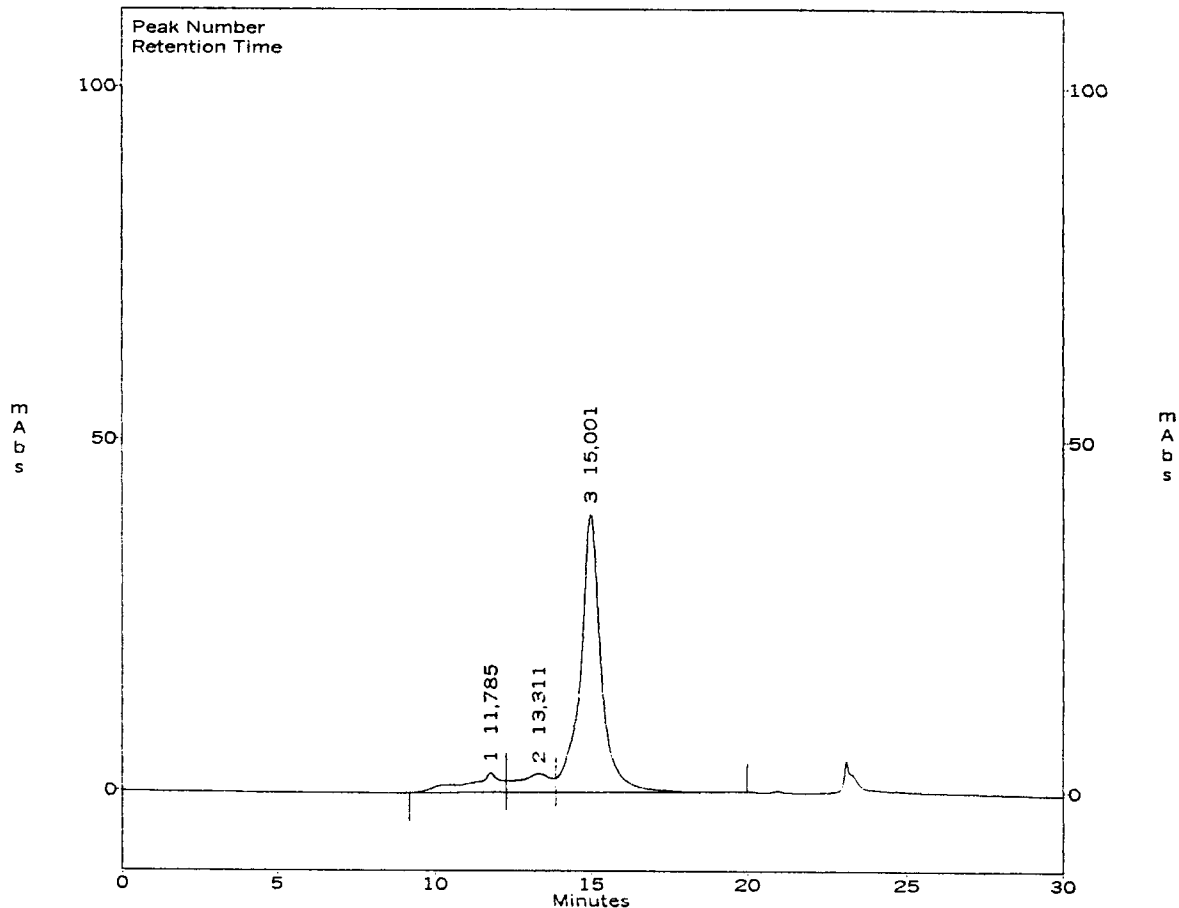
Peak	Time	Area	Area %
1	11,90	71275	2,034
2	13,26	135026	3,853
3	14,84	3298187	94,113
Totals :		3504488	100,000

Fig.15 HPSEC isocrática em coluna Tosohas G 2000 SW do Padrão Internacional de rec-hGH (WHO 88/624)

Coluna: TosoHaas TSK2000 00/1+Pré 00/1
 Tampão: Bicarbonato de amônio 0,025 M pH 7,0
 220nm
 Sample ID : pit-hPRL-NIDDK 10µg
 File : c:\class-vp\chrom\2411002
 Method : c:\class-vp\methods\se_hplc.met

40

c:\class-vp\chrom\2411002 -- Channel A



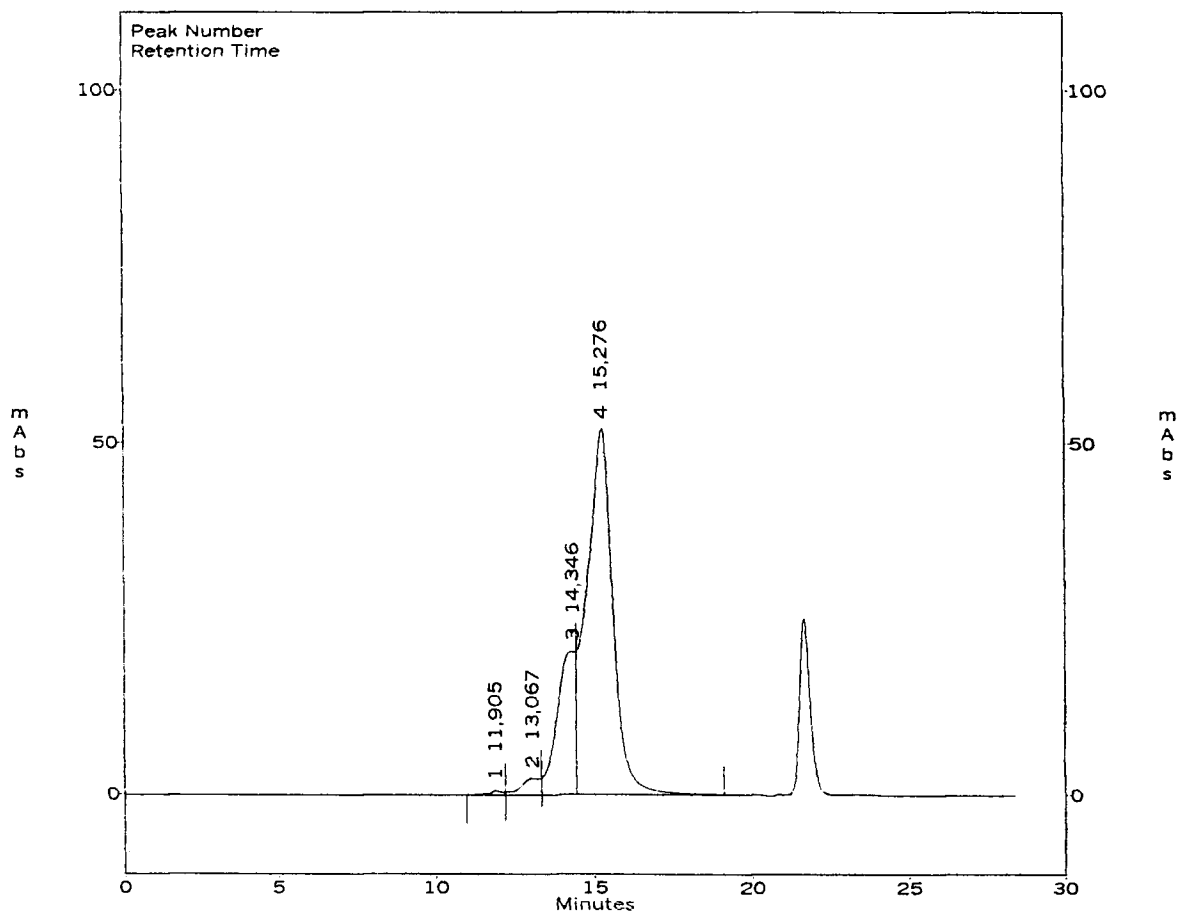
Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	11,78	214480	9,499
2	13,31	198753	8,802
3	15,00	1844687	81,699
Totals :		2257920	100,000

Fig.16 HPSEC isocrática em coluna Tosohas G 2000 SW da preparação de hPRL pituitária do NIDDK

Coluna: TosoHaas TSK2000 00/1+Pré 00/1
 Tampão: Bicarbonato de amônio 0,025 M pH 7,0
 220nm
 Sample ID : Rec-hPRL-CRS-Liq. 11µg
 File : c:\class-vp\chrom\0702013
 Method : c:\class-vp\methods\se_hplc.met

c:\class-vp\chrom\0702013 -- Channel A



Channel A Results

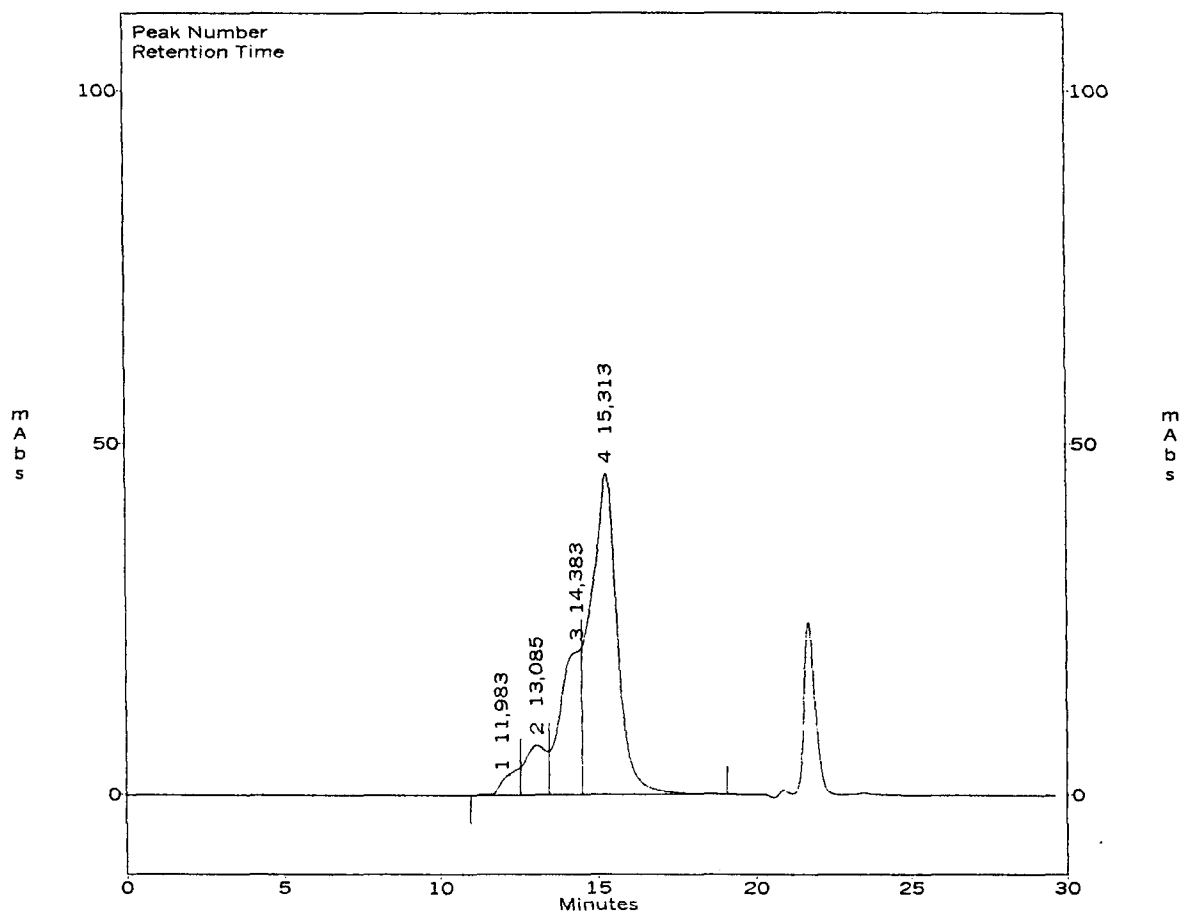
Peak	Time	Area	Area %
1	11,91	16076	0,410
2	13,07	96391	2,457
3	14,35	843296	21,499
4	15,28	2966701	75,634

Totals :
 3922464 100,000

Fig.17 HPSEC isocrática em coluna Tosohas G 2000 SW do Padrão de Referência Química (CRS) líquido

Coluna: TosoHaas TSK2000 00/1+Pré 00/1
 Tampão: Bicarbonato de amônio 0,025 M pH 7,0
 220nm
 Sample ID : Rec-hPRL-CRS-Lyo 11µg
 File : c:\class-vp\chrom\0702014
 Method : c:\class-vp\methods\se_hplc.met

c:\class-vp\chrom\0702014 -- Channel A



Channel A Results

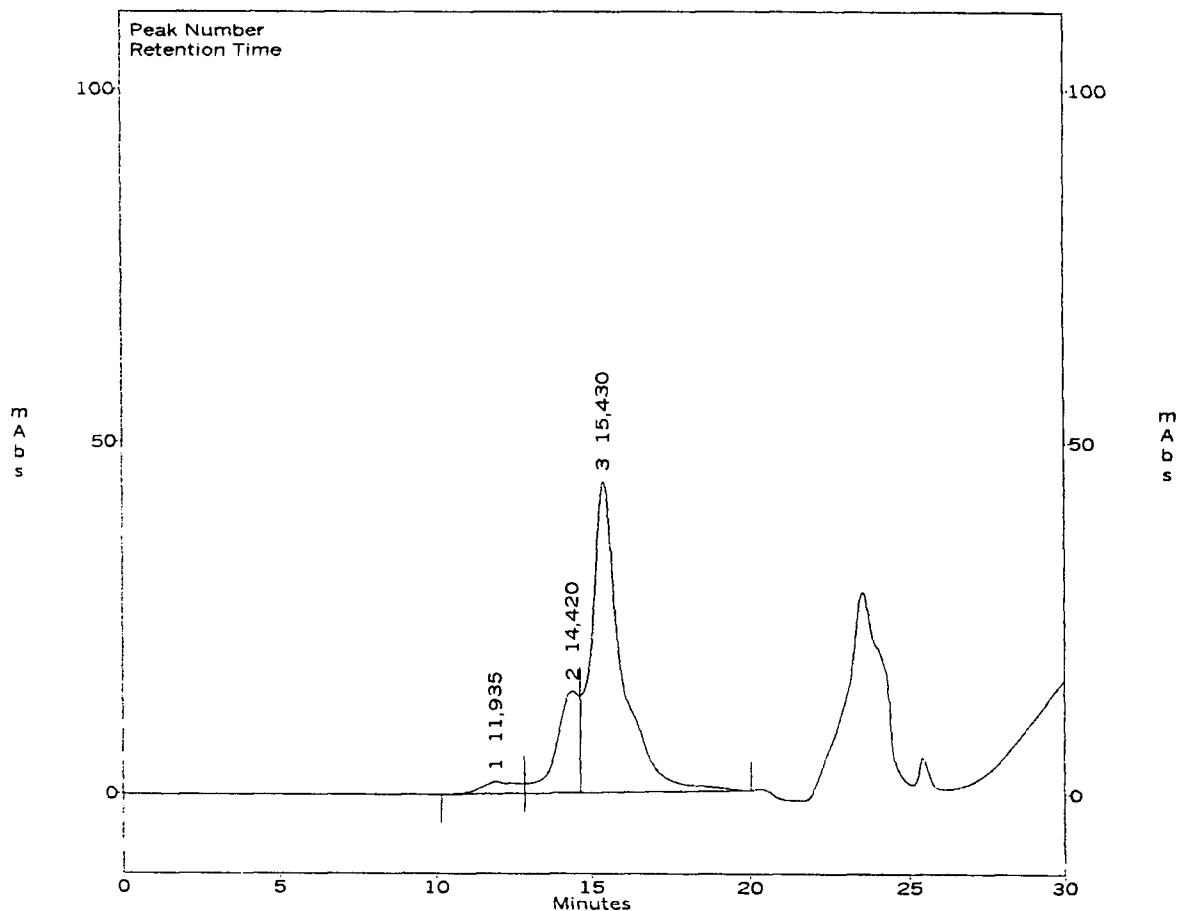
Peak	Time	Area	Area %
1	11,98	129965	3,207
2	13,09	331458	8,180
3	14,38	950667	23,461
4	15,31	2640022	65,152

Totals :
 4052112 100,000

Fig.18 HPSEC isocrática em coluna Tosohas G 2000 SW do Padrão de Referência Química (CRS) liofilizado

Coluna: TosoHaas TSK2000 00/1+Pré 00/1
 Tampão: Bicarbonato de amônio 0,025 M pH 7,0
 220nm
 Sample ID : Rec-hPRL(97/714) 10µg
 File : c:\class-vp\chrom\0702016
 Method : c:\class-vp\methods\se_hplc.met

c:\class-vp\chrom\0702016 -- Channel A



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	11,94	137716	3,624
2	14,42	742784	19,547
3	15,43	2919494	76,829

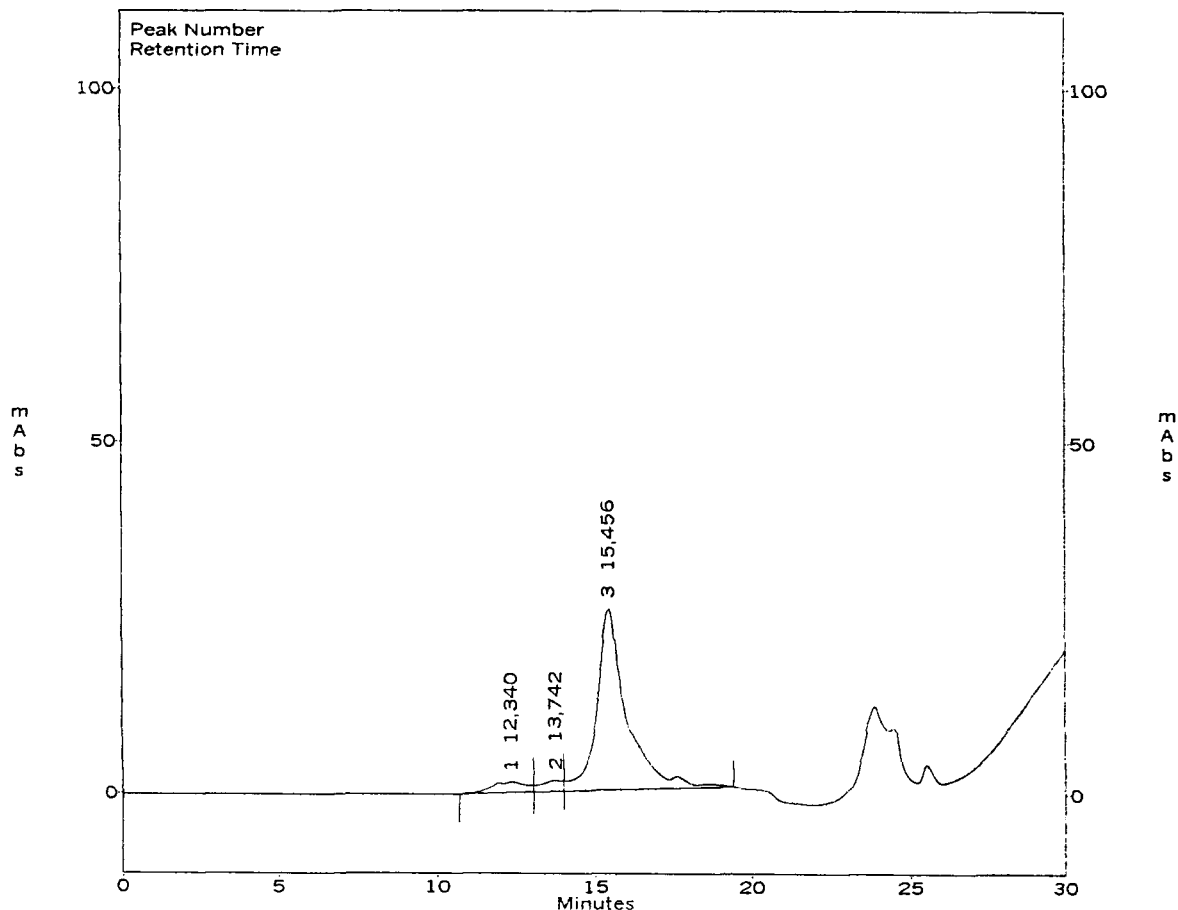
Totals :
 3799994 100,000

Fig.19 HPSEC isocrática em coluna Tosohas G 2000SW da rec-hPRL 97/714

44

Coluna: TosoHaas TSK2000 00/1+Pré 00/1
 Tampão: Bicarbonato de amônio 0,025 M pH 7,0
 220nm
 Sample ID : NG-Rec-hPRL(98/582) 5µg
 File : c:\class-vp\chrom\0702017
 Method : c:\class-vp\methods\se_hplc.met

c:\class-vp\chrom\0702017 -- Channel A



Channel A Results

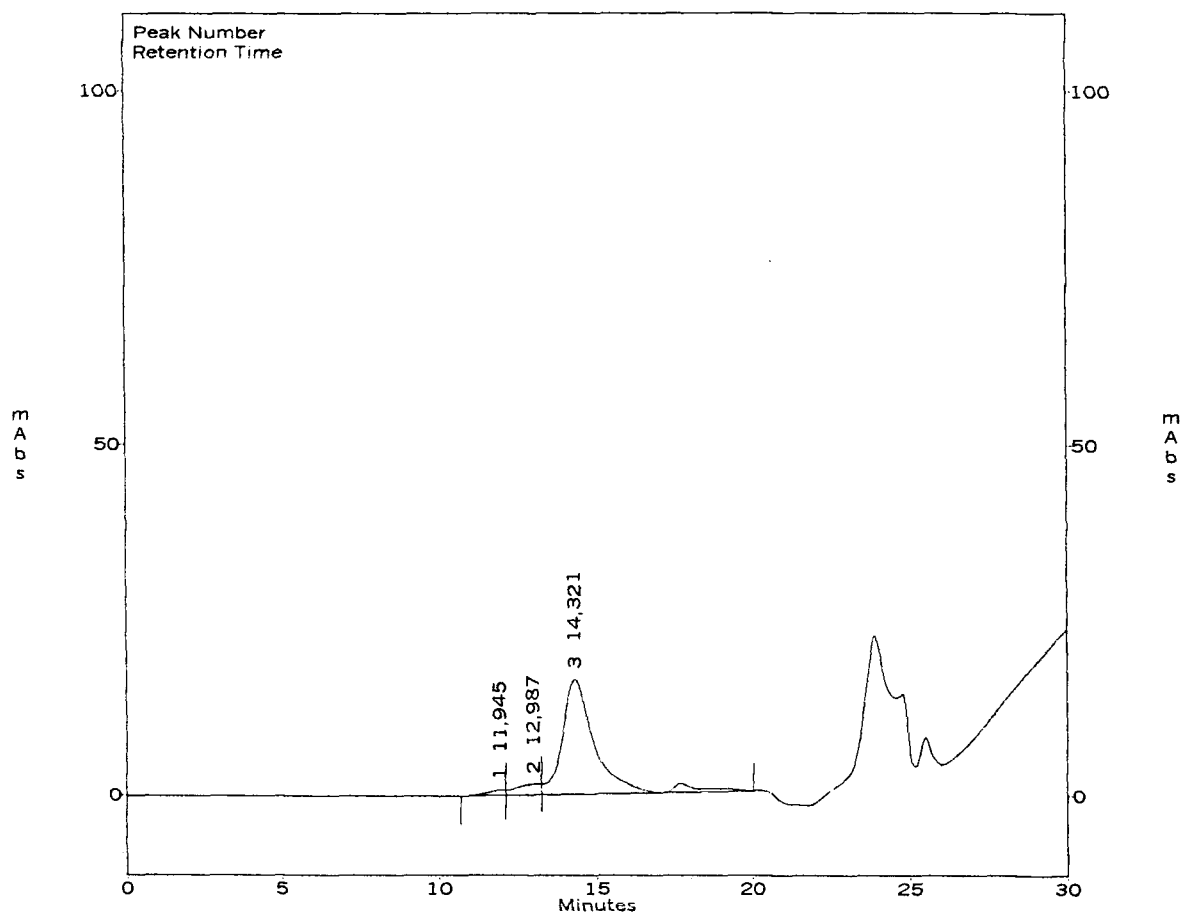
Peak	Time	Area	Area %
1	12,34	112912	5,902
2	13,74	75727	3,958
3	15,46	1724471	90,140

Totals :
 1913110 100,000

Fig.20 HPSEC isocrática em coluna Tosohas G 2000SW da NG-rec-hPRL 98/582

Coluna: TosoHaas TSK2000 00/1+Pré 00/1
 Tampão: Bicarbonato de amônio 0,025 M pH 7,0
 220nm
 Sample ID : G-Rec-hPRL(98/580) 5µg
 File : c:\class-vp\chrom\0702018
 Method : c:\class-vp\methods\se_hplc.met

c:\class-vp\chrom\0702018 -- Channel A



Channel A Results

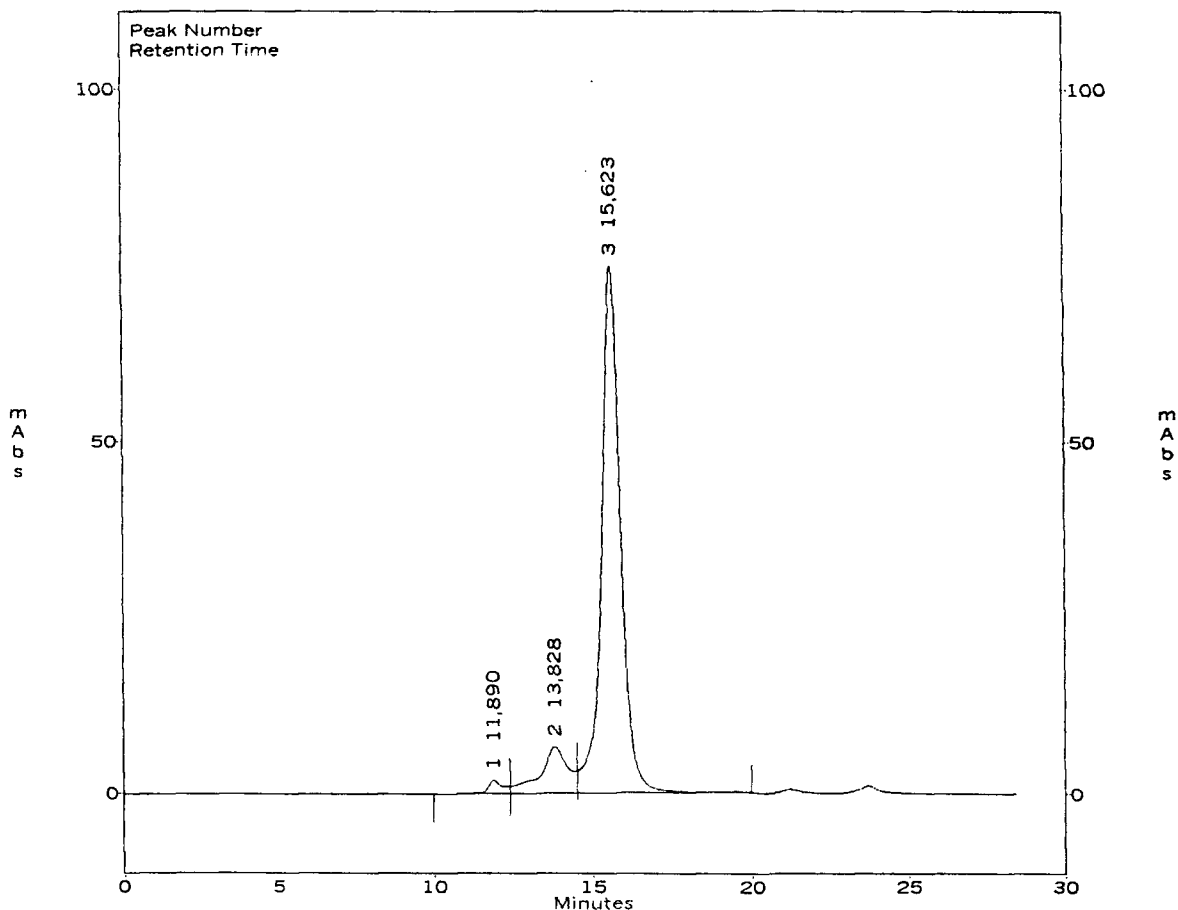
Peak	Time	Area	Area %
1	11,95	30353	2,285
2	12,99	83727	6,304
3	14,32	1214002	91,410

Totals :
 1328082 100,000

Fig.21 HPSEC isocrática em coluna Tosohas G 2000SW da G-rec-hPRL 98/580

Coluna: TosoHaas TSK2000 00/1+Pré 00/1
 Tampão: Bicarbonato de amônio 0,025 M pH 7,0
 220nm
 Sample ID : NG-Rec-hPRL-IPEN 10µg
 File : c:\class-vp\chrom\2411004
 Method : c:\class-vp\methods\se_hplc.met

c:\class-vp\chrom\2411004 -- Channel A



Channel A Results

Peak	Time	Area	Area %
1	11,89	65263	1,813
2	13,83	412285	11,456
3	15,62	3121330	86,731
Totals :		3598878	100,000

Fig.22 HPSEC isocrática em coluna Tosohas G 2000SW da NG-rec-hPRL-IPEN

3.5.4. Análise de uma preparação de hPRL-IPEN de origem bacteriana, mediante HPSEC

A mesma preparação sintetizada, purificada e liofilizada em nosso laboratório e já analisada mediante RP-HPLC, passou também por HPSEC. Podemos observar novamente seu alto nível de pureza (86,7%), maior daquela apresentada pelo padrão proposto (97/714) e uma perfeita identidade de t_R (+1,2%) com relação ao 97/714.

3.5.5. Conclusões do estudo da O.M.S.

Muitas observações podem ser derivadas do estudo realizado mediante RP-HPLC e HPSEC especialmente em consideração da unicidade das amostras analisadas. Na Tabela 4 colocamos exclusivamente os dados de maior interesse da O.M.S. quanto à calibração dos tres Reagentes de Referência (97/714, 98/580, 98/582) realizada por nós mediante duas técnicas físico-químicas, contra tres preparações com conteúdo proteico conhecido: CRS, BSA e hGH. Utilizando todos os dados podemos chegar aos seguintes valores:

rec- hPRL 97/714	X = 27,54 $\mu\text{g}/\text{ampola}$ (DPR = 6,4%, n = 9)
rec-G hPRL 98/580	X = 6,43 $\mu\text{g}/\text{ampola}$ (DPR = 5,2%, n = 6)
rec- NGhPRL 98/582	X = 12,10 $\mu\text{g}/\text{ampola}$ (DPR = 13,4%, n = 6)
97/714, + 37°C	X = 23,70 $\mu\text{g}/\text{ampola}$ (DPR = 6,0%, n = 2)
97/714, + 45 °C	X = 25,65 $\mu\text{g}/\text{ampola}$ (DPR = 13,8%, n = 4)

Tabela 4. Determinações individuais mediante HPSEC e RP-HPLC do padrão proposto de PRL, 97/714 e das preparações de PRL glicosilada (98/580) e não-glicosilada (98/582), relativamente à CRS (definido com um conteúdo de 2,2 mg/mL), BSA e hGH.

Preparação	HPSEC Padrão			RP-HPLC Padrão		
	CRS-Lio µg/amp	BSA µg/amp	hGH µg/amp	CRS-Liq µg/amp	BSA µg/amp	hGH µg/amp
97/714	25,8 25,1	28,8 28,0	27,2 26,4	31,1	—	27,4 28,1
97/714 (+37°C)	—	—	—	22,7	—	24,7
97/714 (+45°C)	—	—	—	29,9 21,9	—	23,8 27,0
98/580	6,0	6,7	6,3	6,9	—	6,5 6,2
98/582	10,4	11,6	11,0	13,0	—	14,9 11,7

4. DISCUSSÃO

Foi padronizada uma técnica isocrática de RP-HPLC para a determinação de prolactina em preparações purificadas e diretamente em fluídos derivados de choques osmóticos. Trata-se da primeira descrição de análise físico-química qualitativa e quantitativa deste hormônio em condições não desnaturantes. O método representa também uma ferramenta extremamente útil para detectar e identificar diferentes isômeros de prolactina, como podemos observar na análise de hPRL-NIDDK ou ovina-Sigma (Fig.3B) e mais ainda no estudo desenvolvido em colaboração com a OMS.

Como já observamos no caso do Padrão Internacional de rec-hGH (32), picos menores de eluição mais rápida podem ser atribuídos a formas desamidadas ou a sulfóxidos. Ao mesmo tempo os tempos de retenção dos picos principais de 11 preparações de prolactina, todas de origem ou composição diferente (Tabela 1), representam um índice de hidrofobicidade que pode ser muito útil para sua identificação, caracterização e purificação (31). Nas nossas condições, todas as formas de prolactina são geralmente menos hidrofóbicas que o hGH. As formas glicosiladas são 1,2-1,5 vezes menos hidrofóbicas que as formas não glicosiladas e há uma alta concordância entre os t_R da prolactina (pituitária ou recombinante) de diferente origens, com exceção da preparação do NIDDK. Como mostra a Tabela 1, a mesma concordância foi também encontrada entre as duas preparações de hGH. Esta característica de alta hidrofobicidade pode portanto ser usada não somente para uma determinação mais exata da proporção de prolactina glicosilada presente em preparações heterogêneas, como também para estudar as diferenças existentes na distribuição das isoformas entre as prolactinas pituitárias e recombinantes de origem diferente (12,24). Estas aplicações potenciais da presente metodologia físico-química podem ser extendidas, com as modificações necessárias, também a outras proteínas e glicoproteínas, como por exemplo o hormônio estimulador de tireóide (hTSH), cuja caracterização ainda é especialmente baseada em técnicas imunológicas e biológicas (52).

O método padronizado foi amplamente validado e caracterizado com relação à exatidão, precisão e sensibilidade. A inclinação da curva dose-resposta que relaciona a quantidade de prolactina pituitária (NIDDK) (quantificada mediante análise de aminoácidos) com as unidades arbitrárias de área, foi encontrada comparável àquela obtida com o padrão internacional de rec-hGH. A mesma concordância foi encontrada mediante determinação espectrofotométrica dos coeficientes de absorção na luz ultravioleta destas duas proteínas, em 220 nm, o comprimento de onda utilizado rotineiramente, conforme recomendado pela Farmacopéia Européia (55), para o controle farmacêutico da somatropina para injeção.

No estudo em colaboração com a OMS e com mais 15 laboratórios de 8 países diferentes, o nosso laboratório forneceu uma importante contribuição especialmente com relação às determinações físico-químicas, fornecidas somente por três participantes. Com base nestes ensaios, capazes de investigar propriedades estruturais no lugar das propriedades funcionais (como por exemplo as imuno e biológicas investigadas também no mesmo estudo), foi possível definir o conteúdo das ampolas em exame em termos de unidades de massa. Portanto, pelas determinações realizadas mediante HPLC:

1. a preparação 97/714 foi estabelecida como o primeiro Reagente de Referência da OMS para PRL, humana recombinante, para imunoensaio, com conteúdo declarado de 24,5 µg de rec-hPRL por ampola;
2. a preparação 98/580 foi estabelecida como o Primeiro Reagente de Referência da OMS para PRL, humana recombinante, glicosilada, para imunoensaio, com conteúdo declarado de 5,5 µg por ampola;
3. a preparação 98/582 foi estabelecida como o Primeiro Reagente de Referência da OMS para PRL, humana recombinante, não glicosilada, para imunoensaio, com conteúdo declarado de 10,5 µg por ampola.

Além das metas propostas pelo referido estudo da OMS e plenamente alcançadas, muitas outras observações, mais diretamente ligadas ao estudo bioquímico destas preparações, podem ser colocadas.

Do ponto de vista da análise qualitativa, esta técnica de RP-HPLC permitiu identificar dois picos principais de NG-hPRL e dois picos principais de G-hPRL, presentes em todas as preparações enviadas pela OMS e que não seriam detectados simplesmente por HPSEC. A preparação de prolactina pituitária do NIDDK, mesmo sendo mais pura que todas as preparações da OMS, apresentou ao pico principal levemente alterado, com relação a todas as outras preparações, incluindo a preparação do IPEN. Esta última, sendo a mais pura em absoluto, e também a única em que foi possível determinar o t_R da forma fundamental diretamente no extrato periplásmico, antes de qualquer degradação ou artefacto de extração, pode ser usada como a referência mais confiável de hidrofobicidade da forma nativa de hPRL recombinante.

Do ponto de vista quantitativo podemos observar que, mediante RP-HPLC, o padrão proposto de rec-hPRL (97/714) apresentou, com boa reprodutibilidade, um valor de área específica ($ua/\mu g$) próximo ao valor apresentado pelo hGH e pela CRS (referência química de prolactina da OMS). Estes valores foram também confirmados na análise mediante HPSEC, pela qual foi possível considerar o dado de área específica, também muito próximo, obtido com BSA. Isto permite ressaltar que a HPLC em geral pode ser usada, com alta reprodutibilidade e sensibilidade, utilizando a leitura a 220 nm, para a quantificação de diferentes proteínas. As mesmas considerações quantitativas podem ser extendidas à análise da NG-hPRL e G-hPRL. Esta última porém, considerando as menores quantidades disponíveis para a análise, apresentou erros de determinação um pouco maiores.

Foi também possível confirmar, para a hPRL pituitária do NIDDK, um conteúdo bem inferior ao declarado, o que aconselha extremo cuidado na hora que esta preparação é utilizada como referência quantitativa primária para estabelecer uma técnica analítica.

5. REFERÊNCIAS

- [1] W.C. Clarke, H.A. Bern, Comparative endocrinology of prolactin. In: C.H. Li (Ed.), *Hormonal Proteins and Peptides*, Academic Press, New York, 1980, p.105.
- [2] N.E. COOKE, Prolactin: normal synthesis, regulation and actions. In: De Groot LJ (ed) *Endocrinology*, Sanders, Philadelphia, p. 384-407, 1989.
- [3] Y.N.Sinha, Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance *Endocr.Rev.* 16 (1995) 354-368.
- [4] C. BOLE-FEYSOT, V. GOFFIN, M. EDERY, N. BINART, P.A KELLY, Prolactin (PRL) and its receptor: action, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.*, v.19, p. 225-268, 1998.
- [5] F. BOLLENGIER, A. MAHLER, A. MATTON, L. VANHAELST, Molecular heterogeneity and glycosylation modulation of rat prolactin isoforms synthesized and secreted in vitro in postnatal ontogeny, gestation, lactation and weaning. *J. Neuroendocrinol.*, v. 8, p. 721-730, 1996.
- [6] M. JINNO, Y. KATSUMATA, T. HOSHIAI, Y. NAKAMURA, K. MATSUMOTO, Y. YOSHIMURA, A therapeutic role of prolactin supplementation in ovarian stimulation for in vitro fertilization: the bromocriptine rebound method. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 82, p. 3603-3611, 1997.
- [7] D.A. WEIGENT, Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. *Pharmacol. Ther.*, v. 69, p. 237-257, 1996.
- [8] L.Y. YU-LEE, Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 215, p. 35-52, 1997.

- [9] N.BEM-JONATHAN, J.L.MERSON, D.L.ALLEN, R.W.STEINMETZ. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr. Rev.*, v.17, p. 639-669, 1996.
- [10] A.M. Walker, Phosphorylated and nonphosphorylated prolactin isoforms. *Trends Endocrinol. Metab.* 5 (1994) 195-200.
- [11] T.HIROOKA, N.SUGANUMA, M.FURUHASHI, T.KITAGAWA, H.ANDO, F.KIKKAWA, Y.TOMODA, H.SEO. Synthesis and release of glycosylated prolactin in transfected cells with human complementary deoxyribonucleic acid. *Endocr. J.*, v. 43, p. 423-428, 1996.
- [12] A.E. Price, K.B. Logvinenko, E.A. Higgins, E.S. Cole, S.M.Richards, Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. *Endocrinology* 136 (1995) 4827-4833.
- [13] P. Hwang, H. Guyda, H. Friesen. Purification of human prolactin. *Meth. Enzymol.* 37 (1975) 389-402.
- [14] M.O. Thorner, M.L. Vance, E.R. Laws, E. Horvath, K. Kovacs, The anterior pituitary. In: J.D. Wilson, D.W. Foster, H.M. Kronenberg, P.R. Larsen (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th edition, W.B. Sanders Co, Philadelphia, PA, 1998, p. 249-340.
- [15] U.J. Lewis, N.P. Singh, B.K. Seavey, Human prolactin – Isolation and some properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44 (1971) 1169.
- [16] P. Roos, F. Nyberg, L. Wide, Isolation of human pituitary prolactin. *Biochim. Biophys. Acta* 588 (1979) 368-379.

- [17] S.C. Hodgkinson, J. Lowry, Hydrophobic interaction chromatography and ion exchange chromatography in the presence of acetonitrile. *Biochem. J.* 199 (1981) 619-627.
- [18] N. Paris, F. Rentier-Delrue, F. Defontaine, V. Goffin, J.J. Lebrum, L. Mercier, J.A. Martial, Bacterial production and purification of recombinant human prolactin. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12 (1990) 436.
- [19] B.C. Cunningham, D.J. Henner, J.A. Wells, Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone receptor. *Science* 247 544 (1990) 1461-1465.
- [20] M.S. Gilbert, P.J. Lowry, M.G. Castro, R.J. Woods, D. Savva, Expression and partial purification of human prolactin in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem.* 23 (1991) 107-114.
- [21] Y. Hiraoka, Y. Nomata, K. Matsuo, N. Tsubata, K. Tanabe T. Fukasawa, Efficient production of biologically active human prolactin in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 81 (1991) 147-154.
- [22] L. Morganti, M. Huyer, P.W. Gout, P. Bartolini, Production and characterization of biologically active Ala-Ser-(His)₆-Ile-Glu-Gly-Arg-human prolactin (tag-hPRL) secreted in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23 (1996) 67-75.
- [23] L. Morganti, C.R.J. Soares, R. Affonso, P.W. Gout, P. Bartolini, Synthesis and characterization of recombinant, authentic human prolactin secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27 (1998) 63-70.
- [24] C.R.J. Soares, L. Morganti, B. Miloux, J.H. Lupker, P. 556 Ferrara, P. Bartolini, High-level synthesis of human prolactin in chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32 (2000) 127-135.

- [25] T. Das, P.W. Johns, V. Goffin, P. Kelly, B. Kelder, J.Kopchick, K. Buxton, P. Mukerji, High-level expression of biologically active human prolactin from recombinant baculovirus in insect cells. *Protein Expres. Purif.* 20 (2000)265-273.
- [26] L. Strokovskaya, Z. Bartoszewicz, E. Szolajska, I. Kikhno, A. Solomko, J. Michalik, Expression and one-step purification of intracellular human prolactin in insect cells. *Protein Expres. Purif.* 22 (2001) 242-248.
- [27] P.W. Gout, C.T. Beer, R.L. Noble, Prolactin stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas. *Cancer Res.* 40 (1980) 2433-2436.
- [28] F.S. Jacobson, J.T. Hanson, P.Y. Wong, M. Mulkerrin, J. Deveney, D. Reilly, S.C. Wong, Role of high-performance liquid chromatography protein analysis in developing fermentation processes for recombinant human growth hormone, relaxin, antibody fragments and lymphotoxin. *J. Chromatogr. A* 763 (1997) 31-48.
- [29] J.E. Oliveira, C.R.J. Soares, C.N. Peroni, E. Gimbo, I.M.C. Camargo, L. Morganti, M.H. Bellini, R. Affonso, R.R. Arkaten, P. Bartolini, M.T.C.P. Ribela, High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in *Escherichia coli* periplasmic space. *J. Chromatogr. A* 852 (1999) 441-450.
- [30] B.Rafferty et al, submitted for publication.
- [31] E.W. Leser, J.A. Asenjo, Rational design of purification processes for recombinant proteins. *J. Chromatogr.* 584 (1992) 43-57.
- [32] S. Dalmora, J.E. Oliveira, R. Affonso, E. Gimbo, M.T.C.P.Ribela, P. Bartolini, Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. *J. Chromatogr. A* 782 (1997) 199-210.

- [33] B.L. Karger, J.R. Gant, A. Hartkopt, P.H. Weiner, Hydrophobic effects in reversed-phase liquid-chromatography. *J. Chromatogr.* 128 (1976) 65-78.
- [34] W.S. Hancock, C.A. Bishop, M.T.W. Hearn, High-pressure liquid-chromatography of peptides and proteins. *FEBS Lett.* 72 (1976) 139-142.
- [35] W.S. Hancock, C.A. Bishop, R.L. Prestidge, D.D.K. Harding, M.T.W. Hearn, Reversed-phase, high-pressure liquid-chromatography of peptides and proteins with ion-pairing reagents. *Science* 200 (1978) 1168-1170.
- [36] Cs. Horvath, W. Melander, Liquid chromatography with hydrocarbonaceous bonded phases- Theory and practice of reversed phase chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 393-404.
- [37] R.M. Riggan, G.K. Dorulla, D.J. Miner, A reversed-phase high performance liquid chromatography method for characterization of biosynthetic human growth hormone. *Anal. Biochem.* 167 (1987) 199-209.
- [38] B. Grego, G.S. Baldwin, J.A. Knessel, R.J. Simpson, F.J. Morgan, M.T.W. Hearn, High performance liquid chromatography of amino-acids, peptides and proteins. *J. Chromatogr.* 297 (1984) 21-29.
- [39] B.A. Johnson, J.M. Shinokawa, W.S. Hancock, M.W. Spel-Iman, L.J. Basa, D.W. Aswad, Formation of isoaspartate at 2 distinct sites during in vitro aging of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 14262-14271.
- [40] P. Oroszlan, S. Wicar, G. Teshima, S.L. Wu, W.S. Hancock, B.L. Karger, Conformational effects in the reversed-phase chromatographic behavior of recombinant human growth hormone (RHGH) and N-methionyl recombinant human growth hormone (MET-HGH). *Anal. Chem.* 64 (1992) 1623-1631.

- [41] S. Wicar, M.G. Mulkerrin, G. Bathory, L.H. Khundkar, B.L. Karger, Conformational-changes in the reversed-phase liquid-chromatography of recombinant human growth hormone as a function of organic-solvent – The molten globule state. *Anal. Chem.* 66 (1994) 3908-3915.
- [42] W.S. Hancock, R.C. Chloupek, J.J. Kirkland, L.R. Snyder, Temperature as a variable in reversed-phase high-performance liquid-chromatographic separations of peptide and protein samples. *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 31-43.
- [43] M.A. Strege, A.L. Lagu, Analysis of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli* fermentation broth by micellar high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 155-161.
- [44] G. Karlsson, P. Gellerfors, A. Persson, B. Noren, P.O. Edlund, C. Sandberg, S. Birnbaum, Separation of oxidized and deamidated human growth hormone variants by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 147-155.
- [45] A.F. Parlow, Technical Sheet on "New, Super-Pure Human Pituitary Prolactin", NIDDK, Bethesda, MD, 1997. 591
- [46] D.B. Nyberg, P. Bergman, L. Wide, P. Ross, Stability studies on human pituitary prolactin. *Uppsala J. Med. Sci.* 90 (1985) 265-277.
- [47] D. Coss, C.B. Kuo, L. Yang, P. Ingleton, R. Luben, A.M. Walker, Dissociation of Janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 5 activation after treatment of Nb2 cells with a molecular mimic of phosphorylated prolactin. *Endocrinology* 140 (1999) 5087-5094.
- [48] M.A. Woody, L.A. Welniak, R. Sun, Z.G. Tian, M. Henry, S. Richards, A. Raziuddin, D.L. Longo, W. Murphy, Prolactin exerts hematopoietic growth-

promoting effects in vivo and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. *Exp. Hematol.* 27 (1999) 811-816.

[49] B.K. Vonderhaar, Prolactin involvement in breast cancer. *Endocr. Rel. Cancer* 6 (1999) 389-404.

[50] W.Y. Chen, P. Ramamoorthy, N. Chen, R. Sticca, T.E. Wagner, A human prolactin antagonist, hPRL-G129R, inhibits breast cancer proliferation through induction of apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 3583-3593.

[51] C.R.J. Soares São Paulo, 2000. Síntese de prolactina humana em células de ovário de hamster chinês. Tese de Doutorado-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-Comissão Nacional de Energia Nuclear].

[52] B. Rafferty, R. Gaines Das, 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.* 45 (1999) 2207-2215.

[53] D. Koshland, D. Botstein, Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell* 20 (1980) 749-760.

[54] A.F. Bristow, R. Gaines Das, S.L. Jeffcoate, D. Schulster, The first international standard for somatropin: report of an international collaborative study. *Growth Regul.* 5 (1995) 133-141.

[55] European Pharmacopeia Convention, Somatropin In: European Pharmacopeia, 3ed edition, Council of Europe, Strasbourg, 1997, p. 1518-1526.