

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Michele Cardoso do Nascimento

**AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE AS LINHAGENS DE
CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER E B6D2F1 NO TESTE DE POTÊNCIA DA
ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE**

Rio de Janeiro

2013

Michele Cardoso do Nascimento

**AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE AS LINHAGENS DE
CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER E B6D2F1 NO TESTE DE POTÊNCIA DA
ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE**

Dissertação de Mestrado Acadêmico
apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de
Controle de Qualidade em Saúde da Fundação
Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Vigilância
Sanitária

Orientadores: Isabella Fernandes Delgado
Wlamir Corrêa de Moura

Rio de Janeiro
2013

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Nascimento, Michele Cardoso do

Avaliação da concordância entre as linhagens de camundongos *Swiss webster* e B6D2F1 no teste de potência da eritropoietina humana recombinante / Michele Cardoso do Nascimento. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

115 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2013.

Orientador: Isabella Fernandes Delgado e Wlamir Corrêa de Moura

1. DNA Recombinante. 2. Eritropoietina. 3. Camundongos. 4. Vigilância Sanitária.
I.Título.

Evaluation of the agreement between *Swiss Webster* and B6D2F1 mice strains in the potency test of recombinant human erythropoietin

Michele Cardoso do Nascimento

**AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE AS LINHAGENS DE
CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER E B6D2F1 NO TESTE DE POTÊNCIA DA
ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE**

Dissertação de Mestrado Acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Data de aprovação: 26/03/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Pinheiro de Araújo (FIOCRUZ/INCQS)

Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez (UFF)

Prof. Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida (FIOCRUZ/INCQS)

Prof^a. Dr.^a Isabella Fernandes Delgado (orientadora)

Prof. Dr. Wlamir Corrêa de Moura (orientador)

Ao meu Pedrinho.

Te amo irmão para toda eternidade.

(In memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

Aos meus pais pela vida e pela oportunidade que me proporcionaram de ir um pouco além de onde puderam ir.

Aos meus irmãos, Maíra, Marcelle, Marcelo e Thainá, pelo amor e pela torcida.

Ao meu marido Haroldo pelo apoio, dedicação e compreensão, em todos os instantes.

A Dr^a. Isabella Fernandes Delgado e ao Dr. Wlamir Corrêa de Moura pela orientação e pela amizade.

Aos meus amigos Jarbas Emílio dos Santos, Patrícia Alves e Patrícia Aquino pelo apoio e amizade de sempre.

A amiga Clarice Abreu pela amizade e apoio na realização dos ensaios.

Ao meu amigo André Plastino, que mesmo “longe” sempre me apoiou.

Ao Humberto Pinheiro de Araújo pelo apoio e pelas revisões na dissertação.

Ao Rodrigo Costa pelo apoio na realização dos ensaios.

A Lúcia Werneck, atual chefe do Departamento de Imunologia do INCQS, pela amizade e pelo incentivo e apoio na realização deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Imunologia do INCQS que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas. Dizem que são tão belas!

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A eritropoietina humana recombinante (rhEPO) é produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO) pela tecnologia do DNA recombinante (rDNA) e vem sendo amplamente utilizada na prática clínica, para redução da necessidade de transfusão sanguínea em processos cirúrgicos e no tratamento de anemias de várias etiologias, incluindo anemia devido à doença renal crônica; relacionada ao câncer ou ao tratamento do mesmo, anemia relacionada à utilização de zidovudina, utilizada para terapia de pacientes infectados pelo HIV e anemia relacionada à utilização de ribavirina, utilizada para terapia de pacientes portadores de hepatite C. Diante da gama de produtos contendo rhEPO disponíveis no mercado, da abrangência da indicação terapêutica e das características dos pacientes usuários de rhEPO, é de grande importância o efetivo controle da qualidade deste produto previamente ao seu ingresso no mercado. Neste contexto, a avaliação da potência biológica é um dos ensaios preconizados para produtos contendo rhEPO, devendo ser realizada a cada lote produzido, antes que o mesmo possa ser liberado para uso da população. A Farmacopeia Europeia (*Ph. Eur.*) preconiza o ensaio de potência biológica de rhEPO, recomendando a utilização da linhagem de camundongos B6D2F1. Entendendo que a possibilidade de utilização de outras linhagens de camundongos seria de grande utilidade para laboratórios produtores, assim como para os laboratórios de controle da qualidade, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a concordância entre os valores de potência biológica obtidos com a linhagem preconizada pela *Ph. Eur.* (B6D2F1) e Swiss Webster (SW). Todos os resultados foram considerados válidos e satisfatórios, pois cumpriram com os critérios de regressão, linearidade e paralelismo. Os resultados se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pela *Ph. Eur.* Em todos os grupos de dados avaliados pelo teste de KS, $p > 0,05$, não houve evidência estatística que comprovasse que a distribuição não seja normal. Em nenhum dos casos, houve necessidade de combinação de ensaios para obter resultados satisfatórios. O ensaio de potência utilizando a linhagem SW demonstrou estar padronizado e sob controle, podendo ser empregado na avaliação da potência biológica de rhEPO. Para os parâmetros avaliados, *i.e.* precisão intra e inter-ensaios e veracidade, com ambas as linhagens testadas, os valores obtidos foram excelentes, sobretudo se consideramos o fato de tratar-se de um ensaio *in vivo*. As linhagens testadas geraram resultados estatisticamente semelhantes e homogêneos, portanto, podem ser consideradas concordantes. O ensaio demonstrou ser reprodutível pela abordagem prática adotada, no entanto, estudos complementares, com diferentes laboratórios utilizando a linhagem SW, devem ser realizados.

Palavras-chave: Eritropoietina. Avaliação da potência. Swiss Webster. B6D2F1.

Vigilância Sanitária

ABSTRACT

The recombinant human erythropoietin (rhEPO) is produced in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells by recombinant DNA technology (rDNA) and has been widely used in clinical practice, to reduce the need for blood transfusion and in surgical procedures for treatment of anemia of various etiologies; including anemia due to chronic kidney disease, cancer-related or treatment thereof, anemia related to the use of zidovudine therapy used for patients infected with HIV, anemia related to the use of ribavirin, used for therapy of patients with hepatitis C. Given the range of products available on the market containing rhEPO, the scope of the therapeutic indication and characteristics of patients using rhEPO, it is of great importance to effectively control the quality of this product prior to its entry into the market. The assessment of biological potency is a recommended test by the European Pharmacopoeia (Ph. Eur) for products containing rhEPO, and B6D2F1 is the mice strain recommended for this test. The possibility of using other mouse strains would be useful for producing laboratories, as well as for quality control laboratories. For this reason, the present study aimed to evaluate the agreement between values obtained with the strain recommended by the Ph. Eur (B6D2F1) and Swiss Webster (SW). The methodology for assessing the potency of rhEPO was standardized for the SW strain and the biological potency results conducted with both strains by INCQS were compared with those conducted by a producing laboratory. All tests were considered valid, satisfactory and met the criteria for regression, linearity and parallelism. The results remained within the limits set by Ph. Eur. In all groups of data evaluated by the KS test, $p > 0.05$, no statistical evidence existed to prove that the distribution is not normal. There was no need for combination of tests to obtain satisfactory results in both strains tested. The potency assay using the SW strain is standardized under control and can be employed in assessing the biological potency of rhEPO. For the all variables, i.e. intra-and inter-assay and accuracy, with both strains tested, the values obtained were excellent, especially considering an in vivo assay. The strains, SW and B6D2F1, generated statistically homogeneous and similar results, and therefore can be considered concordant. The assay proved to be reproducible by the practical approach adopted, however, further studies with different laboratories using the SW strain, should be performed.

Keywords: Erythropoietin. Potency evaluation. Swiss Webster. B6D2F1. Sanitary Surveillance

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Ensaio realizados no INCQS para o controle da qualidade da rhEPO.....	26
Tabela 2-	Quantitativo de lotes recebidos no INCQS.....	30
Tabela 3-	Produtos contendo eritropoietina registrados na ANVISA	32
Tabela 4-	Preparo das soluções para inoculação nos animais - padrão MRT(B)rhEPO/0208 (A); amostra 4000 UI (B).....	38
Tabela 5-	Comparações realizadas entre os grupos de dados.....	41
Tabela 6-	Testes de desempenho e interpretação dos gráficos de controle do programa <i>SPC Explorer RT®</i>	44
Tabela 7-	Valores de potência e limites de confiança obtidos para 22 amostras de rhEPO testadas no INCQS utilizando a linhagem SW (grupo A1).....	50
Tabela 8-	DE ₅₀ do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem SW (grupoA1)....	56
Tabela 9-	DE ₅₀ do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem B6D2F1 (grupoA2).....	64
Tabela 10-	Valores de potência e limites de confiança obtidos para 22 amostras de rhEPO testadas no INCQS utilizando as linhagens SW (grupo A1) e B6D2F1 (grupo A2).....	66
Tabela 11-	ANOVA fator único para as linhagens SW x B6D2F1 (grupo A1 x A2) testadas no INCQS.....	67
Tabela 12-	Valores de p obtidos no teste qui-quadrado para avaliação da homogeneidade entre pares de resultados de potência obtidos nas linhagens SW x B6D2F1 (grupo A1xA2) em 22 amostras testadas no INCQS.....	68
Tabela 13-	ANOVA para a linhagem B6D2F1 entre INCQS (grupo B1) e produtor (grupo B2).....	72
Tabela 14-	Valores de p obtidos no teste qui-quadrado para avaliação da homogeneidade entre pares de resultados de potência obtidos na linhagem B6D2F1 em 49 amostras testadas pelo INCQS (grupo B1) e pelo produtor (grupo B2).....	74
Tabela 15-	Valores de potência e limites de confiança obtidos para 22 amostras de rhEPO testadas no INCQS utilizando as linhagens SW (grupo A1) e pelo produtor na linhagem B6D2F1 (grupo A3).....	76
Tabela 16-	ANOVA SW INCQS (grupo A1) x B6D2F1 produtor (grupo A3).....	78
Tabela 17-	Resumo dos resultados encontrados.....	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Mecanismo de ação da EPO.....	15
Figura 2 -	Sequência de aminoácidos da rhEPO.....	18
Figura 3 -	Estrutura molecular da rhEPO (A) e darbepoietina alfa (B).....	20
Gráfico 1-	CV% das contagens de reticulócitos da linhagem SW (grupo A1) do padrão MRT(B)rhEPO/0208 nas concentrações: 30 (A), 90 (B) e 270 (C) UI.....	51
Gráfico 2-	Média das contagens (n=6) de reticulócitos do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem SW (grupo A1) nas concentrações 30 (A), 90 (B) e 270 (C) UI.....	52
Gráfico 3-	Regressão linear para a linhagem SW (grupo A1) - média de cada concentração (A); Valores individuais (B)	54
Gráfico 4-	DE ₅₀ do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem SW (grupo A1).....	57
Gráfico 5-	CV% das contagens de reticulócitos da linhagem B6D2F1 (grupo A2) para o padrão MRT(B)rhEPO/0208 nas concentrações: 30 (A), 90 (B) e 270 (C) UI	58
Gráfico 6-	Média das contagens (n=6) de reticulócitos do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem B6D2F1 (grupo A2) nas concentrações 30 (A), 90 (B) e 270 (C) UI.....	60
Gráfico 7-	Regressão linear para a linhagem B6D2F1 (grupo A2) no padrão MRT(B)rhEPO/0208 - média de cada concentração (A); valores individuais (B).....	62
Gráfico 8-	DE ₅₀ do padrão MRT (B)rhEPO/0208 na linhagem B6D2F1 (grupo A2).....	65
Gráfico 9-	Bland-Altman para as linhagens SW (grupo A1) x B6D2F1 (grupo A2) testadas no INCQS.....	69
Gráfico 10-	Erro Relativo entre as linhagens SW (grupo A1) e B6D2F1 (grupo A2) em ensaios realizados no INCQS (n=22).....	70
Gráfico 11-	Coefficiente de Variação % entre as linhagens SW (grupo A1) e B6 (grupo A2) em ensaios realizados no INCQS (n=22).....	70
Gráfico 12-	Erro Relativo para a linhagem B6D2F1 utilizada no INCQS (grupo B1) e produtor (grupo B2).....	71
Gráfico 13-	Bland-Altman para linhagem B6D2F1 INCQS (grupo B1) x produtor (grupo B2).....	73
Gráfico 14-	Erro Relativo entre SW INCQS (grupo A1) e B6D2F1 produtor (grupo A3).....	77
Gráfico 15-	Bland-Altman para SW INCQS (grupo A1) X B6D2F1 produtor (grupo A3).....	79

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ala	Alanina
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asn	Asparagina
B6D2F1	Linhagem de camundongo do cruzamento das linhagens C57BL/6 e DBA/2
BFU	Unidades Formadoras de “Explosão”-eritróide, do inglês <i>Burst-Forming Units- Erythroid</i>
BHK	Células de rim de hamster neonato, do inglês, <i>Baby Hamster Kidney</i>
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CFU	Unidades Formadoras de Colônia-eritroblástica, do inglês, <i>Colony Forming Units-Eritroblastic</i>
CHO	Ovário de Hamster Chinês, do inglês <i>Chinese Hamster Ovary</i>
Cis	Cisteína
CV%	Coeficiente de Variação
CV _R %	Coeficiente de Variação de reprodutibilidade percentual
DE ₅₀	Dose Efetiva 50
DNA	Ácido Desoxiribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio padrão
EPO	Eritropoietina
EPO-R	Receptor da eritropoietina
ER	Erro Relativo
ER%	Erro Relativo percentual
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
gCV%	Coeficiente de Variação geométrico
HIF-1	Fator Induzido de Hipóxia, do inglês <i>Hypoxia Induced Fator 1</i>
His	Histidina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IM	Infarto do miocárdio
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
kDa	kilodalton
KS	Kolmogorov Smirnov

LC	Limite de Concordância
LI	Limite Inferior
LIA	Limite Inferior de Alerta
LIC	Limite Inferior de Controle
Log	Logaritmo
LS	Limite Superior
LSA	Limite Superior de Alerta
LSC	Limite Superior de Controle
MS	Ministério da Saúde
PEG	Polietileno glicol
Ph. Eur.	Farmacopeia Europeia
PNI	Programa Nacional de Imunização
POP	Procedimento Operacional Padronizado
Pro	Prolina
PRPC	Protocolo Resumido de Produção e Controle
P/V	Peso por volume
rDNA	Tecnologia do DNA recombinante
R-EPO	Receptor de Eritropoietina
rhEPO	Eritropoietina Humana Recombinante
Ser	Serina
SUS	Sistema Único de Saúde
SW	Linhagem de camundongo Swiss Webster
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
UI	Unidades Internacionais
Val	Valina
V/V	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ERITROPOIESE.....	13
1.2 A ERITROPOIETINA HUMANA.....	14
1.3 BIOFÁRMACOS.....	16
1.4 ERITROPOIETINA RECOMBINANTE HUMANA.....	17
1.5 NOVAS CLASSES DE rhEPO.....	19
1.6 USO TERAPÊUTICO DA rhEPO.....	21
1.7 A rhEPO ALÉM DO TRATAMENTO DA ANEMIA.....	22
1.8 RISCOS ASSOCIADOS AO USO DE rhEPO.....	24
1.9 CONTROLE DA QUALIDADE DA rhEPO.....	25
1.9.1 Avaliação da potência biológica para rhEPO.....	27
1.9.2 As linhagens B6D2F1 e Swiss Webster.....	28
1.9.3 Lotes analisados pelo INCQS.....	29
1.10 SITUAÇÃO DA rhEPO NO BRASIL.....	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 AMOSTRAS TESTE E PADRÃO DE REFERÊNCIA.....	34
3.2 ANIMAIS.....	34
3.3 REAGENTES	35
3.4 SOLUÇÕES.....	35
3.5 AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA BIOLÓGICA.....	37

3.5.1	Preparo das soluções para inoculação nos animais.....	37
3.5.2	Inoculação.....	38
3.5.3	Coleta de sangue.....	39
3.5.4	Processamento do sangue.....	39
3.5.5	Contagem de reticulócitos.....	40
3.5.6	Cálculo da estimativa de potência e avaliação do ensaio.....	40
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	41
3.6.1	Análise exploratória.....	42
3.6.2	Padronização da metodologia de avaliação da potência de eritropoietina humana recombinante utilizando a linhagem SW.....	42
3.6.3	Avaliação da concordância dos valores de potência entre as linhagens SW e B6D2F1 testadas no INCQS.....	44
3.6.4	Comparação entre os resultados obtidos pelo INCQS e por um laboratório produtor de rhEPO nos testes de potência biológica realizados com as linhagens SW e B6D2F1.....	47
4	RESULTADOS.....	49
4.1	PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE POTÊNCIA UTILIZANDO A LINHAGEM SW.....	49
4.2	AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE AS POTÊNCIAS OBTIDAS COM AS LINHAGENS SWISS WEBSTER E B6D2F1.....	57
4.3	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELO INCQS E POR UM LABORATÓRIO PRODUTOR DE RHEPO, NOS TESTES DE POTÊNCIA BIOLÓGICA REALIZADOS COM AS LINHAGENS B6D2F1 E SW.....	71
5	DISCUSSÃO.....	82
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	90
6.1	CONCLUSÕES.....	90
6.2	PERSPECTIVAS.....	90
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERITROPOIESE

A eritropoiese é o processo natural de formação das células vermelhas do sangue, também conhecidas como hemácias ou eritrócitos. A diferenciação dessas células é feita a partir das células pluripotentes, através de etapas sucessivas, até atingir a maturação completa, que se verifica no eritrócito maduro.

Observa-se que nas fases iniciais da diferenciação formam-se células denominadas BFU-E (Unidades Formadoras de “Explosão” - eritróide, do inglês, *Burst-Forming Units - Erythroid*) e CFU-E (Unidades Formadoras de Colônia - eritróide do inglês, *Colony Forming Units - Eritroblastic*). Estas últimas correspondem às colônias de células que respondem à ação da eritropoietina (EPO) (LORENZI, 2006).

Resumidamente, a partir das CFU-E formam-se, por divisão mitótica, os proeritroblastos, o eritroblasto basófilo e o eritroblasto policromatófilo que se diferencia em eritroblasto ortocromático. Este não se divide e seu núcleo sofre o processo denominado cariorexe ou degeneração, onde há fragmentação do núcleo, ou ainda perdem o núcleo pelo processo de extrusão, ou seja, sua expulsão através do citoplasma, dando origem ao reticulócito. O reticulócito é um eritrócito grande e imaturo, jovem, rico em hemoglobina e com RNA ribossômico em variáveis quantidades em seu citoplasma (HOFFBRAND, 2006).

A maturação dos reticulócitos acontece na circulação, pois eles contêm restos de ácido ribonucleico, além de excesso de membrana citoplasmática que são retirados pelos macrófagos esplênicos. Após um tempo de maturação de aproximadamente cinco dias formam-se os eritrócitos maduros (LORENZI, 2006).

1.2 A ERITROPOIETINA HUMANA

Carnot e DeFlandre em 1906 postularam a existência de um fator humoral de regulação da eritropoiese, o qual denominaram hemopoietina, e que segundo estes autores era produzida em resposta a anemia. Esta afirmação não foi aceita, apesar de estar correta, devido a não comprovação experimental (ZANICHELLI, 1995; METCALF, 2008). As pesquisas continuaram e entre as décadas de 1940 e 1950 muitos experimentos com animais foram realizados gerando dados que reforçaram esta ideia e demonstraram que este fator humoral de regulação da formação de células vermelhas não só existia, como também estava presente em níveis altos no plasma e na urina de indivíduos anêmicos. Este regulador foi então chamado de eritropoietina - EPO - (PLZAK, 1955).

A EPO é um hormônio glicoproteico essencial à vida, que tem como função primordial a regulação da eritropoiese (SCHMIDT et al, 2003). Camundongos com deleções no gene da EPO ou do seu receptor (EPO-R) morrem devido à anemia ainda na vida intrauterina (WEISS, 2003).

Este hormônio é produzido no indivíduo adulto principalmente pelas células peritubulares fibroblásticas do interstício do córtex renal e também, em menor quantidade, por células hepáticas. No feto e em recém-natos é produzido no fígado (JACOBSON et al, 1957; FRIED, 1972; ZANJANI et al, 1981; KOURY et al, 1993; FISHER et al, 1996). A ausência ou diminuição deste hormônio na corrente sanguínea pode gerar anemia severa. Possui meia-vida de aproximadamente cinco horas, com uma taxa de produção em torno de 2 UI/Kg/dia (KAUSHANSKY; KIPPS, 2005).

A produção da EPO é constante; alguns fatores, tais como níveis de ferro, condição nutricional, condições ambientais, estados patológicos e fatores genéticos podem afetar os níveis de EPO circulante (ELLIOTT; PHAM; MACDOUGALL, 2008). Ela é regulada por um complexo sistema de retroalimentação, no qual sensores renais detectam alterações no nível de oxigênio sanguíneo (KAUSHANSKY; KIPPS, 2005; FRIED, 2009).

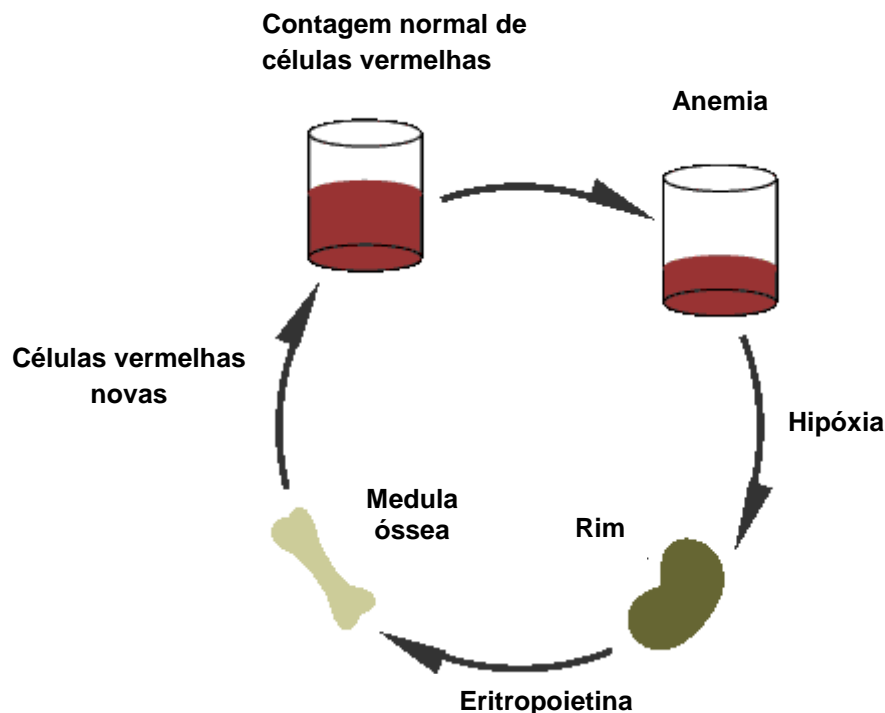
Nos rins, a hipóxia gera um aumento da expressão de EPO, estimulada pelo HIF-1, fator induzido por hipóxia (do inglês, *hypoxia inducible factor*), o qual medeia

a secreção da EPO bem como a regulação do seu receptor (EPO-R) (WEISS, 2003; WANG; SEMENZA, 1993).

A EPO é secretada no plasma e, ao chegar à medula óssea se liga a receptores específicos na superfície de células progenitoras eritróides, estimulando assim, a diferenciação das mesmas em hemácias (Figura 1). Ela atua como fator hormonal de estimulação mitótica e diferenciação, aumentando a formação de eritrócitos maduros a partir das células progenitoras eritróides (WEISS, 2003; FRIED, 2009).

Em 1990, estudos demonstraram que o EPO-R está expresso em vários tecidos não hematopoiéticos, como endotélio, células neurais e placenta (D'ANDREA; ZON, 1990; RIBATTI, 2008). Alguns estudos têm demonstrado ainda que a EPO apresenta atividade antiapoptótica (MINAMINO; KITAKAZE, 2006).

Figura 1 – Mecanismo de ação da EPO



Fonte: Adaptado de: <http://www.noblood.org/content/erythropoietin_-28epo-29-179#.UT54WRyE088>.

1.3 BIOFÁRMACOS

Em 1972 surgiu o que conhecemos hoje como tecnologia do DNA recombinante (rDNA). Nesta ocasião Berg utilizou, pela primeira vez, enzimas de restrição para cortar e reunir pedaços de DNA de espécies diferentes (MATTE, 1999). Alguns anos após, em 1977, a *E. coli* foi utilizada para clonar, um hormônio humano, a somatostatina.

Com a tecnologia do DNA recombinante uma indústria de biotecnologia, a Genentech[®], clonou e sintetizou, em bactérias manipuladas em laboratórios, a insulina humana. Quatro anos depois, ela já era comercializada (BERG; MERTZ, 2010).

Desde então, o avanço tecno-científico tem permitido o emprego industrial de micro-organismos ou células geneticamente modificadas com vistas à produção de proteínas de interesse em diversas áreas e, em especial, na saúde humana. Esta tecnologia permite reproduzir proteínas idênticas às naturais, bem como, elaborar outras totalmente novas, mediante alterações correspondentes à inserção de genes nestes micro-organismos ou células. Tais moléculas podem se revelar mais vantajosas do que as naturais para uma determinada função, podendo, por exemplo, apresentar maior atividade biológica, meia-vida mais apropriada ao uso terapêutico ou efeitos colaterais mais brandos.

Desde 1980 estes produtos baseados na tecnologia do DNA recombinante, têm sido produzidos e comercializados. No Brasil as principais aplicações desta tecnologia estão na produção de biofármacos¹, vacinas, reagentes para diagnósticos e hemoderivados (SOARES, 2005).

Neste contexto, em 2004 Brasil e Cuba assinaram um acordo para transferência de tecnologia na produção de biofármacos. Os produtos, que tiveram sua produção iniciada no Brasil, por Bio-Manguinhos, uma das unidades da Fiocruz, em 2006, são o Interferon alfa 2b humano recombinante e a Eritropoietina alfa humana recombinante. Assim, a Fiocruz passou a liderar o grupo nacional de

¹ Os biofármacos, que também são chamados de medicamentos biológicos, produtos biológicos ou ainda biomedicamentos, podem ser definidos como aqueles obtidos de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal, e de procedimentos biotecnológicos (BRASIL, 2010a).

detentores de tecnologia para a produção de biofármacos. A produção desses medicamentos proporciona uma economia de cerca de 40 milhões por ano ao país, além de estabelecer a inovação como pilar central de desenvolvimento tecnológico e a transformação do conhecimento científico em benefícios para a sociedade (FARDELONE; BRANCHI, 2006).

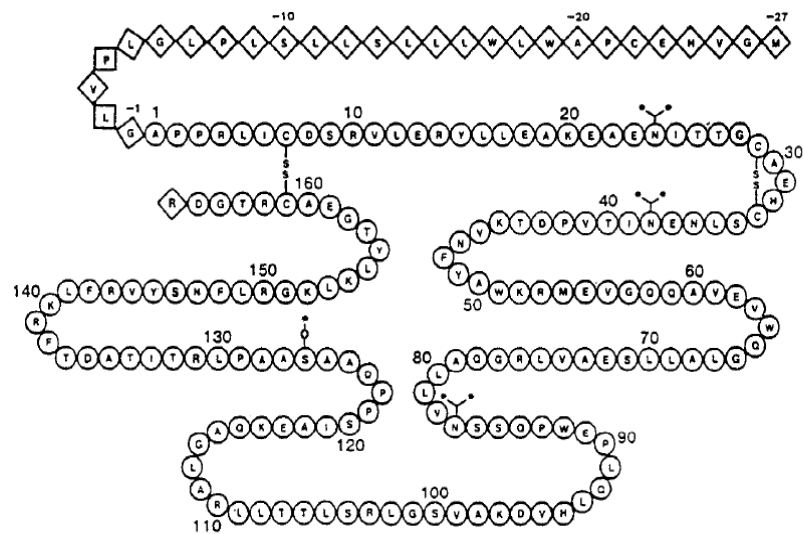
1.4 ERITROPOIETINA RECOMBINANTE HUMANA

Em 1977, a EPO foi extraída e purificada da urina de pacientes anêmicos. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante (rDNA), baseado na sequência de aminoácidos dos dados da purificação, o gene da EPO humana foi então clonado para obter a Eritropoietina Humana Recombinante (rhEPO), um avanço tecnológico que revolucionou o tratamento da anemia (MIYAKE; KUNG; GOLDWASSER, 1977; LIN et al, 1985).

A rhEPO é produzida em células CHO, ovário de hamster chinês, (do inglês, *Chinese Hamster Ovary*). Esta célula é amplamente utilizada, pois tem uma alta taxa de produção, é adequada para cultura em larga escala e a estrutura e composição das glicoproteínas são similares as dos seres humanos (WANG; SEMENZA, 1993), conferindo a rhEPO uma sequência de aminoácidos idêntica à da EPO endógena (MIYAKE; KUNG; GOLDWASSER, 1977; JACOBS et al, 1985).

A rhEPO é uma glicoproteína composta de 165 aminoácidos que formam cadeia polipeptídica com duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições (Cis⁷⁻¹⁶¹ e Cis²⁹⁻³³). Apresenta três sítios de glicosilação N-ligados (Asn²⁴, Asn³⁸ e Asn⁸³) que podem formar duas a quatro cadeias sialiladas, e uma O-ligada (Ser¹²⁶) com até dois resíduos (Figura 2). A rhEPO obtida por tecnologia rDNA pode conter até 14 ácidos siálicos, necessários para que o hormônio atinja os sítios alvo, evitando a rápida metabolização pelos receptores hepáticos que reconhecem as estruturas expostas de galactose, com posterior excreção. A massa molecular da estrutura glicosilada, que contém cerca de 40% de carboidratos, é de 30–34 kDa, e somente a da cadeia peptídica é de 18 kDa. A atividade específica deve ser maior ou igual a 100.000 UI/mg de proteína (GILD et al, 1996; SCHMIDT et al, 2003; COUNCIL OF EUROPE, 2011).

Figura 2 – Sequência de aminoácidos da rhEPO



Os círculos representam a sequência de 165 aminoácidos. Os losangos indicam a sequência de 27 aminoácidos iniciais, os quais são removidos após a transdução. Estão indicados as posições das pontes dissulfeto (S-S) e os sítios de glicosilação: três N-ligados (*Y) e um O-ligado (-o-).

Adaptado de GILD et al, 1996.

As eritropoietinas alfa e beta foram as primeiras rhEPO liberadas comercialmente para uso humano. Ambas são produzidas em células CHO, têm as menores diferenças estruturais em relação ao padrão de glicosilação, e os mesmos efeitos fisiológicos da EPO humana (WHO, 2010).

Alguns estudos demonstraram que as eritropoietinas alfa e beta, podem apresentar diferenças na composição das isoformas, resultando em alterações na sua farmacocinética e função (indução da produção de reticulócitos, por exemplo), o que possivelmente está associado à glicosilação (HALSTENSON et al, 1991; STORRING et al, 1998). Em contrapartida, estudos recentes afirmam que estas diferenças existem, mas não são significativas (SÖRGEL et al, 2009).

A rhEPO produzida em células BHK (linhagem contínua de células de rim de hamster neonato; do inglês, *Baby Hamster Kidney*) - a omega epoetina - tem padrão de glicosilação diferente, assim como a deltaepoetina, que é produzida em fibroblasto humano - HT1082 (WHO, 2010).

Alfaepoetina (Epogen[®] da Amgen) foi a primeira rhEPO comercializada nos Estados Unidos, seguida pela alfaepoetina (Eprex[®] da Ortho Biotech Products), no

ano de 1989 e posteriormente, a betaepoetina (NeoRecormon[®] da F.Hoffmann-LaRoche) em 1990 na Europa (ELLIOTT; PHAM; MACDOUGALL, 2008; WHO, 2010).

A patente das primeiras eritropoietinas disponíveis comercialmente começou a expirar em 2007, o que levou ao surgimento de eritropoietinas similares no mercado mundial, chamadas de biosimilares. Este fato causa preocupação aos órgãos regulatórios, sobretudo no que diz respeito à eficácia e segurança de tais produtos, uma vez que os mesmos não são idênticos aos originais (WHO, 2010; BRINKS et al, 2011).

1.5 NOVAS CLASSES DE rhEPOs

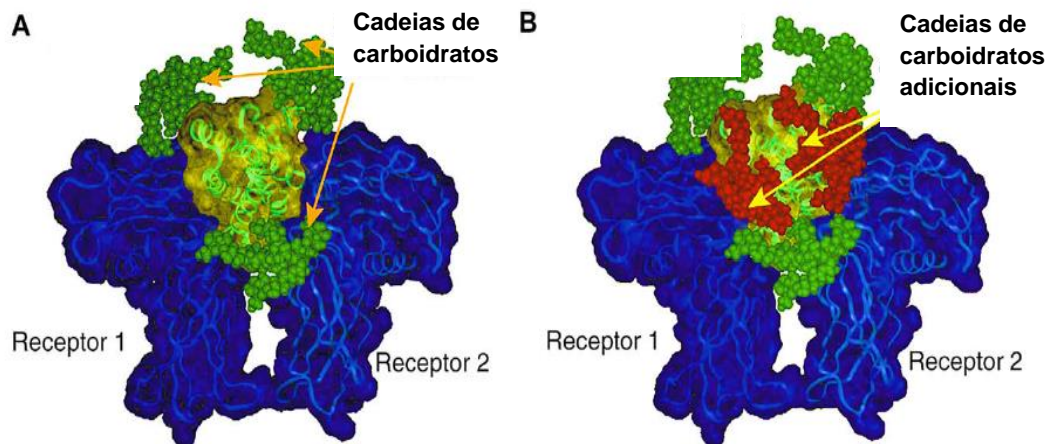
Pesquisas vêm sendo realizadas, seguindo diferentes abordagens, com o objetivo de estender a meia-vida da rhEPO, dentre elas estão: a adição de polietileno glicol (PEG), processo conhecido como peguilação e a adição de cadeias de carboidratos, conhecido como hiperglicosilação.

A EPO endógena e a recombinante, ambas apresentam heterogeneidade na estrutura de carboidratos com variação no conteúdo de ácido siálico, (acima de 14 resíduos). A importância do conteúdo de ácido siálico foi observada em experimentos com isoformas de rhEPO, revelando uma relação direta e positiva entre o conteúdo de ácido siálico e a potência *in vivo* (EGRIE; BROWNE, 2002).

As moléculas com o conteúdo de ácido siálico aumentado tiveram a afinidade pelo EPO-R reduzida e a meia-vida aumentada, sugerindo que a maior meia-vida, devido ao maior tempo de exposição, foi um determinante mais forte para a potência do que a afinidade pelo receptor. Consequentemente, a mistura de glicofomas foi importante para definir as propriedades biológicas de rhEPO. Esta observação também nos leva a pensar que a modificação da molécula de EPO, pela adição de mais cadeias de carboidratos e aumento do conteúdo de ácido siálico (> 14 resíduos), pode prolongar a meia-vida sérica e elevar a potência quando comparada a rhEPO convencional (EGRIE; BROWNE, 2002; ELLIOTT; PHAM; MACDOUGALL, 2008).

A alfadarbepoietina é um análogo hiperglicosilado que contém duas cadeias adicionais de carboidratos N-ligados nas posições 30 e 88 (Figura 3), como resultado de cinco substituições de aminoácidos (Ala30Asn, His32Thr, Pro87Val, Trp88Asn, Pro90Thr). Estudos demonstram que os carboidratos adicionais não interferiram diretamente na ligação com o receptor ou modificaram a estrutura e a estabilidade da molécula. A porção de carboidrato foi aumentada de 40% para 51%, e o peso molecular aproximado elevado de 30 kDa para 37 kDa. O número máximo de resíduos de ácido siálico aumentado de 14 para 22. Comparada com a alfaepoetina, a alfadarbepoietina teve a meia-vida três vezes mais longa, mais baixa afinidade de ligação com o receptor e melhor atividade *in vivo* em diferentes espécies (EGRIE; BROWNE, 2002; ELLIOTT et al, 2003; ELLIOTT; PHAM; MACDOUGALL, 2008).

Figura 3 – Estrutura molecular da rhEPO (A) e alfadarbepoietina (B)



Fonte: Adaptado de ELLIOTT; PHAM; MACDOUGALL, 2008.

A adição de PEG ou peguilação em regiões reativas de proteínas ou carboidratos, tanto em solução como em fase sólida, tem sido utilizada com sucesso para estender a meia-vida sérica de diferentes proteínas recombinantes. (WANG et al, 2010; PADULLÉS-ZAMORA et al, 2012).

Tem-se considerado que PEG é relativamente inerte e não imunogênico, sendo assim um material adequado para conjugação de proteínas terapêuticas. Moléculas de rhEPO peguiladas, via de regra, contém mistura de moléculas com

PEG ligado a diferentes aminas reativas, cada uma delas pode ter efeitos diferenciais na atividade e no envelopamento de proteínas (WANG et al, 2010).

A metoxipolietilenoglicol-epoetina beta da F. Hoffmann- La Roche Ltd., Basel, Suíça, foi aprovada, em 2007, nos Estados Unidos e na Europa. É um peguilado da betaepoetina. Parâmetros farmacocinéticos da metoxipolietilenoglicol-epoetina beta foram medidos em pacientes que receberam diálise peritoneal. A meia-vida média foi de 134 horas quando administrada por via intravenosa e 139 horas quando administrada por via subcutânea. A meia-vida dessa EPO permite sua administração uma vez por mês na fase de manutenção da terapia (MACDOUGALL et al, 2006; ELLIOTT; PHAM; MACDOUGALL, 2008; PADULLÉS-ZAMORA et al, 2012).

1.6 USO TERAPÊUTICO DA rhEPO

O primeiro relato de uso em humanos da rhEPO foi descrito por Winearls et al (1986) no Reino Unido e posteriormente por Eschbach et al (1987) nos Estados Unidos, ainda durante estudos clínicos. Em 1989 a primeira rhEPO foi aprovada nos Estados Unidos pelo *Food and Drug Administration* (FDA).

Antes do desenvolvimento da rhEPO, a transfusão de sangue era o mais comum tratamento para pacientes com anemia, contudo, desde o seu advento, a rhEPO vem sendo amplamente utilizada na prática clínica, para redução da necessidade de transfusão sanguínea em processos cirúrgicos (FARIS et al, 1996) e no tratamento de anemias de várias etiologias, incluindo anemia devido a doença renal crônica, anemia relacionada ao câncer ou ao tratamento do mesmo (RIZZO et al, 2001), anemia relacionada à utilização de zidovudina, utilizada para terapia de pacientes infectados pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) (SAAG et al, 2002) e anemia relacionada a utilização de ribavirina, utilizada para terapia de pacientes portadores de hepatite C (SOLKOWSKY et al, 2001).

A rhEPO também está indicada para pacientes oncológicos com malignidades de origem não mielóide, cuja anemia se deva diretamente ao efeito concomitante de quimioterapia administrada por no mínimo dois meses. A rhEPO está indicada neste grupo de pacientes para elevar ou manter o nível do hematócrito ou de

hemoglobina e, assim, reduzir o número de transfusões sanguíneas. Não está indicada para os casos de anemia grave que requeiram correção imediata. Este produto substitui a necessidade de tratamento com transfusão, mas não transfusão de emergência em qualquer que seja o caso. Também não é indicada para a correção da anemia, neste grupo particular de pacientes, quando esta for devida a outros fatores como a deficiência de folato, hemólise ou sangramento gastrointestinal (FRIED, 2009; BIO-MANGUINHOS, 2011).

Um fator de grande relevância, quando do uso da rhEPO, está a melhora da qualidade de vida, e de maneira geral a sobrevida, ocorrendo um decréscimo na sensação de fadiga. O uso da rhEPO permite normalizar o apetite de pacientes anêmicos e acelerar o seu retorno às atividades de rotina (AAPRO et al, 2006; GUAN; CHEN, 2008).

1.7 A rhEPO ALÉM DO TRATAMENTO DA ANEMIA

Existem estudos que avaliaram o uso de rhEPO em outras etiologias, sugerindo a interação da rhEPO com seu receptor, o qual tem sido identificado em células tumorais (FANDRY, 2008), e ainda que a rhEPO possa reagir com receptores em células endoteliais para estimular a angiogênese (RIBATTI et al, 2007), sugerindo funções não eritróides para a EPO.

Estudos recentes demonstram que o uso da rhEPO interfere com componentes do sistema imune induzindo efeitos em uma variedade de parâmetros e funções imunológicas, como por exemplo a normalização da proporção de células CD4:CD8 em pacientes com mieloma múltiplo, sugerindo assim uma função anti-mieloma (PRUTCHI-SAGIV et al, 2006).

Algumas investigações, com modelo animal canino, demonstraram que a administração de rhEPO antes ou logo depois do início da indução de isquemia, reduziu o tamanho do infarto no miocárdio (IM) (CALVILLO et al, 2003; MINAMINO; KITAKAZE, 2006).

Recentemente, Hirata et al (2005) demonstraram, em modelo animal, que a rhEPO aumenta a formação de células progenitoras endoteliais assim como a angiogênese em miocárdio isquêmico após o IM, enquanto melhora a função

cardíaca, sugerindo ainda que alguns potenciais mecanismos, pelos quais a EPO pode induzir a cardioproteção, seriam a redução da morte celular por apoptose; a angiogênese (pode contribuir para melhora da função cardíaca após o IM); e a prevenção do remodelamento em áreas não infartadas.

O potencial papel protetor da rhEPO para IM e seus efeitos benéficos têm sido observados independentemente da administração ter sido feita antes da isquemia, no início da isquemia ou na reperfusão (PATEL et al, 2011). Isto sugere que o tratamento com a EPO é efetivo tanto para a prevenção como para tratamento da isquemia.

A EPO é conhecida por ser o maior regulador da formação vascular, *i.e.*; angiogênese, e do crescimento de órgãos no embrião e o EPO-R tem sido encontrado em quase todos os tecidos embrionários. A rhEPO estimula a sobrevivência e a proliferação de células endoteliais *in vitro* e promove a formação de novos vasos sanguíneos (RIBATTI et al, 2007; RIBATTI, 2008).

O primeiro relato do efeito neuroprotetor da rhEPO, administrada por uma via periférica, foi dado por Brines et al (2000), que demonstraram, em um modelo de acidente vascular cerebral focal, uma significativa redução do volume do infarto quando da aplicação de uma alta dose de rhEPO (5000 UI/kg) injetada por via intraperitoneal até seis horas após a reperfusão.

A EPO e seu receptor estão presentes no sistema nervoso central. Em modelo *in vitro* a EPO protegeu as células neuronais contra a isquemia induzida pelo glutamato, o primeiro fator responsável pela morte dos neurônios relacionados à hipóxia (BUEMI et al, 2003; WEISS, 2003).

A rhEPO tem demonstrado efeito antioxidante (CHATTOPADHYAY et al, 2000). O exato mecanismo não está completamente elucidado, porém algumas hipóteses têm sido sugeridas. Uma delas é que a EPO apresenta ação antioxidante direta pela remoção de radicais livres (YANG et al, 2011).

1.8 RISCOS ASSOCIADOS AO USO DE rhEPO

Os principais efeitos colaterais relacionados ao uso da rhEPO são: aumento da hipertensão arterial, crises convulsivas, hiperemia conjuntival, eventos trombóticos e cefaleia (BIO-MANGUINHOS, 2011; ABENSUR, 2000).

A expressão da EPO e de seu receptor tem sido reconhecida em uma variedade de cânceres humanos, incluindo de mama, próstata, colo, ovário, útero, glioblastoma e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Testes *in vitro* e em modelos animais têm demonstrado que o EPO-R pode estar presente em uma gama de tumores e linhagens de células cancerosas (HARDEE et al, 2006; OSTERBORG et al, 2007).

A EPO não somente estimula a proliferação de células cancerosas e inibe a apoptose, como também estimula a migração e invasão dessas células. O completo entendimento da função do EPO-R em células tumorais ainda permanece ausente na literatura (HARDEE et al, 2006; GUAN; CHEN, 2008).

Outro ponto que merece atenção é o risco de trombose. De acordo com estudo baseado na revisão sistemática e triagem de 9.353 pacientes com câncer, o tratamento com epoetina ou alfadarbepoietina aumentou de forma significativa o risco de eventos tromboembólicos (BOHLIUS et al, 2006).

Apesar dos benefícios do uso da EPO, que são de grande importância, é preciso cautela quanto à sua aplicação clínica. Estudos clínicos demonstram que uma alta dose de EPO (40.000 – 60.000 UI por semana), administrada por via subcutânea, aumenta a incidência de eventos trombóticos como trombose venosa ou embolia pulmonar em pacientes com câncer de mama (MINAMINO; KITAKAZE, 2006). Isso demonstra a importância de se seguir as indicações autorizadas do uso da rhEPO, e ainda de alertar a comunidade esportiva sobre os riscos do *dopping* associado ao uso da rhEPO.

1.9 CONTROLE DA QUALIDADE DA rhEPO

Diante da gama de produtos disponíveis no mercado, da abrangência da indicação terapêutica e das características dos pacientes usuários de rhEPO, é de grande importância o efetivo controle da qualidade deste produto previamente ao seu ingresso no mercado.

O Ministério da Saúde (MS), em 2005, passou a fornecer produtos biológicos, dentre eles a rhEPO, por meio de acordo entre Brasil e Cuba, ficando a Fiocruz na liderança do grupo nacional de detentores da tecnologia para a produção de biofármacos (FARDELONE; BRANCHI, 2006). Desde 1983 o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) faz o controle da qualidade de produtos biológicos, entre eles soros hiperimunes e vacinas, utilizados no Programa Nacional de Imunização (PNI), sendo igualmente responsável pelo controle da qualidade de alguns biofármacos, *i.e.* rhEPO e Interferon alfa 2b humano recombinante, que são adquiridos pelo MS.

Dentre os ensaios preconizados nos compêndios oficiais e realizados pelo INCQS para o controle da qualidade da rhEPO (Tabela 1), estão: (i.) análise de protocolo resumido de produção e controle (PRPC); (ii.) potência biológica; (iii.) determinação de pH; (iv.) volume médio; (v.) identificação por *immunoblot*; (vi.) identificação por SDS-PAGE; (vii.) esterilidade e (viii.) endotoxina bacteriana.

Atualmente não existe monografia para rhEPO na Farmacopeia Brasileira, desta forma o compendio adotado como referência no Brasil é a Farmacopeia Europeia (*Ph. Eur.*).

Tabela 1 – Ensaio realizados no INCQS para o controle da qualidade da rhEPO

ENSAIO	VALOR DE REFERÊNCIA	FONTE
Análise de PRPC	De acordo com a norma oficial	Farmacopeia Europeia, 7.0-2011
Potência biológica	Entre 80 a 125% e limites de confiança entre 64 e 156% do rotulado	Farmacopeia Europeia, 7.0-2011
Determinação de pH	6,5 a 7,5	Dossiê do fabricante
Volume médio	Mínimo de 1,1 mL/frasco	Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, parte I, 1998
Identificação por Imunoblot	Reativo com reagente	Farmacopeia Europeia, 7.0, 2011
Identificação por SDS-PAGE	Conforme a faixa de peso molecular esperada	Farmacopeia Europeia, 7.0, 2011
Esterilidade	Ausência de bactérias e fungos contaminantes	Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, parte I, 1998
Endotoxina bacteriana	< 20 UI para um volume que contenha 100.000 UI de eritropoietina	Farmacopeia Europeia, 7.0, 2011

UI: Unidades Internacionais; PRPC: Protocolo Resumido de Produção e Controle

1.9.1 Avaliação da potência biológica para rhEPO

A potência biológica ou atividade biológica é definida como a habilidade específica ou capacidade do produto atingir um efeito biológico definido (BRASIL, 2010a); no caso da rhEPO a correção da anemia, *i.e.* a elevação do nível de hemoglobina e hematócrito. Esta é uma avaliação laboratorial de suma importância, uma vez que seu resultado está relacionado à eficácia do produto final. Assim, a avaliação da potência biológica é um dos ensaios preconizados pela *Ph. Eur.* em produtos contendo rhEPO para que os mesmos possam ser liberados para uso da população.

Os primeiros bioensaios *in vivo* preconizados para avaliação da potência biológica da rhEPO foram baseados na captação de Fe^{59} radioativo (METCALF, 2008). Atualmente, esta avaliação pode ser realizada por dois métodos distintos. Um método utiliza camundongos policitêmicos (método A) e outro utiliza camundongos normocitêmicos (método B) (COUNCIL OF EUROPE, 2011).

O método B tem sido o método de escolha, uma vez que o método A - em camundongos policitêmicos - causa maior sofrimento e estresse aos animais que devem ser mantidos por longos períodos em câmaras hipobáricas e expostos a radioisótopos (ECVAM, 2002).

Como resultado dessa escolha, diferentes linhagens de camundongos normocitêmicos têm sido testadas para a avaliação da potência de rhEPO, tais como CF1, Balb/c, Swiss webster, NIH, C57BL6, e B6D2F1 (ALBERTENGO et al, 1999; RAMOS et al, 2003; SCHMIDT et al, 2003; BARTH, 2008; COUNCIL OF EUROPE, 2011; SILVA, 2012).

Um trabalho experimental testou o uso da linhagem Swiss Webster (SW), na avaliação da rhEPO, sugerindo esta linhagem como alternativa válida à linhagem B6D2F1, preconizada pela *Ph Eur.* (LOPES, 2004). No entanto, por não ter seguido compêndio oficial e por não ter avaliado a concordância entre esta linhagem alternativa e a linhagem preconizada oficialmente – B6D2F1 – a linhagem SW não pôde até hoje ser utilizada para fins regulatórios.

Mais recentemente nosso grupo publicou um trabalho demonstrando a aplicabilidade da linhagem SW na avaliação da potência de rhEPO (COSTA et al,

2010). E Silva (2012) testou, dentre outras, a linhagem SW, demonstrando seu potencial como linhagem de escolha na avaliação da potência biológica de rhEPO.

1.9.2 As linhagens B6D2F1 e Swiss Webster

Atualmente, a classificação genética das espécies se baseia nos programas de acasalamento utilizados pelos centros de criação de animais de laboratório. Estes definem a forma de transmissão dos caracteres genéticos.

Animais *inbred* são também chamados de isogênicos por serem iguais geneticamente. Estes animais são obtidos a partir de cruzamentos entre irmãos ou pais e filhos (endocruzamentos). São necessárias pelo menos 20 gerações consecutivas em pares monogâmicos permanentes. Isto assegura um alto grau de consanguinidade (*inbreeding*), cerca de 99%. De modo geral, animais *inbred* são de porte menor, menos férteis e menos prolíficos (têm menor número de filhotes por ninhada) quando comparados com os animais *outbred* (ANDRADE, 2002; MGI, 2010).

Camundongos híbridos de primeira geração (F1) são produzidos através do cruzamento de duas linhagens de animais isogênicos que possuem alelos diferentes para uma determinada característica. Embora os híbridos sejam heterozigotos em um determinado *loci*, com uma diferença genética pontual, eles são semelhantes geneticamente às linhagens *inbred* e uniformes fenotipicamente. Enquanto as linhagens isogênicas apresentarem mesmo perfil genético e fenotípico nas matrizes de reprodutores, os híbridos podem ser repetidamente produzidos.

A linhagem B6D2F1 é um híbrido de primeira geração do cruzamento de duas linhagens *inbred*, (fêmea de C57BL/6 com o macho de DBA/2) (TACONIC, 2011) que como descrito acima, tem menor porte, menor número de filhotes por ninhada e menor fertilidade, quando comparada aos animais *outbred*. Camundongos híbridos de primeira geração (F1) têm como vantagens a uniformidade genética e fenotípica, a maior resistência a doenças e maior longevidade.

Animais *outbred* são também chamados animais heterogênicos. Este estado de alta heterozigose (99%) deve ser conhecido e mantido. São animais de constituição genética variada, por serem obtidos através de cruzamentos aleatórios,

evitando que os animais em acasalamento sejam parentes próximos. Com isso, busca-se manter um baixíssimo grau de consanguinidade, cerca de 1% (UFF, 2011; MGI, 2010).

Para obter estes animais e manter este *status* genético, deve-se estabelecer métodos de acasalamento que evitem consanguinidade. Todos os acasalamentos devem acontecer ao mesmo tempo evitando sobreposição de gerações. Esses animais possuem grande variabilidade gênica, devido aos cruzamentos aleatórios, assim como ocorre com a espécie humana, ou seja, reproduzindo populações naturais (MGI, 2010; ANDRADE, 2002).

Vale ressaltar que a linhagem SW, *outbred*, é de fácil aquisição junto ao CECAL, sua criação é mais simples, é consagrada pelo uso e vem sendo utilizada há décadas em diferentes estudos, demonstrando sua aplicabilidade em pesquisas e testes de segurança de produtos.

Outro ponto importante é em relação do custo de obtenção dessas duas linhagens. Uma fêmea de seis semanas de idade da linhagem SW custa cerca de U\$5,20, o custo da linhagem B6D2F1 é de cerca de U\$25,40 (TACONIC, 2013). Se calcularmos o custo de um ensaio com 36 animais da linhagem SW, o valor por ensaio ficaria em torno de U\$187,20 (ou cerca de R\$374,40, considerando a cotação do dólar de R\$ 2,00). Já o custo do ensaio para a linhagem B6D2F1 ficaria em torno de U\$914,40, ou R\$1828,80.

1.9.3 Lotes analisados pelo INCQS

O INCQS recebe em média, anualmente, cerca de 130 lotes rhEPO para análise, o que corresponde à demanda do MS, por meio da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE). A avaliação da qualidade de lotes de rhEPO utilizados pelo MS teve início no Instituto no ano de 2007. Com base nos dados oriundos dos Sistemas de Gerenciamento de Amostras (SGA-web e SGA 2000) utilizados no INCQS e do Protocolo Resumido de Produção e Controle (PRPC) (Tabela 2), foi possível observar que no primeiro ano de análise foram recebidos 96 lotes. Nos anos seguintes, de 2008 a 2012 foram recebidos 136, 150, 144, 170 e 101 lotes, respectivamente, totalizando 797 lotes. Esse total de lotes

corresponde a aproximadamente 35 milhões de frascos de rhEPO liberados anualmente para consumo.

Considerando a forma de apresentação (2000 UI ou 4000 UI /frasco), a maioria dos lotes recebidos no período de 2007 a 2012 foi de 4000 UI/frasco. A apresentação de 2000 UI/frasco consistiu em cerca de 10% do total de lotes recebidos em todo o período de estudo.

Tabela 2 – Quantitativo de lotes recebidos no INCQS

Ano	Total de lotes	2000 UI	4000 UI
2007	96	27 (28%)	69 (72%)
2008	136	6 (4%)	130 (96%)
2009	150	16 (11%)	134 (89%)
2010	144	19 (13%)	125 (87%)
2011	170	18 (11%)	152 (89%)
2012	101	12 (12%)	89 (88%)
Soma	797	98 (12%)	699 (88%)

(%): percentual em relação ao total daquele ano.

1.10 SITUAÇÃO DA rhEPO NO BRASIL

O tratamento padrão para a anemia na doença renal crônica, atualmente, consiste na administração de agentes estimulantes da eritropoiese. Dentre estes, por ter uma melhor relação custo-benefício, a rhEPO, é o fármaco de escolha na terapêutica, inclusive no Brasil (GURGEL et al, 2012).

A rhEPO é um medicamento que faz parte do Componente Especializado de Assistência Farmacêutica, aprovado pela Portaria nº 2981 de 26/11/2009 do MS (BRASIL, 2009), como parte da Política Nacional de Assistência Farmacêutica. Para atender ao exposto nesta Portaria, o MS em parceria com a Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE) financia a compra deste medicamento,

com cofinanciamento pelas Secretarias Estaduais de Saúde. Estas também são responsáveis pela aquisição, distribuição e dispensação do medicamento ao usuário final, para garantir à população acesso gratuito a rhEPO.

Avaliando os protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas elaborados pelo MS, a rhEPO está indicada e tem sido prescrita para uso ambulatorial e hospitalar, para casos de anemia na insuficiência renal crônica; hepatite C e transplante de intestino, medula ou pâncreas (BRASIL, 2010b).

Em consulta realizada no site da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) em 14/01/2013 (Tabela 3) observou-se a existência de três produtos registrados de três diferentes empresas, quando o termo busca foi “princípio ativo: eritropoietina humana recombinante”. Quatro produtos de quatro diferentes empresas quando o termo busca foi “princípio ativo: alfaepoetina” e dois produtos de uma mesma empresa quando o termo busca foi “princípio ativo: betaepoetina”. Esta consulta nos mostrou que temos um número considerável de diferentes empresas (sete) que detém tecnologia para produção de rhEPO, levando a uma gama de diferentes produtos (nove). E ainda com diferentes países fabricantes (oito), com produtos registrados em nosso país. Todas as buscas consideraram registros válidos, ou seja, dentro do prazo de vigência.

Ainda assim, esta quantidade de lotes não consegue atender plenamente aos pacientes, a maioria deles renais crônicos, que recebem a rhEPO através do SUS (Sistema Único de Saúde).

A Secretaria de Vigilância Sanitária publicou em seu *clipping*, que no Pará, segundo a Associação dos Renais Crônicos e Transplantados do Estado (ARCT-PA) os pacientes estariam com dificuldades para obter o medicamento eritropoietina. Segundo a ARCT-PA, o MS repassa 10 mil frascos com 4000 mg cada, no entanto existem 1.728 pacientes renais crônicos cadastrados que dependem da rhEPO e cada paciente recebe por mês 12 frascos de rhEPO com 4000 mg cada frasco, ou seja um quantitativo insuficiente para a demanda do Pará (BRASIL, 2011b).

Outro exemplo de desabastecimento ocorreu em Sumaré - São Paulo, onde pacientes protestaram contra a falta de rhEPO nas farmácias do SUS. A falta deste medicamento, como relatam os pacientes, pode agravar a situação de indivíduos que sofrem hemodiálise, uma vez que o mesmo ajuda a manter o quadro de saúde (BRASIL, 2011a).

Tabela 3 - Produtos contendo eritropoietina registrados na ANVISA

Princípio ativo	Produto	Empresa/CNPJ	Registro	Vencimento
eritropoietina humana recombinante	ALFAEPOETINA	Blau Farmacêutica S.A./ 58.430.828/0001-60	116370059	04/2015
	HEMAX ERITRON	Biosintética Farmacêutica LTDA/ 53.162.095/0001-06	112130049	05/2014
	ERITROPOIETINA A	Chron Epigen Indústria e Comércio LTDA/ 04.415.365/0001-38	156250002	08/2015
Alfaepoetina	ALFAEPOETINA	Fundação Oswaldo Cruz / 33.781.055/0001-35	110630110	04/2015
	EPREX	Janssen-Cilag Farmacêutica LTDA/ 51.780.468/0001-87	112363337	12/2015
	HEMOPREX	Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo LTDA/ 61.282.661/0001-41	106460119	10/2017
	ERITROMAX	Blau Farmacêutica S.A./ 58.430.828/0001-60	116370024	10/2014
Betaepoetina	RECORMON	Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A./ 33.009.945/0001-23	101000559	09/2016
	MIRCERA	Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A./ 33.009.945/0001-23	101000654	09/2013

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a concordância dos valores de potência entre as linhagens Swiss Webster e B6D2F1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a metodologia de avaliação da potência de eritropoietina humana recombinante utilizando a linhagem Swiss Webster.

- Comparar os resultados obtidos pelo INCQS e por um laboratório produtor de rhEPO, nos testes de potência biológica realizados com as linhagens B6D2F1 e Swiss Webster.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS TESTE E PADRÃO DE REFERÊNCIA

Foram utilizadas 22 amostras de rhEPO recebidas no INCQS para análise, com apresentação de 4000 UI/mL.

O Padrão de Referência de Trabalho utilizado foi o lote MRT(B)rhEPO/0208, contendo 3773 UI/mL, produzido pelo Centro de Imunologia Molecular de Cuba, envasado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos e validado por meio de estudo interlaboratorial frente ao Padrão Internacional, lote 2 da *Ph Eur*.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados em cada teste, 36 camundongos normocitêmicos de cada uma das linhagens Swiss Webster e B6D2F1, fêmeas com peso variando entre 16 a 18 g provenientes do CECAL/Fiocruz (Centro de Criação de Animais de Laboratório).

Após o recebimento, os animais foram pesados e avaliados quanto ao sexo e estado de saúde geral. Os animais permaneceram em aclimatação por um período de 24 horas, no mínimo, antes de cada ensaio. Foi oferecido aos animais, água e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro alternados, com 12 horas cada, temperatura variando de 21 ± 2 °C e $55 \pm 10\%$ de umidade do ar.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ, com licença de número LW-14/11.

3.3 REAGENTES

Os reagentes azul de metileno; citrato de sódio; cloreto de sódio e fosfato de sódio dibásico foram adquiridos da Merck[®]; a soro albumina bovina fração V, da Sigma[®]; a heparina da Eurofarma[®]; a Cellmlise III - Solução hemolisante a base de amônio quaternário, da CELM[®] e a solução oftálmica anestésica local a base de Oxybuprocaina da Latinofarma[®]. Todos os reagentes foram de alta pureza e estavam disponíveis comercialmente.

3.4 SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas conforme segue:

- tampão com albumina 0,1%, pH 7,2

fosfato dissódico..... 1,075 g
cloreto de sódio0,76 g
albumina bovina 0,1g
água destilada q.s.p.....100 mL

- solução salina 0,9% P/V

cloreto de sódio.....9 g
água destilada q.s.p.....1000 mL

- citrato de sódio 3,8% P/V

citrato de sódio 2 H₂O 0,38 g

água destilada q.s.p. 10 mL

- azul de metileno 2,4% P/V

azul de metileno..... 0,12 g

solução salina 0,9%5 mL

- solução corante azul de metileno

citrato de sódio 3,8%.....10 mL

azul de metileno 2,4% P/V.....5 mL

- solução hemolisante 4,4% V/V

CellmLise III120 µL

solução salina 0,9%.....2580 µL

3.5 AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA BIOLÓGICA

Foram realizados 22 ensaios para a avaliação da potência biológica de rhEPO utilizando cada uma das linhagens SW e B6D2F1, conforme metodologia descrita em Council of Europe (2011), método B e POP 65.3430.042 (INCQS, 2012). Este método tem como base a medida do estímulo da produção de reticulócitos após a injeção de rhEPO, sem qualquer exposição prévia.

O ensaio foi realizado com desenho de blocos ao acaso, onde os animais são distribuídos de forma randômica. O tratamento dos animais foi por via subcutânea com as doses de 30, 90 e 270 UI/0,2 mL. Foram inoculados animais com a amostra teste e animais com padrão de referência, sendo seis animais representantes de cada dose, totalizando 36 animais em cada teste.

Após um período de 72 ou 96 horas, para a SW e B6D2F1, respectivamente, foi realizada a coleta de sangue por via plexo orbital com o auxílio de pipetas Pasteur heparinizadas com heparina Eurofarma[®], sob anestesia local, com anestésico a base de Oxybuprocaina da Latinofarma[®]. O sangue coletado foi transferido para tubos tipo *safe lock* e mantido sob refrigeração (banho de gelo, com temperatura, aproximadamente, entre 4 a 8 °C) até o momento do seu processamento, que foi feito logo após a coleta. Tal processamento, descrito em detalhe nos item 3.5.4 e 3.5.5, consta da indução da hemólise seletiva com hemolisante e coloração do material genético dos reticulócitos com corante vital azul de metileno. Posteriormente, tais células foram contadas em hemocítômetro (câmara de Neubauer).

3.5.1 Preparo das soluções para inoculação nos animais

As soluções do padrão e da amostra em teste foram preparadas em tubos de ensaio 13x100 mm identificados, de forma a se obter três doses para cada preparação, padrão (P) e amostra (A), em razão constante entre as doses (Tabela 4).

Tabela 4 – Preparo das soluções para inoculação nos animais - padrão MRT(B)rhEPO/0208 (A); amostra 4000 UI (B)

(A)

MRT(B)rhEPO/0208 (3773 UI/mL)		
SOLUÇÃO	PADRÃO	TAMPÃO
30 UI /0,2 mL	80 µL	1920 µL
90 UI/0,2 mL	239 µL	1771 µL
270 UI/0,2 mL	716 µL	1284 µL

(B)

rhEPO – amostra 4000 UI/mL		
SOLUÇÃO	AMOSTRA	TAMPÃO
30 UI /0,2 mL	75 µL	1925 µL
90 UI/0,2 mL	225 µL	1775 µL
270 UI/0,2 mL	675 µL	1325

MRT(B)rhEPO/0208: padrão; rhEPO: eritropoietina humana recombinante; UI: Unidades Internacionais

3.5.2 Inoculação

Foi inoculado em cada animal, com seringas BD *Ultra fine II*TM de 1 mL, por via subcutânea, 0,2 mL de cada solução. Após a administração, cada animal foi identificado individualmente e colocado em uma nova caixa. Os animais foram combinados de tal maneira que cada nova caixa contivesse um representante de cada dose, ou seja, um camundongo administrado com 30 UI, 90 UI e 270 UI/0,2 mL, tanto do padrão quanto da amostra. Foram inoculados seis animais de cada dose, distribuídos em seis caixas, totalizando 36 animais.

3.5.3 Coleta de sangue

Após, aproximadamente, 72 ou 96 horas, para a linhagem SW e B6D2F1, respectivamente, da administração das doses, foram coletadas amostras de sangue de cada animal pela via do plexo orbital, utilizando pipetas Pasteur heparinizadas (10 µL de heparina 5000 UI/mL). Todo o volume de sangue coletado foi transferido para um microtubo identificado de acordo com tratamento recebido pelos animais, homogeneizando-o cuidadosamente a seguir. O sangue coletado foi mantido em banho de gelo desde a coleta até seu processamento.

Realizou-se anestesia local com colírio anestésico para proceder à coleta a fim de minimizar o sofrimento animal. Para facilitar sua contenção física, o animal foi submetido à inalação por éter etílico.

3.5.4 Processamento do sangue

Após a coleta do sangue, foram preparadas duas séries de tubos identificados de acordo com tratamento recebido pelos animais.

Na 1ª série de tubos foi colocado 120 µL de solução corante azul de metileno e adicionados 40 µL de sangue, cada tubo foi homogeneizado suavemente e colocado em banho-maria Fanem[®], a 37 ± 1 °C por uma hora.

Após uma hora em banho-maria, foi adicionado 40 µL de solução hemolisante e homogeneizou-se por aproximadamente seis segundos em agitador de tubos, após, o tubo foi mantido em temperatura ambiente (18 a 25 °C) por aproximadamente três minutos. Este ciclo de homogeneização e descanso foi realizado mais uma vez. Depois foram retirados 10 µL, os quais foram transferidos para os tubos da 2ª série que já continham 1,960 mL de solução salina, homogeneizou-se em agitador de tubos. Este procedimento foi repetido para todos os tubos.

3.5.5 Contagem de reticulócitos

Para realizar a contagem dos reticulócitos retirou-se 10 μ L da solução do tubo da 2.^a série e passou-se para câmara de Neubauer, após o período de sedimentação de aproximadamente cinco minutos, as câmaras foram levadas ao microscópio ótico com ocular 10X e objetiva seca de 40X.

Os reticulócitos foram contados nos quadrantes da câmara de Neubauer destinados à contagem de hemácias, levando-se em consideração os reticulócitos presentes nos 25 quadrantes.

3.5.6 Cálculo da estimativa de potência e avaliação do ensaio

O cálculo foi realizado utilizando o método de linhas paralelas, ensaio 3+3 doses, com delineamento de blocos ao acaso para avaliar a validade do ensaio e para o cálculo da estimativa de potência. Para tal, utilizou-se o programa computacional CombiStats[®] (EDQM, 2012), desenvolvido segundo o capítulo 5.3 da *Ph. Eur.* (COUNCIL OF EUROPE, 2012), o qual foi alimentado com os dados da contagem dos reticulócitos.

O ensaio foi considerado válido quando atendeu aos critérios de validade, que são regressão linear, paralelismo e linearidade, onde:

regressão linear: deve ser significativa, ou seja, a probabilidade calculada deve ser menor que 0,05;

linearidade: não deve ser significativa, ou seja, a probabilidade calculada deve ser maior ou igual a 0,05;

paralelismo: não deve ser significativo, ou seja, a probabilidade calculada deve ser maior ou igual a 0,05;

A amostra foi considerada satisfatória quando o ensaio foi válido e a estimativa da potência estava entre 80% e 125% e os limites fiduciais entre 64% e 156% da potência declarada.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados resultantes dos ensaios realizados foram agrupados da seguinte forma:

- (i) Resultados de potência obtidos com a utilização da linhagem SW pelo INCQS - Grupo A1 (n=22);
- (ii) Resultados de potência obtidos com a linhagem B6D2F1 pelo INCQS - Grupo A2 (n=22). Este grupo de dados está contido no grupo B1, foi separado para fins de comparação com o grupo A1;
- (iii) Resultados de potência obtidos com a linhagem B6D2F1 pelo produtor (dados do protocolo resumido de produção e controle) Grupo A3 (n=22). Este grupo de dados está contido no grupo B2, foi separado para fins de comparação com o grupo A1;
- (iv) Resultados de potência obtidos com a utilização da linhagem B6D2F1 pelo INCQS - Grupo B1 (n=49);
- (v) Resultados de potência obtidos com a utilização da linhagem B6D2F1 pelo produtor (dados do protocolo resumido de produção e controle) - Grupo B2 (n=49);

Na tabela 5 estão esquematizadas as comparações realizadas.

Tabela 5 – Comparações realizadas entre os grupos de dados

Grupos	A1	B1
A2	X (n=22)	
B2		X (n=49)
A3	X (n=22)	

3.6.1 Análise exploratória

Os dados foram submetidos a uma análise exploratória, utilizando o programa GraphPad Prism[®], com a determinação de médias, desvio padrão (DP) e ajuste dos dados à distribuição normal (teste de Kolmogorov Smirnov - KS).

3.6.2 Padronização da metodologia de avaliação da potência de eritropoietina humana recombinante utilizando a linhagem SW

Segundo Fitzgerald et al (1978), a variabilidade dos ensaios *in vivo* é bem conhecida e pode ser medida através da inclusão de um padrão de referência a cada ensaio realizado.

Visando demonstrar que o método está padronizado e sob controle, (*i.e.*, sua variabilidade é aceitável, está estabelecida e só resulta de causas aleatórias) foram calculados e/ou avaliados os seguintes parâmetros:

- a) O coeficiente de variação (CV%) e a média das contagens do padrão MRT(B)rhEPO/0208 (grupo A1) foram introduzidos no programa de computador SPC Explorer RT[®] (Quality America Inc.; EUA)² que determina a média, o limite de alerta (± 2 DP) e de controle (± 3 DP). Os gráficos foram avaliados de acordo com os critérios descritos na tabela 6. Com o CV% foi possível avaliar a precisão intra-ensaio.
- b) Se a função de resposta do ensaio (relação entre a resposta instrumental e a dose) apresenta uma relação linear. Os dados da contagem de reticulócitos do padrão na linhagem SW (grupo A1) foram avaliados através da regressão linear logaritmo-logaritmo.
- c) As Dose Efetiva 50 (DE₅₀) do padrão MRT(B)rhEPO/0208 obtidas a cada ensaio com o grupo A1 (n=22), submetidas a uma transformação logarítmica foram:

² SPC: Este programa, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), permite a construção de gráficos de controle para avaliação e acompanhamento de ensaios por meio da aplicação de testes de desempenho.

- Introduzidas no programa de computador GraphPad Prism[®] para avaliar o ajuste à distribuição normal pelo método de KS;
- Uma vez constatada a normalidade dos resultados o gráfico de controle foi obtido com estes valores;
- Avaliada a precisão inter-ensaios da técnica utilizando os mesmos valores (logaritmo das DE₅₀), calculando o Coeficiente de Variação geométrico (gCV%) utilizando a equação 1.

Equação 1

$$gCV\% = 100 \cdot (10^\sigma - 1)\%$$

Onde:

σ = Desvio padrão

d) O ER% também foi calculado.

A DE₅₀ é a dose que causa 50% do efeito esperado (*i.e.* aumento na contagem de reticulócitos em relação ao padrão) nos animais inoculados com rhEPO. É calculada através da aplicação do teste estatístico de análise de linhas paralelas, utilizando-se o programa de análise estatística de ensaios biológicos CombiStats[®] (EDQM, 2012).

As DE₅₀ do padrão (MRT(B)rhEPO/0208) devem estar situadas entre a menor e a maior dose aplicadas aos animais.

Tabela 6 – Testes de desempenho e interpretação dos gráficos de controle do programa *SPC Explorer RT®*

Testes	1 ponto além de 3 DP (99%)	9 pontos consecutivos no mesmo lado da linha média	6 pontos consecutivos aumentando ou diminuindo	2 entre 3 pontos além de 2 DP (97,5%)
Interpretação	A média do processo se alterou	A média do processo se alterou	A média do processo se alterou (tendência)	A média do processo se alterou
Ações	Ensaio inválido Novo teste	Aumentar supervisão	Aumentar supervisão	Aumentar supervisão

DP: desvio padrão
Adaptado de INCQS, 2008.

3.6.3 Avaliação da concordância dos valores de potência entre as linhagens SW e B6D2F1 testadas no INCQS

A concordância entre os resultados utilizando as duas linhagens (grupos A1 e A2) foi avaliada através de: análise de variância, teste qui-quadrado, gráfico Bland-Altman e regra 4-6-30% com erro relativo e coeficiente de variação.

(i) Análise de variância

Os resultados foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) para avaliar se houve variabilidade significativamente maior das variâncias entre grupos ou dentro dos grupos sobre a variação total do método.

Quando F calculado foi menor que o F crítico, considerou-se que os grupos não diferiram significativamente.

(ii) Teste qui-quadrado

A concordância entre os resultados dos diferentes grupos (A1xA2) foi avaliada, utilizando o programa CombiStats[®] (EDQM, 2012), através do teste qui-quadrado para determinar a homogeneidade entre os dados utilizando os intervalos de confiança da potência como fator de ponderação, com $\alpha = 0,05$. Quando o valor calculado no teste qui-quadrado foi maior do que o valor tabulado, as potências foram consideradas heterogêneas, o que foi demonstrado pela obtenção de $p < 0,05$. Isto significa que a variação entre as estimativas individuais foram maiores do que havia sido previsto a partir das estimativas dos limites de confiança, isto é, que existe uma variabilidade significativa entre os ensaios (COUNCIL OF EUROPE, 2012).

(iii) Gráfico de Bland-Altman

Os gráficos Bland-Altman foram confeccionados utilizando o programa GraphPad Prism[®]. Este programa calcula a média, a diferença entre cada par de dados, o viés/tendência (*bias*) e os Limites de Concordância (LC).

É esperado que as diferenças plotadas contra as médias estejam dentro do LC calculado.

Segundo Bland e Altman (1986), medir as diferenças entre dois métodos para cada amostra e testá-las contra as médias é a melhor maneira de avaliar a relação entre os métodos. A dispersão das diferenças ao longo da linha zero é uma indicação da concordância entre os dois métodos (BLAND; ALTMAN, 1986).

(iv) Regra 4-6-30% com Erro Relativo e Coeficiente de Variação

Os critérios de aceitação para a validação de ensaios do *Food and Drug Administration* (FDA, 2001) preconizam que pelo menos 66,7% (4 em 6 resultados) das amostras de controle da qualidade estejam entre 15% do seu valor nominal, porém, em certas circunstâncias, critérios de aceitação mais amplos podem ser justificáveis. Este critério ficou conhecido como a regra 4-6-15 (HOFFMAN; KRINGLE, 2007).

Bioensaios normalmente usados para estimar a potência de drogas podem ser distinguidos de testes químicos por serem realizados em substratos biológicos (e.g. animais, células vivas, ou complexos funcionais de receptores alvo), e desta forma, devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos advindos da base biológica, eles tipicamente exibem uma maior variabilidade do que os testes baseados em química (USP, 2012). Assim, foi avaliada a proporção de Erro Relativo (ER) de resultados de potência obtidos nas duas linhagens utilizadas no estudo, que se apresentou dentro do intervalo esperado para Tendência de $\pm 30\%$, visando determinar se o ensaio obedece ao critério de aceitação 4-6-n%, como descrito pelo FDA (2001), adotando o ER máximo aceito de 30% (4-6-30). Desta forma o método utilizando a linhagem SW será considerado satisfatório se pelo menos 4 (66,7%) em 6 ensaios apresentarem resultados dentro da faixa de $\pm 30\%$.

Para calcular as Tendências (do termo inglês *bias*, diferença entre a expectativa de resultado de um teste ou medição e um valor verdadeiro, ISO, 2006) entre os resultados obtidos pelas duas linhagens, os valores de potência em percentagem obtidos com a linhagem B6D2F1, foram considerados como o valor verdadeiro e a diferença entre os valores percentuais destes resultados com os da linhagem SW, para cada par de resultados, foram considerados como o ER, sendo também calculados os coeficientes de variação (CV%) para cada par de resultados dos grupos A1 e A2.

A Veracidade (do termo inglês *trueness*, grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidamente e um valor de referência) expressa como Erro Relativo percentual (ER%) foi calculada utilizando a equação 2,

também utilizando os dados dos grupos A1 e A2. Neste caso, a potência nominal foi considerada como 100%.

Equação 2.

$$ER\% = 100 \cdot \left(\frac{\mu - \mu_T}{\mu_T} \right)$$

Onde:

ER% = Erro Relativo percentual

μ = média dos resultados obtidos

μ_T = Potência nominal

As Tendências e os CV% foram introduzidos em gráficos, a percentagem de valores dentre os limites de aceitação ($\pm 30\%$) foram também calculados.

3.6.4 Comparação entre os resultados obtidos pelo INCQS e por um laboratório produtor de rhEPO nos testes de potência biológica realizados com as linhagens SW e B6D2F1

Uma vez que não foi realizado um estudo colaborativo convencional onde as mesmas amostras seriam analisadas em uma matriz de ensaios, nos dois laboratórios, como uma etapa adicional na avaliação do método, foi adotada uma abordagem prática na determinação da reprodutibilidade (ou precisão entre laboratórios).

Os resultados de potência, de 49 lotes de um mesmo laboratório produtor (grupo B2) e obtidos pelo INCQS (grupo B1), utilizando a linhagem B6D2F1 foram comparados por meio da determinação da variação média entre os resultados dos dois laboratórios para as diferentes amostras testadas. Isto foi realizado calculando a média das variâncias entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelo produtor para determinação do Coeficiente de Variação de reprodutibilidade percentual ($CV_R\%$). O mesmo critério de aceitação de 30% de variação máxima entre os resultados dos dois laboratórios foi usado.

Foi calculado o ER, realizado o teste ANOVA fator único e foi aplicado o método de Bland-Altman.

Estas mesmas abordagens foram aplicadas para comparar a potência entre a linhagem SW do INCQS e B6D2F1 do produtor nos grupos A1 e A3 (n=22).

O teste do qui-quadrado, conforme descrito no item 3.7.3, também foi aplicado nos grupos B1 e B2 para avaliar a homogeneidade entre os grupos.

4 RESULTADOS

Todos os ensaios foram considerados válidos e satisfatórios, pois cumpriram com os critérios de regressão, linearidade e paralelismo. Os resultados se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pela *Ph. Eur.* (COUNCIL OF EUROPE, 2011), *i.e* a estimativa da potência estava entre 80% e 125% e os limites fiduciais da estimativa de potência entre 64% e 156%.

Na avaliação dos dados quanto ao ajuste à distribuição normal ($\alpha = 0,05$) o valor *p* foi maior que 0,05 em todos os grupos (A1, A2, A3, B1 e B2), ou seja, não existe evidência estatística que comprove que a distribuição de dados não é normal pelo teste de KS.

4.1 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE POTÊNCIA UTILIZANDO A LINHAGEM SWISS WEBSTER

Foram testadas 22 amostras comerciais de rhEPO, recebidas no INCQS para análise, frente ao padrão MRT(B)rhEPO/0208, na linhagem Swiss Webster (SW)

A tabela 7 apresenta os resultados de potência para cada amostra testada no INCQS utilizando a linhagem SW (grupo A1).

Os valores de potência para a linhagem SW variaram de 80 a 113%, e limites entre 70 e 129%. A média dos valores de potência para as 22 amostras testadas foi de 92,77%, com uma veracidade (expressa pelo ER%) de -7,23%.

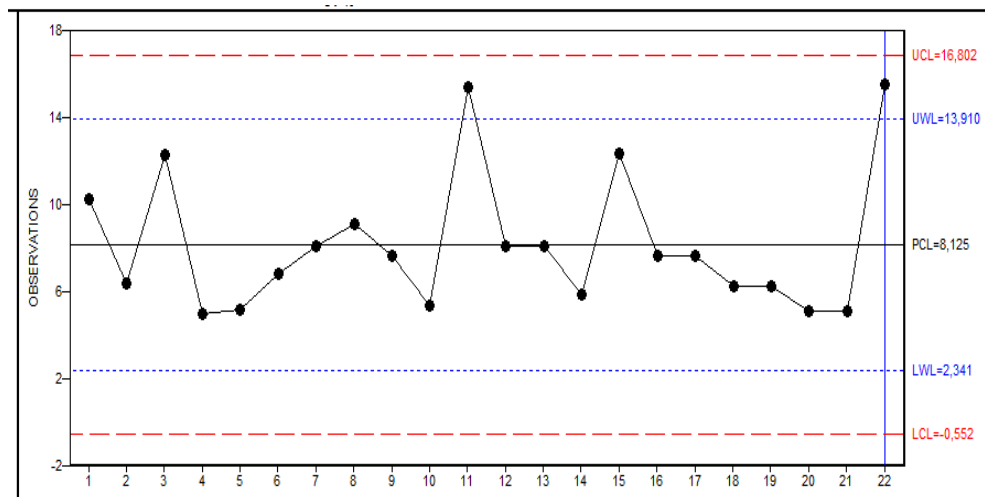
Tabela 7 - Valores de potência e limites de confiança obtidos para 22 amostras de rhEPO testadas no INCQS utilizando a linhagem SW (grupo A1)

Grupo A1			
Amostra	Pot (%)	LI (%)	LS (%)
1	92	72	116
2	98	85	112
3	88	76	102
4	83	73	95
5	80	70	91
6	113	99	129
7	96	76	121
8	94	80	109
9	90	78	103
10	98	90	106
11	94	73	121
12	102	91	114
13	110	97	126
14	86	74	101
15	92	81	104
16	81	71	93
17	98	85	113
18	85	71	102
19	87	74	101
20	93	82	106
21	88	77	101
22	93	78	110
μ	92,77		
ER%	-7,23		

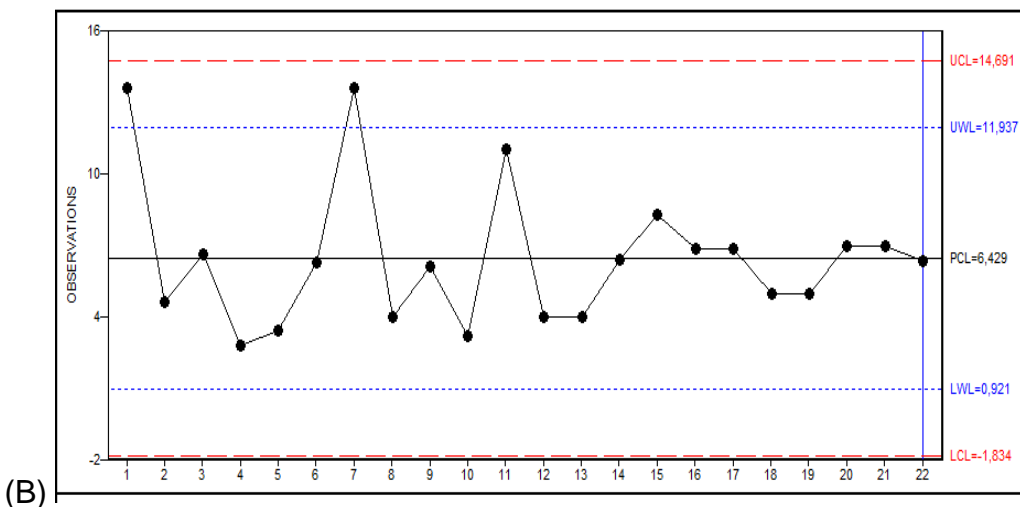
Pot: Potência; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior; μ : média dos resultados obtidos; ER%: Erro Relativo%

Visando demonstrar que a técnica está padronizada e sob controle, os CV% das contagens de reticulócitos do padrão MRT(B)rhEPO/0208, para cada uma das doses (30, 90 e 270 UI/animal), foram introduzidos no programa de computador SPC® e estão demonstrados no gráfico 1. Para a dose 30UI a média do CV foi de 8,125%, para a dose 90 UI foi de 6,429% e para a de 270 UI de 5,041%. Na dose 270 UI o primeiro ponto ficou acima do Limite Superior de Controle (LSC), que pode ser visto pelo alerta mostrado (círculo ao redor do ponto).

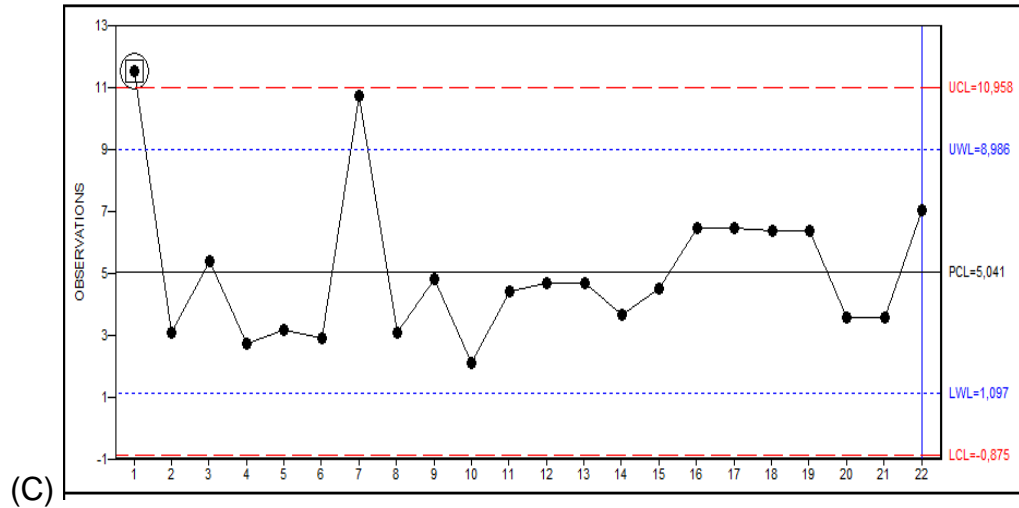
Gráfico 1 - CV% das contagens de reticulócitos da linhagem SW (grupo A1) para o padrão MRT(B)rhEPO/0208 nas doses: 30 (A), 90 (B) e 270 UI (C)



(A)



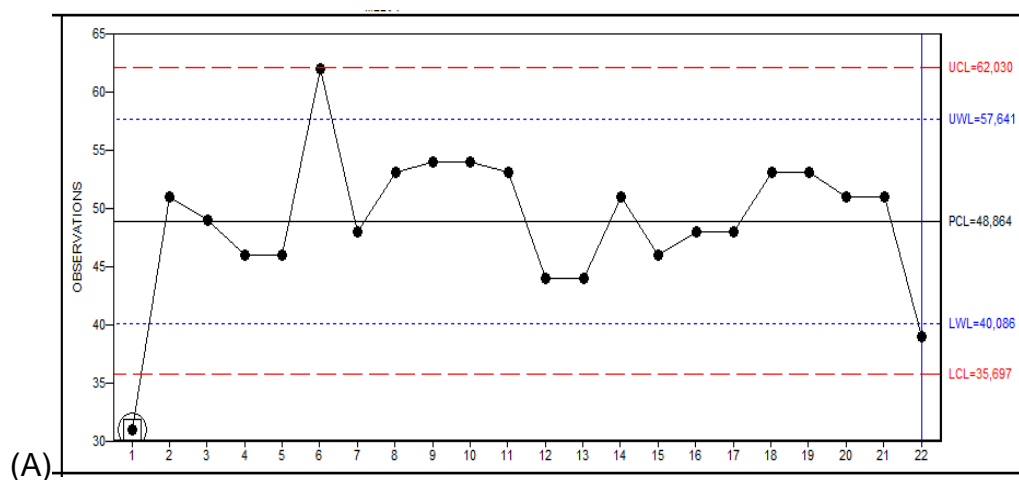
(B)

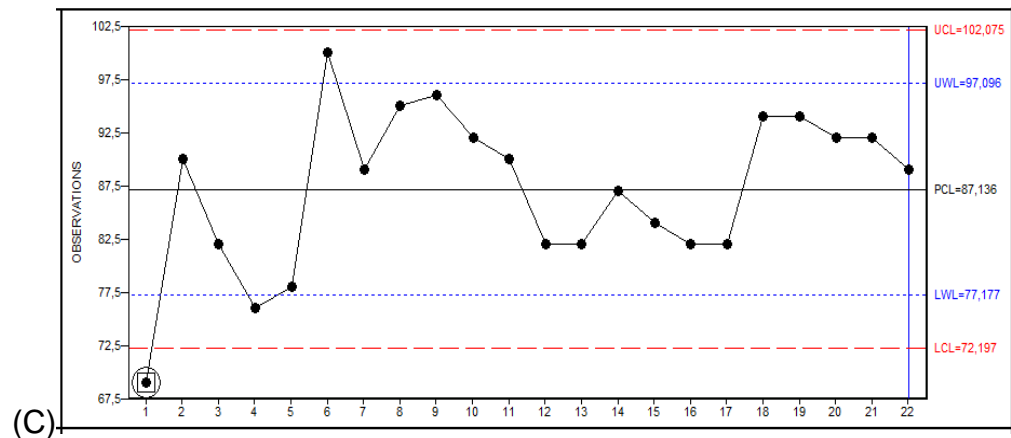
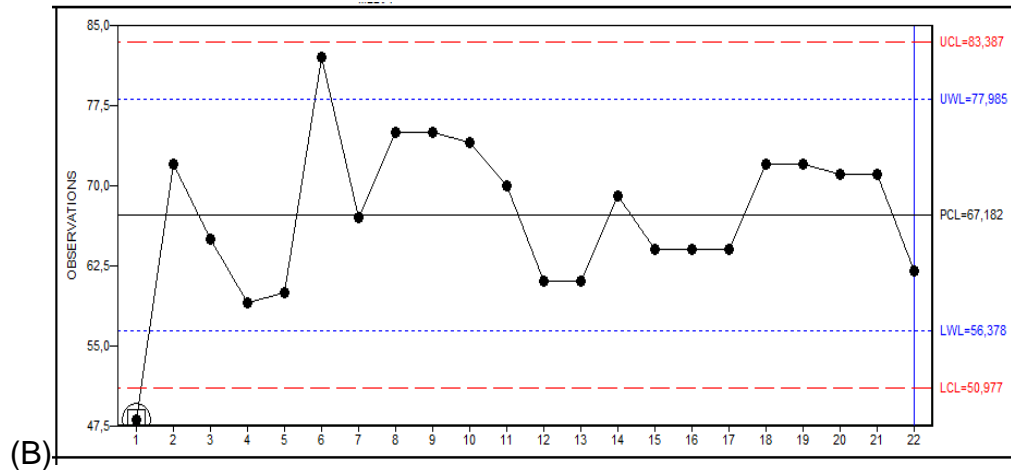


--- LSA (UWL): Limite Superior de Alerta; --- LIA (LWL): Limite Inferior de Alerta; -- LSC (UCL): Limite Superior de Controle; -- LIC (LCL): Limite Inferior de Controle; — média (PCL)

A média das contagens de reticulócitos do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem SW (grupo A1), foi introduzida no programa SPC (Gráfico 2). Na dose 30UI a média foi 48,864, na dose 90 UI foi de 67,182 e na de 270 foi 87,136. Nas três doses testadas o primeiro valor ficou abaixo do Limite Inferior de Controle (LIC), que pode ser visto por meio do alerta mostrado (círculo ao redor do ponto).

Gráfico 2 – Média das contagens (n=6) de reticulócitos do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem SW (grupo A1) nas doses: 30 (A), 90 (B) e 270 UI (C)





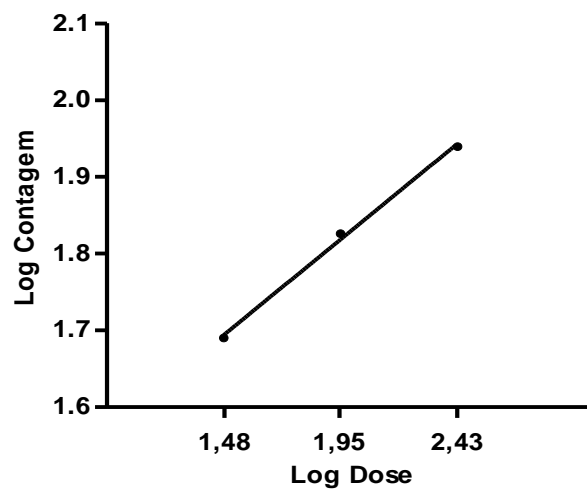
--- LSA (UWL): Limite Superior de Alerta; --- LIA (LWL): Limite Inferior de Alerta; -- LSC (UCL): Limite Superior de Controle; -- LIC (LCL): Limite Inferior de Controle; — média (PCL)

Com a finalidade de avaliar se a função de resposta (relação entre a resposta instrumental e a dose) do ensaio apresenta uma relação linear, os dados da contagem de reticulócitos do padrão na linhagem SW (grupo A1) foram avaliados através da regressão linear logaritmo-logaritmo. O gráfico 3 (A) apresenta a reta da média das contagens e (B) e os valores individuais de contagem obtidos em cada ensaio (n=22).

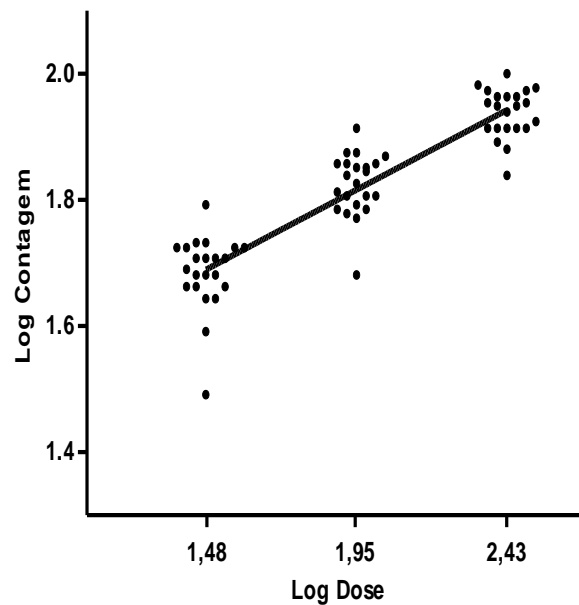
Considerando as médias, a equação que descreve a relação entre a dose e a resposta é: $y = 0,0888x + 0,9643$; com $R^2 = 0,9973$ ($p = 0,0330$). Não houve desvios significativos de linearidade ($p = 1$).

Considerando os valores individuais, a equação que descreve a relação entre a dose e a resposta é: $y = 0,2655x + 1,297$; com $R^2 = 0,8152$ ($p < 0,0001$). Não houve desvios significativos de linearidade ($p = 1$).

Gráfico 3 – Regressão linear para a linhagem SW (grupo A1) do padrão MRT(B)rhEPO/0208 - Média de cada dose (A); Valores individuais (B)



(A)



(B)

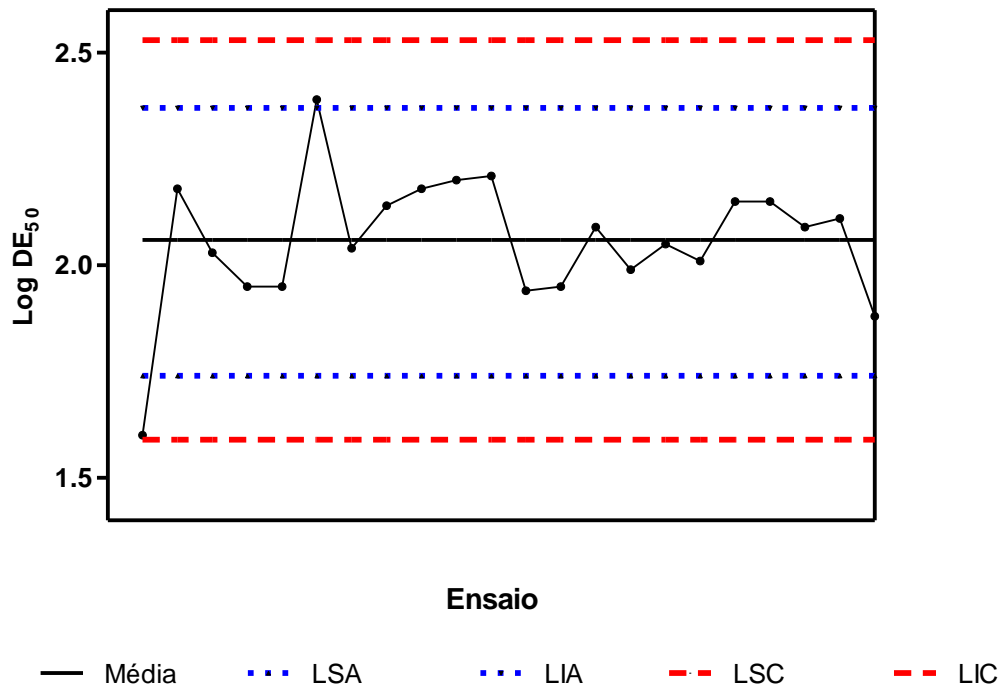
Também com a finalidade de avaliar se o ensaio estava sob controle, foi calculada a DE_{50} do padrão (MRT(B)rhEPO/0208) obtida na linhagem SW (grupo A1), conforme mostra a tabela 8. Todos os valores ficaram entre a menor e a maior dose aplicada nos animais (*i.e.* entre 30 a 270 UI/animal). Os resultados da DE_{50} em logaritmo foram introduzidos no programa de computador GraphPad Prism[®] (Gráfico 4). Apenas dois valores ficaram fora dos limites de alerta, um fora do Limite Inferior de Alerta (LIA) e um fora do Limite Superior de Alerta (LSA).

Visando avaliar a precisão inter-ensaios da técnica foi calculado o gCV% (Coeficiente de Variação geométrico) utilizando o logaritmo das DE_{50} obtidas com o padrão. O gCV% encontrado foi 14,34%. O KS maior que 0,05 ($> 0,1$) demonstra que os dados seguem uma distribuição normal.

Tabela 8 – DE₅₀ do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem SW (grupo A1)

SW (grupo A1)		
Amostra	DE₅₀	Log
1	39,82	1,60
2	151,36	2,18
3	106,38	2,03
4	89,31	1,95
5	88,35	1,95
6	247,15	2,39
7	110,00	2,04
8	139,12	2,14
9	150,44	2,18
10	159,23	2,20
11	160,50	2,21
12	86,50	1,94
13	88,52	1,95
14	124,25	2,09
15	97,13	1,99
16	111,45	2,05
17	101,16	2,01
18	142,17	2,15
19	141,82	2,15
20	122,87	2,09
21	129,15	2,11
22	76,27	1,88
gCV%		14,34%
KS		> 0,10

DE₅₀: dose efetiva 50; Log: Logaritmo; gCV%: Coeficiente de Variação geométrico; KS: Kolmogorov Smirnov

Gráfico 4 – DE₅₀ do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem SW (grupo A1)

LSA: Limite Superior de Alerta; LIA: Limite Inferior de Alerta; LSC: Limite Superior de Controle; LIC: Limite Inferior de Controle; Log: Logaritmo; DE₅₀: Dose Efetiva 50

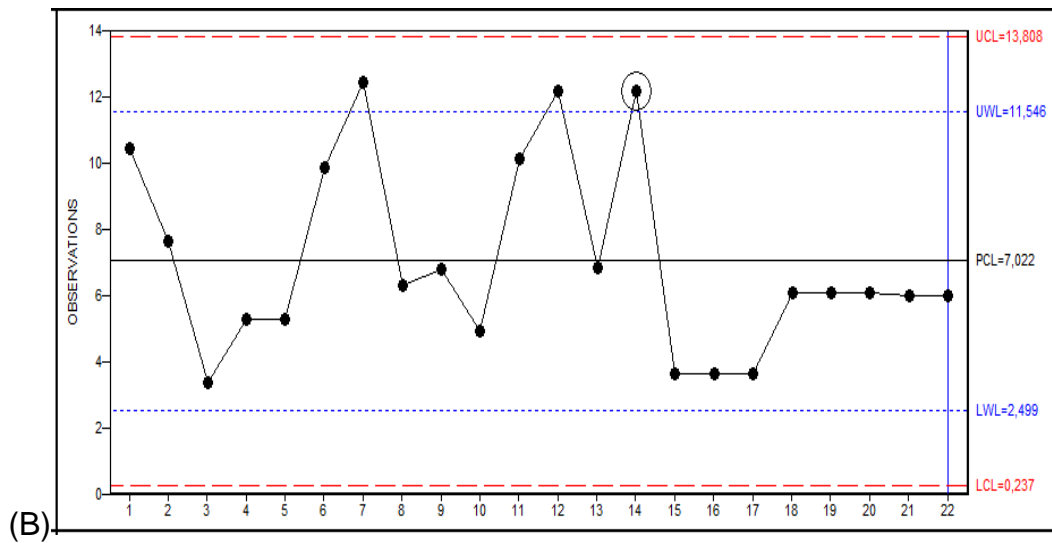
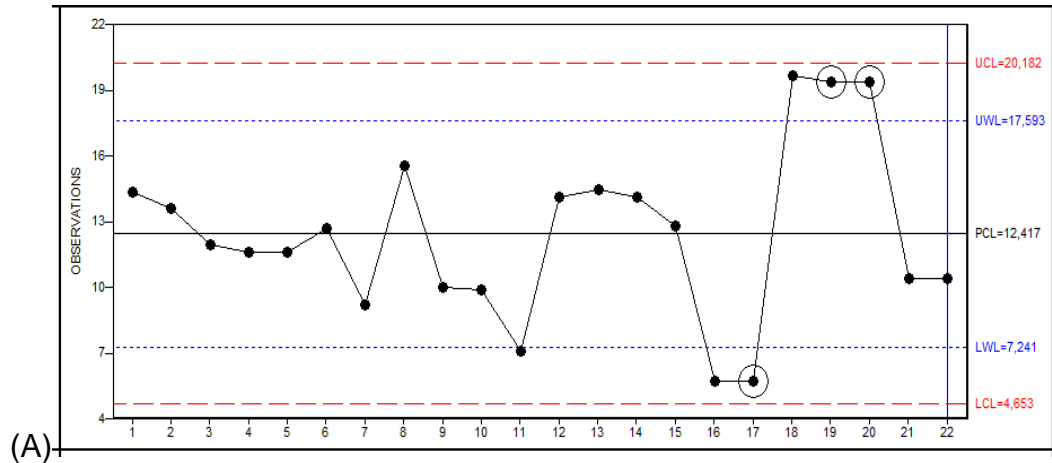
4.2 AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE AS POTÊNCIAS OBTIDAS COM AS LINHAGENS SW E B6D2F1

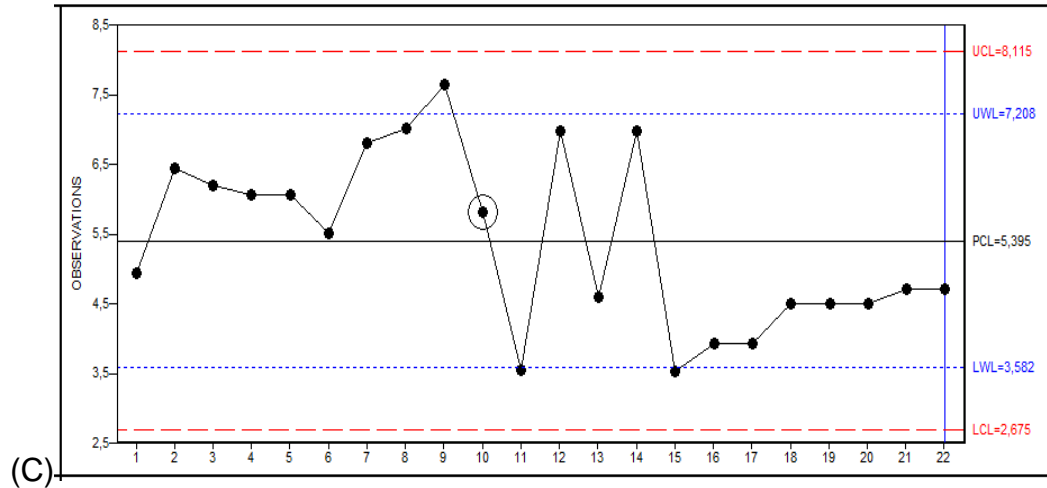
Para avaliar a concordância entre as linhagens SW e B6D2F1, as mesmas amostras foram testadas em ambas as linhagens. A seguir serão apresentados os resultados da linhagem B6D2F1 e logo após os resultados das comparações.

O CV% das contagens de reticulócitos do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem B6D2F1 (grupo A2), para cada uma das doses (30, 90 e 270 UI/animal), foram introduzidos no programa de computador SPC[®] e estão demonstrados no gráfico 5. Para a dose 30 UI a média do CV foi de 12,417%, para a dose 90 UI foi de 7,022% e na dose 270 UI de 5,395%. Nas três doses foram observados alertas (círculos ao redor dos pontos de dados). Na dose de 30 UI três valores ficaram fora dos limites de alerta (LIA e LSA). Na dose de 90 UI um valor ficou fora do LSA. E na

dose de 270 UI o alerta mostrou nove pontos consecutivos do mesmo lado da média.

Gráfico 5 - CV% das contagens de reticulócitos da linhagem B6D2F1 (grupo A2) para o padrão MRT(B)rhEPO/0208 nas doses: 30 (A), 90 (B) e 270 UI (C)

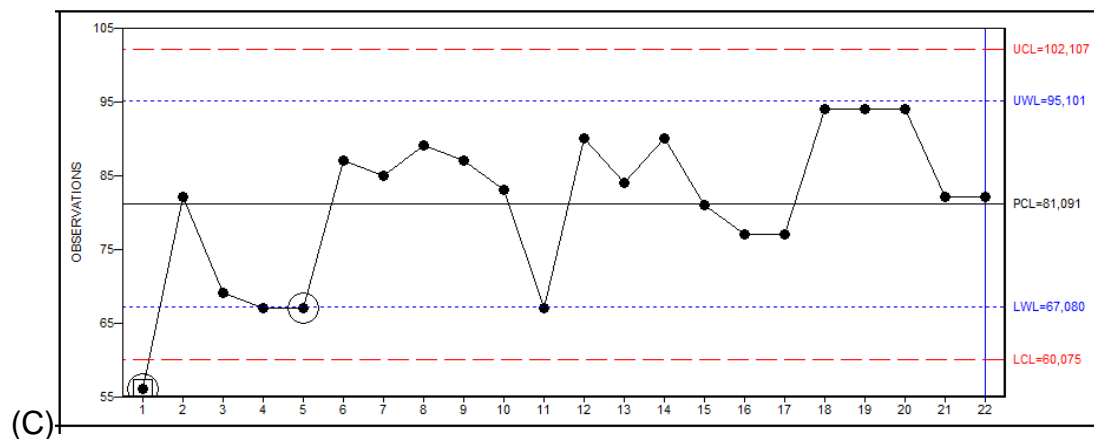
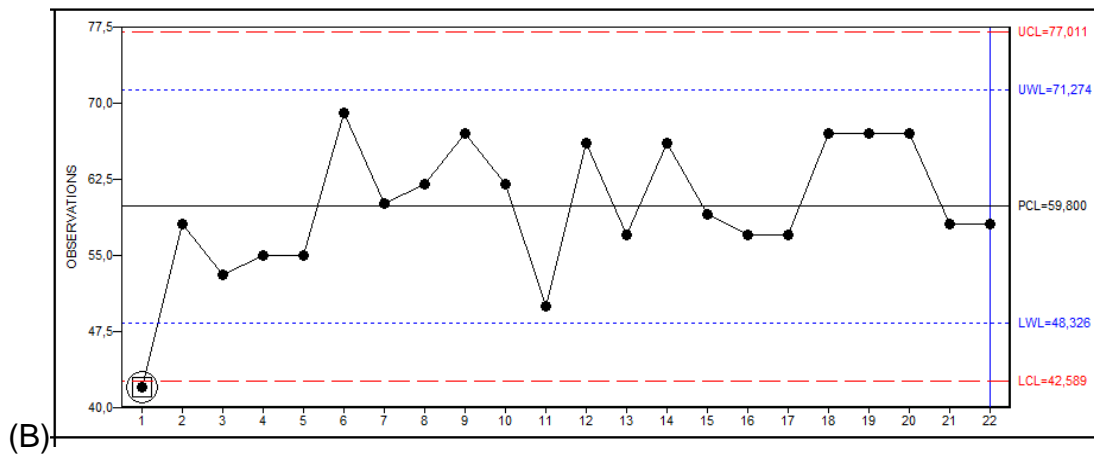
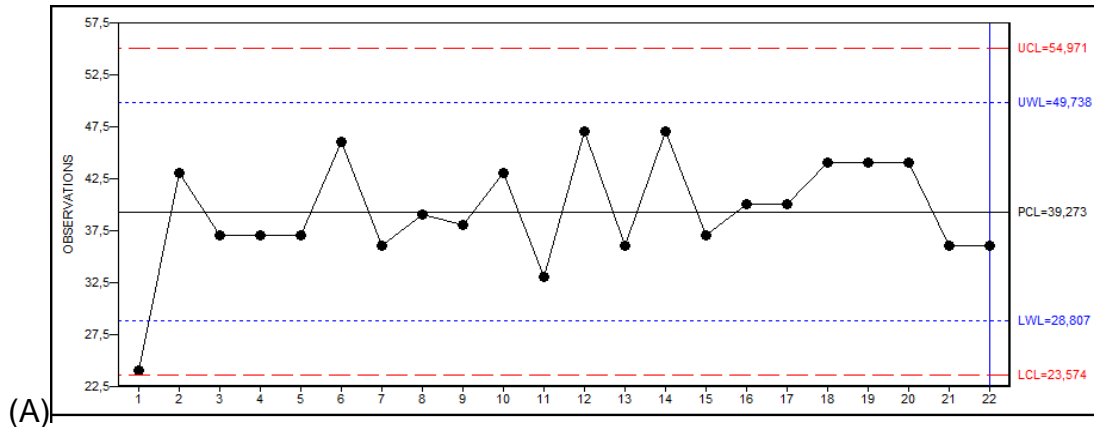




--- LSA (UWL): Limite Superior de Alerta; --- LIA (LWL): Limite Inferior de Alerta; -- LSC (UCL): Limite Superior de Controle; -- LIC (LCL): Limite Inferior de Controle; — média (PCL)

A média das contagens de reticulócitos do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem B6D2F1 (grupo A2), a cada ensaio, para cada dose testada, foi plotada no SPC[®] (Gráfico 6). Na dose 30 UI a média foi 39,273, na dose 90 UI foi de 59,800 e na de 270 foi 81,091. Um alerta, um ponto além do LIC, foi observado na dose 90 UI e dois, um além do LIA e um além do LIC, na de 270 UI.

Gráfico 6 – Média das contagens (n=6) de reticulócitos do padrão MRT(B)rhEPO/0208 na linhagem B6D2F1 (grupo A2) nas doses 30 (A), 90 (B) e 270 UI (C)



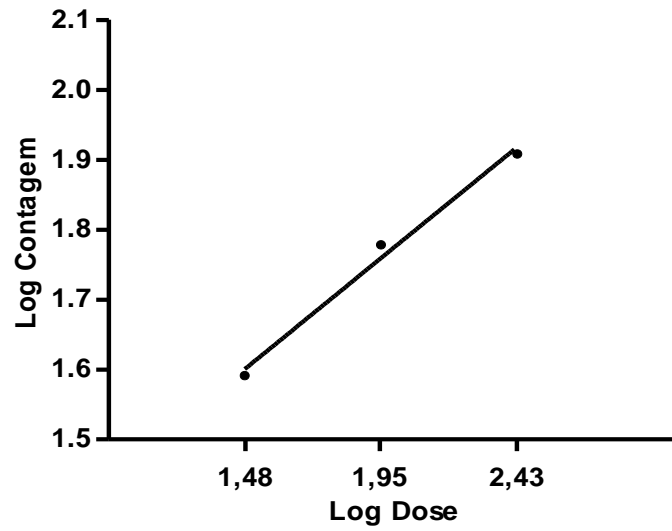
--- LSA (UWL): Limite Superior de Alerta; --- LIA (LWL): Limite Inferior de Alerta; -- LSC (UCL): Limite Superior de Controle; -- LIC (LCL): Limite Inferior de Controle; — média (PCL)

Com a finalidade de avaliar se a função de resposta (relação entre a resposta instrumental e a dose) do ensaio apresenta uma relação linear, os dados da contagem de reticulócitos do padrão na linhagem B6D2F1 (grupo A2) foram avaliados através da regressão linear logaritmo-logaritmo. O gráfico 7 (A) apresenta a reta da média das contagens e (B) e os valores individuais de contagem obtidos em cada ensaio ($n = 22$).

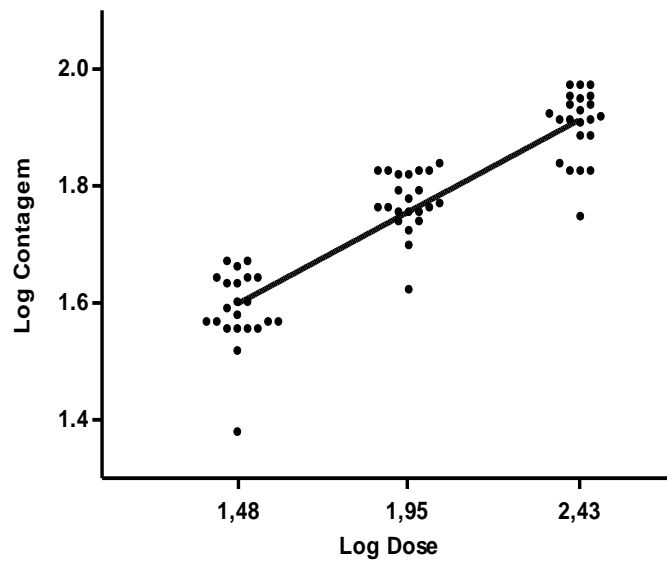
Considerando as médias a equação que descreve a relação entre a dose e a resposta é: $y = 0,3326x + 1,109$; $R^2 = 0,9895$ ($p = 0,0655$). Não houve desvios significativos de linearidade ($p = 1$).

Considerando os valores individuais, a equação que descreve a relação entre a dose e a resposta é: $y = 0,3306x + 1,110$; $R^2 = 0,8305$ ($p < 0,0001$). Não houve desvios significativos de linearidade ($p = 1$).

Gráfico 7 – Regressão linear para a linhagem B6D2F1 (grupo A2) no padrão MRT(B)rhEPO/0208 - média de cada dose (A); valores individuais (B)



(A)



(B)

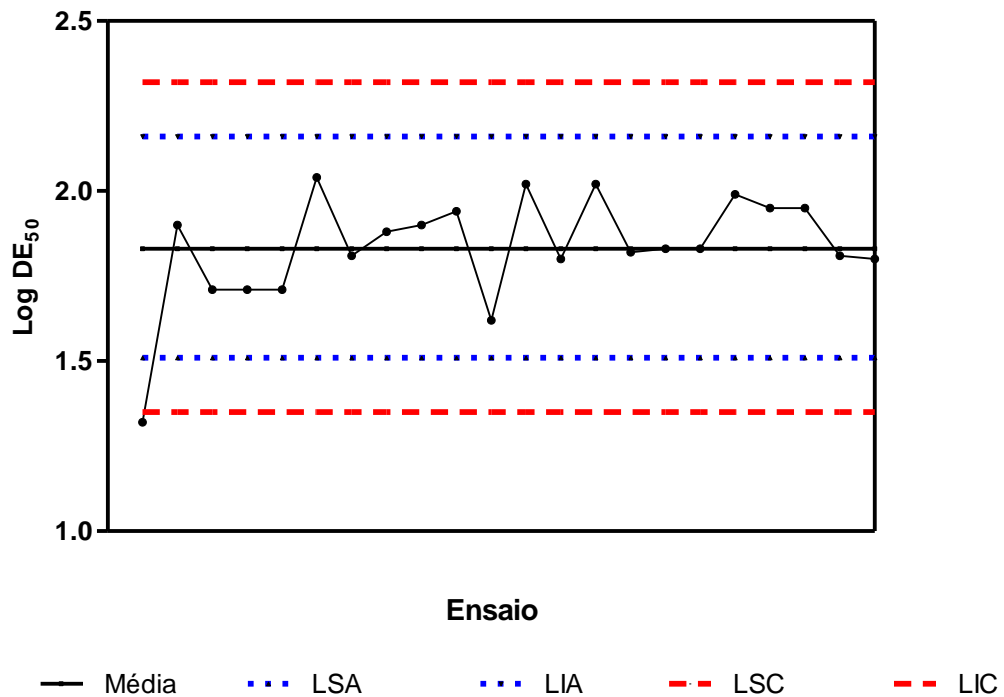
Também com a finalidade de avaliar se o ensaio estava sob controle, foi calculada a DE_{50} do padrão (MRT(B)rhEPO/0208) obtida na linhagem B6D2F1 (grupo A2), conforme tabela 9. Com exceção do primeiro valor (amostra 1), todos os demais valores de DE_{50} se mantiveram entre a menor e maior dose aplicada nos animais (*i.e.* 30 a 270 UI/animal). Os resultados da DE_{50} em logaritmo foram introduzidos no programa de computador GraphPad Prism[®] (Gráfico 8). Apenas o primeiro valor ficou fora do LIC.

Visando avaliar a precisão inter-ensaios da técnica, foi calculado o gCV% (Coeficiente de Variação geométrico) utilizando o logaritmo das DE_{50} obtidas com o padrão. O gCV% encontrado foi 14,51%. O KS maior que 0,05 (0,06) demonstrou que os dados seguem uma distribuição normal.

Tabela 9 – DE₅₀ do padrão na linhagem B6D2F1 (grupo A2).

B6D2F1 (grupo A2)		
Amostra	DE₅₀	Log
1	20,77	1,32
2	78,57	1,90
3	51,74	1,71
4	50,83	1,71
5	50,96	1,71
6	108,53	2,04
7	64,20	1,81
8	76,27	1,88
9	80,32	1,90
10	86,78	1,94
11	41,61	1,62
12	105,49	2,02
13	63,59	1,80
14	105,69	2,02
15	66,11	1,82
16	67,34	1,83
17	67,93	1,83
18	97,81	1,99
19	88,81	1,95
20	89,23	1,95
21	63,88	1,81
22	62,89	1,80
gCV%		14,51%
KS		0,06

DE₅₀: dose efetiva 50; Log: logaritmo; gCV: coeficiente de variação geométrico; KS: Kolmogorov Smirnov.

Gráfico 8 – DE₅₀ do padrão MRT (B)rhEPO/0208 na linhagem B6D2F1 (grupo A2).

LSA: Limite Superior de Alerta; LIA: Limite Inferior de Alerta; LSC: Limite Superior de Controle; LIC: Limite Inferior de Controle; Log: logaritmo; DE₅₀: Dose Efetiva 50

As 22 amostras testadas na linhagem SW (grupo A1) foram também testadas na linhagem B6D2F1 (grupo A2) para que fosse possível avaliar a concordância entre as linhagens.

A tabela 10 apresenta os resultados de potência para cada amostra. Os valores de potência na linhagem B6D2F1 variaram de 80 a 102%. E os limites entre 70 e 116%. A média dos valores de potência para as 22 amostras testadas foi de 92,95%, com uma veracidade (expressa pelo ER%) de -7,05%.

Tabela 10 - Valores de potência e limites de confiança obtidos para 22 amostras de rhEPO testadas no INCQS utilizando as linhagens SW (grupo A1) e B6D2F1 (grupo A2)

Grupo	A1			A2			A1xA2	
	Amostra	Pot (%)	LI (%)	LS (%)	Pot (%)	LI (%)	LS (%)	CV%
1	92	72	116	98	84	115	4,87	-6
2	98	85	112	93	76	113	3,53	5
3	88	76	102	93	80	107	3,72	-5
4	83	73	95	98	86	112	11,83	-15
5	80	70	91	99	85	116	15,28	-19
6	113	99	129	80	64	99	24,37	33
7	96	76	121	94	83	106	1,83	2
8	94	80	109	93	78	110	0,61	1
9	90	78	103	93	80	109	2,55	-3
10	98	90	106	97	87	108	0,73	1
11	94	73	121	86	76	103	4,36	8
12	102	91	114	98	82	118	2,81	4
13	110	97	126	95	81	112	10,48	15
14	86	74	101	88	75	103	1,38	-2
15	92	81	104	97	89	106	3,90	-5
16	81	71	93	95	82	109	10,59	-14
17	98	85	113	102	92	114	21,13	-4
18	85	71	102	96	81	112	7,94	-11
19	87	74	101	82	70	95	4,13	5
20	93	82	106	86	73	102	5,25	7
21	88	77	101	90	81	100	1,39	-2
22	93	78	110	92	83	103	0,36	1
μ	92,77			92,95				
ER%	-7,23			-7,05				

Pot: Potência; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior; μ : média dos resultados obtidos; ER: Erro Relativo; ER%: Erro Relativo%; CV%: Coeficiente de Variação.

O teste ANOVA foi realizado com os resultados de potência das linhagens SW (grupo A1) e B6D2F1 (grupo A2), conforme tabela 10. A tabela 11 apresenta os resultados da ANOVA para um nível de significância $\alpha = 0,05$. A média de quadrados (MQ) entre grupos (variância entre grupos) foi de 42,0087 e a MQ dentro dos grupos (variância dentro dos grupos) foi de 57,3182. O *valor-p* igual a 0,7599, maior que 0,05 e o *F* calculado, 0,7329, menor que o *F crítico* de 2,0587.

Tabela 11 - ANOVA fator único para as linhagens SW x B6D2F1 (grupo A1 x A2) testadas no INCQS

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GI</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-p</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	882,18	21	42,0087	0,7329	0,7599	2,0587
Dentro dos grupos	1261	22	57,3182			
Total	2143,18	43				

SQ = Soma de Quadrados; GI = Graus de Liberdade; MQ = Média de Quadrados

Com a finalidade de avaliar o grau de concordância entre os resultados, a homogeneidade foi determinada. Os resultados obtidos por amostra nas duas linhagens (grupo A1 x A2) foram submetidos ao teste qui-quadrado utilizando o programa CombiStats[®] (EDQM, 2012). Os resultados da comparação dos ensaios podem ser vistos na tabela 12. Foi adotado um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), onde 20 dos 22 pares de resultados (90,90%) foram considerados homogêneos ($p > 0,05$). Apenas as amostras 5 e 6 foram consideradas heterogêneas ($p < 0,05$).

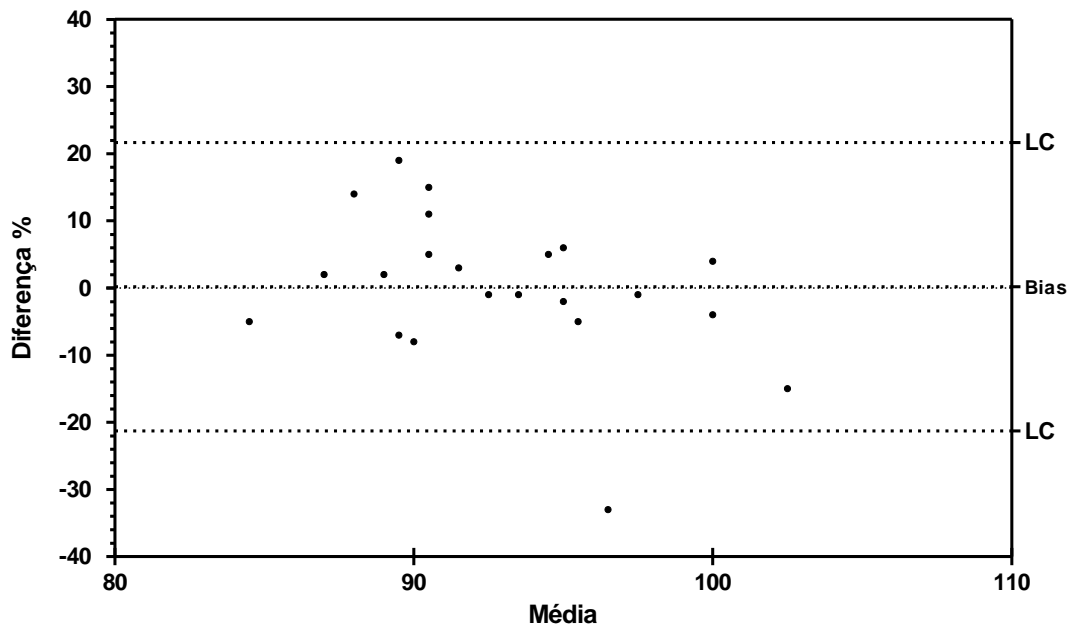
Tabela 12 – Valores de p obtidos no teste qui-quadrado para avaliação da homogeneidade entre pares de resultados de potência obtidos nas linhagens SW x B6D2F1 (grupo A1xA2) em 22 amostras testadas no INCQS.

Amostra	valor p	Amostra	valor p
1	0,618	12	0,704
2	0,668	13	0,142
3	0,597	14	0,860
4	0,069	15	0,454
5	0,027	16	0,114
6	0,006	17	0,646
7	0,840	18	0,335
8	0,936	19	0,577
9	0,721	20	0,466
10	0,879	21	0,812
11	0,666	22	0,959

Para avaliar a concordância entre as linhagens SW (grupo A1) e B6D2F1 (grupo A2) foi aplicado o método de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1986), o qual foi realizado utilizando o programa de computador GraphPad Prism[®]. Este programa de computador analisou os valores de potência das 22 amostras testadas nas duas linhagens. O gráfico 9 apresenta as diferenças e as médias entre as duas linhagens, de cada amostra testada, com a tendência (*bias* = 0,1818) e os limites de concordância (LC: -21,29 a 21,66). Apenas um valor ficou fora do LC.

No eixo x estão representadas as médias (B6D2F1+SW/2) e no eixo Y as diferenças (B6D2F1-SW).

Gráfico 9 – Bland-Altman para as linhagens SW (grupo A1) x B6D2F1 (grupo A2) testadas no INCQS

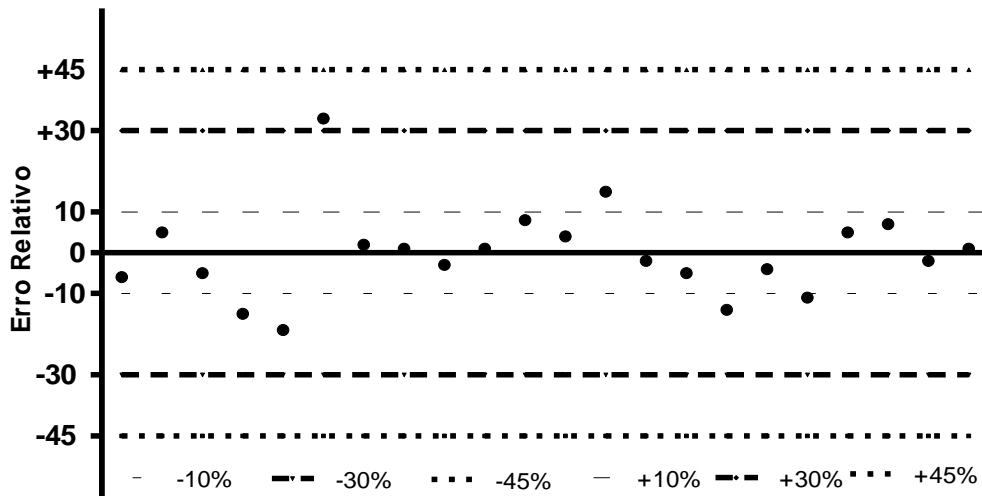


LC: Limite de Concordância; *bias*: Tendência

Foi calculado o Erro Relativo (ER) entre os valores percentuais de potência para a mesma amostra testada nas duas linhagens (grupo A1 x grupo A2), em ensaios realizados no INCQS (n = 22).

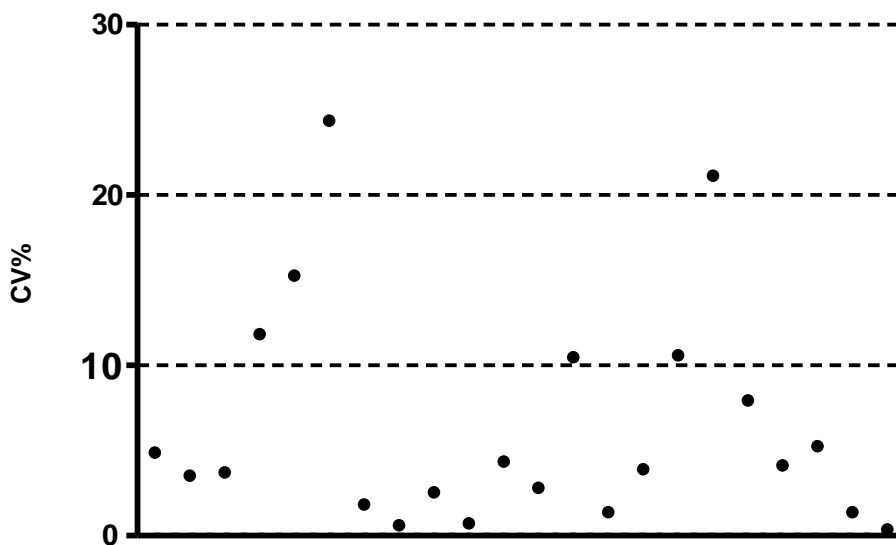
Observando o gráfico 10 e a tabela 11, podemos ver que a maior parte dos valores de ER (16/22) encontra-se dentro de $\pm 10\%$, apenas um ER ficou acima de $\pm 30\%$ (ER = 33; amostra 6).

Gráfico 10 – Erro Relativo entre as linhagens SW (grupo A1) e B6D2F1 (grupo A2) em ensaios realizados no INCQS (n=22).



O CV% entre as linhagens SW (grupo A1) e B6D2F1 (grupo A2) foi calculado a cada ensaio e 16 dos 22 valores ficaram abaixo de 10% (tabela 10). O gráfico 11 apresenta a distribuição desses valores. Podemos ver que todos os valores de CV% ficaram abaixo de 30%.

Gráfico 11 – Coeficiente de Variação % entre as linhagens SW (grupo A1) e B6D2F1 (grupo A2) em ensaios realizados no INCQS (n=22)



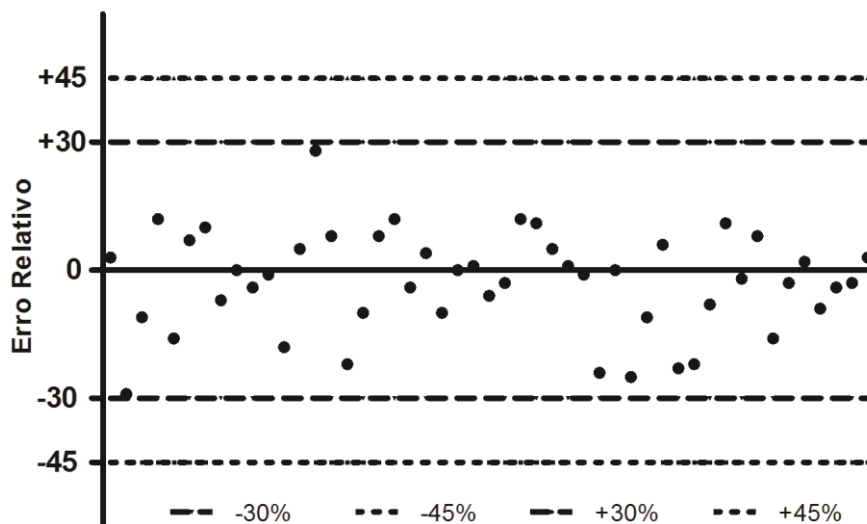
CV%: Coeficiente de Variação %

4.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELO INCQS E POR UM LABORATÓRIO PRODUTOR DE rhEPO, NOS TESTES DE POTÊNCIA BIOLÓGICA REALIZADOS COM AS LINHAGENS B6D2F1 E SW

Para comparar os resultados de potência obtidos pelo INCQS (grupo B1) e pelo produtor (grupo B2) foram utilizados os valores de potência de 49 amostras de rhEPO testadas na linhagem B6D2F1. Foi calculado o ER, o teste ANOVA fator único foi realizado e foi aplicado o método de Bland-Altman. E ainda foi aplicado o teste qui-quadrado para avaliar a homogeneidade.

O gráfico 12 mostra a dispersão dos Erros Relativos (ER). Todos os ER foram inferiores a $\pm 30\%$.

Gráfico 12- Erro Relativo para a linhagem B6D2F1 utilizada no INCQS (grupo B1) e produtor (grupo B2)



O teste ANOVA foi realizado com os resultados de potência da linhagem B6D2F1 obtidos pelo INCQS (grupo B1) e pelo produtor (grupo B2). A tabela 13 apresenta os resultados do ANOVA para um nível de significância $\alpha = 0,05$. A média de quadrados (MQ) entre grupos (variância entre grupos) foi de 76,9569 e a MQ

dentro dos grupos (variância dentro dos grupos) foi de 86,53. O *valor-p* igual a 0,6588, maior que 0,05 e o *F calculado* igual a 0,8894, menor que o *F crítico* de 1,6024.

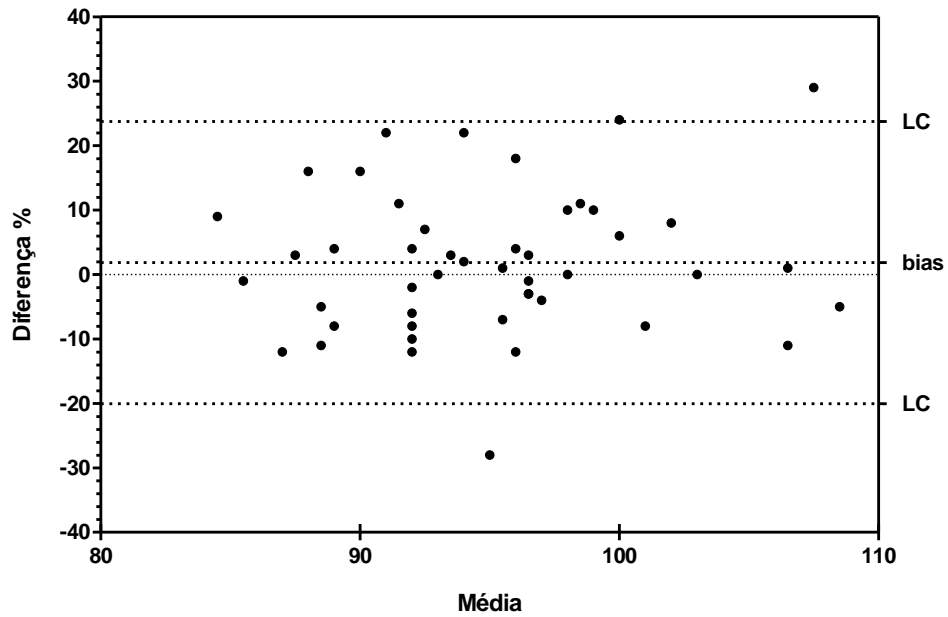
Tabela 13 – ANOVA para a linhagem B6D2F1 entre INCQS (grupo B1) e produtor (grupo B2)

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GI</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-p</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3770,89	48	76,9569	0,8894	0,6588	1,6024
Dentro dos grupos	4326,50	49	86,53			
Total	8097,39	97				

SQ = Soma de Quadrados; GI = Graus de Liberdade; MQ = Média de Quadrados

Foi aplicado o método de Bland-Altman nos valores de potência das 49 amostras testadas pelo INCQS (grupo B1) e pelo produtor (grupo B2) na linhagem B6D2F1. O gráfico 13 apresenta as diferenças e as médias entre INCQS (grupo B1) e produtor (grupo B2), de cada amostra testada, com a tendência (*bias* = 1,851) e LC (-20 a 23,74). Apenas dois valores ficaram fora do LC.

Gráfico 13 – Bland-Altman para linhagem B6D2F1 INCQS (grupo B1) x produtor (grupo B2)



Foi possível avaliar a homogeneidade destes resultados, através do teste qui-quadrado utilizando o programa CombiStats[®] (EDQM, 2012) entre cada par de valores de potência e limites de confiança, obtidos pelo INCQS (grupo B1) e pelo produtor (grupo B2) (Tabela 14). Apenas dois resultados (amostras 14 e 37) foram considerados heterogêneos ($p < 0,05$) sendo os demais considerados homogêneos ($p > 0,05$). Ou seja, 95,92% de resultados homogêneos.

Tabela 14 - Valores de p obtidos no teste qui-quadrado para avaliação da homogeneidade entre pares de resultados de potência obtidos na linhagem B6D2F1 em 49 amostras testadas pelo INCQS (grupo B1) e pelo produtor (grupo B2).

Amostra	valor p	Amostra	valor p	Amostra	valor p
1	0,8329	18	0,3489	35	0,2022
2	0,1546	19	0,2232	36	0,6174
3	0,5954	20	0,6466	37	0,0033
4	0,3602	21	0,7341	38	0,0748
5	0,1851	22	0,2201	39	0,5022
6	0,6034	23	1,0000	40	0,1884
7	0,3638	24	0,9281	41	0,8645
8	0,6104	25	0,4794	42	0,4655
9	1,0000	26	0,7803	43	0,1203
10	0,7722	27	0,1662	44	0,7814
11	0,9329	28	0,1737	45	0,8524
12	0,1631	29	0,6452	46	0,2492
13	0,6122	30	0,9363	47	0,6184
14	0,0103	31	0,9161	48	0,7539
15	0,5023	32	0,0749	49	0,7952
16	0,0647	33	1,0000		
17	0,2742	34	0,1219		

Em uma abordagem prática foi possível avaliar a reprodutibilidade do ensaio. Quando analisamos os resultados de potência na linhagem B6D2F1, entre INCQS (grupo B1) e o produtor (grupo B2), o $CV_R\%$ foi 8,97% ($n = 49$).

Foram comparados os resultados de potência obtidos para as 22 amostras testadas pelo INCQS na linhagem SW (grupo A1) e pelo produtor na linhagem B6D2F1 (grupo A3).

Os valores de potência do grupo A3 variaram de 81 a 122% e os limites entre 66 e 172. A média foi igual a 95,64 e a veracidade (expressa pelo ER%) de -4,36. (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores de potência e limites de confiança obtidos para 22 amostras de rhEPO testadas no INCQS utilizando as linhagens SW (grupo A1) e pelo produtor na linhagem B6D2F1 (grupo A3)

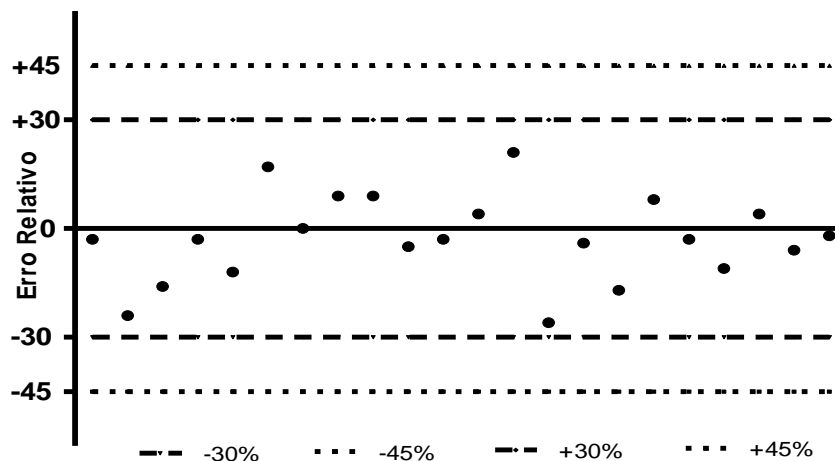
Grupo	A1			A3			A1xA3	
	Pot (%)	LI (%)	LS (%)	Pot (%)	LI (%)	LS (%)	CV%	ER
1	92	72	116	95	73	122	2,27	-3
2	98	85	112	122	88	172	15,43	-24
3	88	76	102	104	69	155	11,79	-16
4	83	73	95	86	66	111	2,51	-3
5	80	70	91	92	72	117	9,87	-12
6	113	99	129	96	80	114	11,50	17
7	96	76	121	96	84	110	0,00	0
8	94	80	109	85	77	93	7,11	9
9	90	78	103	81	68	96	7,44	9
10	98	90	106	103	90	118	3,52	-5
11	94	73	121	97	86	109	2,22	-3
12	102	91	114	98	85	114	2,83	4
13	110	97	126	89	72	110	14,92	21
14	86	74	101	112	91	137	18,57	-26
15	92	81	104	96	77	119	3,01	-4
16	81	71	93	98	82	117	13,43	-17
17	98	85	113	90	77	104	6,02	8
18	85	71	102	88	73	105	2,45	-3
19	87	74	101	98	82	117	8,41	-11
20	93	82	106	89	74	108	3,11	4
21	88	77	101	94	81	108	4,66	-6
22	93	78	110	95	79	113	1,50	-2
μ	92,77			95,64				
ER%	-7,23			-4,36				
CV _R %							9,01	

Pot: Potência; LI: limite Inferior; LS: Limite Superior; μ : média dos resultados obtidos; ER: Erro Relativo; ER%: Erro Relativo%; CV_R%: Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade; CV%: Coeficiente de variação.

Foi calculado o CV% e o ER entre os valores percentuais de potência para a mesma amostra testada na linhagem SW pelo INCQS (grupo A1) e na linhagem B6D2F1 pelo produtor (grupo A3).

Analisando a tabela 15 podemos ver que 16 dos 22 valores de CV% ficaram abaixo de 10%, seis valores ficaram entre 10 e 20% e todos abaixo de 30%. E ainda que 14 resultados para ER ficaram entre ± 10 , cinco entre ± 10 e ± 20 e apenas três acima de ± 20 , mas todos abaixo de ± 30 . No gráfico 14, constatamos que 100% dos valores de ER estão entre $\pm 30\%$.

Gráfico 14 – Erro Relativo entre SW INCQS (grupo A1) e B6D2F1 PRODUTOR (grupo A3)



O teste de ANOVA foi realizado com os resultados de potência da linhagem SW no INCQS (grupo A1) e B6D2F1 no produtor (grupo A3). A tabela 16 apresenta os resultados da ANOVA para um nível de significância $\alpha = 0,05$. A média de quadrados (MQ) entre grupos (variância entre grupos) foi de 90,2046 e a MQ dentro dos grupos (variância dentro grupos) foi de 76,1656. O *valor-p* igual a 0,2827, maior que 0,05 e o *F calculado* foi 1,1843, menor que o *F crítico* de 4,0726.

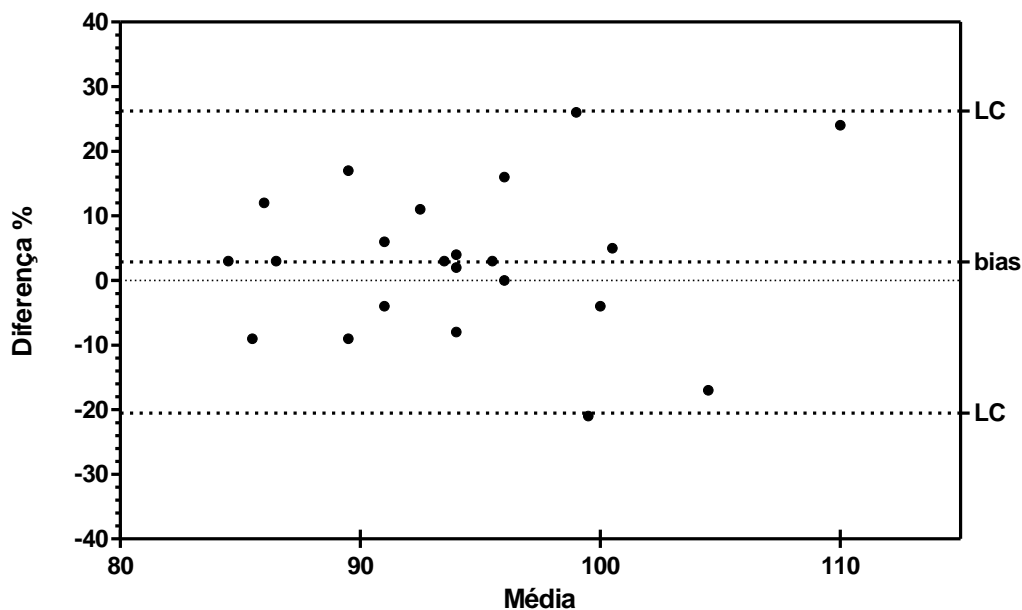
Tabela 16 – ANOVA SW INCQS (grupo A1) x B6D2F1 produtor (grupo A3)

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-p</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	90,20455	1	90,2046	1,1843	0,2827	4,0726
Dentro dos grupos	3198,955	42	76,1656			
Total	3289,159	43				

SQ= Soma de Quadrados; Gl= Graus de liberdade; MQ= Média de Quadrados

Para comparar os resultados de potência entre SW do INCQS (grupo A1) e B6D2F1 do produtor (grupo A3), foi aplicado o método de Bland-Altman utilizando o programa de computador GraphPad Prism[®]. Este programa de computador analisou os valores de potência das 22 amostras testadas pelo INCQS e pelo produtor. O gráfico 15 apresenta as diferenças e as médias entre INCQS e produtor, de cada amostra testada, com a tendência (*bias* = 2,864) e LC (-20,51 a 26,24). Dois valores ficaram em cima da linha do LC, um no LC superior e um no inferior.

Gráfico 15 – Bland-Altman para SW INCQS (grupo A1) X B6D2F1 produtor (grupo A3)



LC: Limite de Concordância; bias: Tendência

Em uma abordagem prática foi possível avaliar a reprodutibilidade do ensaio. Quando analisamos a potência na linhagem SW no INCQS (grupo A1) e B6D2F1 no produtor (grupo A3), o $CV_R\%$ foi 9,01% ($n = 22$), conforme tabela 15.

Com base nos dados apresentados, os quais podem ser vistos de forma resumida na tabela 17, ficou demonstrado que a linhagem SW não apresentou resultados significativamente diferentes em relação à linhagem B6D2F1 no que se refere à avaliação da atividade biológica de rhEPO, demonstrando, que esta linhagem pode ser utilizada para fins de controle da qualidade deste medicamento biológico.

Há décadas, a linhagem SW é amplamente utilizada e consagrada pelo uso. Sua criação é mais simples, pois se origina de cruzamentos aleatórios produzindo populações naturais, diferentemente da linhagem B6D2F1, que é originada do cruzamento de duas linhagens isogênicas. Além da facilidade de criação e maior disponibilidade para laboratórios de saúde pública, outro ponto importante é a relação do custo de obtenção dessas duas linhagens. Enquanto uma fêmea de seis semanas de idade da linhagem SW custa cerca de US\$5,20, o custo da linhagem

B6D2F1 é de cerca de US\$25,40 (TACONIC, 2013), ou seja cerca de cinco vezes maior quando comparada à linhagem SW. Se calcularmos o custo dos animais para um ensaio com 36 camundongos da linhagem SW, o valor por ensaio ficaria em torno de US\$187,20 (ou cerca de R\$374,40, considerando a cotação do dólar de R\$ 2,00). Já o custo dos animais por ensaio para a linhagem B6D2F1 ficaria em torno de US\$914,40, ou R\$1828,80.

Tabela 17 – Resumo dos resultados encontrados

GRUPOS			
	A1 (n = 22)	A2 (n = 22)	A3 (n = 22)
ER%	-7,23	-7,05	-4,35
μ (potência)	92,77	92,95	95,64
CV%	30 UI= 8,125 90 UI= 6,42 270 UI= 5,041	30 UI= 12,417 90 UI= 7,022 270 UI= 5,395	NA
μ (contagem)	30 UI= 48,864 90 UI= 67,182 270 UI= 87,136	30 UI= 39,273 90 UI= 59,800 270 UI= 81,091	NA
R²	μ* = 0,9973 I = 0,8152	μ* = 0,9895 I = 0,8305	NA
gCV%	14,34 KS = >0,10	14,51 KS = 0,06	NA

Continuação tabela 17

COMPARAÇÕES			
	A1xA2 (n=22)	B1xB2 (n= 49)	A1xA3 (n=22)
Bland-Altman	Bias = 0,1818 LC= -21,29 a 21,66 Valor fora do LC= 1	Bias = 1,851 LC= -20,00 a 23,74 Valor fora do LC= 2	Bias = 2.864 LC= -20,51 a 26,24 Valor fora do LC= 0
CVR%	NA	8,97	9,01
Qui-quadrado (% de valores homogêneos)	90,90	95,92	NA
ER	1 valor acima de 30%	Todos os valores abaixo de 30%	Todos os valores abaixo de 30%
CV%	Todos os valores abaixo de 30%	NA	Todos os valores abaixo de 30%

n= tamanho amostral; ER%: Erro Relativo percentual; μ : média; CV%: Coeficiente de Variação; R^2 : coeficiente de determinação; μ^* : média da contagem; l: valores individuais de contagem; gCV%: Coeficiente de Variação geométrico; KS: Kolmogorov Smirnov; *Bias*: Tendência; LC: Limite de Concordância; ER: Erro Relativo; NA: Não se Aplica;

5 DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta, purificação, clonagem e produção pela tecnologia do DNA recombinante, dando origem a rhEPO, a EPO vem sendo amplamente estudada. Na seleção de ensaios a serem realizados durante o processo de controle da qualidade da rhEPO, deve se levar em consideração a complexidade deste medicamento biológico, com padrão de glicosilação heterogêneo, onde o conteúdo de ácido siálico pode influenciar significativamente em seu metabolismo. Deste modo e dada tal complexidade, não há ainda modelos *in vitro* para a avaliação da atividade biológica da rhEPO, e internacionalmente, preconiza-se a realização de testes *in vivo* para determinação de sua potência (COUNCIL OF EUROPE, 2011; ALBERTENGO et al, 1999).

Frente a essa recomendação, diferentes linhagens de camundongos, entre elas, CF1, BALB/C, NIH, C57BL6 e B6D2F1, vêm sendo testadas para a realização de ensaios *in vivo* (ALBERTENGO et al, 1999; RAMOS et al, 2003; SCHMIDT et al, 2003; BARTH, 2008; COUNCIL OF EUROPE, 2011, SILVA, 2012). No entanto a linhagem SW, a qual é amplamente utilizada em laboratórios de saúde pública no âmbito nacional, foi testada somente por Lopes (2004) e mais recentemente por nosso grupo que publicou estudo preliminar sobre a aplicabilidade da utilização desta linhagem na avaliação da potência de rhEPO (COSTA et al, 2010), e por Silva (2012) que testou dentre outras linhagens (B6D2F1, C57BL6, NIH e BALB/C) a linhagem SW, sugerindo sua aplicabilidade na avaliação da potência de rhEPO.

Como resultado desses estudos, pôde-se concluir que SW é uma linhagem adequada para a determinação da potência de rhEPO, no entanto, ressaltava-se a necessidade de um estudo mais robusto, com um número ampliado de amostras e seguindo a metodologia preconizada em compêndio oficial. Além disso, detectou-se naquele momento a necessidade de estabelecer uma comparação sistemática entre laboratórios e resultados obtidos com SW em relação à linhagem sugerida na *Ph Eur.*, *i.e.* a B6D2F1.

Dando continuidade a essa investigação, o presente estudo avaliou os resultados de amostras comerciais de rhEPO, de um mesmo produtor, frente ao

padrão MRT(B)rhEPO/0208, após avaliação da potência biológica na linhagem SW, avaliando a concordância entre esta linhagem e aquela recomendada pela *Ph. Eur.* - B6D2F1, e comparando dados obtidos em nosso laboratório com aqueles obtidos pelo produtor.

Todos os ensaios realizados - tanto na linhagem SW quanto na B6D2F1 - cumpriram com os critérios de validade (regressão, linearidade e paralelismo) e apresentaram resultados dentro dos limites estabelecidos pela *Ph. Eur.* (COUNCIL OF EUROPE, 2011), isto é, a potência entre 80% e 125% e limites entre 64% e 156% da potência rotulada. Em todos os grupos de dados avaliados, não existe evidência estatística que comprove que a distribuição não seja normal pelo teste de KS, $p > 0,05$.

Cabe ainda ressaltar, que segundo recomendação da *Ph. Eur.* é possível a combinação de resultados válidos obtidos em ensaios independentes de potência biológica para a liberação de um lote de rhEPO e que no presente estudo, não houve a necessidade de combinação de ensaios para obtenção de resultados satisfatórios em nenhuma das duas linhagens testadas. Esses dados diferem de estudos anteriores, onde foi necessária a combinação de dois ou até três ensaios independentes para obtenção de resultados satisfatórios para uma mesma amostra, tanto na linhagem SW (LOPES, 2004; COSTA et al, 2010; SILVA, 2012) como em outras linhagens (ALBERTENGO et al, 1999; RAMOS et al, 2003; SCHIMIDT et al, 2003; BARTH et al, 2008). Este fato se deve – provavelmente - a otimização alcançada em nosso Instituto em termos de padronização e de controle de fatores que podem interferir no resultado final de um ensaio, tais como faixa de peso corpóreo e idade dos animais; temperatura e umidade ambiental do biotério; precisão no preparo das amostras e na leitura de reticulócitos; uso de instrumentos calibrados etc. que conseqüentemente geraram resultados com variabilidade adequada ao tipo do ensaio.

A variabilidade de ensaios *in vivo* é bem conhecida e muito maior que aquela esperada para outros tipos de ensaios, como *e.g.* ensaios químicos. Segundo a OMS (WHO, 1997) ensaios biológicos, sejam eles *in vitro* ou *in vivo*, podem apresentar variabilidade acima de 50%. Neste contexto, Fitzgerald et al (1978)

recomendam a inclusão de um padrão de referência a cada ensaio como forma de controlar e auxiliar a medição desta variabilidade.

Visando demonstrar que o método em questão está padronizado e sob controle, o CV% e a média das contagens do padrão na linhagem SW (grupo A1), utilizados na elaboração de gráficos de controle, foram avaliados e demonstraram que o método teve um desempenho que atende às necessidades do uso, apresentando apenas um valor de CV% além do LSC na dose 270 UI/ animal (Gráfico 1) e os valores de média do primeiro ensaio abaixo do LIC nas três doses testadas (Gráfico 2). No entanto não foram detectadas tendências, uma vez que nos demais ensaios não foi observado nenhum alerta. Os valores da média das contagens de reticulócitos do padrão, na linhagem SW (grupo A1) (Gráfico 2) apresentaram um incremento da contagem a medida que a dose aumentou, o que já indica uma boa relação dose resposta.

Moura et al (2009) obtiveram um valor de CV% = 43,09% para DE₅₀ (n = 33) utilizando a mesma vacina de referência em todo seu estudo sobre controle de qualidade de vacinas anti-rábicas. No estudo de Bruckner et al (2003), em 24 testes NIH realizados com uma mesma vacina anti-rábica de referência o CV% foi de 45%, e em 38 testes NIH, chegou a 115%.

O CV% médio das contagens de reticulócitos do padrão na linhagem SW - grupo A1- (Gráfico 1) ficou abaixo de 10% em todas as doses testadas (30, 90 e 270 UI/ animal), o que demonstra uma variabilidade intra-ensaio (repetibilidade) bastante satisfatória.

Estes resultados estão de acordo com os dados anteriormente publicados por nossa equipe Costa et al (2010) e Silva (2012) que encontraram CV% abaixo de 10% na avaliação da contagem de reticulócitos na linhagem SW em condições de ensaio próximas a deste estudo.

Lopes (2004) encontrou valores de CV% entre 10% e 32%. Valores mais adequados de CV% foram encontrados quando um esquema de doses repetidas foi adotado. No entanto, cabe destacar, que embora o esquema de doses múltiplas tenha sido adotado de forma experimental, o tratamento preconizado pela *Ph. Eur* é o de dose única.

Após o tratamento com o padrão MRT(B)rhEPO/0208, os valores das médias de reticulócitos, na linhagem SW - grupo A1 (gráfico 2) apresentaram um aumento no valor de contagem à medida que a dose utilizada foi elevada, indicando como esperado, uma boa relação dose-resposta. Além disso, a função de resposta do ensaio apresentou uma relação linear, como demonstrado pela regressão linear na linhagem SW - grupo A1 (gráfico 3), que apresentou uma boa inclinação da reta e um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9973, quando considerou-se a média de reticulócitos de cada dose, e R^2 de 0,8152, quando considerados os valores individuais de contagem. Silva (2012), quando avaliou a curva dose-resposta na linhagem SW, encontrou um valor de R^2 similar ao deste estudo, *i.e.* 0,9652.

Valores de R^2 próximos de 1, indicam a validade da regressão. Importante notar que valores de R^2 variam de 0 a 1, quanto maior for o valor de R^2 , melhor será o ajuste da reta aos dados, ou seja, quanto mais próximo de 1 maior será a validade da regressão (BEIGUELMAN, 2006; MOTTA, 2006), pois o valor de $R^2 = 1$ representa a linha de identidade onde $x = y$.

Outra abordagem utilizada no presente estudo diz respeito à avaliação da aplicabilidade de gráficos de controle como instrumento adicional de avaliação da consistência de resultados de ensaios biológicos. Gráficos de controle de valores individuais são ferramentas estatísticas usadas para avaliar a tendência central de um processo ao longo do tempo e fundamentar ações preventivas e/ou corretivas, quando necessário (HENDRIKSEN et al, 1998).

Também com a finalidade de avaliar se o ensaio estava sob controle, foi calculada a DE_{50} do padrão MRT(B)rhEPO/0208 obtida a cada ensaio ($n = 22$) com as duas linhagens testadas e os resultados submetidos a uma transformação logarítmica (tabela 8 e 9). Estes dados foram avaliados quanto ao ajuste à distribuição normal pelo método de KS e uma vez constatada a normalidade dos resultados, o gráfico de controle foi obtido com estes valores. No gráfico 4 identificamos dois valores entre o limite de alerta e de controle quando a linhagem SW (grupo A1) foi utilizada. Vale esclarecer que, valores nesta faixa são aceitos como válidos, apenas sugerindo maior supervisão e investigação sobre possíveis causas não aleatórias (fonte de variação imprevisível), no entanto os gráficos não demonstraram tendências não aleatórias, ou seja, as variações detectadas são

previsíveis e intrínsecas ao processo. Isto permitiu uma visão geral tanto da atividade do padrão quanto do método.

A avaliação da precisão inter-ensaios da técnica utilizando os mesmos valores (logaritmo das DE_{50}), obtidos pelo padrão na linhagem SW (grupo A1) a cada ensaio (Tabela 8), demonstrou uma variabilidade satisfatória dos ensaios com a determinação da precisão inter-ensaios, com $gCV\% = 14,34\%$. Nas condições experimentais adotadas, a veracidade do método também foi satisfatória, com $ER\% = -7,23$ (Tabela 7).

Na linhagem B6D2F1 (grupo A2) o $CV\%$ das contagens de reticulócitos do padrão (Gráfico 5) ficou acima de 10% apenas na dose de 30UI/0,2 mL (12,417%), as demais doses, 90 e 270 UI/ animal, apresentaram CV de 7,022% e 5,395%, respectivamente. Estes dados demonstram uma baixa variabilidade intra-ensaio. Lopes (2004) quando testou esta mesma linhagem encontrou CV máximo de 10% (2 a 10%), no entanto, como citado anteriormente, neste estudo utilizou-se um esquema de doses repetidas. Silva (2012) encontrou valores de $CV\%$ 14,86; 16,20 e 7,87 nas doses 30 UI, 90 UI e 270 UI/ animal, respectivamente.

Os alertas observados no gráfico 5 demonstram a necessidade de aumentar a supervisão no ensaio. Nenhuma tendência não aleatória foi detectada.

Os valores da média das contagens de reticulócitos do padrão MRT(B)rhEPO/0208, na linhagem B6D2F1 - grupo A2 (gráfico 6) apresentaram um incremento da contagem a medida que a dose aumentou, o que indica, assim como observado para a linhagem SW, uma boa relação dose-resposta. Para a linhagem B6D2F1 (grupo A2) a função de resposta do ensaio apresentou uma relação linear, o que pode ser demonstrado pela regressão linear (gráfico 7) que apresentou uma boa inclinação da reta e um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9895 quando considerou-se a média de reticulócitos de cada concentração e R^2 de 0,8305 quando avaliados os valores individuais de contagem.

O ensaio com a linhagem B6D2F1 (grupo A2) estava sob controle, o que pode ser demonstrado no gráfico 8. Com exceção do primeiro ensaio, todos os valores de DE_{50} (Tabela 9) se mantiveram entre a menor e maior dose aplicada nos animais. Apenas um valor (\log da DE_{50}) ficou na faixa do LIC. Assim, como

observado para a linhagem SW, cabe destacar que valores nesta faixa são aceitos como válidos, apenas sugerem maior supervisão e investigação sobre possíveis causas não aleatórias, no entanto os gráficos não demonstraram tendências não aleatórias, tendo em vista que os demais ensaios não apresentaram valores fora dos limites.

A precisão inter-ensaios do método para a linhagem B6D2F1 (grupo A2), avaliada utilizando os valores de logaritmo das DE_{50} , obtidos após tratamento com o padrão MRT(B)rhEPO/0208 a cada ensaio (Tabela 9), demonstrou uma variabilidade satisfatória, com $gCV\% = 14,51\%$. Nas condições experimentais adotadas, a veracidade também foi satisfatória, com $ER\% = -7,05$ (Tabela 10), *i.e.* dados muito semelhantes aqueles obtidos para a linhagem SW.

O ANOVA realizado entre os resultados de potência das linhagens SW (grupo A1) e B6D2F1 (grupo A2) (Tabela 11) demonstrou, para um nível de significância $\alpha = 0,05$, que os dados são homogêneos e que não houve evidência estatística que comprovasse que os resultados obtidos com ambas as linhagens não são concordantes (valor $p > 0,05$).

Observando a média de quadrados (MQ) entre grupos (variância entre grupos) e a MQ dentro dos grupos (variância dentro dos grupos) vimos que a variação entre grupos não contribui mais que a variação dentro dos grupos. Isto também demonstra a homogeneidade entre os grupos avaliados.

A concordância também pode ser demonstrada através da avaliação da homogeneidade entre as linhagens pelo teste do qui-quadrado (Tabela 12). Um total de 90,90% dos pares de resultados foram considerados homogêneos, uma proporção significativa de ensaios concordantes.

Segundo Bland e Altman (1986), medir as diferenças entre dois métodos para cada amostra e testá-las contra as médias é a melhor maneira de avaliar a relação entre os métodos. Aplicando essa regra aos nossos dados (Gráfico 9), ficou demonstrada considerável concordância entre as linhagens (grupo A1 e A2). Tendo em vista a tendência de 0,1818, ou seja, as diferenças não se afastaram de zero de forma significativa, além de ser possível observar a dispersão aleatória das diferenças em torno da média, uma vez que os resultados se mantiveram dentro dos

limites de concordância (-21,29 a 21,66), com exceção de apenas um valor que ficou fora. A dispersão das diferenças ao longo da linha zero é uma indicação da concordância entre dois métodos (BLAND; ALTMAN, 1986).

A concordância entre as linhagens SW e B6D2F1 pode ainda ser demonstrada pela avaliação dos Erros Relativos entre as linhagens (Gráfico 10). Apenas um ER, dos 22, ficou acima de $\pm 30\%$ (-33%), sendo que a maioria ficou dentro de $\pm 10\%$.

A regra 4-6-30 (USP, 2012) para veracidade foi atendida, ou seja, 1 resultado em 22 (4,54%) se apresentou fora do limite de aceitação de $\pm 30\%$, logo 95,45% dos resultados se mantiveram dentro do limite de aceitação de $\pm 30\%$. A regra preconiza que 4 em 6 amostras (66,67%) devem estar dentro os limites de aceitação de 30%.

O CV% máximo esperado entre as linhagens era de 30%, no entanto todos os valores de CV (Tabela 10 e Gráfico 11) ficaram abaixo de 30% e a maioria dentro de 10%, demonstrando uma baixa variabilidade (imprecisão) entre as linhagens.

Quando comparamos os nossos resultados de ensaios (grupo B1) com os do produtor (grupo B2), utilizando a linhagem B6D2F1 para liberação de lotes ($n = 49$), o ER ficou abaixo de $\pm 30\%$ (Gráfico 12), demonstrando que a variabilidade independe da linhagem utilizada. Esta variação é esperada e inerente aos ensaios biológicos. Contudo, no ANOVA (Tabela 13) os dados foram considerados homogêneos e sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0.05$).

Aplicando o método de Bland-Altman nestes mesmos dados (valores de potência das 49 amostras testadas pelo INCQS - grupo B1 e pelo produtor - grupo B2, na linhagem B6D2F1), apenas dois valores ficaram fora do limite de concordância (Gráfico 13), o que demonstrou que os resultados entre os dois laboratórios (INCQS e produtor) são concordantes.

Avaliando a homogeneidade destes resultados (grupo B1 x grupo B2), através do teste qui-quadrado, entre cada par de valores de potência e limites de confiança (Tabela 14), apenas dois pares de resultados foram considerados heterogêneos ($p < 0,05$) sendo os demais considerados homogêneos ($p > 0,05$).

E comparando a linhagem B6D2F1 do produtor (grupo A3) com a linhagem SW do INCQS (grupo A1), para a mesma amostra, a maioria dos valores de CV% ficaram abaixo de 10% e todos os ER abaixo de $\pm 30\%$ (Tabela 15 e Gráfico 14), o que demonstra uma variabilidade aceitável para ensaios biológicos. No ANOVA (Tabela 16) também ficou demonstrada a homogeneidade dos dados e que não há diferença significativa entre os grupos ($p > 0.05$).

Aplicando o teste de Bland-Altman a estes mesmos dados observamos a concordância entre ambos laboratórios (Gráfico 15), uma vez que as diferenças não se afastaram de zero de forma significativa, além de ser possível observar a dispersão aleatória das diferenças em torno da média, uma vez que os resultados se mantiveram dentro dos limites de concordância, exceto dois valores que ficaram em cima da linha do LC.

Foi adotada uma abordagem prática na avaliação da reprodutibilidade do ensaio (precisão entre laboratórios), uma vez que não pode ser realizado um estudo colaborativo convencional. Isto foi feito pela determinação do coeficiente de variação de reprodutibilidade ($CV_R\%$), o qual leva em conta a média das variâncias.

Quando analisamos os resultados de potência na linhagem B6D2F1, entre INCQS (grupo B1) e produtor (grupo B2) o $CV_R\%$ foi 8,97 ($n = 49$). E quando analisamos a potência na linhagem B6D2F1 do produtor (grupo A3) e SW do INCQS (grupo A1), o $CV_R\%$ foi 9,34 ($n = 22$). Ambos abaixo do critério de aceitação adotado (*i.e.* 30%), no entanto o intervalo de aceitação do ensaio permitiria que ensaios com até 45% de diferença fossem aceitos, uma vez que a faixa de aceitação para os valores de potência é de 80 a 125% (COUNCIL OF EUROPE, 2011).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSÕES

O ensaio de potência utilizando a linhagem SW demonstrou está padronizado e sobre controle e pode ser empregado na avaliação da potência biológica de rhEPO para fins regulatórios.

Para os parâmetros avaliados, tais como precisão intra e inter-ensaios e veracidade, com ambas as linhagens testadas, os valores obtidos foram excelentes, tendo em vista ser um ensaio biológico *in vivo*.

Ainda em relação a comparação das linhagens testadas, cabe ressaltar que SW e B6D2F1 geraram resultados estatisticamente semelhantes e homogêneos, portanto, podem ser consideradas linhagens concordantes.

O ensaio demonstrou ser reprodutível pela abordagem prática adotada, no entanto, estudos complementares utilizando a linhagem SW, com um maior número de laboratórios participantes devem ser realizados.

6.2 PERSPECTIVAS

Sugerir a realização de um estudo colaborativo utilizando a linhagem SW com um maior número de laboratórios para avaliação da potência de rhEPO.

Propor a inclusão do ensaio de avaliação da potência de rhEPO na Farmacopeia Brasileira, sugerindo a utilização das linhagens aqui testadas.

REFERÊNCIAS

- AAPRO, M. S. et al. Epoetin alfa increases hemoglobin levels and improves quality of life in anemic geriatric cancer patients receiving chemotherapy. **Supportive Care Cancer**, Heidelberg, v. 14, n.12, p. 1184-1194, 2006.
- ABENSUR, H. Reações adversas associadas à eritropoietina. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 22, supl. 5, p. 30-41, 2000.
- ALBERTENGO, M. E. et al. Eritropoietina recombinante humana: método de valoración *in vivo* con ratones normocitêmicos. **Sangre**, Zaragoza, v. 44, n. 5, p. 357-363, 1999.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (orgs.). *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 388 p.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta de Produtos. Medicamentos. 2013. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp. Acesso em: 14/01/2013.
- BARTH, T. et al. Validation of the normocythemmic mice bioassay for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 91, n. 2, p. 285-291, 2008.
- BEIGUELMAN, B. *Curso prático de bioestatística*. 5ª edição revisada. FUNPEC editora. Ribeirão Preto, 2006.
- BERG, P.; MERTZ, J. E. Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. **Genetics**, Bethesda, v. 184, n. 1, p. 9–17, 2010.
- BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ. Eritropoietina humana recombinante. Monografia do produto. Disponível em http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/monografia_epo.pdf. Acesso em: 31/05/2011.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **The Lancet**, Philadelphia, v. 327, n. 8476, p. 307-310, 1986.
- BOHLIUS, J. et al. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. **Journal of National Cancer Institute**, Oxford, v. 98, p. 708-714, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 2981 de 26 de novembro de 2009. Aprova o Componente Especializado da Assistência Farmacêutica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 de novembro de 2009, Seção 1, n. 228, p. 725-771.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº. 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o Registro de Produtos Biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 dezembro de 2010a. Seção 1, n. 241, p. 110-113.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Da excepcionalidade às linhas de cuidado: O Componente Especializado da Assistência Farmacêutica. **Série B. Textos Básicos de Saúde**, Brasília, DF, 2010b. 262 p. il..

BRASIL. Ministério da Saúde. SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária. Falta de medicamentos gera protestos de moradores. **Clipping SVS**. Brasília, DF, janeiro, 2011a. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_31012011.pdf. Acesso em: 28 de mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária. Doentes sofrem sem remédios. **Clipping SVS**. Brasília, DF, maio, 2011b. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_24052011.pdf. Acesso em: 28 de mar. 2012.

BRINES, M. L. et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 97, p. 10526-10531, 2000.

BRINKS, V. et al. Quality Original and Biosimilar Epoetin Products. **Pharmaceutical Research**, Heidelberg, v. 28, n.2, p. 386-393, 2011.

BRUCKNER, L. et al. Three Rs approaches in the quality control of inactivated Rabies vaccines. **Alternatives to Laboratory Animals**, Nottingham, v.31, p.429–454, 2003.

BUEMI, M. et al. The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, Philadelphia, v. 62, n. 3, p. 228-236, 2003.

CALVILLO, L. et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia- reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 100, p. 4802-4806, 2003.

CHATTOPADHYAY, A. et al. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.59, p.419–425, 2000.

COSTA, R. N. et al. Evaluation of the applicability of swiss webster lineage on the biological potency test of recombinant human erythropoietin. **International Journal of Biosafety and Biosecurity**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 49-59, 2010.

COUNCIL OF EUROPE. Erythropoietin concentrated solution. In: The European Pharmacopoeia. Monograph 1316, 7th ed. v. 1, Strasbourg, 2011, p.1813-17.

COUNCIL OF EUROPE. Combination of assay results. (Chapter 5.3 Statistical analysis). In: The European Pharmacopoeia, 2012, 7th ed. Strasbourg, France. p 572-573.

D'ANDREA, A. D.; ZON, L. I. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 86, p. 681-687, 1990.

ECVAM. Scientific Advisory Committee. Statement on the batch potency testing of erythropoietin concentrated solution. In: 18th Meeting, 2002, Ispra, Italy.

EGRIE, J.; BROWNE, J. Darbepoietin alfa is more potent in vivo and can be administered less frequently than rHuEPO. **British Journal of Cancer**, Basingstoke, v. 87, p. 476-477, 2002.

ELLIOTT, S. et al. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. **Nature Biotechnology**, Basingstoke, v. 21, p. 414-421, 2003.

ELLIOTT, S.; PHAM, E.; MACDOUGALL, I. C. Erythropoietins: A common mechanism of action. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 36, p. 1573-1584, 2008.

ESCHBACH, J.W. et al. Correction of the anemia of end stage renal failure with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 316, p. 73–78, 1987.

FANDRY, J. Erythropoietin receptors on tumor cells: what do they mean? **The Oncologist**, Durham, v. 13, suppl. 3, p. 16–20, 2008.

FARDELONE, L. C; BRANCHI, B. A. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil. **Revista da FAE**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 29-38, 2006.

FARIS, P. M.; RITTER, M. A.; ABELS, R. I. The effects of recombinant human erythropoietin on perioperative transfusion requirements in patients having major orthopedic operation. The American Erythropoietin Study Group. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Needham, v. 78, n. 1, p. 62-72, 1996.

FDA - Food and Drug Administration. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville, 2001.

FISHER, J. W. et al. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. **British Journal of Haematology**, Hoboken, v. 95, p. 27–36, 1996.

FITZGERALD, E. A. et al. Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. **Developments in Biological Standardization**, Basel, v. 40, p. 183-186, 1978.

FRIED, W. The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. **Blood**, Washington, v. 40, p. 671–677, 1972.

FRIED, W. Erythropoietin and erythropoiesis. **Experimental Hematology**. Philadelphia, v. 37, p. 1007–1015, 2009.

GILD, D. et al. Analytical methods for characterization and quality control of pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an example. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, Amsterdam, v. 71, n. 6, p. 383-394, 1996.

GUAN, X.; CHEN, L. Role of erythropoietin in cancer-related anaemia: a double-edged sword? **The Journal of International Medical Research**, London, v. 36, p. 1-8, 2008.

GURGEL, T. C. et al. Utilização de eritropoetina por pacientes incidentes em hemodiálise no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2002-2003. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 5, 2012.

HALSTENSON, C. E. et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, New York, v.50, n.6, p.702-712, 1991.

HARDEE, M. E. et al. Erythropoietin biology in cancer. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 12, p. 332-339, 2006.

HENDRIKSEN, C.F. M. et al. Validation of Alternative Methods for the Potency Testing of Vaccines, **Alternatives to Laboratory Animals**, Nottingham, v. 26, p. 747-761, 1998.

HIRATA, A. et al. Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, Heidelberg, v. 19, p. 33-40, 2005.

HOFFBRAND, V.; MOSS, P.; PETTIT, J. Essential Haematology. 5 ed, Hoboken. John e Wiley, 2006. 392 p.

HOFFMAN, D.; KRINGLE, R. A total error approach for the validation of quantitative analytical methods. **Pharmaceutical Research**, Heidelberg, v. 24, n. 6, p. 1157-63, 2007.

INCQS - INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE. POP 65.3400.002: gráficos de controle para medidas individuais e amplitudes móveis em ensaios biológicos. Rev.00. Rio de Janeiro. 2008. 10p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS - INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE. POP 65.3430.042: ensaio para avaliação "in vivo" da potência biológica de eritropoetina humana recombinante. Rev.01. Rio de Janeiro. 2012. 17p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

ISO. N° 3534-2, Statistics, Vocabulary and Symbols - Part 2: Applied Statistics. 2nd ed., Geneva, 2006.

JACOBS, K. et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. **Nature**, Basingstoke, v. 313, p. 806-810, 1985.

JACOBSON, L. O. et al. Role of the kidney in erythropoiesis. **Nature**, Basingstoke, v. 139, p. 633–634, 1957.

KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T. Hematopoietic agents: Growth Factors, Minerals and Vitamins. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11^o Edition, 2005. p. 1433-1465.

KOURY, S.T. et al. The use of in situ hybridization to study erythropoietin gene expression in murine kidney and liver. **Microscopy Research and Technique**, Hoboken, v. 25, n. 1 p. 29–29, 1993.

LIN, F-K. et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 82, pp. 7580-7584, 1985.

LOPES, M.C. Avaliação da potência biológica da eritropoetina humana recombinante em produtos farmacêuticos: estudo comparativo entre as linhagens de camundongos B6D2F1 e Swiss Webster. 2004. 73p. il. Dissertação (mestrado). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz.

LORENZI, T. F. Hematopoese. In: LORENZI, T.F (coord.). Atlas de hematologia: Clínica Hematológica ilustrada. 1 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2006. p. 3-66.

MACDOUGALL, I. C. et. al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 1, p. 1211–1215, 2006.

MATTE, U. Histórico de Fatos Relevantes em Genética 1859-1999. Texto incluído em 21/07/1999. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/bioetica/crogen.htm>. Acesso em: 25/5/11.

METCALF, D. Hematopoietic cytokines. **Blood**, Washington, v. 111, n. 2, p. 485-491, 2008.

MGI - International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. Guidelines for nomenclature of mouse and rat strains. Revised: September 2010. Disponível em: www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml#definition. Acesso em: 25/05/2011.

MINAMINO, T.; KITAKAZE, M. New therapeutic application of erythropoietin against ischemic heart diseases. **Journal of Pharmacological Sciences**, Bunkyo-ku, v. 101, p. 179-181, 2006.

MIYAKE, T.; KUNG, C. K-H.; GOLDWASSER, E. Purification of human erythropoietin. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 252, n. 15, p. 5558-5564, 1977.

MOTTA, U.T. Bioestatística. 2 edição. EDUCS. Caxias do Sul, 2006.

MOURA, W. C. et al. Potency evaluation of rabies vaccine for human use: the impact of the reduction in the number of animals per dilution. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.158, n.1-2, p.84-92, 2009.

OSTERBORG, A. et al. Preclinical studies of erythropoietin receptor expression in tumor cells: Impact on clinical use of erythropoietic proteins to correct cancer-related anemia. **European Journal of Cancer**, Amsterdam, v. 43, p. 510-519, 2007.

PADULLÉS-ZAMORA, N. et al. Use of methoxy polyethylene glycol-epoetin beta in stage 3, 4 or 5 non-dialysis chronic kidney disease. **Revista Nefrología**, Barcelona, v. 32, n. 2, p. 221-227, 2012

PATEL, N. S. A. et al. Erythropoietin in the intensive care unit: beyond treatment of anemia. **Annals of Intensive Care**, Heidelberg, v. 1, n. 40, 2011.

PLZAK, L. F. et al. Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe59. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 671- 678, 1955.

PRUTCHI-SAGIV, S. et al. Erythropoietin treatment in advanced multiple myeloma is associated with improved immunological functions: could it be beneficial in early disease? **British Journal of Haematology**, Hoboken, v. 135, p. 660 – 672, 2006.

RAMOS, A. S. et al. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 11, p. 1561-1569, 2003.

RIBATTI, D. et al. Erythropoietin/erythropoietin receptor system is involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. **Histopathology**, Hoboken, v. 50, p. 591–596, 2007.

RIBATTI, D. Erythropoietin, the first century (editorial). **Leukemia Research**, Kidlington, v. 32, p.1169-1172, 2008.

RIZZO, J. D. et al. Erythropoietin: a paradigm for the development of practice guidelines. **Hematology**, Washington, v. 2001, n.1, p. 10-30, 2001.

SAAG, M. S. et al. Once-weekly epoetin alfa improves quality of life and increases hemoglobin in anemic HIV+ patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New Rochelle, v. 20, n. 10, p. 1037-1045, 2004.

SCHMIDT, C. A. et al. Avaliação da atividade e caracterização de Eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 183-189, 2003.

SILVA, I. B. Avaliação do ensaio de potência biológica da alfaepoetina nas linhagens de camundongos B6D2F1, Swiss Webster, C57BL6, NIH e BALB/c. 2012. 91p. (Doutorado). ENSP/FIOCRUZ. Disponível em: <http://bvssp.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=2841>. Acesso em 18/02/2013.

SOARES, E. E. O Setor de biotecnologia. Mesa redonda: bionegócios. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Recife, 2-5 de agosto, 2005.

SOLKOWSKY, M.; WASSERMAN, R.; BRAU, N. Once Weekly recombinant human erythropoietin (epoetin alfa) facilitates optimal ribavirin (RBV) doping in hepatitis C virus-infected patients receiving interferon alfa 20b (IFN/RBV therapy). In: The hepatitis single topic Conference, June, 2001, Chicago, Illinois.

SÖRGE, F. et al. Biosimilarity of HX575 (human recombinant epoetin alfa) and epoetin beta after multiple subcutaneous administration. **International Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, Malden, v.47, n.6, p.391-401, 2009.

STORRING, P. L. et al. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. **British Journal of Haematology**, New York, v.100, n.1, p.79-89, 1998.

TACONIC. Animals models list. B6D2F1. 2011. Disponível em: <http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=763>. Acesso em 22/08/2011.

TACONIC. Animals models list. B6D2F1. 2013. Disponível em: <http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=763>. Acesso em: 10/03/2013.

TACONIC. Animals models list. Swiss Webster. 2013. Disponível em: <http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=856>. Acesso em: 10/03/2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE. 2011. Classificação Genética dos Animais de Laboratório. Disponível em: www.uff.br/animaislab/ap6.doc. Acesso em: 22/08/2011.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA, mon. <1033>; Biological Assay Validation, in: USP 35 NF30, Rockville; 1st Sup; 2012; p. 5174-85

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. General involvement of hypoxia inducible factor response to hypoxia. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 90, p. 4304-4308, 1993.

WANG, Y. J. et al. PEGylation markedly enhances the *in vivo* potency of recombinant human non-glycosylated erythropoietin: a comparison with glycosylated erythropoietin. **Journal of Controlled Release**, Kidlington, v. 145, n. 3, p. 306-313, 2010.

WEISS, M. J. New Insights into erythropoietin and Epoetin Alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications. **The Oncologist**, Durham, v. 8, suppl. 3, p. 18-29, 2003.

WHO. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation, p. 69-73, Geneva, 1997.

WHO. Drug Information. v. 24, n. 1, 2010. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/DrugInfo_2010_Vol24-2.pdf. Acesso em: 13/03/2012.

WINEARLS, G. C. et al. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic hemodialysis. **The Lancet**. Philadelphia, v. 328, n. 8517, p. 1175-1178, 1986.

YANG, W. S. et al. Darbepoetin alfa suppresses tumor necrosis factor- α -induced endothelin-1 production through antioxidant action in human aortic endothelial cells: Role of sialic acid residues. **Free Radical Biology & Medicine**, Kidlington, v. 50, p. 1242–1251, 2011.

ZANICHELLI, M. A. et al. Hematopoese, fatores de crescimento e aplicação clínica da eritropoetina na anemia da prematuridade. **Pediatria**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 123-142, 1995.

ZANJANI, E. D. et al. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. **The Journal of Clinical Investigation**, Danvers, v. 67, p. 1183-1188, 1981.