ESTUDO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO CELULAR PARA EXPRESSÃO DE GLICOPROTEÍNA RECOMBINANTE HUMANA, EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO)

https://doi.org/10.5281/zenodo.15566565

MACEDO, Fernanda de Mendonça, Mestra*

* Faculdade de Tecnologia de Praia Grande
Departamento de Processos Químicos
Pça. 19 de Janeiro, 144, Boqueirão, Praia Grande / SP, CEP: 11700-100
Fone (13) 3591-1303
fernanda.macedo@fatecpg.com.br

RESUMO

Um cultivo de células eucariota refere-se à manutenção de células removidas a partir de tecido animal ou órgãos, as quais continuam a crescer com adição de fatores de crescimento e nutrientes. As células CHO (Células de Ovário de Hamster Chinês) são muito populares quanto à expressão de glicoproteína recombinante humana. Estas células possuem enzimas de glicosilação que se assemelham àquelas encontradas em linhagens de células humanas. A CHO é uma linhagem aderente passível de adaptação ao crescimento em suspensão e requer meio de cultivo líquido quimicamente complexo e adequado para o seu crescimento. No presente estudo, foi realizado um comparativo de quatro meios de cultivo para células CHO e a expressão da glicoproteína recombinante TSH (Hormônio Estimulante da Tireóide) em dois processos de cultivo, foi analisada.

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo celular, CHO, Meio de cultivo, TSH, glicoproteínas.

ABSTRACT

A cell culture refers to the maintenance of eukaryotic cells removed from animal tissue or organs. They continue to grow with the addition of growth factors and nutrients. CHO cells (Chinese Hamster Ovary Cells) are very popular for the expression of human recombinant glycoproteins. These cells have the glycosylation enzymes which resemble those found in human cell lines. The CHO line are adherent and can grow as cell suspensions and require liquid medium chemically complex and suitable for their growth. In this case, we made a comparison of four culture media for CHO cells and the expression of glycoprotein recombinant TSH (Thyroid Stimulating Hormone) was analyzed.

KEYWORDS: *Cell culture, CHO, Culture medium, TSH, glycoprotein.*

INTRODUÇÃO

O cultivo de célula de organismos eucariotos é o sistema majoritário para a produção em grande escala de glicoproteínas biologicamente ativas, especialmente para produção de biofármacos. As glicoproteínas recombinantes desempenham um papel significativo na terapia de diversas patologias, como por exemplo: câncer de tireóide, anemia, hemofilia, esclerose múltipla, entre outros. Um cultivo de célula eucariota refere-se à manutenção de células removidas a partir de tecido animal ou órgãos, as quais continuam a crescer com adição de fatores de crescimento e nutrientes. Estas células se dividem por mitose de maneira similar as bactérias e fungos, e continuam a crescer, limitando-se apenas pela depleção de nutrientes, acumulação de subprodutos tóxicos ou inibição de densidade.

Com base no estudo de Hayflick e Moorhead (1961, 25:585-621), sobre o potencial de crescimento de células embrionárias humanas, as células podem ser cultivadas continuamente por 50 gerações e passam por mudanças relacionadas a idade até atingirem a fase final, quando tornam-se incapazes de se dividirem. A figura 1 (Butler, M., 2004) apresenta o tempo de vida finito de um cultivo celular de células embrionárias, segundo Hayflick e Moohead. Pode-se observar que durante a fase 1, as células estão se adaptando ao cultivo celular e o

crescimento é relativamente lento. Na fase 2, as células estão crescendo exponencialmente e a taxa de duplicação está entre 18 e 24 horas. O ponto de crise ocorre quando a célula reconhece a limitação da capacidade na divisão celular e a velocidade do crescimento diminui. Na fase 3 o crescimento é retardado, e eventualmente é inibido.

O cultivo celular pode ser geneticamente homogêneo, quando submetido à clonagem, ou mostrar uma variação genética conhecida como população heterogênea. O presente trabalho irá evidenciar a expressão da glicoproteína recombinante Hormônio Estimulante da Tireóide (TSH), em um cultivo celular geneticamente homogêneo.

O TSH é uma glicoproteína com estrutura dimérica contendo duas subunidades glicosiladas (μ e β), não covalentemente ligadas. Cole (1993, p. 1014-1023) descreve: "A subunidade μ, contém duas cadeias de oligossacarídeos de ligação-N na asparagina 52 e 78 e a subunidade β apenas uma na asparagina 23". É bem documentado na literatura que as cadeias de carboidratos do TSH são importantes na biosíntese, associação das subunidades, secreção e expressão da atividade hormonal (THOTAKURA, 1991; PERSANI, 1998; SHAAF, 1997). A contribuição devida às cadeias de cada uma das subunidades na ação do hormônio não é perfeitamente conhecida. Os oligossacarídeos da subunidade μ são particularmente importantes na ação do TSH durante a transdução de sinal pós-receptor (THOTAKURA, 1991;), enquanto a glicosilação da subunidade β é essencial para a estabilidade e secreção (TAKATA, 1989).

Análises estruturais têm mostrado que a tireotrofina é sintetizada e secretada como uma série de isoformas que diferem na glicosilação, bioatividade e meia vida circulatória. Diferenças no conteúdo de sialilação das várias isoformas de TSH modificam as propriedades biológicas, um menor grau de sialilação resultando em menor bioatividade *in vivo* e meia vida circulatória mais curta (THOTAKURA, 1991; WEINTRAUB, 1999; ZEFANOUNI, 1996; SZKUDLINSKI, 1993). A diferente estrutura glicídica pode também influenciar as propriedades imunológicas dos hormônios glicoprotéicos, relacionada com o tipo de célula hospedeira e com as diferentes condições de cultivo e produção em biorreator (THOTAKURA, 1991; ZEFANOUNI, 1996; SZKUDLINSKI, 1993; KASHWAI, 1991).

A expressão de glicoproteínas recombinantes tem sido realizada

mediante construções que utilizam vetores plasmídicos ou virais, transfecções transientes ou estáveis e diversos marcadores gênicos de seleção e amplificação. O TSH recombinante foi obtido através de co-transfecção de células CHO deficientes no gene da enzima dihidrofolato redutase ($DHRF^-$) com dois plasmídeos, um dos quais contendo o gene da $DHFR^-$ ligado ao gene da subunidade μ (WATANABE, 1987). Foi também expresso transitoriamente em células de rim humano e rim de macaco pela co-transfecção destas células com dois vetores idênticos, cada um contendo uma subunidade (WONDISFORD, 1988).

Nestes trabalhos, o rendimento obtido foi muito baixo, entretanto este não foi o objetivo principal do trabalho. Níveis maiores de TSH utilizando um mecanismo de co-amplificação gênica induzida por metotrexato (MTX) e utilizando um sistema de cultivo celular em biorreator, foram conseguidos por Hussain e colaboradores (HUSSAIN, 1996) e Cole e colaboradores (COLE, 1993). O TSH foi obtido utilizando dois vetores dicistrônicos (pEDdc e pEAdc) que contém os marcadores gênicos de seleção e amplificação dehidrofolato redutase (DHFR) e adenosina deaminase (ADA), cada um ligado ao gene da subunidade μ ou β (PERONI, 2002). Após cotransfecção das células CHO ($DHFR^-$) com estes vetores de expressão e submetidas à amplificação gênica em meio de cultivo contendo quantidades crescentes de MTX, foi possível isolar clones com nível de secreção em frascos (cultivo celular em monocamadas) de até $7,2 \pm 1,3 \mu g\ TSH.10^{-6}$células.$dia^{-1}$, o mais alto já relatado para a expressão deste hormônio (PERONI, 2002).

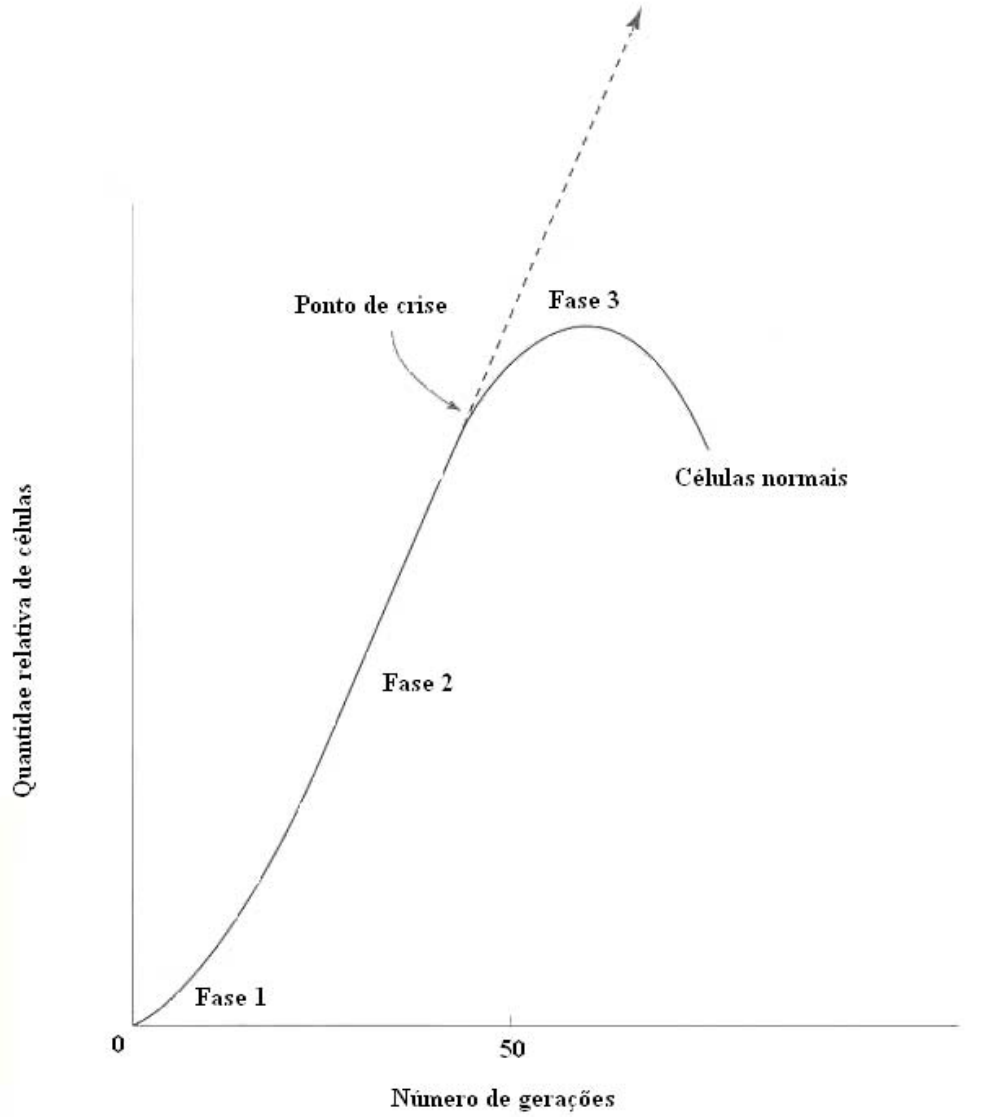

Figura 1 - Crescimento de células embrionárias normais e transformadas ao longo do número de passagens

Fonte: Butler (2004)

Um segundo tratamento, envolvendo deoxiconformacinma, direcionado para amplificar o marcador gênico ADA, forneceu um clone com secreção de TSH 2-3 vezes maior que na estratégia anterior, chegando a uma secreção de 17,8 ± 7,6µg TSH.10^{-6} células.dia^{-1}. O clone utilizado no desenvolvimento do presente trabalho foi aquele que resultou da estratégia de amplificação incompleta (só com MTX). Poucos grupos de pesquisas realizaram a síntese de TSH recombinante em células CHO. Apenas o grupo da Genzyme, Cambridge, MA, USA, obteve, mediante utilização de vetores convencionais, uma expressão

semelhante: 4,5μg TSH.10^{-6} células.dia^{-1}(COLE, 1993).

A importância e o objetivo desse trabalho é o estudo comparativo de quatro meios de cultivo para células CHO e a expressão da glicoproteína recombinante TSH (Hormônio Estimulante da Tireóide) em dois processos de cultivo.

1 DESENVOLVIMENTO

A linhagem celular utilizada para a expressão da glicoproteína TSH, foi a de células de ovário de hamster chinês (CHO), deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR), (linhagem mutante DXB-11) co-transfectadas com vetores dicistrônicos (pEDdc-μ e pEAdc-β-TSH) e submetidas à amplificação gênica com metotrexato (MTX) (PERONI,2002).

Foram utilizados dois sistemas de expressão: biorreator tipo "hollow-fiber" e frascos de cultivo celular. O sistema "hollow-fiber" se baseia no cultivo de células em cartuchos com capilares artificiais por onde é bombeado continuamente o meio de cultivo apropriado (meio intracapilar). As células CHO transfectadas foram semeadas no espaço extracapilar, de onde se extraiu periodicamente o meio contendo a proteína de interesse. Os meios de cultivo intracapilar utilizados foram:

a) CD que é um meio quimicamente definido, que não contém nucleosídeos, proteínas de origem animal, de plantas ou de origem sintética;

b) CHO-S-SFM II, com e sem nucleosídeos, que é um meio completo, sem soro e de baixo teor protéico (<100μg/mL);

c) CHO-S-SFM II, com nucleosídeos, que é um meio completo, sem soro e de baixo teor protéico (<100μg/mL) suplementado com 100nM de metotrexato (MTX). Todos os meios de cultivo foram suplementados com penicilina/estreptomicina (50μg/mL), gentamicina (40μg/mL), anfotericina B (0,25μg/mL). Os meios extracapilares utilizados foram os mesmos citados anteriormente com ou sem 10% de soro fetal bovino dialisado (dFBS).

Durante cinco dias as células foram mantidas em meio de cultivo com 10% de dFBS para aderirem aos capilares. Após esse período, o meio foi substituído para remover as células que se soltaram.

O meio de perfusão foi periodicamente substituído quando a concentração de glicose era inferior a 2mg/mL. Após cerca de 20 dias o meio extracapilar foi substituído por meio sem soro e então foram coletadas amostras e armazenadas a temperatura de-80ºC. Todo o processo foi realizado a 37ºC em atmosfera com 5% de CO_2.

As células CHO transfectadas também foram cultivadas pelo sistema de frascos de cultivo de 75cm^2 de dimensão, com aproximadamente 10^6 células em 10mL de meio de cultivo, a 37ºC e atmosfera de 5% de CO_2. Os meios utilizados para o cultivo em frascos foram os mesmos utilizados no cultivo intracapilar. Durante cinco dias as células foram mantidas no meio de cultivo com 10% de soro fetal bovino dialisado (dFBS) até atingirem 80% de confluência. Após a confluência, as células foram tripsinizadas, colhidas e divididas em frascos de 162cm^2, com aproximadamente 10^6 células em 20mL de meio de cultivo.

O cultivo permaneceu nas mesmas condições descritas acima até atingirem a confluência citada. Após esse período o meio foi substituído por meio sem soro. O meio de cultivo (sem soro), de diferentes frascos, foi coletado diariamente e centrifugado a 979 x g por 5 minutos, sendo as células removidas e o sobrenadante coletado e armazenado a temperatura de -80ºC.

Foi utilizado um biorreator escala piloto do tipo "*Hollow-fiber*", que consiste em um sistema de cultivo celular em cartuchos com capilares artificiais por onde é bombeado continuamente o meio de cultivo apropriado (meio intracapilar). As células CHO transfectadas foram semeadas no espaço extracapilar, onde foi extraído periodicamente o meio contendo a proteína de interesse. O meio intracapilar utilizado foi o CHO-S-SFM II suplementado com penicilina/estreptomicina (50µg/mL), gentamicina (40 µg/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL) e 100 nM de MTX. O meio extracapilar utilizado foi o mesmo citado anteriormente com ou sem 10% de soro fetal bovino dialisado (dFBS).

Durante cinco dias as células foram deixadas em meio CHO-S-SFM II com 10% de dFBS para aderirem aos capilares. Após este período, o meio foi substituído para remover as células que não ficaram

aderidas. O meio de perfusão foi periodicamente substituído quando a concentração de glicose era inferior a 2mg/mL. Após cerca de 20 dias o meio extracapilar foi substituído por meio sem soro e então foram coletadas amostras e armazenadas a temperatura de -80ºC. Todo processo foi realizado a 37ºC e atmosfera com 5% de CO_2.

A avaliação qualitativa e quantitativa do TSH no meio condicionado foi realizada por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) (DALMORA, 1997; OLIVEIRA, 2003; RIGGIN, 1988). A coluna foi mantida a 25ºC e foram usados na fase móvel dois tampões A e B (tampão A: fosfato de sódio 0,05M pH7,0 e tampão B: 50% de A + 50% de acetonitrila). Um gradiente linear de 25 a 100% de tampão B foi estabelecido durante 40 minutos, com fluxo de trabalho de 0,5mL/min.

A determinação do tempo de retenção se fez sempre comparativamente à preparação Thyrogen (amostra de referência disponível no mercado – Genzyme) bem como a quantificação se fez sempre comparativamente à preparação hipofisária de referência do NIDDK (National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA, EUA).

A determinação da concentração de proteína total foi estimada usando o método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) que consiste na detecção colorimétrica e quantificação de proteína total em solução diluída após reação com ácido bicinconínico. Utilizou-se uma curva padrão de calibração que relaciona diferentes concentrações de albumina de soro bovino pura (BSA; 0,5 – 200 μg/mL) com a absorbância correspondente, no comprimento de onda de 540nm.

A Tabela 1 apresenta os níveis de TSH e conteúdo protéico obtidos com diferentes meios de cultivo em frascos de 100mm. Observa-se que tanto a concentração de TSH quanto a de proteína total é bem menor quando se utiliza o meio CD sem nucleosídeos, o que acarreta uma atividade específica (μg TSH / μg de proteína total) cerca de 50% menor com relação ao meio CHO-S-SFM II com nucleosídeos suplementado com MTX.

Quando se considera a atividade por célula, determinada mediante teste de Mônaco (MONACO, 1996, p. 197-203), realizado em placas e 24 poços, obtém-se, conforme mostra a Tabela 2, uma produção de TSH 50% menor no meio CD do que no meio CHO-S-SFM II com

nucleosídeos suplementado com MTX, enquanto essa produção é cerca de 20% menor com o meio CHO-S-SFM II sem nucleosídeos e cerca de 5% menor quando é usado o meio CHO-S-SFM II com nucleosídeos.

Tabela 1: Níveis de TSH e conteúdo proteico obtidos com diferentes meios de cultivo em frascos de 100mm

Meio	TSH[a] (µg/mL)	Proteína total[b] (µg/mL)	Atividade específica (%)
CD sem nucleosídeos	0,70	62,5	1,12
CHO-S-SFM sem nucleosídeos	2,04	123,8	1,65
CHO-S-SFM sem nucleosídeos + MTX	2,74	121,2	2,26
CHO-S-SFM II SFM com nucleosídeos	2,40	115,8	2,07

[a] determinado por RP-HPLC

[b] determinado por BCA

Tabela 2: Níveis de TSH obtidos com diferentes meios de cultivo, em placas de 24 poços

Meio	TSH[a] (µg/mL)	TSH (µg.10^{-6} células. dia^{-1})
CD sem nucleosídeos	0,42	62,5
CHO-S-SFM II sem nucleosídeos	1,0	123,8
CHO-S-SFM II sem nucleosídeos + MTX	1,6	121,2
CHO-S-SFM II com nucleosídeos	1,2	115,8

Com base nos resultados expostos nas tabelas 1 e 2, o meio de cultivo CHO-S-SFM II, suplementado com MTX obteve o melhor desempenho, este meio de cultivo foi escolhido para iniciar uma produção em biorreator e em frascos de cultivo celular.

O ciclo de duas produções (A e B) de TSH em biorreator é apresentado na figura 2. Em ambas, o nível mais alto de TSH foi praticamente 20µg.mL^{-1}.dia^{-1}, obtido nos primeiros 20 dias quando ainda o dFBS está presente no meio.

Uma redução do nível de TSH, da ordem de 3 vezes, ocorreu, entretanto, após a retirada do soro. Fato semelhante é relatado por Skudlinski (1993, p. 1490-1503; 2000, p. 67-81) na utilização de um sistema análogo de hollow-fiber. O conteúdo protéico obtido nestes diferentes lotes de produção foi da ordem de 1,9mg/mL.

Diferentes lotes de produção foram realizados em frascos de cultivo celular de 162cm^2 (Tabela 3). O nível de TSH obtido nas diferentes produções foi bastante reprodutível. Nas doze produções realizadas a concentração média de TSH foi de 4,5 ± 0,78µg/mL e o conteúdo protéico de 1425,7 ± 23,9 µg/mL.

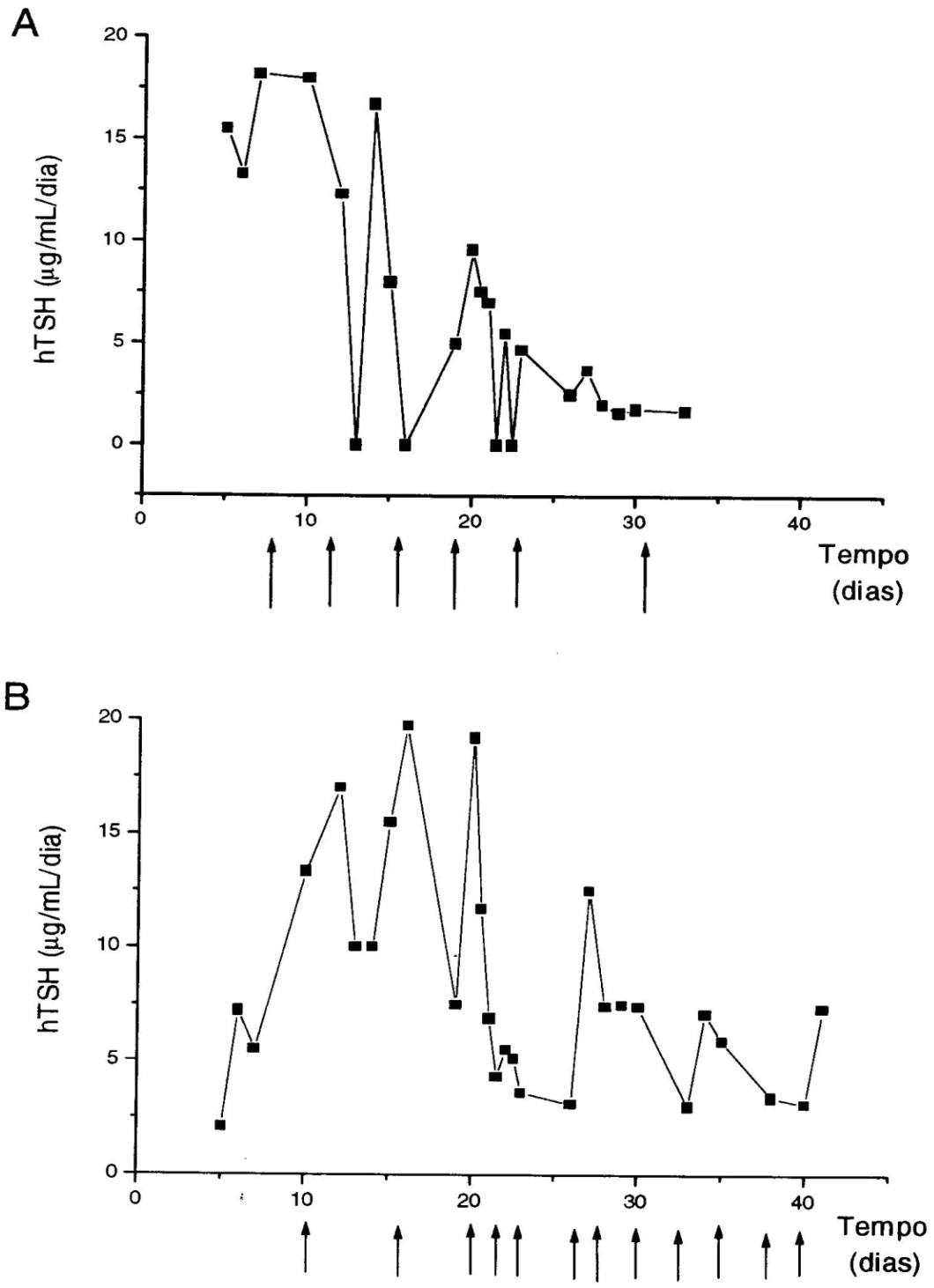

Figura 2 - Exemplos de ciclos de produção de TSH em biorreator tipo Hollow-Fiber. O meio extracapilar utilizado foi o CHO-S-SFM II com 10% de dFBS até o dia 20. O meio intracapilar foi o mesmo CHO-S-SFM II sem dFBS. ■, coleta de meio extracapilar; ↑, troca de meio intracapilar

Tabela 3: Concentração de TSH e de proteína total nos diferentes lotes de produção realizados em frascos de 162cm².

Produção	TSH[a] (µg/mL)	Proteína[b] (µg/mL)	Atividade específica (%)
P1	4,7	100,8	4,7
P2	5,3	142,8	3,7
P3	5,3	160,6	3,3
P4	4,6	170,6	2,7
P5	5,6	157,6	3,6
P6	3,7	136,0	2,7
P7	4,1	117,3	3,5
P8	3,2	129,8	2,5
P9	5,0	180,4	2,8
P10	4,0	158,6	2,5
P11	4,5	141,2	3,2
P12	3,4	116,5	2,9

[a]determinado por RP-HPLC

[b]determinado por BCA

A atividade específica (conteúdo de TSH / conteúdo total de proteína x 100) média encontrada nos lotes foi de 3,2 ± 0,64%.

A variação da produção de TSH, para quatro lotes escolhidos aleatoriamente (P4, P6, P7 e P12), que se estendeu por tempos diferentes, respectivamente 10, 13, 17 e 23 dias é exemplificado na figura 03, mostrando pouca variabilidade na concentração da proteína.

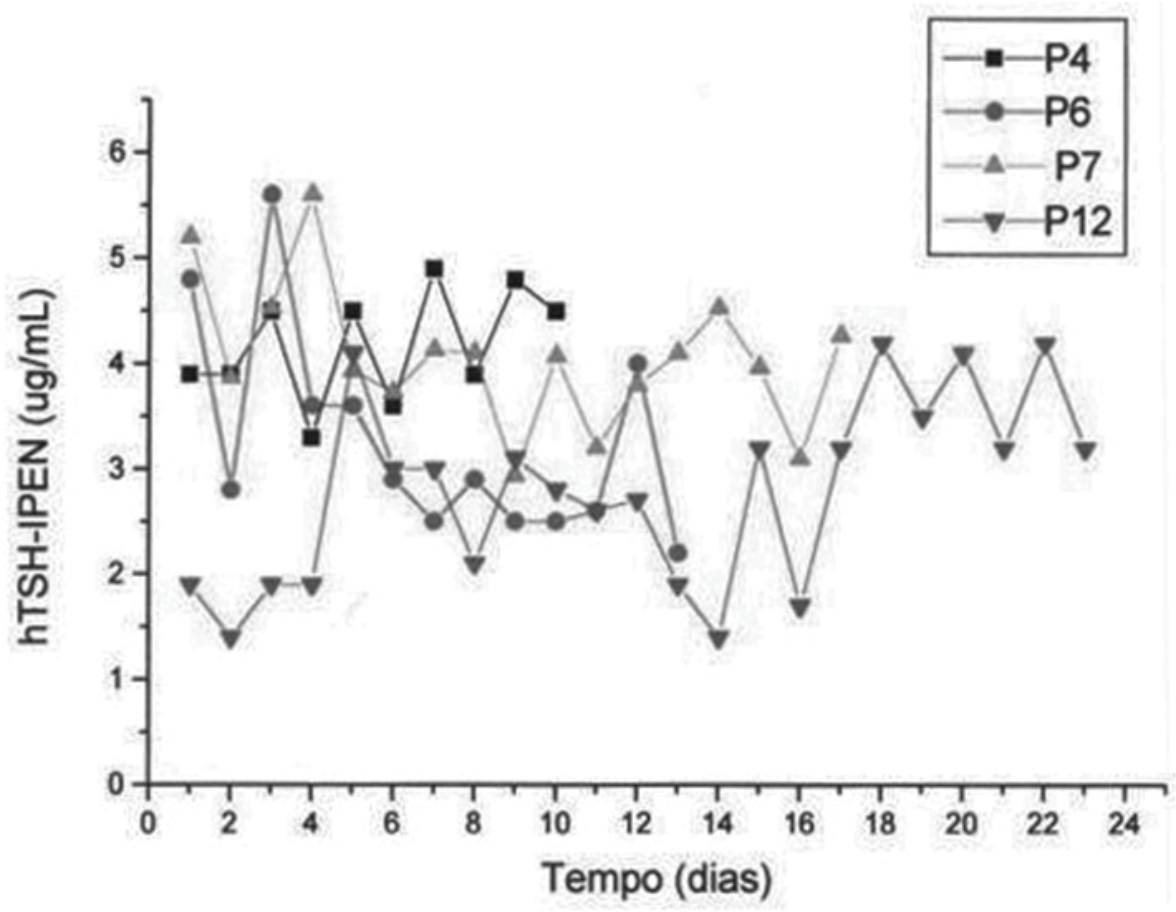

Figura 3: Variação da concentração de TSH, relativa às produções 4, 6, 7 e 12, durante 24 dias

4 CONCLUSÕES

O estudo comparativo entre os meios de cultivo CD, CHO-S-SFM II com e sem nucleosídeos, com adição ou não de MTX e os suplementos anteriormente citados, evidenciou que o meio de cultivo CHO-S-SFM II com nucleosídeos, acrescido de MTX e suplementos tiveram o melhor êxito, provavelmente, por ser um meio completo, sem soro, de baixo teor proteico e pela seleção de amplificação celular com MTX. O meio escolhido foi capaz de manter o crescimento celular no ciclo de duas produções em biorreator e em doze lotes de diferentes produções em frascos de cultivo celular de 162cm^2, atingindo a expectativa de reprodutibilidade e altos níveis de expressão.

REFERÊNCIAS

BUTLER, M. 2004. ***Animal cell culture and technology.*** 2nd ed. London and New York:Garland Science/BIOS Scientific Publishers, p.5.

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. ***Recombinant human thyroid stimulating hormone:*** *development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma.* Bio-Technol., v. 11, p. 1014-1023, 1993.

DALMORA, S.; De 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 (2), p. 199-210, 1997.

HAYFLICK, L., MOORHEAD, PS, (1961) ***The serial cultivation of human diploid cell strains.*** Exp Cell Res 25:585-621.

HUSSAIN, A.; ZIMMERMAN, C.A.; BOOSE, J.A.; FROEHLICH, J.; RICHARDSON, A.; HOROWITZ, R.S.; COLLINS, M.T.; LASH, R.W. ***Large scale synthesis of recombinant human thyrotropin using methotrexate amplification:*** *chromatographic, immunological, and biological characterization.* J. Clin. Endocrinol. *Metab*, v. 81, p. 1184-1188, 1996.

KASHWAI, T.; ICHIHARA, K.; ENDO, Y.; TAMAKI, H.; AMINO, N.; MIYAI, K. ***Immunological and biological characteristics of recombinant human thyrotropin***. J. Immunol. Methods, v. 143, p. 25-30, 1991.

MONACO, L.; MARC, A.; EONDUVAL, A.; ARCERBIS, G.; DISTEFANO, G.; LAMOTTE, D.; ENGASSER, J.M.; SORIA, M.; JENKINS, N. ***Genetic engineering of alpha 2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effects on the sialylation of recombinant interferon-gamma.*** Cytotechnology, v. 22, p. 197-203, 1996.

OLIVEIRA JE, MENDONÇA F, PERONI CN, BARTOLINI P, RIBELA MTCP. ***Determination of chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography.*** J Chromatogr. B., v. 787, p. 345-355, 2003.

PERONI CN, SOARES CRJ, GIMBO E, MORGANTI L, RIBELA MTCP, BARTOLINI P. ***High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy.*** Biotechnol. Appl. Biochem., v. 35, p. 19-26, 2002.

PERSANI, L.; BORGAT, S.; ROMOLI, R.; ASTENA, C.; PIZZOCARO, A.; BECK-PECCOZ, P. ***Changes in the degree of sialylation of carbohydrate chains modify the biological properties of circulating thyrotropin isoforms in various physiological and patological states***. J. Clin. Endocrinol. Metab, v. 83, p. 2486-2492, 1998.

RIGGIN, R.M.; SHAAR, C.J.; DORULLA, G.K.; LEFEBER, D.S.; MINER, D.J. ***High performance size exclusion chromatographic determination of the potency of biosyntetic human growth hormone product.*** J. Chromatogr., v.435, p. 307-318, 1988.

SHAAF, L.; LEIPRECHT, A.; SAJI, M.; HUBNER, V.; USADEL, K.H.; KOHN, L.D. ***Glycosylation variants of human TSH selectively activate signal transduction pathways.*** Mol. Cell Endocrinol., v. 132, p. 185-194, 1997.

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

SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; BUCCI, I.; JOSHI, L.R.; TSAI, A.; EAST-PALMER, J.; SHILOACH, J.; WEINTRAUB, B. ***Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by chinese hamster ovary cells: the role of sialylation and sulfatation in TSH bioactivity.*** Endocrinology, v. 133, p. 1490-1503, 1993.

TAKATA, K; WATANABE, S.; HIRONO, M.; TANAKO, M.; TERAOKA, H.; HAYASHIZAKI, Y. ***The role of the carboxyl-terminal aminoacid extension of human TSH*** b ***subunit.*** Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 165, p.1035-1042, 1989.

THOTAKURA, N.R.; DESAI, R.K.; BATES, L.G., COLE, E.S.; PRATT, B.M.; WEINTRAUB, B.D. ***Biological-activity and metabolic-clearance of a recombinant human thyrotropin produced in chinese hamster ovary cells.*** Endocrinology, v. 128, p. 341-348, 1991.

THOTAKURA, N.R.; SZKUDLINSKI, M.W.; WEINTRAUB, B.D. ***Structure-function studies of oligosaccharides of recombinant human thyrotropin by sequential deglycosylation.*** Glycobiology, v. 4(4), p. 525-533, 1994.

WATANABE, S.; HAYASHIZAKI, Y.; ENDO, Y.; HIRONO, M.; TAKIMOTO, N.; TAMAKI, M.; TERAOKA, H.; MIYAI, K.; MATSUBARA, K. ***Production of human thyroid-stimulating hormone in chinese hamster ovary cells***. Biochem. Bioph. Res. Co., v. 149, p. 1149-1155, 1987.

WEINTRAUB, B.D.; SKUDLINSKI, M.W. ***Development and in vitro characterization of human recombinant thyrotropin.*** Thyroid, 9 (1999) 447-450.

WONDISFORD, F.E.; USALA, S.J.; DE CHERNEY, G.S.; CASTREN, M.; RADOVICK, S.; GYVES, P.W.; TREMPE, J.P.; KERFOOT, B.P.; NIKODEM, V.M.; CARTER, B.J.; WEINTRAUB, B.D. ***Cloning of the thyrotropin beta-subunit gene and transient expression of biologically-active human thyrotropin after gene transfection.*** Mol. Endocrinol, v. 2, p. 32-39, 1988.

ZEFAOUNI, M.; RONIN, C. ***Glycosylation is the structural basis for changes in polymorphism and immunoreactivity of pituitary glycoprotein hormones.*** Eur. J. Clin. Chem.Clin. Biochem. v. 34, p. 749-753, 1996.