

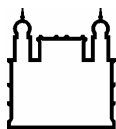
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA OTIMIZAÇÃO DO
MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DA ALFAEPOETINA
HUMANA RECOMBINANTE EM BIO-MANGUINHOS / FIOCRUZ**

ANA RODRIGUES DE ANDRADE

Rio de Janeiro

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ANA RODRIGUES DE ANDRADE

**Aplicação da citometria de fluxo para otimização do método de
determinação da potência da alfaeopetina humana recombinante em Bio-
Manguinhos / Fiocruz**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia em Imunobiológicos como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A553

Andrade, Ana Rodrigues de.

Aplicação da citometria de fluxo para otimização do método de determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante em Bio-Manguinhos / Fiocruz. / Ana Rodrigues de Andrade. – Rio de Janeiro, 2011

xvi, 96 f. : il. ; 30 cm.

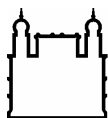
Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011

Bibliografia: f. 72-80

1. Alfaepoetina. 2. Eritropoetina. 3. Citometria de fluxo. 4. Potência
5. Atividade biológica 6. Reticulócitos 7. Laranja de tiazol.

CDD 615.1

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Departamento de Qualidade, sob a orientação do Prof. Dr. Damião Carlos Moraes dos Santos e da Dra. Denise Cristina de Souza Matos com a colaboração da Seção de Controle Biológico, do Laboratório em Tecnologia Diagnóstica e do Laboratório de Experimentação Animal.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ANA RODRIGUES DE ANDRADE

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO
DE DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DA ALFAEPOETINA HUMANA
RECOMBINANTE EM BIO-MANGUINHOS / FIOCRUZ**

Orientadores: Dr. Damião Carlos Moraes dos Santos
Dra. Denise Cristina de Souza Matos

Dissertação aprovada em 28 de Junho de 2011

Examinadores:

Dra. Marcia Arissawa
Bio-Manguinhos / Fiocruz – Presidente

Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto
IOC / Fiocruz

Dra. Rilza Beatriz Gayoso de Azeredo Coutinho
Hospital Geral de Bonsucesso

Rio de Janeiro
2011

Aos meus grandes amores mamãe, Lara,
papai e João Pedro.

AGRADECIMENTOS

À Fiocruz e a Bio-Manguinhos por oferecerem o Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos e toda a estrutura necessária à realização do trabalho.

A Izabel Crespo, Lauro de Sena, Ana Lúcia Palmigiani e Darcy Akemi Hokama pela permissão para fazer o mestrado e por compreenderem as ausências.

Aos meus orientadores, Damião Santos e Denise Matos, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

À Dra. Sheila Farage, a Zaíra Antunes, a Andrea Ayrosa e a Michele Clarina pelos diferentes tipos de apoio recebidos no ambiente do MPTI.

Ao Prof. Dr. Geraldo Marcelo Cunha pela valiosa ajuda com o tratamento estatístico dos dados.

A Akie Kawakami Avila pela grande ajuda de última hora.

Ao LAEAN por todas as etapas envolvendo os camundongos.

Ao LATED, por proporcionar o uso do citômetro de fluxo, e em especial a Marta Santiago, por toda a ajuda com a citometria e por me receber sempre com carinho.

A todos da SEBIO pela constante disponibilidade em ajudar; pela cessão de espaço físico, material e equipamentos; e pelo compartilhamento de dados, resultados e ideias.

Aos amigos do LAFIQ, em especial do SEAPQ, pelo apoio e compreensão e por transformarem os dias de trabalho em momentos prazerosos.

A todos os amigos e colegas de Bio-Manguinhos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos colegas do MPTI 2009, por termos passados juntos por todo esse caminho.

Às amigas do coração Lucrecia Fazollo, Thais Bosch, Anita Toshie e Elizabete Figueredo, por estarem sempre lá quando precisei e por toda a alegria e conforto que trazem à minha vida.

A minha família: pais, irmãos, avós, tios, primos e madrasta por estarem presentes sempre com carinho na minha vida.

À minha avó Rilma por ter sido uma das maiores incentivadoras da minha formação.

Ao meu namorado João Pedro pela ajuda com PowerPoint e principalmente por me fazer feliz todos os dias.

À minha irmã Lara por ter sido a maior companheira e cúmplice em tudo na minha vida.

À minha mãe, Teresinha, por todo amor, dedicação e ajuda, e por ter me mostrado, pela primeira vez, a beleza da ciência.

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!

Mário Quintana

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvi
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Aspectos gerais.....	1
1.2. Eritropoetina	2
1.2.1- Estrutura da eritropoetina	3
1.2.2- Produção endógena	5
1.2.3- Receptores e sinalização intracelular	7
1.3- Eritropoiese	10
1.4- Reticulócitos.....	12
1.5- Contagem de reticulócitos.....	15
1.5.1- Métodos de contagem de reticulócitos	16
1.5.2- Método visual.....	17
1.5.3- Citometria de fluxo	20
1.5.4- Contagem de reticulócitos por citometria de fluxo e analisadores hematológicos automáticos.....	23
1.5.5- Método visual <i>versus</i> citometria de fluxo	26
1.5.6- Contagem de reticulócitos por meio da marcação com anticorpos monoclonais ...	27
1.5.7- Variabilidade biológica e a contagem de reticulócitos.....	28
1.6- Eritropoetina humana recombinante	29
1.7- Usos da eritropoetina humana recombinante	31
1.7.1- Efeitos adversos	33
1.8- Controle de qualidade.....	34
1.9- Relevância do estudo.....	36
2- OBJETIVOS.....	38
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos.....	38
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	39

3.1- Amostras e material de referência da alfaeopetina humana recombinante	39
3.2- Animais utilizados.....	40
3.3- Inoculação das amostras e padrões nos camundongos.....	40
3.4- Anticoagulantes	40
3.5- Coleta do sangue	41
3.6- Análise por microscopia.....	42
3.7- Preparo das amostras para análise por citometria	42
3.8- Leitura das amostras em citômetro de fluxo e análise dos dados.....	43
3.9- Cálculo de potência e validade do teste	46
3.10- Análise estatística e comparação dos métodos.....	48
3.11- Variação intra-analista e inter-analistas para a contagem de reticulócitos pelo método de citometria de fluxo.....	49
3.12- Testes para validação do método de citometria de fluxo para uso na rotina da Seção de Controle Biológico (SEBIO) de Bio-Manguinhos	49
4 – RESULTADOS	51
4.1- Resultados gerados pela citometria de fluxo para os vinte lotes de alfaeopetina humana recombinante utilizados na comparação entre os métodos.....	51
4.2- Validade estatística dos ensaios	54
4.3- Resultados de potência	54
4.4- Análise de concordância entre os métodos de citometria e microscopia.....	58
4.5- Variação intra-analista e inter-analistas para a contagem de reticulócitos por citometria de fluxo.....	61
4.6- Repetitividade dos resultados de potência obtidos pela contagem de reticulócitos por citometria.....	62
4.7- Precisão intermediária dos resultados de potência obtidos pela contagem de reticulócitos por citometria.....	62
5 – DISCUSSÃO	64
5.1- A citometria de fluxo para a contagem de reticulócitos.....	64
5.2- Uso de EDTA e heparina como anticoagulante	66
5.3- Comportamento das amostras e material de referência.....	67
5.4- Comparação e avaliação da concordância entre os métodos de citometria de fluxo e microscopia.....	67
5.5- Testes para validação do novo método	68
6 – CONCLUSÕES.....	70
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc -	Adenosina monofosfato cíclico
Anvisa -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Arg -	Arginina
Asn -	Asparagina
ATP -	Adenosina trifosfato
BFU-E -	<i>Burst-forming unit erythroid</i> – unidade eritróide formadora de blasto
BHK -	<i>Baby Hamster Kidney</i> – rim de filhote de hamster
Bio-Manguinhos -	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
CECAL -	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA -	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFU-E -	<i>Colony-forming unit erythroid</i> – unidade eritróide formadora de colônia
CHO -	<i>Chinese Hamster Ovary</i> – Ovário de hamster chinês
CIM -	Centro de Inmunología Molecular
CIPBR -	Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos para Diagnóstico
COI -	Comitê Olímpico Internacional
CV -	Coefficiente de variação
DCB -	Denominação Comum Brasileira
DEQUA -	Departamento de Controle de Qualidade
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
ECVAM -	Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO -	Eritropoetina
EPOmRNA -	RNA mensageiro da eritropoetina
EpoR -	Receptor para a eritropoetina
FDA -	<i>US Food and Drug Administration</i>
Fiocruz -	Fundação Oswaldo Cruz

fL -	Fentolitro
FL1 -	Canal de fluorescência
FS / FSC -	<i>Forward scatter</i> – dispersão frontal
g.l. -	Graus de liberdade
GM-CSF -	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> – fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
gp -	Glicoproteína
HIF-1 -	<i>Hypoxia inducible factor 1</i> – Fator induzido por hipóxia 1
hist -	Histograma
HNF-4 -	<i>Hepatocyte nuclear factor 4</i> – Fator nuclear 4
ICSH -	<i>International Council for Standardisation in Hematology</i>
IFA -	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IFN- γ -	Interferon gama
IGF-1 -	<i>Insulin-like growth factor 1</i> – Fator de crescimento insulínico 1
IL -	Interleucina
INCQS -	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IRC -	Insuficiência renal crônica
IRF -	<i>Immature reticulocyte fraction</i> – Fração de reticulócitos imaturos
IT -	Instrução de trabalho
LAEAN -	Laboratório de Experimentação Animal
LATED -	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LIC -	Limite inferior de concordância
LSC -	Limite superior de concordância
Met -	Metionina
MAb -	<i>Monoclonal antibody</i> – anticorpo monoclonal
mRNA -	Ácido ribonucléico mensageiro
MRT -	Material de referência de trabalho
NCCLS -	<i>National Comitee for Clinical Laboratory Standards</i>
pb -	Pares de base
PBS -	<i>Phosphate buffered saline</i> – tampão fosfato em salina
Phe -	Fenilalanina
pI -	Ponto isoelétrico
PI-3K -	Fosfaditil-inositol 3-quinase
POP -	Procedimento Operacional Padronizado

rhEPO -	Eritropoetina humana recombinante
RMN -	Ressonância magnética nuclear
RNA -	Ácido ribonucléico
S -	Desvio padrão
SCF -	Fator de célula tronco
SEBIO -	Seção de Controle Biológico
Ser -	Serina
SESOD -	Seção de Soluções e Diluentes
SPF -	<i>Specific Pathogen Free</i> – livre de patógenos específicos
SS / SSC -	<i>Side scatter</i> – dispersão lateral
SUS -	Sistema Único de Saúde
TfR -	<i>Transferrin receptor</i> – receptor de transferrina
Thr -	Treonina
TNF- α -	<i>Tumor necrosis factor-α</i> – Fator de necrose tumoral α
Tyr -	Tirosina
UI -	Unidades Internacionais
Val -	Valina
VDTEC -	Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 –	Estrutura da eritropoetina	3
Figura 1.2 –	Estrutura da eritropoetina obtida por RMN	5
Figura 1.3 –	Fatores envolvidos na regulação do gene da eritropoetina	6
Figura 1.4 –	Representação esquemática do domínio intracelular de EpoR	9
Figura 1.5 –	Etapas de ativação de EpoR	9
Figura 1.6 –	Ativação e inativação do receptor de eritropoetina (EpoR)	10
Figura 1.7 –	Diagrama esquemático da produção de eritrócitos	11
Figura 1.8 –	Os fatores de crescimento que influenciam a eritropoiese	14
Figura 1.9 –	Estágios de maturação dos reticulócitos	15
Figura 1.10 –	Fotomicrografia de sangue periférico marcado com novo azul de metileno	18
Figura 1.11 –	Os quadrantes da Câmara de Neubauer e os reticulócitos vistos neste aparato	19
Figura 1.12 –	Principais componentes de um citômetro de fluxo	21
Figura 1.13 –	As dispersões frontal e lateral e a fluorescência	22
Figura 1.14 –	Etapas da contagem de reticulócitos por citometria de fluxo	25
Figura 3.1 –	Preparo e inoculação das amostras e material de referência	41
Figura 3.2 –	Processamento das amostras e contagem de reticulócitos em Câmara de Neubauer por microscopia ótica	43
Figura 3.3 –	Processamento das amostras e contagem de reticulócitos por citometria de fluxo	44
Figura 3.4 –	Gráfico FSC x SSC com o <i>gate</i> (R1) delimitando a população de células vermelhas	45
Figura 3.5 –	Histograma FL1 para uma amostra controle negativo	45
Figura 3.6 –	Histograma FL1 para uma amostra marcada com Retic-COUNT	46
Figura 4.1 –	Gráfico FSC x SSC representativo de uma amostra de sangue inoculada com alfaepoetina humana recombinante	51

Figura 4.2 –	Histogramas de fluorescência x número de células representativos das três doses inoculadas nos camundongos	52
Figura 4.3 –	Gráfico FSC x SSC representativo de uma amostra de sangue de camundongo não inoculado	53
Figura 4.4 –	Histograma de fluorescência x número de células representativo das amostras não inoculadas	54
Figura 4.5 –	Gráfico dose x resposta para amostra e material de referência	56
Figura 4.6 –	Gráfico de Bland-Altman para os resultados obtidos pela contagem por citometria e microscopia	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 –	Ferramentas para contagem de reticulócitos	17
Tabela 1.2 –	Principais diferenças entre a contagem de reticulócitos por método visual e por citometria de fluxo	27
Tabela 1.3 –	Composição de carboidratos da eritropoetina	30
Tabela 3.1 –	Exemplo da comparação entre os resultados obtidos por microscopia e citometria de fluxo	49
Tabela 4.1 –	Exemplo dos resultados esperados para os testes de regressão, paralelismo e linearidade para os resultados da amostra e do material de referência obtidos por citometria ou microscopia	55
Tabela 4.2 –	Resultados de potência e limites de confiança para os lotes de alfaepoetina testados por citometria	56
Tabela 4.3 –	Comparação entre as médias dos resultados obtidos com heparina e EDTA	57
Tabela 4.4 –	Resultados de potência e limites de confiança para os lotes de alfaepoetina testados por microscopia	57
Tabela 4.5 –	Comparação entre as médias dos resultados obtidos por citometria de fluxo e microscopia	57
Tabela 4.6 –	Análise de Bland-Altman para comparação entre os métodos de citometria e microscopia	58
Tabela 4.7 –	Variação intra-analista para a contagem de reticulócitos por citometria de fluxo	60
Tabela 4.8 –	Variação inter-analistas para a contagem de reticulócitos por citometria de fluxo	61
Tabela 4.9 –	Repetitividade entre os resultados de um mesmo analista para a determinação de potência da alfaepoetina humana recombinante pela contagem de reticulócitos por citometria de fluxo	62
Tabela 4.10 –	Precisão intermediária para os resultados de três analistas, em dias diferentes, para a determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante pela contagem de reticulócitos por citometria de fluxo	63

RESUMO

A eritropoetina é o hormônio responsável pela regulação da produção de células vermelhas. A eritropoetina humana recombinante (rhEPO) produzida em laboratório e usada como medicamento pode apresentar as isoformas alfa e beta, chamadas de alfaepoetina e betaepoetina humana recombinante. O tratamento com rhEPO melhora bastante a vida de pacientes anêmicos e/ou em diálise, reduzindo a necessidade de transfusão de sangue. A grande demanda por este biofármaco justifica o esforço de pesquisa não só para conhecimento de seus mecanismos de ação e desenvolvimento de processos de produção, como também para controle da qualidade do produto. É de grande importância o desenvolvimento de métodos de análise que diminuam a margem de erro e aumentem a precisão e a confiabilidade dos resultados, além de reduzir o tempo de liberação para o mercado.

O ensaio de determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante produzida por Bio-Manguinhos é realizado pelo método de camundongos normocitêmicos, com contagem de reticulócitos por microscopia. Este método de contagem é demorado, pouco preciso e desgastante para o analista. O objetivo deste trabalho é estudar o uso do método de citometria de fluxo na contagem de reticulócitos para o ensaio de potência da alfaepoetina humana recombinante. Visando a implantação do método no Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) de Bio-Manguinhos, o desenvolvimento deste trabalho teve também como objetivo comparar a sua eficácia em relação ao processo atualmente utilizado, e a realizar os testes necessários à sua validação.

Os camundongos foram inoculados com três doses diferentes de amostra ou material de referência e os reticulócitos presentes no sangue coletado foram marcados com o corante fluorescente laranja de tiazol (Retic-COUNT). Os reticulócitos foram contados em citômetro de fluxo FACSCalibur e seu percentual foi utilizado para a determinação da potência de acordo com os cálculos da Farmacopéia Européia 6ª edição. Para a comparação entre os métodos, vinte lotes de alfaepoetina humana recombinante produzidos por Bio-Manguinhos tiveram sua potência determinada pela contagem de reticulócitos por citometria e microscopia. Para a determinação da repetitividade e da precisão intermediária, foi utilizado um único lote de alfaepoetina humana recombinante. Para avaliar a concordância entre os métodos de citometria de fluxo e microscopia, foi utilizado o teste estatístico de Bland-Altman, com comparação dos vinte resultados obtidos com os mesmo lotes, analisados a partir das mesmas amostras de sangue.

Os resultados apresentaram boa repetitividade e precisão intermediária e mostraram que os métodos são equivalentes no que diz respeito à determinação da potencia da rhEPO produzida por Bio-Manguinhos. No entanto, em função da alta probabilidade de erros associados ao método de microscopia, a introdução da citometria de fluxo mostra-se uma alternativa bastante promissora para suprir a demanda de testes com precisão, reprodutibilidade e maior velocidade de liberação de lotes.

ABSTRACT

Erythropoietin is the hormone responsible for the regulation of the red cells' production. The recombinant human erythropoietin (rhEPO) produced in laboratory and used as a drug exists in the alpha and beta isoforms, called alpha epoietin and beta epoietin. The treatment with rhEPO improves the life of anemic patients and/or on dialysis, reducing the need for blood transfusion. The high demand for this biopharmaceutical product justifies the research effort not only for the knowledge of its mechanisms of action and development of production processes, but also for the product quality control. The development of quality control methods able to reduce errors and increase the accuracy and the reliability of the results, along with a reduction in the release time to the market, is of great importance.

The assay to determine the biological activity of the recombinant human alpha epoietin produced in Bio-Manguinhos is performed by the normocythaemic mice method and reticulocyte counting by microscopy. This counting method is time consuming, imprecise and stressful to the analyst. The present study aimed to study the use of the flow cytometric method for reticulocyte counting in the biological activity assay for the human alpha epoietin. Intending to implement this new method in the Quality Control Department of Bio-Manguinhos, this work also compared its effectiveness with the currently used method, and the tests required to its validation were performed.

The mice were inoculated with three different doses of sample and reference material, and the reticulocytes on the collected blood were stained with the fluorescent dye thiazole orange (Retic-COUNT). The reticulocytes were counted in a FACSCalibur flow cytometer and their percentage was used for the biological activity determination in accordance with the European Pharmacopoeia 6th edition. To compare the methods, the biological activity of twenty batches of recombinant human alpha epoetin produced by Bio-Manguinhos was determined through both cytometry and microscopy. To the determination of repeatability and intermediate precision, only a single batch of recombinant human alpha epoetin was used. For the evaluation of agreement between both methods, the Bland-Altman test was used to compare the twenty results obtained from the same batches, analyzed from the same blood samples.

The results showed good repeatability and intermediate precision and indicated that the two methods are equivalent when it concerns the determination of the rhEPO biological activity. However, due to the high probability of errors associated with the microscopy method, the introduction of the flow cytometry method seems to be a promising alternative to meet the demand for analyses with precise and reproducible results, along with a good speed in releasing batches for the market.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais

A eritropoetina (EPO) é um hormônio glicoprotéico responsável pela regulação da produção de células vermelhas. A eritropoetina humana recombinante (rhEPO) produzida em laboratório e utilizada como medicamento é encontrada nas isoformas alfa e beta. As eritropoetinas alfa e beta são chamadas de alfaepoetina e betaepoetina, respectivamente, de acordo com a Denominação Comum Brasileira (DCB). Seu uso é hoje bastante disseminado, principalmente em pacientes submetidos à diálise.

A grande demanda por este hormônio justifica o esforço de pesquisa não só para conhecimento de seus mecanismos de ação no organismo humano e desenvolvimento de processos de produção, como também para controle da qualidade do produto.

Antes da produção da eritropoetina humana recombinante, aproximadamente 25% dos pacientes em diálise necessitavam de transfusões regulares de células vermelhas. O tratamento com rhEPO melhorou bastante a vida desses pacientes anêmicos e o medicamento tornou-se um dos mais vendidos no mundo. A eritropoetina humana recombinante foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration – Estados Unidos) para uso humano em pacientes com insuficiência renal crônica em 1989 e sua administração se dá pelas vias subcutânea ou endovenosa.

Além da anemia por insuficiência renal crônica, a rhEPO tem sido também recomendada para o tratamento de anemias associadas ao uso de zidovudina em pacientes com AIDS, ao uso de ribavirina durante o tratamento da hepatite C e também ao uso de quimioterápicos em pacientes com tumores malignos não-mielóides. A rhEPO também pode ser usada no tratamento de síndrome mielodisplásica, em casos de doação de sangue autóloga, período perioperatório, anemias de gravidez e prematuridade, artrite reumatóide e transplantes de medula óssea. O medicamento ainda é rotineiramente administrado a pacientes em hemodiálise, em diálise peritoneal em ambulatório ou em pacientes pré-diálise.

Assim, uma análise criteriosa da eritropoetina humana recombinante produzida é crucial para garantir que os usuários do medicamento tenham acesso a um produto com qualidade. É de grande importância o desenvolvimento de métodos de análise que diminuam a

margem de erro e aumentem a precisão e a confiabilidade dos resultados, além de reduzir o tempo de liberação para o mercado.

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos / Fiocruz) produz alfaepoetina humana recombinante nas doses de 2000 UI e 4000 UI. O controle de qualidade dos lotes do produto final é realizado quanto a aspecto, volume médio, pH, concentração de proteínas, potência, esterilidade, toxicidade inespecífica, pirogênio e endotoxina, de forma a aprovar sua liberação para o mercado. O ensaio de potência é realizado pela Seção de Controle Biológico do Departamento de Controle de Qualidade (SEBIO – DEQUA), seguindo-se o método de camundongos normocitêmicos e contagem de reticulócitos em microscópio com auxílio da câmara de Neubauer (padrão ouro).

O método de contagem de reticulócitos por microscopia, apesar de bem implantado no conjunto dos processos de controle dos lotes de alfaepoetina, é demorado, pouco preciso e desgastante para o analista, acarretando alta probabilidade de erros. Ainda assim, a introdução de métodos mais eficazes depende de estudos prévios, domínio das técnicas e instrumentos e de testes que comprovem que o novo método apresenta resultados no mínimo equivalentes aos do método já padronizado, além de precisão e reprodutibilidade adequadas, bem como viabilidade financeira e boa relação custo / benefício.

O presente trabalho tem como objetivo aplicar o método de citometria de fluxo na contagem de reticulócitos para o controle da atividade da alfaepoetina humana recombinante produzida por Bio-Manguinhos. Visando a implantação do método no Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA), o desenvolvimento deste trabalho teve também como objetivo comparar a sua eficácia em relação ao processo atualmente utilizado, e realizar os testes necessários à sua validação.

1.2. Eritropoetina

A eritropoetina (EPO) é um hormônio glicoprotéico produzido principalmente pelas células peritubulares dos rins, responsável pela regulação da produção de células vermelhas. Circula numa concentração aproximadamente cem vezes menor que a maioria dos hormônios do corpo e age nos receptores presentes nas células eritróides imaturas para promover sua sobrevivência, proliferação e diferenciação na medula óssea (Krantz 1991, Maier et al. 1994, Sawyer e Penta 1996, Lappin 2003, Delanghe et al. 2008). Como a principal função das células vermelhas é o transporte de oxigênio do pulmão para os tecidos periféricos, a regulação da produção de eritropoetina é importante para a oxigenação tecidual.

1.2.1- Estrutura da eritropoetina

A eritropoetina consiste de uma cadeia polipeptídica de 166 aminoácidos (pI 4,5-5,0) com duas pontes dissulfeto (uma ligando a cisteína do aminoácido 7 com a cisteína do aminoácido 161 e a outra ligando as cisteínas dos aminoácidos 29 e 33), como mostrado na figura 1.1.

A primeira ligação dissulfeto é a mais importante, uma vez que garante que a molécula exiba a conformação correta para se ligar ao seu receptor. Assim, se essa ligação dissulfeto é rompida ou defeituosa, a eritropoetina perde sua atividade biológica (Krantz 1991, Lappin 2003). Existem quatro sítios de glicosilação em potencial na eritropoetina, três deles N-substituídos (Asn²⁴, Asn³⁸ e Asn⁸³) e um O-substituído (Ser¹²⁶), mostrados na figura 1.1.

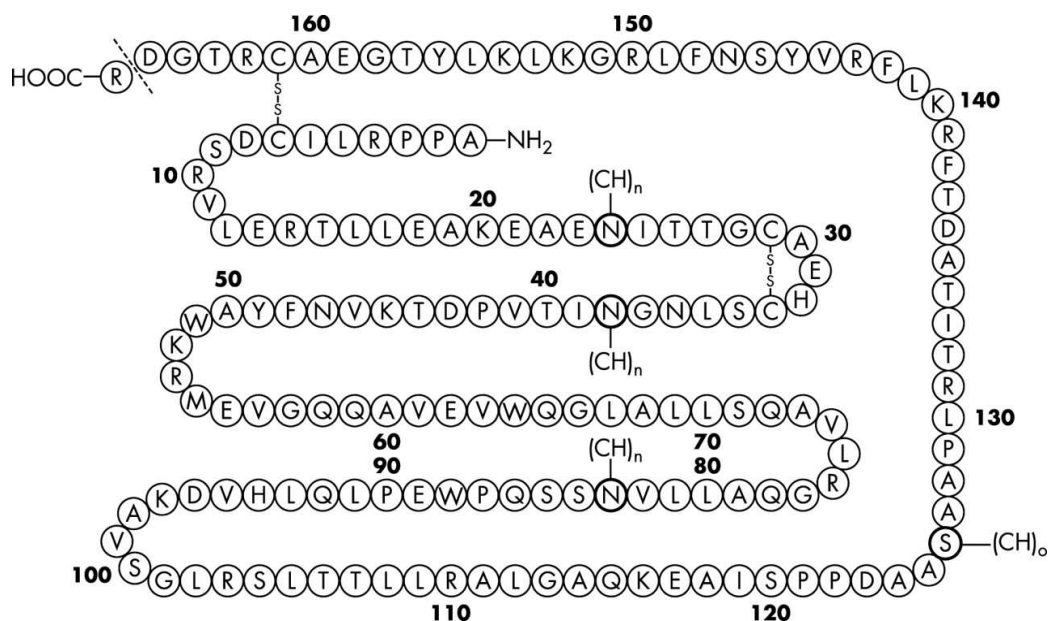


Figura 1.1 – Estrutura da eritropoetina. Fonte: NG et al. 2003.

A massa molecular da eritropoetina varia de 30 a 34 kDa, mas a massa da cadeia peptídica é de apenas 18 kDa, o que indica que, em média, os carboidratos representam aproximadamente 40% da eritropoetina integralmente glicosilada (Krantz 1991, Choi et al. 1996, Aguiar et al. 2003, Schmidt et al. 2003, Sepehrizadeh et al. 2008).

Os carboidratos têm importante papel na atividade biológica da eritropoetina. Como este hormônio é produzido nos rins e tem a medula óssea como alvo, deve ser protegido contra a depuração hepática enquanto circula pelo sangue. Os ácidos siálicos terminais da eritropoetina são necessários para que o hormônio alcance os sítios alvo ao prevenir a depuração pelos receptores hepáticos, que reconhecem os resíduos de galactose expostos. Assim, a atividade *in vivo* da eritropoetina depende do número de resíduos de ácido siálico.

Os carboidratos N-ligados podem apresentar até quatro ácidos siálicos na porção terminal, enquanto os O-ligados apresentam no máximo dois. Os carboidratos N- e O- ligados são necessários para a atividade *in vivo*, mas não para a atividade *in vitro*. A glicosilação garante biossíntese e/ou secreção apropriadas, estabilidade e atividade biológica à molécula da eritropoetina ao proteger contra a degradação pelas proteases, além de reduzir a suscetibilidade à degradação térmica e prevenir contra a remoção por filtração glomerular e depuração hepática. (Krantz 1991, Choi et al. 1996, Aguiar et al. 2003, Schmidt et al. 2003, Liefoghe et al. 2005, Sepehrizadeh et al. 2008).

As unidades glicosídicas N-ligadas (como os grupos funcionais secundários, terciários e quaternários) presentes na eritropoetina são bastante diversas. As proporções entre os grupos funcionais secundários, terciários e quaternários são 1,4:13,5:85,1, respectivamente. Assim, os principais componentes dos carboidratos N-ligados da eritropoetina são sacarídeos quaternários com ou sem repetições acetilactosamínicas. Os ácidos siálicos apresentam ligação α 2-3 com todos os sacarídeos e o grau de sialilação é de aproximadamente 80-97% (Choi et al. 1996).

O grupo funcional glicosídico N-ligado da eritropoetina é classificado em três unidades funcionais: (i) parte principal (Man₃GlcNAc(\pm Fuc)GlcNAc), que mantém a conformação bioativa do polipeptídeo, (ii) parte ramificada (GlcNAcs), que codifica um sinal ao órgão alvo e é responsável pela interação com as células do sistema hematopoiético, e (iii) parte terminal (ácidos siálicos, Gal, GalNAc, N-acetilactosamina e/ou Gal α 13Gal, etc), que determina o tempo de vida das glicoproteínas na corrente sanguínea através do sistema de depuração mediado por lectina (Choi et al. 1996).

A composição da cadeia principal da eritropoetina é fixa, apesar das diferenças encontradas nas cadeias laterais entre as espécies. Mutações na cadeia principal afetam o dobramento da proteína e, conseqüentemente, sua atividade.

A molécula da eritropoetina tem estrutura típica da família de fatores de crescimento hematopoiético, composta por quatro α -hélices conectadas por dois *loops* longos e um *loop* curto, além das pontes dissulfeto (Krantz 1991, Cheetham et al. 2008), como ilustrado na figura 1.2.

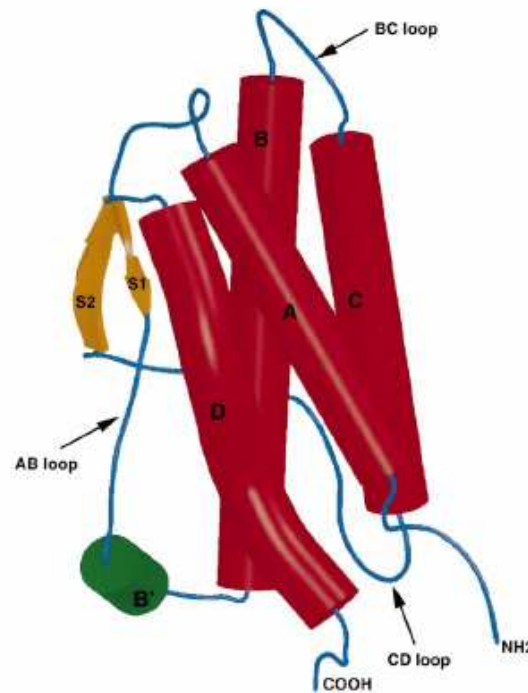


Figura 1.2 – A estrutura da eritropoetina obtida por ressonância magnética nuclear (RMN), mostrando as quatro α -hélices. Fonte: Cheetham et al. 2008.

1.2.2- Produção endógena

Durante o desenvolvimento fetal, o fígado é o principal sítio de produção da eritropoetina. Após o nascimento, a maior parte da eritropoetina circulante é originária das células peritubulares localizadas no córtex renal. Fatores de transcrição da família GATA são importantes no controle da expressão do gene da eritropoetina. A hipóxia tecidual é o principal estímulo para a produção deste hormônio. Foi proposto por Krantz (1991) que a hipóxia resultaria na liberação de prostaglandinas, aumentando o AMPc renal, que por sua vez reduz a concentração intracelular de Ca^{2+} , estimulando a síntese da eritropoetina. Entretanto, a expressão do seu gene não é estimulada apenas por hipóxia tecidual. Há um aumento de expressão também quando a pressão de oxigênio arterial diminui (por exemplo, em altas altitudes) ou quando a afinidade do sangue por O_2 aumenta (Krantz 1991, Jelkmann 2004). Há clara correlação entre anemia e aumento do mRNA da eritropoetina nas células intersticiais do córtex renal, indicando aumento nos níveis de transcrição do seu gene.

Além dos rins, os hepatócitos ao redor das veias centrais do fígado são responsáveis pela produção de cerca de 20% da eritropoetina no organismo. Pequena quantidade de mRNA da eritropoetina também pode ser encontrada nos pulmões e no baço em caso de hipóxia. Além destes locais, eritropoetina é produzida em mínima quantidade no cérebro pelos astrócitos, onde pode proteger os neurônios da morte celular induzida por isquemia se a oxigenação não for suficiente (Lacombe e Mayeux 1998).

Não há estoques pré-formados de eritropoetina. O controle da expressão gênica envolve interações complexas entre o DNA e proteínas nucleares. O gene que codifica a eritropoetina, localizado na região q11-q22 do cromossomo 7, contém diferentes seqüências de DNA necessárias para sua expressão, além de um estimulador de 50 pares de base induzido por hipóxia localizado a aproximadamente 120 pares de base do final 3' do sítio de poliadenilação. Este estimulador é responsável pela indução da expressão do gene da eritropoetina (Lacombe e Mayeux 1998, Aguiar et al. 2003).

O estimulador contém três diferentes segmentos: BS1, BS2 e BS3. BS1 é uma seqüência conservada localizada próximo ao final 5' do sítio de ligação ao fator de transcrição induzido por hipóxia 1 (HIF-1). BS2, ou segmento do meio, é o menos conservado entre as espécies, mas é necessário para a interação de HIF-1 com o complexo de iniciação da transcrição. A terceira parte (BS3) corresponde a seqüências de 3'DNA, que são sítios de ligação para o fator nuclear 4 (HNF-4). As proteínas que se ligam ao estimulador interagem sinergicamente para estimular a transcrição do gene da eritropoetina e o HNF-4 pode ampliar a ativação da transcrição mediada pelo estimulador em células em hipóxia. Além disso, a porção C-terminal de HIF-1 liga-se especificamente a P300 para aumentar a indução por hipóxia. Assim, a oxigenação tecidual insuficiente induz a formação de um grande complexo de proteínas direta ou indiretamente ligadas ao estimulador, que por sua vez traduz um sinal para o promotor do gene da eritropoetina, permitindo sua transcrição (Lacombe e Mayeux 1998, Fisher 2003), como ilustrado na figura 1.3.

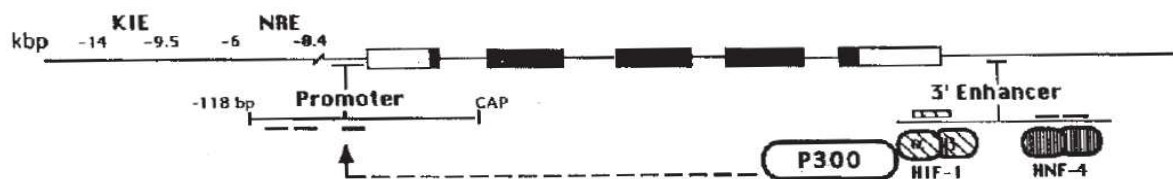


Figura 1.3 – Fatores envolvidos na regulação do gene da eritropoetina. Fonte: Lacombe e Mayeux 1998.

A adenosina é um regulador primário da síntese de eritropoetina, agindo principalmente através das quinases A e C e da fosfolipase A₂. A hipóxia aumenta os níveis de adenosina no fluido extracelular devido à maior quebra de ATP e à atividade ectonucleásica. A teofilina, um antagonista do receptor de adenosina, inibe os efeitos da hipóxia na produção de eritropoetina em camundongos. Da mesma forma, análogos da adenosina aumentam a expressão de EPOMRNA (Fisher 2003).

Outros fatores também podem modular a transcrição do gene da eritropoetina. Em 1997, Imagawa e colaboradores demonstraram que GATA-2 inibe a transcrição através da

ligação ao promotor em condições normóxicas. Além disso, o promotor e a região da ponta 5' contêm sítios de ligação para o fator nuclear κ B (NF κ B) que, junto com GATA-2, inibe a expressão do gene em doenças inflamatórias. As citocinas inflamatórias interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) contribuem para a anemia em doenças crônicas ao suprimirem a produção de eritropoetina (Jelkmann 2004).

1.2.3- Receptores e sinalização intracelular

Os receptores celulares da eritropoetina, EpoR₁ e EpoR₂, pertencem à superfamília de receptores de citocinas que inclui receptores para fatores como o estimulador de colônias de granulócitos, estimulador de granulócitos e macrófagos, muitas interleucinas (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 e 12), hormônio do crescimento e prolactina. Além de terem elementos estruturais semelhantes, estes receptores apresentam transdução do sinal parecida (Sawyer e Penta, 1996). Há menos de 1000 receptores de eritropoetina por célula e estes são expressos em células eritróides nos estágios BFU-E (unidade eritróide formadora de blasto) e CFU-E (unidade eritróide formadora de colônia). O número de receptores por célula diminui gradualmente durante a diferenciação das células eritróides, e estudos demonstraram que reticulócitos e eritrócitos maduros não contêm receptores para EPO (Krantz 1991, Fisher, 2003, Lisowska et al. 2010).

O receptor da eritropoetina apresenta os domínios extracelular, transmembranar e intracelular (citoplasmático). Uma molécula de eritropoetina liga-se a dois receptores na superfície celular. Como consequência, as tirosinas no domínio intracelular são fosforiladas, iniciando uma cascata de sinalização intracelular que regula a expressão gênica no núcleo, de forma a promover a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação celular (Lappin 2003).

Os dois sítios de ligação no domínio extracelular dos receptores são o de alta afinidade (sítio 1) e o de baixa afinidade (sítio 2). O sítio 1 contém um bolsão central de ligação hidrofóbica cercado por interações hidrofílicas. O resíduo de Phe 93 no receptor é muito importante para a interação com o ligante, participando na ligação de hidrogênio com os resíduos Thr 44 e Asn 147 da eritropoetina. As interações no sítio 2 são menos extensas, com a superfície hidrofóbica criada por Phe 93, Phe 205 e Met 150. Met 150 está localizada mais internamente no sítio 2 que no sítio 1, fazendo interações de Van der Waals com Arg 10, Val 11 e Arg 14 da eritropoetina. As interações hidrofílicas acontecem por meio de ligações de hidrogênio (Spahlinger e King, 2007).

Quando a eritropoetina liga-se aos seus dois receptores, força um ângulo de 120° entre eles. Esta orientação angular do complexo EPO-(EpoR)² é um fator crítico à atividade biológica. As superfícies intracelulares criadas pela orientação de 120° são responsáveis por

uma sinalização ótima induzida por EPO através das vias intracelulares das quinases. Assim, ao ligar-se aos seus receptores, a eritropoetina desencadeia uma cascata de fosforilação intracelular. A fosforilação de proteínas é um passo inicial importante na transdução de sinais por vários receptores. A primeira etapa da sinalização intracelular é a ativação da tirosina quinase JAK2, associada ao receptor da eritropoetina próximo à região transmembranar. A ativação de JAK2 leva à fosforilação da tirosina de diversas proteínas, incluindo o próprio receptor de EPO, o que estimula a fosforilação de oito resíduos de tirosina localizados no domínio intracelular. Estas tirosinas fosforiladas podem ser sítios de ligação para várias outras proteínas de sinalização intracelulares com domínios SH2, que são fosforiladas e ativadas (figuras 1.4 e 1.5). A última tirosina do domínio citoplasmático de EpoR (Tyr 479) é necessária para a formação das colônias eritróides progenitoras. As cascatas de fosforilação ativam diversas vias intracelulares, incluindo a via da Ras/MAP quinase, envolvida na proliferação celular em resposta à eritropoetina, e a via da fosfaditil-inositol 3-quinase (PI-3K) (Lacombe e Mayeux 1998 e 1999, Fisher 2003, Jelkmann 2004, Spahlinger e King 2007, Tsiftoglou et al. 2009).

O domínio citoplasmático do receptor de eritropoetina pode ser dividido em duas regiões principais. A região mais próxima da membrana plasmática é necessária para a geração dos sinais de proliferação e diferenciação. Nesta região, a tirosina quinase JAK2 passa por autofosforilação, é ativada e fosforila o receptor e o fator de transcrição STAT5. A fosforilação ativa este fator de transcrição, que se dissocia do receptor, dimeriza-se, migra para o núcleo da célula, reconhece a sequência de base específica na região promotora do gene alvo e inicia a transcrição gênica. A outra parte do domínio citoplasmático do receptor não é necessária para a sinalização e, ao contrário, atua diminuindo os sinais. A sinalização pelo receptor da eritropoetina é inibida pela tirosina fosfatase SHP1, que tem um domínio SH2 e é específica para células sanguíneas. Esta fosfatase associa-se ao sítio de fosforilação da tirosina do receptor e promove a desfosforilação de JAK2 (figura 1.6), cessando a geração de sinal (Akihiko e Arai 1996, Constantinescu et al. 1999).

O receptor de fator de célula tronco (SCF) ou c-kit é outro receptor de citocinas pertencente à família de receptores tirosina-quinase que interage com EpoR. Este receptor, associado à região estendida box2 do EpoR pode ativá-lo e fosforilá-lo, estimulando a proliferação e diferenciação celular. Esta interação entre c-kit e EpoR tem importante papel na diferenciação dos progenitores eritróides no fígado do feto (Lacombe e Mayeux 1998, Fisher 2003).

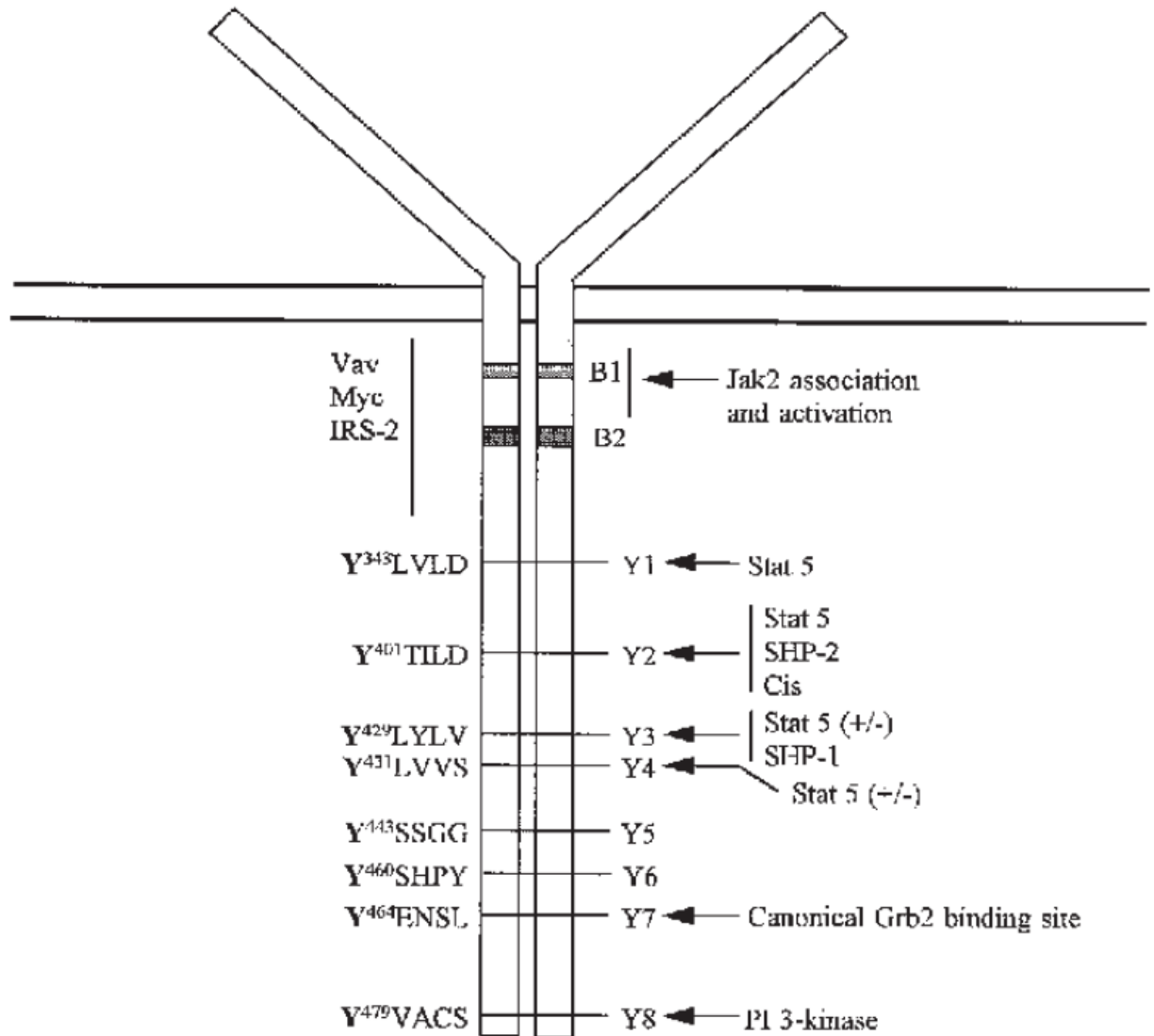


Figura 1.4 – Representação esquemática do domínio intracelular de EpoR. Fonte: Lacombe e Mayeux, 1998.

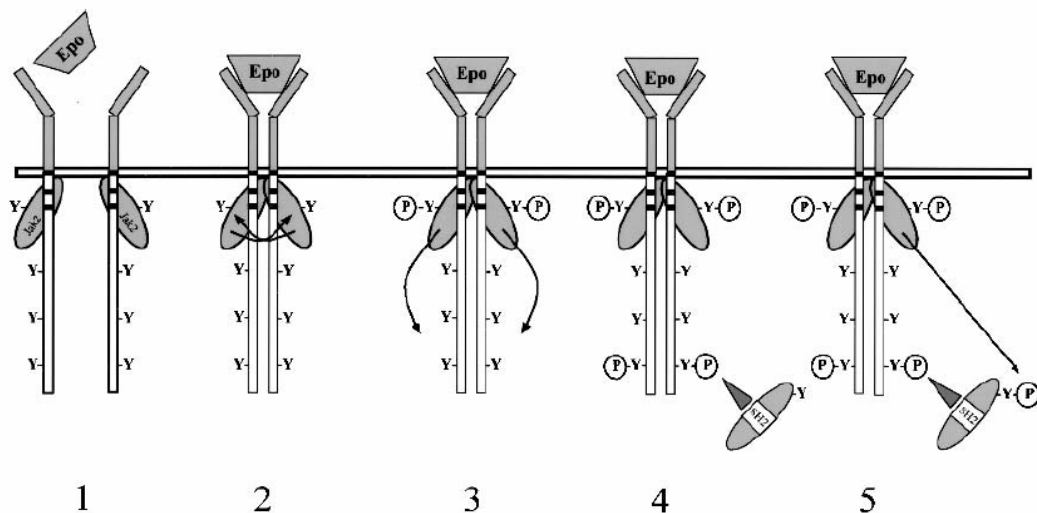


Figura 1.5 – Etapas de ativação de EpoR (1) A primeira etapa na ativação de EpoR é a dimerização; (2) as JAK2 quinases pré-associadas ficam em contato e são ativadas por transfosforilação; (3 e 4) os resíduos de tirosina de EpoR são fosforilados; (5) os resíduos fosforilados são sítios de ligação para proteínas de sinalização intracelular. Fonte: Fisher, 2003.

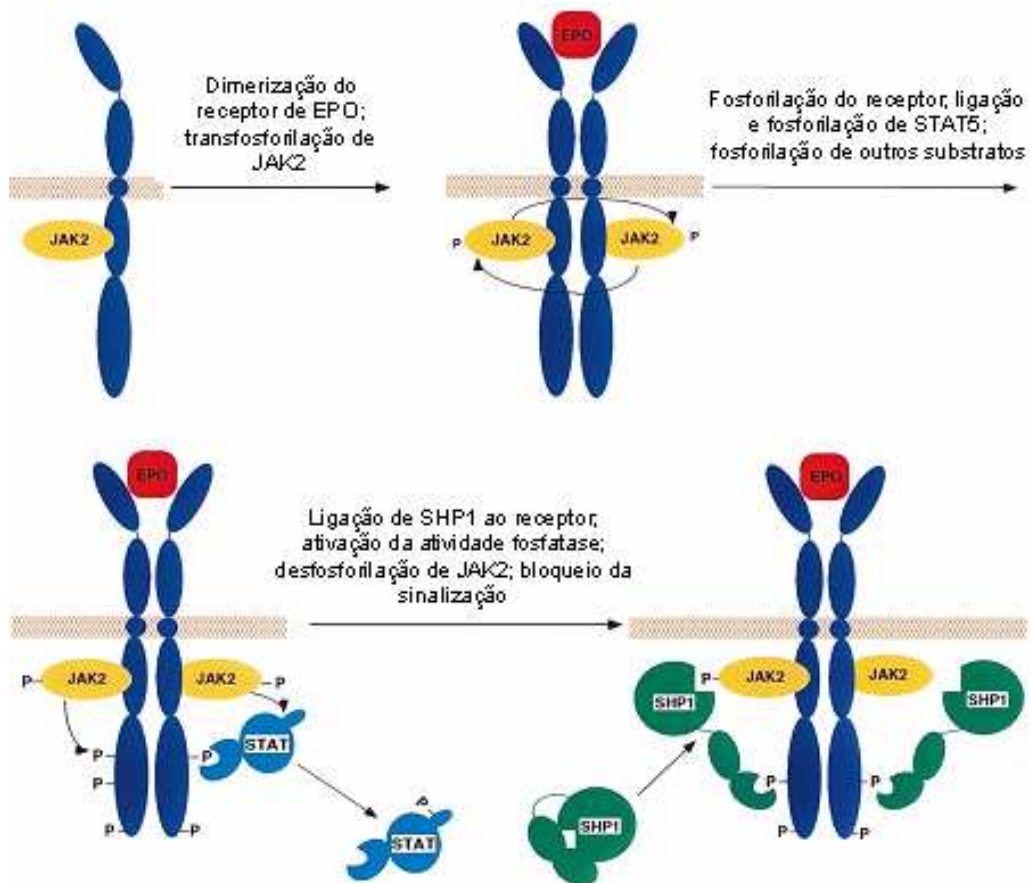


Figura 1.6 – Ativação e inativação do receptor de eritropoetina (EpoR). Adaptado de Constantinescu et al. 1999.

Os receptores para a eritropoetina são também encontrados em diversos tecidos além das células progenitoras eritróides da medula óssea, incluindo o sistema nervoso central, células endoteliais, linfócitos T e B e monócitos, células de tumores sólidos e vários tipos de células renais. Como há receptores em células nervosas do cérebro, a eritropoetina pode ser importante para o desenvolvimento e funcionamento cerebral. O cérebro produz sua própria eritropoetina, que age de forma parácrina, ainda que em mínima quantidade, tamanho menor e com menos ácidos siálicos que a produzida pelos rins (Masuda 1994, Lisowska et al. 2010). A eritropoetina é também importante para o desenvolvimento de vasos sanguíneos necessários à irrigação de músculos, além de apresentar atividade nos ovários, útero e testículos.

1.3- Eritropoiese

A eritropoiese é o processo que regula a produção de eritrócitos, também conhecidos como hemácias ou células vermelhas do sangue, a partir de células precursoras na medula óssea de mamíferos. Este processo ocorre nas ilhas eritroblásticas da medula óssea, compostas de eritroblastos em vários estágios de maturação ao redor de um macrófago central que facilita a fagocitose do núcleo excluído (Tsiftoglou 2009).

A figura 1.7 apresenta um diagrama esquemático da produção de eritrócitos. A eritropoiese é dependente da eritropoetina liberada após estímulo por hipóxia, que estimula as células eritróides progenitoras a diferenciarem-se em eritrócitos até que a concentração de oxigênio nos tecidos volte aos níveis normais. Assim, a eritropoiese é um típico sistema de controle por retroalimentação negativa (Krantz 1991, Maier et al. 1994, Choi et al. 1996, Liu et al. 2010).

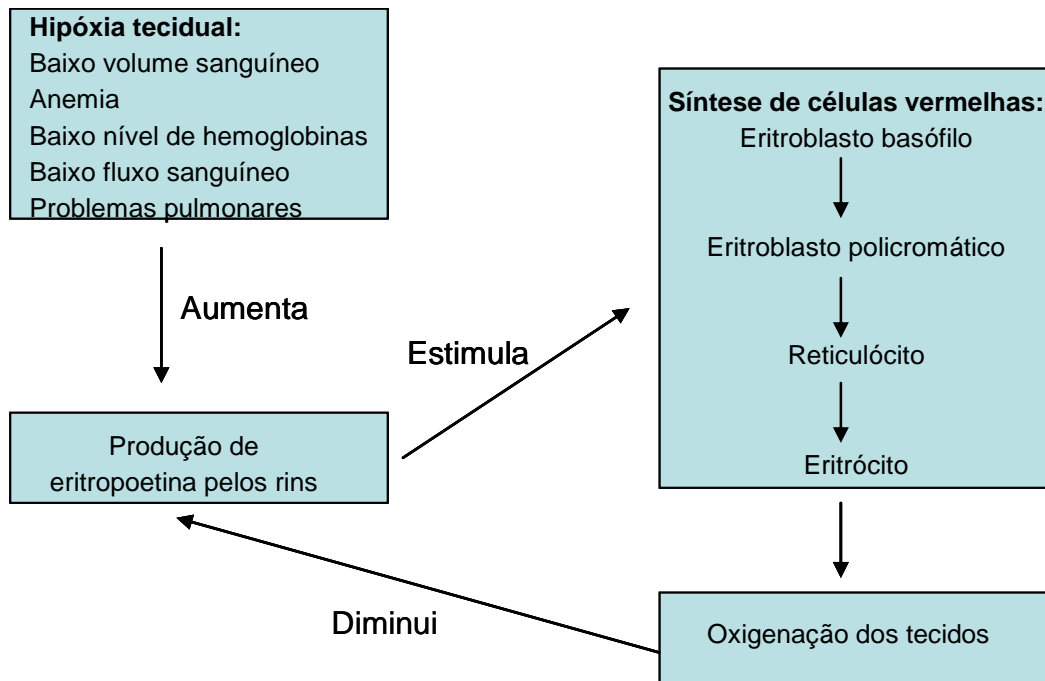


Figura 1.7 – Diagrama esquemático da produção de eritrócitos. Adaptado de Choi et al. 1996.

Em condições normais, a baixa concentração de eritropoetina permite que apenas uma pequena quantidade de progenitores sobreviva e prolifere, enquanto os outros sofrem apoptose. Assim, a eritropoetina mantém a eritropoiese ao impedir a apoptose e induzir a proliferação celular. O estímulo da eritropoetina não é necessário à determinação da linhagem eritróide. Quando a concentração de eritropoetina no sangue aumenta, um número grande de unidades eritróides formadoras de blastos (BFU-Es) e unidades eritróides formadoras de colônia (CFU-Es) deixa de sofrer apoptose e passa por crescimento e maturação (Krantz 1991, Lacombe e Mayeux 1999, Zochodne et al. 2000, Jelkmann 2004).

Além da eritropoetina, a eritropoiese é regulada por diversas citocinas. Os fatores de crescimento envolvidos na eritropoiese são: (i) fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), (ii) interleucina (IL)-6, (iii) fator de célula tronco (SCF) e seu receptor c-Kit, (iv) IL-1, (v) IL-3, (vi) IL-4, (vii) IL-9, (viii) IL-11, (ix) fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), (x) fator de crescimento insulínico (IGF-1) e (xi)

eritropoetina (Krantz 1991, Koury et al. 2002, Aguiar et al. 2003, Fisher 2003, Jelkmann 2004, Tsiftoglou 2009).

O progenitor mais imaturo que responde à eritropoetina é a unidade eritróide formadora de blastos (BFU-E), que dá origem às unidades eritróides formadoras de colônia (CFU-E). As BFU-Es não contêm receptor de transferrina e expressam muito pouco GATA-1, um importante fator de transcrição eritrocítico. Já as CFU-Es possuem receptores de transferrina e exibem níveis abundantes de GATA-1. Além disso, as CFU-Es apresentam maior número de receptores para a eritropoetina e, assim, são mais sensíveis à ação deste hormônio. A ação da eritropoetina é sinérgica com SCF, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-9 e IGF-1 para estimular a maturação e proliferação dos estágios de BFU-E e CFU-E ao estágio normoblástico ortocromático do desenvolvimento de células eritróides. No estágio normoblástico ocorre o acúmulo de hemoglobina. Subseqüentemente, o núcleo é excluído da célula, que evolui a reticulócito e entra na circulação periférica onde amadurece até eritrócito. O tempo de maturação de CFU-E até reticulócito é de aproximadamente 7 dias e envolve de 4 a 6 divisões celulares. SCF, IL-1, IL-3, IL-6 e IL-11 estimulam a diferenciação das células tronco pluripotentes em células tronco mielóides e em eritróides, monocíticas e megacariocíticas (Krantz 1991, Lacombe e Mayeux 1998, Zochodne et al. 2000, Koury et al. 2002, Aguiar et al. 2003, Fisher 2003, Lappin 2003, Jelkmann 2004, Tsiftoglou 2009). A figura 1.8 mostra as etapas da eritropoiese, desde as células pluripotentes até os eritrócitos maduros, e os fatores de crescimento que influenciam o processo.

Quando o sistema regulador da eritropoetina não está em perfeito funcionamento, pode haver diminuição dos níveis de hemoglobina no sangue e anemia. Ao contrário, níveis elevados de eritropoetina podem estimular a produção de células vermelhas em excesso, causando policitemia e alta viscosidade sanguínea, aumentando os riscos de derrame cerebral (Lappin 2003). O efeito da eritropoetina é atenuado por moléculas intracelulares supressoras, que previnem a proliferação descontrolada de células vermelhas (Jelkmann 2004).

1.4- Reticulócitos

A atividade eritropoiética da medula óssea é um processo dinâmico que resulta na produção de 2-3 milhões de novas células por segundo em um humano saudável. As células do sangue (vermelhas, brancas e plaquetas) são continuamente renovadas a partir das células tronco hematopoiéticas. Estas se renovam e se diferenciam para formar populações de células progenitoras, a partir das quais a maioria das células sanguíneas será originada. As células progenitoras mais novas são multipotentes. O micro-ambiente formado pela matriz da medula óssea é essencial para a sobrevivência, crescimento e replicação das células hematopoiéticas.

Fatores de crescimento hematopoiéticos – ou fatores estimuladores de colônia, como a eritropoetina – são necessários para a renovação das células tronco e para a proliferação e diferenciação das células progenitoras (Cavill 1996, Riley et al. 2002).

Mudanças estruturais e bioquímicas ocorrem durante a diferenciação dos precursores imaturos das células vermelhas em células maduras. As mais importantes são a síntese de hemoglobina e seu acúmulo no citoplasma, perda das mitocôndrias e do aparato de síntese de proteínas, perda do núcleo por extrusão, perda da expressão dos receptores de superfície de membrana – incluindo os de eritropoetina e de transferrina – através da formação de exossomos, mudanças nos níveis de colesterol e fosfolipídios e mudanças nos níveis intracelulares de diversas enzimas (Corberand 1997, Riley et al. 2002, Fisher 2003, Lappin 2003).

O reticulócito é uma célula vermelha anucleada, ligeiramente maior que o eritrócito, originado a partir do normoblasto ortocromático após extrusão do núcleo. O reticulócito imaturo contém mitocôndrias, um pequeno número de ribossomos, centríolo, estruturas remanescentes do aparelho de Golgi e alta densidade de receptores de transferrina na membrana, além de restos de RNA eritroblástico responsável pela síntese de 20-30% do total de hemoglobina de uma célula vermelha. À medida que o reticulócito avança pelo processo de maturação, organelas como o núcleo são perdidas, a síntese de hemoglobina é interrompida, a forma da célula muda de polilobulada para disco côncavo e há perda da área de superfície devido à vesiculação da membrana. Além disso, há aumento da resistência ao cisalhamento, há diminuição no conteúdo de RNA e do número e tamanho das mitocôndrias e a célula torna-se um eritrócito (Corberand 1997, Riley et al. 2002, Tsiftoglou 2009, Liu et al. 2010).

Mudanças no conteúdo protéico e na membrana celular também ocorrem durante a diferenciação, como a perda do receptor de transferrina (CD71), GLUT4, Na/K-ATPase e da molécula de adesão ICAM-4. Após a perda do núcleo, os reticulócitos imaturos continuam aderidos a um macrófago central na medula óssea por 2 a 3 dias, quando então atravessam a parede do sinusóide da medula para ganhar acesso ao sangue periférico, onde passam pelo processo final de maturação. O termo ‘reticulócito’ deriva do precipitado azul visto nessas células após marcação com novo azul de metileno ou outros corantes tricíclicos, heterocromáticos e catiônicos que se ligam ao RNA (Cavill 1996, Corberand 1997, Preložnik-Zupan et al. 2000, Riley et al. 2002, Mast et al. 2008, Simionatto et al. 2009, Tsiftoglou 2009, Liu et al. 2010).

Quando a eritropoiese é intensivamente estimulada (como, por exemplo, pela eritropoetina), o número de reticulócitos aumenta e é observada a redução do tempo de maturação na medula óssea de aproximadamente três para um dia, o que aumenta a liberação

de novos reticulócitos. Ao contrário, o tempo de maturação no sangue periférico, normalmente de um dia, aumenta devido à imaturidade dos reticulócitos recém liberados (Corberand 1997, Pierre 2002).



Figura 1.8 – Os fatores de crescimento que influenciam a eritropoiese a partir de células plúripotentes até eritrócitos maduros. Adaptado de Fisher 2003.

O nível de maturação de um reticulócito pode ser determinado pelo seu conteúdo de RNA. A classificação proposta por Heilmeyer e Westhäuser (1932) divide os reticulócitos em 4 grupos. O grupo 1 é constituído por reticulócitos muito jovens, logo após extrusão do núcleo, com grande massa de RNA e organelas. Representa aproximadamente 0,1% da população de reticulócitos em condições normais. Os reticulócitos do grupo 2 têm uma massa de RNA menos densa e representam aproximadamente 0,7% do total em condições normais.

No grupo 3 o RNA encontra-se em menor quantidade e mais disperso e os reticulócitos neste estágio representam aproximadamente 32% da população em indivíduos normais. Finalmente, apenas uma pequena e dispersa quantidade de RNA permanece nos reticulócitos do grupo 4, representando 61% dos reticulócitos encontrados em condições normais. Essa classificação fornece informações acerca do funcionamento da medula óssea (Corberand 1997, Pierre 2002, Riley et al. 2002). Devido à dificuldade de diferenciação entre reticulócitos do grupo 4 e eritrócitos, o National Comitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) propôs a definição de reticulócito como qualquer eritrócito anucleado contendo duas ou mais partículas coradas com corante azul (Corberand 1997, Pierre 2002). A figura 1.9 ilustra os estágios de maturação dos reticulócitos.

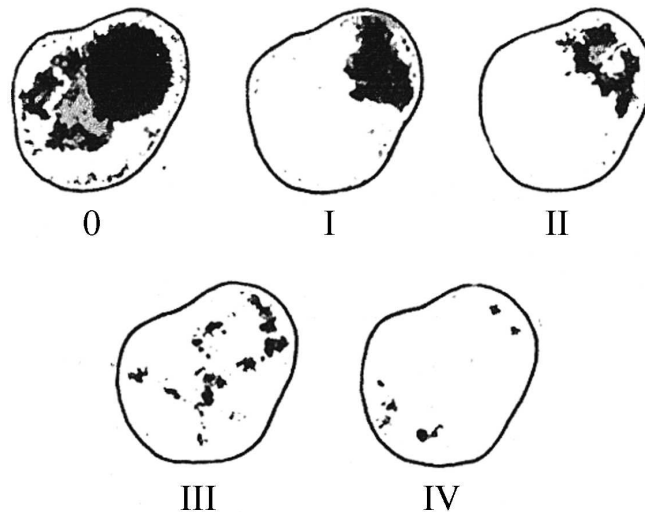


Figura 1.9 – Estágios de maturação dos reticulócitos. 0: célula vermelha nucleada; I: reticulócito mais imaturo com retículo denso; II: reticulócito com rede reticular menos densa; III: reticulócito com rede reticular espalhada; IV: reticulócito no estágio mais maduro com grânulos reticulares espalhados. Fonte: Pierre 2002.

1.5- Contagem de reticulócitos

A atividade eritropoiética e a taxa de liberação de células da medula óssea determinam o número de reticulócitos no sangue periférico. A quantificação de reticulócitos fornece informações a respeito da atividade da medula óssea e da produção de células vermelhas, sendo, então, de grande importância no diagnóstico de doenças hematológicas como a anemia e no monitoramento de pacientes transplantados, em tratamento quimioterápico e em tratamento para anemia, como por exemplo, aqueles que recebem eritropoetina humana recombinante (Lee et al. 1986, Kienast e Schimitz 1990, Bowen et al. 1991, Cavill 1996, Preložnik-Zupan et al. 2000, Riley et al. 2002, Wiwanitkit 2004, Maconi et al. 2010).

A contagem de reticulócitos foi utilizada por Jeffrey e colaboradores em 1995 para avaliar a resposta de pacientes em diálise a pequenas doses de eritropoetina humana recombinante (rhEPO). A quantidade de reticulócitos aumentou na maioria dos pacientes,

atingindo resposta máxima em duas semanas, mostrando que esta análise é de grande utilidade para monitoramento clínico de pacientes em diálise renal tratados com rhEPO (Riley et al. 2002).

Em laboratório, a distinção entre reticulócito e eritrócito é baseada na presença de RNA e outras substâncias, perdidas à medida que o reticulócito amadurece e diferencia-se. A contagem manual de reticulócitos por microscopia ótica com auxílio de corantes supravitais para RNA foi desenvolvida na década de 1940 e permanece o método padrão de acordo com o International Council for Standardisation in Hematology (ICSH). No entanto, métodos automatizados desenvolvidos durante a década de 1990, como a citometria de fluxo, são mais precisos, exatos e apresentam melhor relação custo-benefício que a contagem manual. Além disso, permitem a avaliação de parâmetros relacionados aos reticulócitos, como o índice de maturação e a fração de reticulócitos imaturos (Riley et al. 2001).

1.5.1- Métodos de contagem de reticulócitos

A maioria dos métodos de contagem de reticulócitos é composta por duas etapas: marcação com corante específico para o RNA residual característico dessas células e contagem dos reticulócitos marcados por técnicas manuais ou automáticas (Lee et al. 1986). O método mais antigo para contagem de reticulócitos, e até hoje bastante utilizado, é o visual por microscopia (Riley et al. 2002, Pereira et al. 2008, Maconi et al. 2010). A automação da contagem foi introduzida nos anos 1980. O primeiro contador automático foi o Sysmex R1000, que usa laser argônio com o corante fluorescente auramina O e distingue reticulócitos de células vermelhas maduras, plaquetas e leucócitos pela intensidade de fluorescência e pelo tamanho de partícula. Subseqüentemente, a contagem de reticulócitos passou também a ser feita por equipamentos automáticos de alta capacidade através de detecção ótica de células coradas com novo azul de metileno ou através de citometria de fluxo com corantes fluorescentes (Pierre 2002, Wiwanitkit 2004).

Atualmente existem diversas ferramentas para contagem de reticulócitos. Algumas estão listadas na tabela 1.1. Além dos recursos listados na tabela 1.1, certos sistemas de processamento de imagens têm a capacidade de contar reticulócitos, mas não são capazes de contar grande número de células em intervalos curtos de tempo (Pierre 2002, Riley et al. 2002).

Tabela 1.1- Ferramentas para contagem de reticulócitos

Ferramenta / equipamento	Corante	Técnica
Microscopia ótica	Novo azul de metileno	Contagem manual
Microscopia ótica com disco de Miller ou câmara de Neubauer	Novo azul de metileno	Contagem manual
Citometria de fluxo com corantes fluorescentes	Laranja de tiazol	Detecção de fluorescência
Analizador hematológico ABX PENTRA 120 (Horiba ABX)	Laranja de tiazol	Detecção de fluorescência
Analizador hematológico Cell-Dyn 4000 (Abbott Diagnostics)	CD4K530	Detecção de fluorescência
Sysmex R Series (TOA Medical Electronics)	Auramina O	Detecção de fluorescência
Analizador hematológico XL (Beckman Coulter)	Corifosfina-O	Detecção de fluorescência
Sistema hematológico ADVIA 120 (Bayer/Miles)	Oxazina	Detecção ótica da dispersão de luz
Analizador hematológico Technicon H-3 (Bayer/Miles)	Oxazina	Detecção ótica da dispersão de luz
Analizador hematológico Cell-Dyn 3500 (Abbott Diagnostics)	Novo azul de metileno	Detecção ótica da dispersão de luz
Sistema Coulter GEN.S (Beckman Coulter)	Novo azul de metileno	Detecção ótica da dispersão de luz
Analísadores hematológicos STKS/MAXM (Beckman Coulter)	Novo azul de metileno	Detecção ótica da dispersão de luz
Contador automatizado diferencial Coulter VCS	Novo azul de metileno	Avaliação simultânea de volume, condutividade (composição interna) e dispersão de luz.

1.5.2- Método visual

O método visual por microscopia requer analistas bem treinados na contagem ao microscópio, apresenta baixo custo instrumental, sendo por isso acessível inclusive a laboratórios de pequeno porte ou com baixo poder aquisitivo, e é de fácil execução. Entretanto, esta técnica requer longo tempo, tem alto custo laboral, possui alta variabilidade entre os resultados, com precisão e exatidão insatisfatórias, e não permite a avaliação dos níveis de maturação dos reticulócitos (Lee et al. 1986, Ferguson et al. 1990, Hansson et al. 1992, Rudensky 1997, Yu et al. 1999, Pierre 2002, Weiss 2002, Witt et al. 2008, Simionatto et al. 2009).

Existem diversas metodologias de coloração para a contagem de reticulócitos em microscópio. A mais recomendada usa o novo azul de metileno, um corante supravital que se liga ao RNA ribossomal. Neste procedimento, algumas gotas do corante são misturadas ao sangue periférico coletado e ao anticoagulante. Após incubação, uma fina camada deste preparo é posta em uma lâmina que será analisada por microscopia ótica. O novo azul de metileno deve entrar na célula viva e precipitar a reticulina e os polirribossomos antes da fixação das células na lâmina. São examinadas mil células vermelhas consecutivas e o número delas que contém dois ou mais grânulos com as características de coloração dos grânulos de reticulócitos é determinado como proporção de reticulócitos em relação ao total de células vermelhas contadas (figura 1.10). Aparatos como o Disco de Miller e a Câmara de Neubauer (figura 1.11) facilitam a contagem e diminuem seu erro, assumindo que há uma distribuição uniforme de células vermelhas e reticulócitos na lâmina. Entretanto, mesmo com esses artefatos, a reprodutibilidade da contagem visual de reticulócitos baseada em apenas 1000 células é muito pobre, podendo alcançar coeficientes de variação de até 54,1% (Ferguson et al. 1990, Pierre 2002, Riley et al. 2002, Maconi et al. 2010).

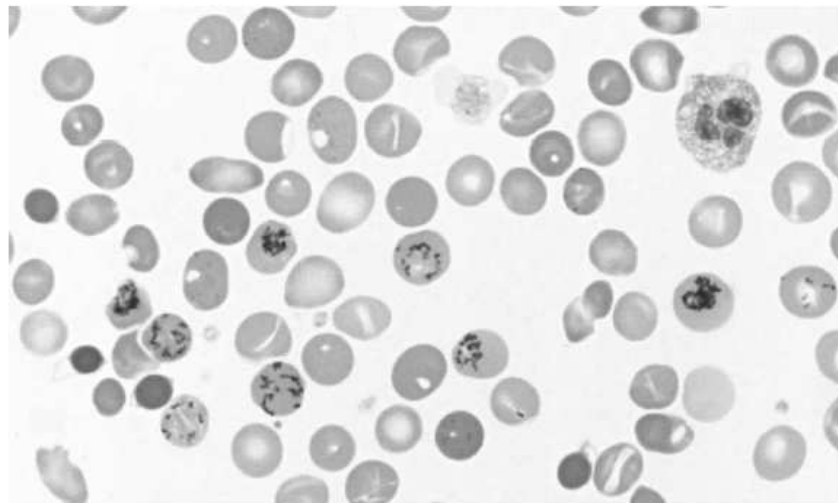


Figura 1.10 – Fotomicrografia de sangue periférico marcado com novo azul de metileno. Os reticulócitos diferenciam-se das células vermelhas maduras pela presença de grânulos intracelulares. Fonte: Riley et al. 2002.

As principais fontes de erros associados à contagem visual de reticulócitos são:

- Pequeno número de células contadas, aproximadamente 1% da população de células vermelhas, gerando pouca confiabilidade estatística, uma vez que reticulócitos são eventos raros.
- Longo tempo necessário para a análise por esta técnica, levando a um menor número de células contadas.

- Possibilidade de precipitação e agregação do RNA e ribonucleoproteínas pelos corantes utilizados. Algumas células são coradas fortemente e outras apenas levemente. Essa heterogeneidade expressa os diferentes estágios de maturação da população de reticulócitos e dificulta a contagem exata pelo método visual em microscópio.
- Alta variabilidade dos resultados entre os analistas, apresentando baixa reprodutibilidade.
- Dificuldade de definição e classificação do estágio de maturação dos reticulócitos, sobretudo no estágio 4 (mais maduro), o que dificulta sua identificação e quantificação.
- Erros na amostragem, uma vez que a proporção de reticulócitos em condições normais é baixa e sua distribuição no esfregaço é variável.

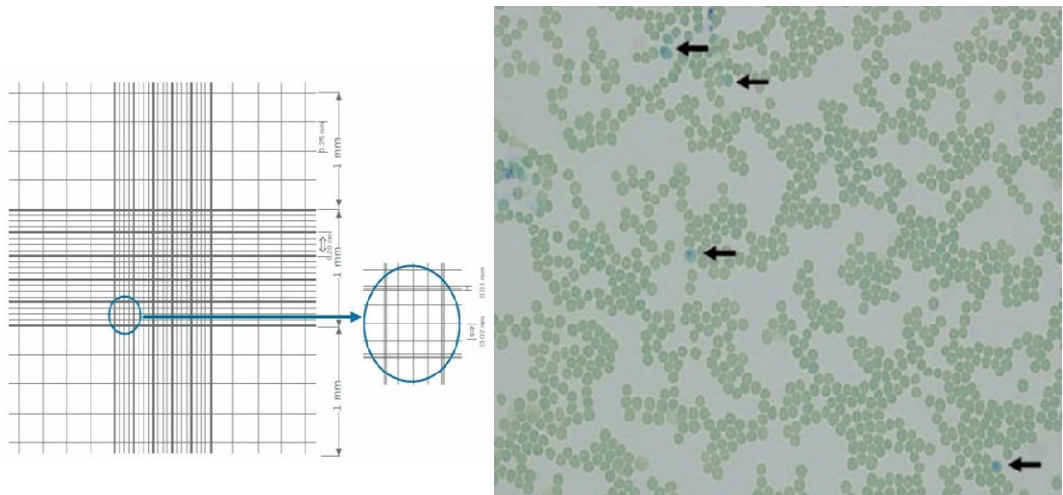


Figura 1.11 – Os quadrantes da Câmara de Neubauer e os reticulócitos vistos neste aparato. Os reticulócitos estão corados com o corante novo azul de metileno e são identificados pelos pontos ou agregados azuis em seu citoplasma. Adaptado de Pérez-Écija et al. 2010.

Um estudo feito pelo College of American Pathologists Survey em 1983 e 1984 mostrou que a contagem de reticulócitos por método visual apresenta coeficiente de variação de 17 a 54,1%, dados condizentes com os outros obtidos na literatura (Tanke et al. 1983, Nobes e Carter, 1990, Corberand, 1997, Preložnik-Zupan et al. 2000, Pierre 2002, Pereira et al. 2008, Maconi et al. 2010). O fato de a contagem visual dificultar a distinção entre os diferentes níveis de maturação dos reticulócitos, além de propiciar falhas quanto à sua identificação, não possibilita uma análise mais detalhada da atividade eritropoiética, uma vez que um maior número de reticulócitos imaturos indica maior atividade.

1.5.3- Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise de diversos parâmetros de células individuais em populações heterogêneas. Baseia-se na aplicação de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica e substâncias fluorescentes (fluoróforos) associados a recursos de informática.

Os citômetros de fluxo podem ser usados em diferentes aplicações e para estudo de vários tipos de células, incluindo protozoários, bactérias e células de mamíferos. São tradicionalmente utilizados para quantificação de células eucarióticas por meio da detecção de alguns antígenos de superfície, podendo-se avaliar o estado de ativação das células e determinar o perfil de expressão de certos marcadores de membrana, além da detecção e quantificação do nível de citocinas citoplasmáticas (Bacal e Faulhaber 2003, Invitrogen 2011).

Em mamíferos, a citometria de fluxo pode ser usada na contagem de diferentes populações celulares como monócitos, linfócitos, granulócitos, reticulócitos, etc., permitindo a avaliação do seu estado hematopoiético (Ebo et al. 2008). A citometria pode também ser empregada no diagnóstico e acompanhamento de leucemias e linfomas, detecção de células neoplásicas, análise do conteúdo de DNA e análise da produção de reticulócitos pela medula óssea (Craig e Foon 2008, Palmeira et al. 2008).

A aquisição dos parâmetros no citômetro de fluxo é feita através da passagem de uma amostra por um feixe de laser, de um determinado comprimento de onda, e pela captura da luz dispersa por cada célula ao passar pelo feixe de luz. Em cada aquisição podem ser passadas milhares de células por segundo. Os dados obtidos podem ser analisados estatisticamente pelos softwares apropriados de forma a fornecer as características celulares, como tamanho e complexidade, bem como o fenótipo das células de interesse (Bacal e Faulhaber 2003, Nakage et al. 2005, Invitrogen 2011).

As partes principais de um citômetro de fluxo, ilustradas na figura 1.11, são:

- O sistema de fluido, que leva a amostra até o ponto de detecção e em seguida até a saída de descarte;
- Os lasers, que são as fontes de luz para a dispersão e a fluorescência;
- Os componentes óticos, que coletam e direcionam a luz resultante da incidência do feixe de laser na célula;
- Os detectores, que recebem a luz;
- Os módulos eletrônicos e informatizados, que convertem os sinais vindos dos detectores em dados digitais e realizam as análises necessárias.

As células devem passar uma a uma pelo feixe de laser. Para tal, a maioria dos citômetros de fluxo aspira as células ou partículas em suspensão e injeta-as exatamente no meio do fluxo contínuo de fluido isotônico. Ambos os fluxos são laminares e não se misturam, fazendo com que o fluxo da amostra seja envolvido pelo fluxo do fluido isotônico. Este conjunto de fluxo passa por uma câmara especial (*flow cell*), de onde as células saem uma de cada vez e são interceptadas pelo laser. À medida que as células passam pelo laser, dispersam a luz em todos os ângulos (figura 1.12). A magnitude da dispersão frontal (*forward scatter* – FSC) é proporcional ao tamanho da célula e pode ser usada para avaliar este parâmetro. A luz dispersada é quantificada por um detector que converte intensidade em voltagem. Como células pequenas geram pouca dispersão de luz e células grandes dispersam maior quantidade de luz, a magnitude do pulso para cada célula é proporcional ao seu tamanho. A luz dispersada lateralmente (*side scatter* – SSC) é resultado da granulosidade e complexidade estrutural da célula. Ao ser dispersa lateralmente, a luz é focalizada por um sistema de lentes e coletada por um detector separado, normalmente localizado a um ângulo de 90 graus do caminho do laser (Bacal e Faulhaber 2003, Invitrogen 2011).

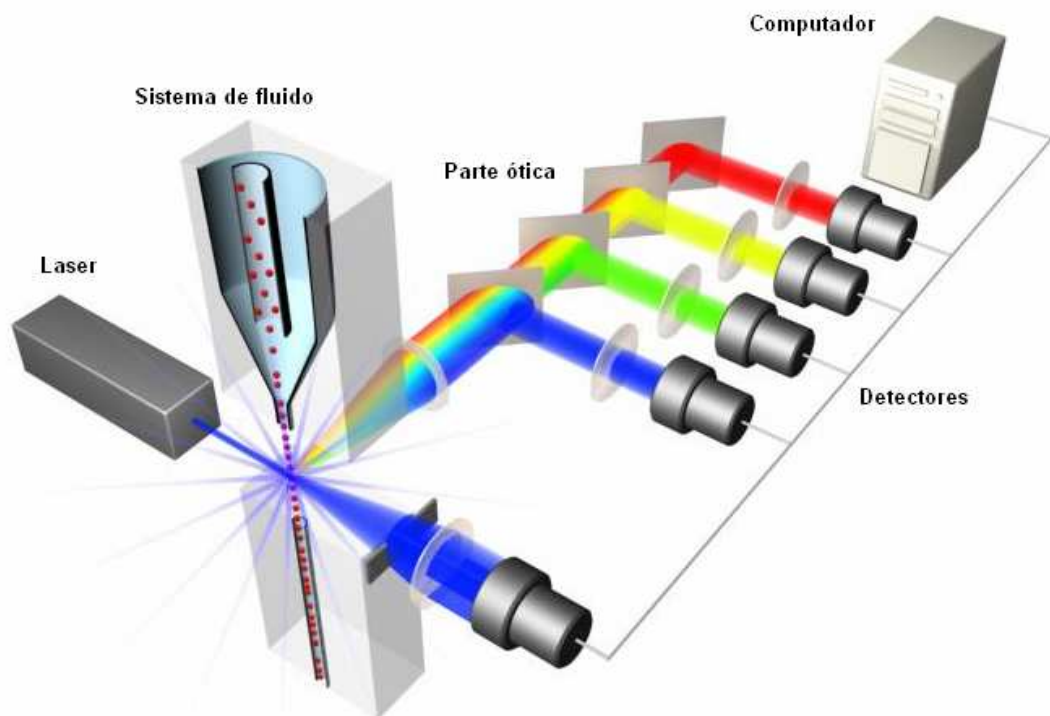


Figura 1.12 – Principais componentes de um citômetro de fluxo. Adaptado de Invitrogen 2011.



Figura 1.13 – As dispersões frontal e lateral e a fluorescência. Adaptado de Invitrogen 2011.

Os dados de fluorescência são geralmente coletados da mesma maneira que os dados de dispersão frontal e lateral. Em uma população de células marcadas com fluoróforos, algumas emitirão mais fluorescência que as outras. À medida que cada célula passa pelo laser, um sinal de fluorescência é gerado (figura 1.12). A luz fluorescente é então direcionada ao detector, onde é traduzida em um pulso de voltagem proporcional à quantidade de fluorescência emitida. Todos os pulsos registrados podem ser representados graficamente, normalmente por um histograma de intensidade de fluorescência versus número de células (Ferguson et al. 1990, Bacal e Faulhaber 2003, Invitrogen 2011). Geralmente, o gráfico de dispersão frontal (tamanho) e dispersão lateral (complexidade) é representado por um *dot plot*.

Bilhas fluorescentes são utilizadas para calibração do equipamento e verificação da eficiência dos detectores a serem utilizados na aquisição das amostras, bem como avaliar a condição geral do equipamento. A voltagem também deve ser ajustada para cada tipo de célula a se analisar, até que a população de interesse esteja no local desejado. Se as células em análise estão marcadas com um fluoróforo, a fluorescência é detectada por um histograma (Weiss 2002). Um discriminador ou ‘threshold’ pode ser utilizado para excluir determinado tamanho de pulso de dispersão frontal ou lateral ou mesmo os pulsos de fluorescência no momento da aquisição de dados, permitindo a coleta apenas das informações de interesse.

Pode-se, por exemplo, excluir células menores e debris, com a utilização da dispersão frontal. O uso do discriminador para a intensidade de fluorescência também permite a eliminação de fluorescências não específicas ou autofluorescências, melhorando os resultados obtidos (Ferguson et al. 1990, Weiss 2002, Bacal e Faulhaber 2003, Invitrogen 2011).

1.5.4- Contagem de reticulócitos por citometria de fluxo e analisadores hematológicos automáticos

A quantificação de reticulócitos por citometria de fluxo se baseia na detecção da fluorescência de um corante que se liga ao RNA das células. Normalmente a capacidade de detecção de um citômetro de fluxo inclui partículas de 1 a 15 micrômetros de diâmetro. As células vermelhas têm aproximadamente 6 micrômetros de diâmetro (Invitrogen 2011). Esta técnica apresenta a vantagem de analisar grande número de células em curto tempo (aproximadamente 10^5 células sanguíneas podem ser contadas em poucos minutos), o que diminui erros e aumenta a precisão, a reprodutibilidade e a exatidão (Tanke et al. 1983, Lee et al. 1986, Ferguson et al. 1990, Bowen et al. 1991, Hansson et al. 1992, Bruce et al. 1995, Buttarello et al. 2001, Weiss 2002, Nakage et al. 2005, Witt et al. 2008, Simionatto et al. 2009).

Outro fator que aumenta a precisão da análise por citometria de fluxo é o método para seleção de reticulócitos e exclusão de células vermelhas maduras. Nesta metodologia, as células vermelhas maduras são excluídas através de sua não marcação com o corante fluorescente, enquanto na análise visual essa discriminação é uma decisão subjetiva (Lee et al. 1986). Os analisadores hematológicos automáticos aumentam ainda mais a eficiência do método ao eliminar as etapas de marcação, diluição e incubação normalmente necessárias. Esses equipamentos também diminuem o tempo de análise e a necessidade de técnicos para sua execução.

A contagem por citometria de fluxo ou por contadores automáticos permite a distinção dos estágios de maturação dos reticulócitos de acordo com sua dispersão ou absorção de luz e intensidade de fluorescência. A distinção entre os estágios de maturação permite determinar a porcentagem de reticulócitos imaturos, intermediários e maduros, facilitando a classificação de anemias e a avaliação da resposta à eritropoetina. Uma alta fração de reticulócitos imaturos (IRF), que é a soma das frações de reticulócitos com média e alta fluorescência, é um bom indicador de recuperação hematopoiética da medula óssea (Davis et al. 1995, England et al. 1998, Yu et al. 1999, Buttarello et al. 2001, Pierre 2002, Riley et al. 2002, Weiss 2002, Łuczyński et al. 2006).

Os corantes fluorescentes utilizados, como o laranja de tiazol, ligam-se ao RNA ribossomal. O grau de emissão de fluorescência causada pela excitação do corante ligado é proporcional à quantidade de RNA na célula (Ferguson et al. 1990, Kienast e Schmitz 1990, Weiss 2002, Maconi et al. 2010). De acordo com a maioria dos dados da literatura e com os fabricantes de corantes fluorescentes e equipamentos, as amostras de sangue devem ser coletadas em EDTA (Ferguson et al. 1990, Bowen et al. 1991, Hansson et al. 1992, Davis 1995, Rudensky 1997, Becton Dickinson 2000, Buttarello et al. 2001, Riley et al. 2002, Bacal e Faulhaber 2003, Weiss 2002, NCCLS 2004, LLSG 2008, Maconi et al. 2010). Entretanto, existem referências quanto ao uso de heparina como anticoagulante com sucesso (Kawamura et al. 1991, Weiss 2002, Torous et al. 2003, Nakage et al. 2005, Witt et al. 2008, Costa et al. 2010).

O desenvolvimento do laranja de tiazol para contagem de reticulócitos, na década de 1980, melhorou muito o uso da citometria de fluxo para este fim, uma vez que o corante é excitado a 488nm, na região visível do espectro, não sendo mais necessário uso de lasers ultravioleta potentes e caros, além de ser permeável à membrana celular, o que elimina etapas adicionais no preparo das amostras, como processos de permeabilização ou fixação das células (Lee et al. 1986, Kienast e Schmitz 1990, Nobes e Carter 1990, Riley et al. 2002).

A figura 1.13 mostra a contagem de reticulócitos por citometria de fluxo com o corante laranja de tiazol. Este corante é misturado ao sangue e incubado no escuro à temperatura ambiente por ao menos 30 minutos. A análise é executada através da detecção da dispersão frontal (*forward scatter* – FS), da dispersão lateral (*side scatter* – SS) e da fluorescência verde. A análise dos dados é feita primeiramente pela separação das células vermelhas das plaquetas e das células brancas, através da avaliação do tamanho e da granulosidade das células por dispersão frontal e lateral (*gating*). Estas características não são suficientes para separar os reticulócitos das outras células vermelhas do sangue, sendo necessário quantificar a incorporação do corante laranja de tiazol nas células através da intensidade da fluorescência verde. Os reticulócitos incorporam o laranja de tiazol graças ao RNA ainda presente. Os reticulócitos imaturos apresentam maior fluorescência por conterem mais RNA, e esta fluorescência decai à medida que as células amadurecem (Ferguson et al. 1990, Kienast e Schmitz 1990, Hansson et al. 1992, Buttarello et al. 2001, Riley et al. 2002, Nakage et al. 2005).

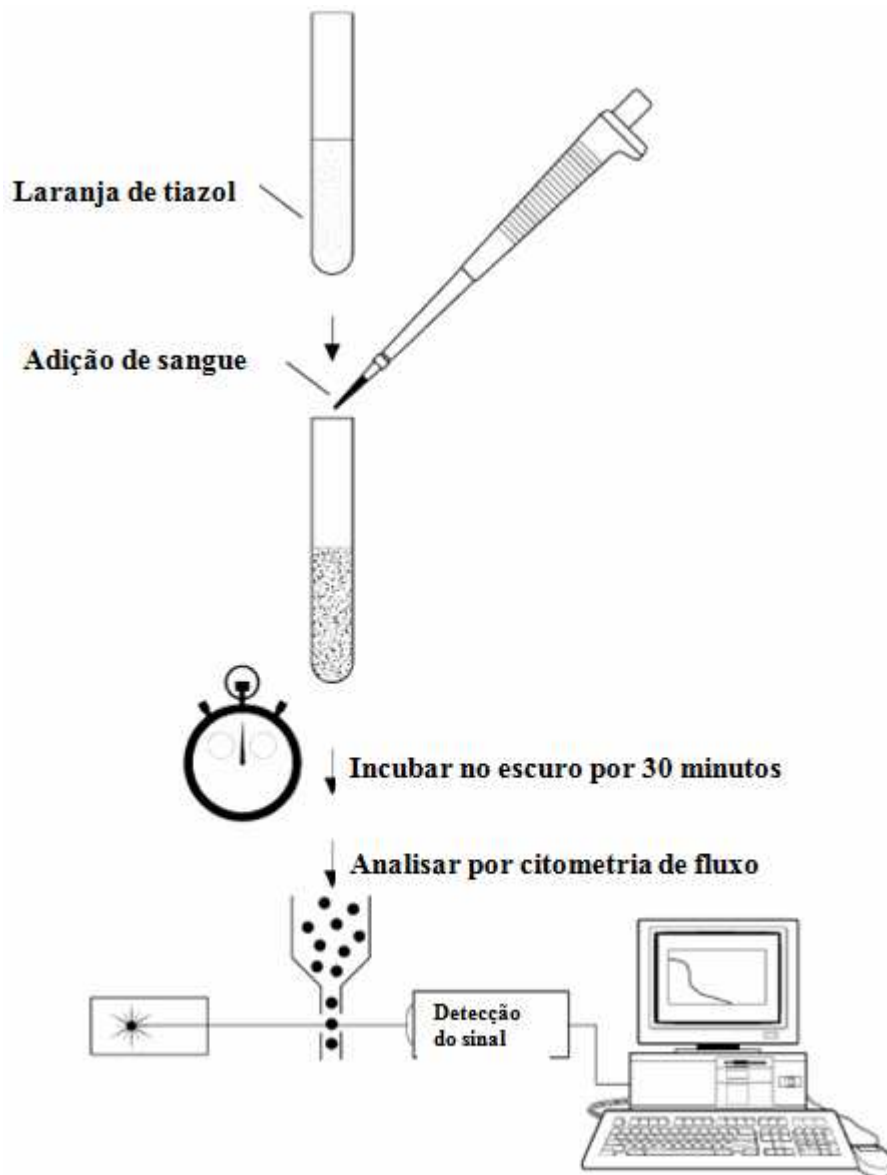


Figura 1.14 – Etapas da contagem de reticulócitos por citometria de fluxo com o corante laranja de tiazol. Adaptado de Riley et al. 2002.

A análise do histograma de fluorescência é feita por determinação da área. Como as áreas referentes aos reticulócitos e aos eritrócitos podem estar sobrepostas, é utilizado um cursor para separação das duas populações de células de acordo com a fluorescência. As células com intensidade de fluorescência positiva pela determinação do cursor são consideradas reticulócitos, e a porcentagem destas células na população total é determinada pela fórmula:

$$\% \text{ de reticulócitos} = \frac{\text{número de células com fluorescência positiva}}{\text{número total de células}}$$

O histograma de fluorescência pode sofrer interferência e ter o número de reticulócitos falsamente aumentado através da autofluorescência de algumas células vermelhas, de células vermelhas nucleadas, dos corpos de Howell-Jolly, ou da alta contagem de leucócitos ou de plaquetas. Para isso, correções precisam ser feitas através de amostras não marcadas (Riley et al. 2002). Além disso, em casos eventuais de doença da aglutinina fria e em condições em que o volume corpuscular médio das células for menor que 60 fL, há impossibilidade de contagem de reticulócitos por citometria de fluxo, devendo-se recorrer à contagem manual (LLSG 2008).

Alguns problemas encontrados na contagem automatizada de reticulócitos relacionam-se às diferentes sensibilidades dos corantes usados, às tecnologias usadas para identificar as células positivas (fluorescência, dispersão de luz, absorbância) e ao software que pode ser mais ou menos capaz de separar os reticulócitos dos eritrócitos e outras células (Preložnik-Zupan et al. 2000, Buttarello et al. 2001). Estudos interlaboratoriais de comparação entre métodos de citometria de fluxo mostram alguns erros sistemáticos na contagem de reticulócitos e na estimativa de seus estágios de maturação gerados pelo uso de diferentes reagentes e instrumentação (Davis et al. 1994, NCCLS 2004). A comparação entre citometria de fluxo e contagem manual de reticulócitos mostra que a citometria pode gerar valores maiores de contagem de reticulócitos – aproximadamente 1,5 vezes maior –, provavelmente devido à maior sensibilidade da detecção por fluorescência e às diferenças entre a ligação do laranja de tiazol e do novo azul de metileno ao RNA, o que facilitaria a detecção de reticulócitos mais maduros e com menos RNA pela técnica de citometria (Hansson 1992, Rudensky 1997, Buttarello et al. 2001, NCCLS 2004).

Analísadores hematológicos também apresentam os mesmos benefícios da citometria de fluxo, como sensibilidade, rapidez e exatidão, além de algumas vantagens como não necessitarem de instrumentação separada e treinamento tão específico. O software próprio fornece a porcentagem de reticulócitos, a contagem absoluta, o volume médio de reticulócitos e o índice de maturação em poucos minutos (Riley et al. 2002). Entretanto, só são vantajosos em casos de laboratórios com grande volume de análises hematológicas, uma vez que são dedicados somente a esses testes.

1.5.5- Método visual *versus* citometria de fluxo

Através da comparação entre as características dos métodos visual e citometria de fluxo, realizada na tabela 1.2, conclui-se que a contagem de reticulócitos pela citometria de fluxo é um procedimento simples, rápido, seguro e sensível para a quantificação de reticulócitos.

Tabela 1.2 – Principais diferenças entre a contagem de reticulócitos por método visual e por citometria de fluxo.

Método visual	Citometria de fluxo
Pequeno número de células contadas → baixa confiabilidade	Alto número de células contadas (aproximadamente 10^5 em poucos minutos)
Longo tempo de análise → demora no resultado, fadiga dos analistas	Curto tempo de análise → resultados gerados com rapidez
Alta variabilidade entre os analistas → baixa reprodutibilidade	Alta confiabilidade e reprodutibilidade
Dificuldade de determinação dos estágios de maturação dos reticulócitos	Permite avaliar os estágios de maturação dos reticulócitos
Baixo custo instrumental, alto custo laboral	Alto custo instrumental, baixo custo laboral

O uso da citometria de fluxo proporciona facilidades sobre a microscopia de luz; porém, é preciso considerar que podem existir diferenças estatisticamente significantes entre o método visual e os métodos automáticos de contagem de reticulócitos, além de entre os métodos automáticos entre si, com variação nos intervalos de referência. Esta diversidade pode ser devido à diferença de sensibilidade dos corantes, à tecnologia usada para identificar células positivas e à sensibilidade do software em separar a população de células desejadas. Assim, há a necessidade de se estabelecer valores e intervalos de referência específicos para cada método. O custo do aparelho, por sua vez, ainda é um fator limitante quando se trata de laboratórios de pequeno e médio porte (Preložnik-Zupan et al. 2000, Buttarello 2001, Bacal e Faulhaber 2003, NCCLS 2004, Pereira et al. 2008, Maconi et al. 2010).

1.5.6- Contagem de reticulócitos por meio da marcação com anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais marcados com fluoróforos específicos para diferentes antígenos, como por exemplo, o CD71, o HAE9, o CD36 e o CD44, podem ser usados como reagentes para quantificação de reticulócitos.

O receptor de transferrina (CD71 ou TfR) é uma proteína homodimérica expressa apenas em timócitos imaturos, linfócitos T e B ativados, mielócitos, precursores de eritrócitos nucleados, macrófagos e células não hematopoiéticas proliferativas. Esta molécula é um típico receptor transmembrana composto de domínios extracelular, transmembranar e intracitoplasmático. Este receptor é ativo durante o crescimento e a proliferação celular dependentes de ferro, quando há estímulo do gene do TfR, levando ao aumento de mRNA e da expressão de proteínas. CD71 é abundante nos reticulócitos imaturos e sua concentração decai à medida que a célula amadurece, sendo ausente nos eritrócitos. A quantificação de

reticulócitos através do receptor de transferrina é feita por citometria de fluxo e utiliza um anticorpo anti-CD71 marcado com fluoróforo (Brun et al. 1990, Riley et al. 2002, Witt et al. 2008).

O antígeno eritroblástico (HAE9) é uma glicoproteína de 70-kD característica de células eritróides de mamíferos. É expresso por aproximadamente um terço das unidades eritróides formadoras de colônia (CFU-E), todos os proeritroblastos, eritroblastos e normoblastos, assim como por uma pequena fração (5-10%) de reticulócitos no sangue periférico, imediatamente após a diferenciação pós-normoblástica. Um anticorpo monoclonal contra esse antígeno (MAb HAE9) pode ser usado na citometria de fluxo de duas cores para analisar a relação entre a população de reticulócitos identificada com este anticorpo e com laranja de tiazol (Riley et al. 2002).

O antígeno CD36 (gpIV, gpIIIb) é uma glicoproteína transmembrana receptora para trombospondina e colágeno, expressa em trombócitos, monócitos, macrófagos, eritroblastos, células B (pouco expresso), células epiteliais e macrófagos. Nas células hematopoiéticas, atua como receptor para neutrófilos apoptóticos. CD36 e o complexo integrina α -4- β -1, um receptor para fibronectina e para a molécula de adesão de célula vascular, são expressos nos reticulócitos, mas não nos eritrócitos. Assim, um anticorpo monoclonal contra esse antígeno marcado com fluoróforo pode ser usado na citometria de fluxo para quantificar reticulócitos (Riley et al. 2002, Telen 2005).

A molécula de adesão CD44 é uma proteína transmembrana expressa em progenitores eritróides, onde atua em conjunto com o complexo integrina α -4- β -1 para sua ligação à matriz de fibronectina da medula óssea. A proteína associada à integrina CD47 é um receptor para trombospondina expresso em células vermelhas, mas não em eritrócitos maduros, assim também pode ser usada para avaliação de reticulócitos (Telen 2005).

1.5.7- Variabilidade biológica e a contagem de reticulócitos

Há grande variabilidade na contagem de plaquetas e reticulócitos em um mesmo animal ao longo de um dia, como mostrou o estudo de Pierre (2002), assim como de um animal para outro, da mesma linhagem e mantido sob as mesmas condições. Assim, os ensaios para determinação de potência da alfaepoetina humana recombinante, executados através da contagem de reticulócitos, caracterizam-se por elevada variabilidade, acentuada pelo fato de as amostras em análise não serem administradas por unidade de peso, e sim por animal. Essa variabilidade, avaliada por coeficientes de variação, pode atingir níveis elevados, às vezes suficientes para invalidar os ensaios. A variação da resposta entre os camundongos, inclusive entre os da mesma linhagem e sexo, é provavelmente relacionada com as

modalidades do estímulo hormonal empregado bem como as diferentes metodologias para a contagem de reticulócitos (Lopes 2004).

1.6- Eritropoetina humana recombinante

A existência da eritropoetina foi sugerida no final do século XIX através da descoberta de que a hipóxia aumenta a produção de células vermelhas. Em 1906, Carnot e Deflandre postularam em Paris que um fator humoral, chamado por eles de ‘hemopoetina’, regulava a produção de células sanguíneas. Seus experimentos foram feitos em coelhos, em que o plasma removido após sangria e injetado em outro coelho gerava um aumento na produção de reticulócitos. Outros pesquisadores obtiveram resultados semelhantes de reticulocitose em diversos experimentos. A eritropoetina foi identificada, na década de 1950, como um fator presente no soro. O interesse cada vez maior pelo hormônio possibilitou a descoberta de seu sítio primário de produção, as células peritubulares intersticiais dos rins, e seu sítio secundário, o fígado (Fisher 2003).

A eritropoetina foi purificada homoganeamente pela primeira vez em 1977, a partir de amostras de urina, por Miyake e colaboradores. A seqüência de aminoácidos de fragmentos trípticos da eritropoetina permitiu a síntese de sondas de DNA, o que possibilitou o isolamento e clonagem do seu gene por Lin e colaboradores e Jacobs e colaboradores (1985) e o desenvolvimento de uma linhagem celular transfectada em células do ovário de hamster chinês capaz de produzir eritropoetina humana recombinante (rhEPO) para uso clínico (Akihiko e Arai 1996, Lacombe e Mayeux 1998, Fisher 2003).

Atualmente, a eritropoetina humana recombinante é produzida através da expressão de um fragmento contendo pares de base (pb) correspondente ao cDNA da eritropoetina em cultura de células eucarióticas *in vitro*, normalmente nas linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO – *Chinese Hamster Ovary*) ou de rim de hamster jovem (BHK – *Baby Hamster Kidney*) (Schmidt et al. 2003, Sepehrizadeh et al. 2008). A eritropoetina produzida em células de *E. coli* ou leveduras é inativa ou muito pouco ativa *in vivo*, enquanto a produzida em células CHO apresenta excelente atividade. Esta característica concorda com o fato de que a desialilação da eritropoetina resulta em inativação de sua atividade, indicando que a sialilação apropriada é essencial para a atividade da eritropoetina *in vivo* (Sasakis et al. 1987).

A eritropoetina humana recombinante apresenta a mesma seqüência peptídica do hormônio natural, mas com diferenças na glicosilação e composição de carboidratos heterogênea. Esta heterogeneidade é devida a mudanças pós-traducionais, especialmente a glicosilação, como por exemplo, a sialilação. Como a glicosilação depende do sistema de

expressão, pode ser bastante influenciada pela estrutura terciária da proteína e pelas cadeias glicosídicas vizinhas (Choi et al. 1996, Costa et al. 2000). Assim como outros hormônios glicoprotéicos, a eritropoetina existe como uma mistura de múltiplas isoformas, diferentes em sua glicosilação. As diferenças em relação à composição de isoformas e às propriedades biológicas que podem ser observadas entre as eritropoetinas humanas recombinantes são devidas ao fato de a glicosilação ser um processo pós-traducional influenciado pelo tipo de linhagens de células usadas para expressão e pelas condições de cultura. A composição de isoformas de um preparo de rhEPO pode também ser influenciada pela seletividade dos processos de isolamento utilizados para sua purificação. Foram encontradas de cinco a oito isoformas da eritropoetina humana e da eritropoetina humana recombinante, devido ao grau de glicosilação e aos resíduos de ácido siálico com ou sem N-acetilgalactosamina (Storring et al. 1998, Schmidt et al. 2003). As diferenças usuais entre as cadeias glicosídicas da eritropoetina natural e a rhEPO podem ser vistas na tabela 1.3.

A eritropoetina humana recombinante aprovada para uso é encontrada nas isoformas alfa e beta. Ambas diferem em sua composição de carboidratos: a alfa tem aproximadamente 39% de carboidratos, enquanto a beta contém cerca de 24% (Storring et al. 1998, Aguiar et al. 2003).

Tabela 1.3 – Composição de carboidratos da eritropoetina (Adaptado de Choi et al. 1996)

	Composição de carboidratos (mol/mol)				
	N-Acetilhexosamina	Manose	Fucose	Galactose	Ácido siálico
EPO	22,1	8,1	2,6	13,3	10,7
rhEPO	28,9	10,1	3,3	15,7	18,7

A afinidade de ligação da rhEPO ao receptor depende da composição de carboidratos. A afinidade diminui com a glicosilação, uma vez que a porção glicosídica de um ligante glicoprotéico inibe a ligação ao receptor através de forças eletrostáticas. A redução da ligação ao receptor e da internalização pode explicar o aumento na meia-vida *in vivo* da rhEPO com maior grau de glicosilação (Jelkmann 2004). Para que a molécula de eritropoetina atinja os sítios alvo e evite a rápida metabolização pelos receptores hepáticos, pelo menos quatorze ácidos siálicos devem estar presentes. A desialilação aumenta a depuração da rhEPO, reduzindo sua meia-vida plasmática e sua atividade biológica. As diferenças na composição de carboidratos podem resultar em diferentes atividades específicas, mas a maioria dos estudos demonstrou que não há diferenças significativas na eficácia clínica da alfaepoetina e da betaepoetina (Storring et al. 1998, Schmidt et al. 2003, Sepehrizadeh et al. 2008).

Para que proteínas sejam utilizadas com finalidade terapêutica, deve-se caracterizar a estrutura macromolecular de suas formas intacta e digerida por proteólise, a seqüência de informações e as modificações pós-traducionais (Choi et al. 1996). Apesar das diferenças na estrutura glicosídica, a rhEPO vem sendo usada com sucesso no tratamento de anemias. A falta de EPO é a causa da anemia devido à insuficiência renal crônica. Antes da produção da eritropoetina humana recombinante (rhEPO), aproximadamente 25% dos pacientes em diálise necessitavam de transfusões regulares de células vermelhas. O tratamento com rhEPO melhorou bastante a vida desses pacientes anêmicos e o medicamento é um dos mais vendidos no mundo (Jelkmann 2004).

1.7- Usos da eritropoetina humana recombinante

O aumento da capacidade de transporte de oxigênio no sangue aumenta o nível de hemoglobinas, o hematócrito e os receptores de transferrina solúveis na circulação sanguínea. Assim, a eritropoetina pode corrigir as anemias renais e não renais, ao aumentar a produção de células vermelhas e seus níveis de hemoglobina, sendo atualmente o tratamento padrão para esses casos (Choi et al. 1996, Österborg et al. 2002). A eritropoetina humana recombinante foi aprovada pelo FDA para uso humano em pacientes com insuficiência renal crônica em 1989. Sua administração se dá pelas vias subcutânea ou endovenosa (Aguiar et al. 2003).

A principal causa da anemia em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) é a falta de eritropoetina suficiente para manter a taxa de eritropoiese necessária devido ao reduzido tempo de vida das células vermelhas, à deficiência de ferro e ácido fólico, ao hiperparatireoidismo com mielofibrose, toxicidade por alumínio, perda de sangue e inibição da eritropoiese causada por toxinas urêmicas. As toxinas urêmicas (poliaminas, hormônio paratireóide e algumas citocinas inflamatórias) presentes em pacientes com insuficiência renal crônica inibem a síntese de eritropoetina e a resposta da medula óssea à eritropoetina, de forma que a taxa de eritropoiese em pacientes anêmicos urêmicos é aproximadamente metade da taxa em indivíduos saudáveis. Foi mostrado recentemente que o interferon- γ (IFN- γ) inibe os receptores de eritropoetina e do fator de célula tronco na superfície dos progenitores eritróides, diminuindo a sobrevivência, o crescimento e a proliferação dessas células e eventualmente levando-as à apoptose. Assim, doses farmacológicas de rhEPO podem prevalecer na medula óssea e corrigir a deficiência de eritropoetina e a supressão da resposta da medula óssea a esse hormônio, estimulando a eritropoiese. (Lacombe e Mayeux 1999, Fisher 2003, Spahlinger e King 2010). A correção da anemia pode também prevenir ou

reverter a hipertrofia no ventrículo esquerdo em pacientes com insuficiência renal crônica (Fisher 2003).

O efeito da rhEPO não está limitado aos progenitores eritróides, havendo influência também em outros tipos celulares. Em pacientes com insuficiência renal crônica, o tratamento com rhEPO tem efeito imunomodulatório ao aumentar os níveis de IL-2 e IL-10 (anti-inflamatórias) e diminuir os níveis de citocinas proinflamatórias como o fator de necrose tumoral α , além de ativar os linfócitos B e a produção de suas imunoglobulinas, e aumentar os níveis de importantes antígenos de superfície dos linfócitos T $CD4^+$, como CD28, CD69 e CD40L. Estes antígenos são essenciais para a correta interação entre células T e B e afetam a produção de interleucinas e imunoglobulinas (Kimata et al. 1991, Bryl et al. 1998, Bryl et al. 1999, Lisowska et al. 2010).

Além da anemia por insuficiência renal crônica, a eritropoetina humana recombinante é também recomendada para o tratamento de anemias associadas ao uso de zidovudina em pacientes com AIDS, ao uso de ribavirina durante o tratamento da hepatite C, e também ao uso de quimioterápicos em pacientes com tumores malignos não-mielóides. O tratamento de pacientes soropositivos com zidovudina frequentemente causa supressão das células progenitoras eritróides na medula óssea e anemia. Aproximadamente metade das anemias crônicas relacionadas ao câncer pode ser corrigida com eritropoetina. Quando os níveis de eritropoetina endógena estão abaixo de 500 mUI/mL, a resposta ao tratamento com rhEPO costuma ser satisfatória (Lacombe e Mayeux 1999, Österborg et al. 2002, Fisher 2003, Delanghe 2008, Costa et al. 2010, Spahlinger e King 2010).

A rhEPO também pode ser usada no tratamento de síndrome mielodisplásica, em casos de doação de sangue autóloga, período perioperatório, anemias de gravidez e prematuridade, artrite reumatóide e transplantes de medula óssea (Aguiar et al. 2003, Fisher 2003, Spahlinger e King 2010) O medicamento é rotineiramente administrado a pacientes em hemodiálise, em diálise peritoneal em ambulatório ou em pacientes pré-diálise. Nestes, a eritropoetina posterga a necessidade de diálise, previne a hipertrofia do ventrículo esquerdo e a falência cardíaca congestiva (Jelkmann 2004). Além de postergar a necessidade de hemodiálise, o uso de eritropoetina humana recombinante descarta muitas vezes a necessidade de hospitalização e transfusão de sangue, procedimento que, apesar do rigoroso controle de qualidade, não é isento de riscos de transmissão de patógenos como os vírus das hepatites e o HIV (Maier et al. 1994, Österborg et al. 2002).

Estudos em animais demonstraram o efeito neuroprotetor da eritropoetina, uma vez que células neuronais de determinadas regiões contêm receptores para este hormônio. Ehrenreich e colaboradores realizaram testes clínicos com rhEPO em pacientes com acidente

vascular encefálico (AVE), mostrando que o tratamento com o medicamento resultou em forte redução do tamanho do infarto. Essa redução foi associada à melhora neurológica e clínica. Assim, espera-se que a eritropoetina possa ser usada como um medicamento neuroprotetor na isquemia cerebral, em trauma cerebral, doenças inflamatórias e doenças degenerativas neurais (Jelkmann 2004).

O receptor para eritropoetina é expresso também em células vasculares endoteliais. A eritropoetina apresenta efeito protetor e ativador nessas células, além de aumentar a mobilização de seus progenitores. A ativação das células vasculares endoteliais, juntamente com a ativação e adesão plaquetária aos microvasos também estimulada pela eritropoetina, são eventos essenciais à angiogênese. A ativação das plaquetas leva ao aumento dos níveis de fatores de crescimento angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator derivado da célula estromal (SDF-1) e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF-2). Há ainda aumento dos níveis plasmáticos de P-selectina solúvel, que medeia a adesão plaquetária às células endoteliais e, em conjunto com os fatores de crescimento angiogênicos, estimula a angiogênese. Assim, a rhEPO pode ser utilizada para auxiliar a recuperação do fluxo sanguíneo pós-isquemia (Asanuma et al. 2009, Kato et al 2010).

A eritropoetina é usada também como doping por atletas que desejam melhorar seu desempenho, uma vez que a produção de eritrócitos é aumentada, melhorando a capacidade cardíaca e de carreamento de oxigênio para os tecidos musculares. Entretanto, seu uso foi banido em 1987 pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) (Choi et al. 1996, Delanghe 2008, Spahlinger e King 2010).

1.7.1- Efeitos adversos

A administração crônica de eritropoetina humana recombinante pode resultar em hipertensão associada à hiperviscosidade sanguínea e à vasoconstrição devido às altas concentrações de cálcio citoplasmático, o que leva ao aumento da resistência à ação vasodilatadora do óxido nítrico. Outros fatores possivelmente relacionados à hipertensão causada pela rhEPO incluem aumento da produção de endotelina, renina tecidual (enzima formadora de angiotensina) e angiotensina, mudanças na produção de prostaglandinas nos tecidos vasculares, estímulo da angiogênese e estímulo da proliferação celular no músculo liso vascular e endotelial. Convulsões, trombose de acessos vasculares, formação de coágulos nas artérias, mialgias, dor de cabeça, aumento dos níveis de potássio no sangue e deficiência de ferro também estão entre os efeitos adversos causados pela administração de rhEPO (Aguiar et al. 2003, Fisher 2003, Costa et al. 2010).

Alguns fatores podem causar resistência ao tratamento, tais como deficiência de ferro, inflamações ou infecções, excesso de alumínio e hiperparatireoidismo (Jelkmann 2004).

1.8- Controle de qualidade

A eritropoetina humana recombinante deve ser utilizada com bastante atenção na prática clínica, no intuito de monitorar os resultados do tratamento e minimizar ao máximo os desconfortos e efeitos adversos. Ainda, para garantir sua eficácia e segurança, o medicamento deve passar por avaliações físico-químicas, imunológicas e biológicas, com identificação completa, caracterização química e, sobretudo, potência biológica.

De acordo com a Farmacopéia Européia 6ª edição, cada lote produzido do produto final de eritropoetina humana recombinante deve passar pelos seguintes testes:

- Aspecto;
- Identificação por eletroforese em gel de poliacrilamida e imunoblotting, eletroforese por capilaridade e por mapeamento peptídico;
- Concentração de proteínas;
- Dímeros e substâncias relacionadas de alto peso molecular;
- Ácido siálico;
- Endotoxinas bacterianas;
- Potência.

Existem diferentes métodos para a determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante. Os testes recomendados pela Farmacopéia Européia para avaliação da atividade eritropoiética da medula óssea envolvem o uso de camundongos normocitêmicos ou policitêmicos, com especificação de potência estimada de 80 a 125% da potência declarada. O ensaio com camundongos policitêmicos baseia-se na incorporação de ^{59}Fe nas células vermelhas dos animais previamente expostos a pressão atmosférica reduzida (Sepehrizadeh et al. 2008, Costa et al. 2010). Este método, no entanto, está em desuso. Desde 2002, na tentativa de minimizar o sofrimento e o estresse sofridos pelos camundongos em condições de pressão atmosférica reduzida, o Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) recomenda o uso somente do método de camundongos normocitêmicos. Além de alto sofrimento para os animais, o uso de radioisótopos neste ensaio apresenta alto risco à saúde humana e ao meio-ambiente (Costa et al. 2010). Os camundongos normocitêmicos são inoculados com eritropoetina humana recombinante em condições normais de pressão e os reticulócitos presentes em sua circulação periférica são contados manualmente ou de forma automática (Sepehrizadeh et al. 2008, Costa et al. 2010). A Farmacopéia Européia (2008)

sugere a contagem de reticulócitos por citometria e o uso do laranja de tiazol como corante fluorescente e um esquema de três doses diferentes de amostra e material de referência inoculados em camundongos B6D2F1.

Há uma constante busca pela substituição dos bioensaios por métodos *in vitro*, entretanto, para a potência da eritropoetina humana, isto ainda não é possível. Diversos métodos *in vitro* para esta determinação foram descritos (Kaempfer 1986, Hammerling et al. 1996, Liefoghe et al. 2005), porém não apresentam a equivalência necessária aos testes *in vivo* para que sejam aprovados para uso. Além do sofrimento causado aos animais, os ensaios *in vivo* são complexos, requerem grande quantidade de material e tempo, restringindo o número de amostras a serem testadas, e normalmente são imprecisos. Os testes *in vitro* são mais convenientes, e geram resultados com menos variações e menores intervalos de confiança, mas apresentam limitações que não permitem seu emprego em testes clínicos de rotina (Kaempfer 1986, Hammerling et al. 1996).

Uma das principais limitações dos testes *in vitro* relaciona-se às ramificações das cadeias glicosídicas da estrutura da rhEPO. As cadeias glicosídicas são essenciais para a secreção celular normal do hormônio e para a proteção contra a rápida degradação e depuração *in vivo* (Hammerling et al. 1996, Liefoghe et al. 2005). Assim, a atividade *in vivo* é altamente dependente do grau de sialilação das cadeias glicosídicas, porém *in vitro* a potência parece não ser dependente desta característica, não sendo possível avaliar os efeitos da filtração glomerular e do metabolismo da eritropoetina pelo organismo na atividade final do hormônio.

Um dos métodos *in vitro* conhecidos é baseado na medição da incorporação de ^{59}Fe ao heme. Entretanto, esse ensaio apresenta baixa sensibilidade e especificidade, além do alto risco associado ao uso do ^{59}Fe radioativo. Outro grupo conhecido de métodos *in vitro* é baseado na medição da formação de colônia eritróide, porém, apesar de mais confiáveis que o método de incorporação de ^{59}Fe , esses métodos são complexos e requerem pessoal altamente especializado. Rádio-imunoensaios ou imunoensaios com uso de anticorpos monoclonais apresentam inconvenientes técnicos e financeiros ao seu uso na rotina clínica, além de não estarem direcionados às características biológicas da eritropoetina, e sim às estruturais, podendo falhar na distinção entre o hormônio ativo ou inativo. Há um método baseado na medição da síntese de DNA pelos precursores eritróides na presença de eritropoetina, porém apresenta diversos requerimentos, tais como substrato eritróide altamente específico e sensível à eritropoetina, facilmente armazenável, com taxa de síntese de DNA proporcional à concentração de eritropoetina e resultados reprodutíveis (Kaempfer 1986). Hammerling e colaboradores propuseram, em 1996, um método *in vitro* baseado na determinação do

estímulo proliferativo em células de eritroleucemia humana linhagem TF-1 induzido pela eritropoetina humana recombinante. Em 2005, Liefoghe e colaboradores descreveram um ensaio para eritropoetina humana recombinante baseado em células com uso de uma lectina ligante de galactose na tentativa de imitar a ação do fígado. Este método, entretanto, gerou resultados de potência menores que o ensaio *in vivo* com camundongos normocitêmicos e não possibilitou a distinção entre eritropoetina totalmente sialilada, parcialmente sialilada ou totalmente deglicosilada.

A contagem de reticulócitos demonstra como está a eritropoiese no momento de coleta do sangue. A inoculação de alfaepoetina diminui o tempo de maturação dos reticulócitos na medula, levando à sua liberação na circulação periférica, onde permanecem por mais tempo devido à sua imaturidade quando liberados (Rowan 1991). Os reticulócitos recém-liberados apresentam maior diâmetro e são mais basofílicos que os liberados em condições normais de maturação na medula (Corberand 1997). Assim, o aumento da concentração de reticulócitos na circulação periférica indica aumento da eritropoiese e ação da alfaepoetina, podendo sua contagem ser utilizada como parâmetro de avaliação de potência.

Em Bio-Manguinhos, os lotes do produto final de alfaepoetina humana recombinante produzidos são avaliados quanto a aspecto, volume médio, pH, concentração de proteínas, potência, esterilidade, toxicidade inespecífica, pirogênio e endotoxina antes de serem liberados para o mercado. O ensaio de potência utilizado na rotina em Bio-Manguinhos é realizado pela Seção de Controle Biológico (SEBIO) seguindo-se o método de camundongos normocitêmicos e contagem de reticulócitos em microscópio com auxílio da Câmara de Neubauer.

1.9- Relevância do estudo

A partir dos dados do Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS, estima-se que, só em 2009, 75.822 pacientes submeteram-se a diálise e cerca de 90% deles, a hemodiálise. O uso de alfaepoetina faz parte do tratamento de mais de 80% destes pacientes (Brasil 2010). Assim, há grande demanda por alfaepoetina humana recombinante pelo Ministério da Saúde. Devido à grande quantidade de unidades constantemente requerida, os testes de controle de qualidade nos lotes produzidos devem ser executados no menor tempo possível para garantir a entrega nos prazos programados.

Com a construção do Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos para Diagnóstico (CIPBR), Bio-Manguinhos ampliará a capacidade produtiva de toda a sua linha de produtos. Em relação aos biofármacos, terá capacidade para produzir toda a demanda do Ministério da Saúde de alfaepoetina humana recombinante (hoje em torno 35 bilhões de

unidades internacionais, cerca de 17,5 milhões de frascos na apresentação de 2000UI) (Brasil 2011). Além do aumento da demanda por análises de lotes do produto final da alfaepoetina humana recombinante produzidos no CIPBR, estão previstas análises, incluindo o teste de potência, no ingrediente farmacêutico ativo (IFA).

Uma análise criteriosa feita na alfaepoetina humana recombinante é crucial para garantir que os usuários do medicamento tenham acesso a um produto com qualidade. Assim, o desenvolvimento de métodos de análise que diminuam a margem de erro e aumentem a precisão e a confiabilidade dos resultados, além de reduzir o tempo de liberação para o mercado, é de grande importância para a qualidade do produto. A contagem tradicional de reticulócitos por microscopia é um método demorado, pouco preciso e desgastante para o analista, com alta probabilidade de erros. O estabelecimento da citometria de fluxo para a contagem de reticulócitos na rotina do controle de qualidade da alfaepoetina humana recombinante reduziria bastante o tempo de análise, aumentaria o número de células analisadas e proporcionaria resultados com precisão e confiabilidade muito maiores, atendendo ao significativo crescimento da produção do biofármaco previsto em Bio-Manguinhos. A estas vantagens, poder-se-ia somar ainda uma boa relação custo-benefício, uma vez que a unidade já dispõe de citômetro de fluxo e os custos seriam advindos dos insumos necessários, ao mesmo tempo em que seria reduzida a necessidade de pessoal e de tempo dedicado à análise, melhorando a disponibilidade de funcionários para cumprimento de outras demandas.

2- OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Utilização do método de citometria de fluxo para otimização da contagem de reticulócitos e sua aplicação na rotina de controle de qualidade da alfaepoetina humana recombinante produzida por Bio-Manguinhos.

2.2. Objetivos específicos

1. Estudo do método de citometria de fluxo para a contagem de reticulócitos.
2. Comparação e avaliação da equivalência entre os resultados obtidos pela citometria de fluxo e pelo processo tradicional de microscopia ótica, atualmente utilizado pelo Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) de Bio-Manguinhos.
3. Realização dos testes necessários à validação do novo método de acordo com a Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

3- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados segundo a Instrução de Trabalho (IT) nº 0919 e o Procedimento Operacional Padronizado (POP) nº 5998 estabelecidos na Seção de Controle Biológico (SEBIO) pertencente ao Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) de Bio-Manguinhos, a Instrução de Trabalho (IT) nº 4642 elaborada pelo Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) pertencente à Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) de Bio-Manguinhos, e o documento de instruções e dados técnicos (*technical data sheet*) do marcador fluorescente utilizado (Retic-COUNT – BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Todos os procedimentos envolvendo animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz, sob a licença nº L-072/08, protocolo P-432/07.

3.1- Amostras e material de referência da alfaeopetina humana recombinante

Para a comparação entre os métodos, foram utilizados os mesmos 20 lotes de alfaeopetina humana recombinante produzidos por Bio-Manguinhos, de concentração 2000 UI ou 4000 UI, que a Seção de Controle Biológico (SEBIO) analisou para liberação pelo teste de potência. Para a determinação da repetitividade e da precisão intermediária, foi utilizado um único lote de alfaeopetina humana recombinante 4000 UI produzido por Bio-Manguinhos.

O material de referência de trabalho utilizado (MRT (B) Rh EPO / 0208), foi estabelecido pela colaboração entre Bio-Manguinhos, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS / Fiocruz) e Centro de Inmunología Molecular – CIM, Cuba.

Amostras e material de referência foram estocados à temperatura de 2 a 8°C até o momento de uso. A diluição das amostras foi feita pela equipe da SEBIO com solução de cloreto de sódio (Sigma Aldrich) 0,9% de forma a obter as concentrações de 150, 450 e 1350 UI/mL, determinadas em estudos prévios de validação do teste de potência da alfaeopetina humana recombinante, de acordo com a IT nº 0919 – Bio-Manguinhos (figura 3.1). As amostras foram diluídas a partir de um *pool* de três frascos do lote em análise.

3.2- Animais utilizados

Para este experimento foram utilizados camundongos SPF normocitêmicos B6D2F1, fêmeas, provenientes do CIM – Cuba ou do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) / Fiocruz. Os animais são alojados no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) de Bio-Manguinhos, com livre acesso a ração e água. Para cada lote, um total de 42 camundongos foi distribuído em sete gaiolas, totalizando seis camundongos por gaiola. Cada camundongo de uma gaiola recebeu, por via subcutânea, uma dose diferente de amostra ou material de referência de trabalho, ou seja: um camundongo recebeu a dose mais baixa do material de referência, outro recebeu a dose intermediária, enquanto outro recebeu a dose mais alta. O mesmo aconteceu para as amostras de alfaepoetina humana recombinante (figura 3.1).

O uso somente de camundongos fêmeas se dá pelo fato de a testosterona induzir a eritropoiese, podendo interferir nos resultados do teste. Esta indução é resultado do estímulo à produção de eritropoetina pela testosterona. Além disso, este androgênio age também diretamente na medula óssea, promovendo a diferenciação das unidades eritróides formadoras de colônia em unidades responsivas à eritropoetina, aumentando seu efeito na eritropoiese (Rishpon-Meyerstein et al. 1968, Ferrucci et al. 2006, Bain 2007, Coviello et al. 2008).

3.3- Inoculação das amostras e padrões nos camundongos

As amostras foram inoculadas no LAEAN, por pessoal treinado para esse fim. Os camundongos devem pesar de 16 a 18 g no dia da inoculação. Foram inoculados 0,2 mL de cada diluição da amostra ou material de referência, de forma que as doses finais fossem 30, 90 e 270 UI/animal, uma seqüência geométrica na base 3 (figura 3.1). A escolha das doses inoculadas foi feita de acordo com a rotina de testes em Bio-Manguinhos e os valores estabelecidos na Instrução de Trabalho referente a este ensaio (Brasil 2009).

Para garantir que a alfaepoetina humana recombinante inoculada gerou aumento na produção de reticulócitos, sete camundongos não inoculados passaram pelo mesmo tratamento dado aos inoculados até o momento da coleta do sangue. O sangue coletado desses camundongos foi analisado da mesma forma que as outras amostras de sangue e o resultado final utilizado para comparação com os valores obtidos pela análise das amostras de sangue provenientes dos animais inoculados.

3.4- Anticoagulantes

As soluções de EDTA 0,5 M (ácido etilenodiamino tetra-acético – Sigma Aldrich – dissolvido em água para injetáveis) e heparina sódica 5000 UI (Sigma Aldrich) foram

utilizadas como anticoagulantes. A heparina é adotada como anticoagulante na análise tradicional por microscopia e foi também empregada em alguns experimentos por citometria. Para a maior parte dos experimentos por citometria, utilizou-se 15 μL de solução de EDTA dissódico 0,5 M como anticoagulante.

3.5- Coleta do sangue

A coleta de aproximadamente 100 μL de sangue dos camundongos por via retroorbital foi feita no LAEAN 96 horas após a inoculação. O sangue foi depositado em microtubos contendo 4 μL de solução de heparina sódica 5000 UI ou 15 μL de solução de EDTA dissódico 0,5M (figura 3.1).

Após o término da coleta de sangue, os animais foram submetidos à eutanásia, descontaminados e descartados pelo LAEAN de acordo com as Instruções de Trabalho (IT) n° 0196, 2118 e 2137.

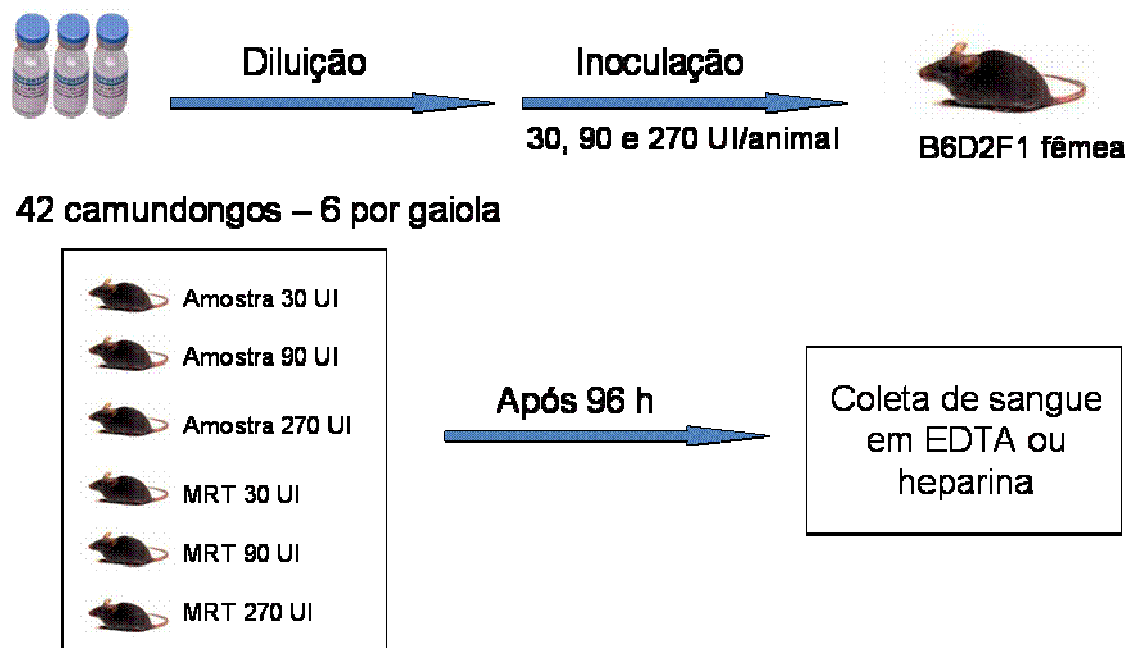


Figura 3.1 – Preparo e inoculação das amostras e material de referência. Amostras e material de referência foram diluídos com solução de cloreto de sódio 0,9% de forma a obter as concentrações de 150, 450 e 1350 UI/mL. Foram inoculados 0,2 mL de cada diluição da amostra ou material de referência, de forma que as doses finais fossem 30, 90 e 270 UI/animal. Para cada lote, utilizou-se um total de 42 camundongos B6D2F1 fêmeas, divididos em 7 gaiolas, totalizando seis camundongos por gaiola. Cada camundongo de uma gaiola recebeu uma dose diferente de amostra ou material de referência de trabalho, ou seja: um camundongo recebeu a dose mais baixa do material de referência, outro recebeu a dose intermediária, enquanto outro recebeu a dose mais alta. O mesmo aconteceu para as amostras de alfaopetina humana recombinante. Após 96 horas, o sangue dos camundongos foi coletado por via retroorbital em tubos contendo heparina sódica 5000 UI ou EDTA dissódico 0,5M.

3.6- Análise por microscopia

A análise por microscopia foi realizada pela equipe da Seção de Controle Biológico, concomitantemente à análise por citometria de fluxo. A análise por microscopia, ainda considerada o padrão ouro para a contagem de reticulócitos, é utilizada na rotineiramente no ensaio de potência da alfaepoetina humana recombinante em Bio-Manguinhos (Brasil 2009). Após a coleta, as amostras de sangue foram homogeneizadas em agitador de tubos, adicionadas (40 µL) em tubos contendo 120 µL de uma mistura de duas soluções – uma obtida a partir de 0,38 g de citrato de sódio (Vetec Química Fina) dissolvidos em 10 mL de água para injetáveis e a outra obtida a partir de 0,12 g do corante novo azul de metileno (Vetec Química Fina) dissolvidos em 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% – e homogeneizadas novamente. Os tubos contendo sangue e as soluções de citrato de sódio e novo azul de metileno foram incubados em banho-maria a 37°C por uma hora e após esse período receberam 40 µL de solução hemolisante (preparada pela adição de 120 µL do reagente hemolisante Cellmlise II – Celm Cia. Equipadora de Laboratórios – a 2580 µL de solução de cloreto de sódio 0,9%). Após dois ciclos de homogeneização de três segundos em agitador e repouso de três minutos, foram retirados 10 µL da mistura hemolisada e adicionados a tubos contendo 1960 µL de solução de cloreto de sódio 0,9%, seguido de homogeneização. Uma alíquota de 10 µL do conteúdo de cada tubo foi transferida para câmara de Neubauer e os reticulócitos em todo o quadrante central da câmara foram contados em microscópio ótico, com objetiva de 40X (figura 3.2).

Após a contagem de reticulócitos, são obtidos sete valores, em números absolutos, por cada dose de amostra e material de referência de trabalho. Para o cálculo de potência foram utilizados apenas seis valores de cada dose, sendo excluído o valor mais discrepante.

3.7- Preparo das amostras para análise por citometria

Após a coleta, as amostras de sangue foram homogeneizadas em agitador de tubos. Cada amostra de sangue recebeu o corante marcador de RNA e DNA (laranja de tiazol) e o tampão PBS para controle negativo. Para a marcação do RNA e do DNA presentes nos reticulócitos, foram adicionados 5,0 µL de sangue a tubos contendo 1,0 mL do corante laranja de tiazol – Retic-COUNT (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) –, formando um complexo reagente com banda de absorção a 475 nm (luz azul) e uma banda de emissão de fluorescência a 530 nm (luz verde). Para controle negativo, foram adicionados 5,0 µL de sangue a tubos contendo 1,0 mL de tampão 1X PBS pH 7,2 fornecido pela Seção de Soluções e Diluentes (SESOD) de Bio-Manguinhos (cloreto de sódio anidro 8,77 g, fosfato de sódio dibásico anidro 1,02 g, fosfato de sódio monobásico monohidratado 0,386 g, água para injetáveis em

quantidade suficiente para 1000 mL) com 0,1% de azida sódica (todos os reagentes da Merck).

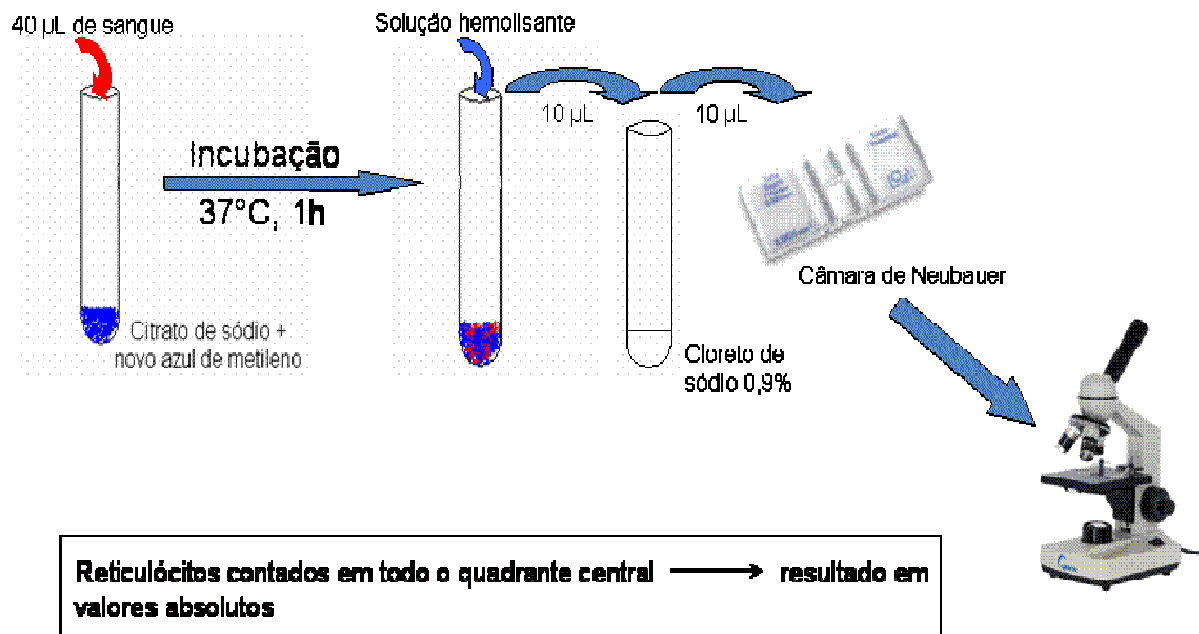


Figura 3.2 – Processamento das amostras e contagem de reticulócitos em Câmara de Neubauer por microscopia ótica. As amostras de sangue foram homogeneizadas, adicionadas (40 µL) em tubos contendo citrato de sódio e novo azul de metileno e homogeneizadas novamente. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por uma hora e após esse período receberam 40 µL de solução hemolisante. Após dois ciclos de homogeneização de três segundos e repouso de três minutos, foram retirados 10 µL da mistura hemolisada e adicionados a tubos contendo 1960 µL de solução de cloreto de sódio 0,9%, seguido de homogeneização. Uma alíquota de 10 µL do conteúdo de cada tubo foi transferida para câmara de Neubauer e os reticulócitos em todo o quadrante central da câmara foram contados em microscópio ótico, com objetiva de 40X.

Em seguida à adição de sangue aos tubos contendo Retic-COUNT e tampão 1X PBS com azida sódica, as amostras foram novamente homogeneizadas em agitador de tubos e incubadas no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos, devendo ser lidas em até 3 horas após a incubação (figura 3.3), de acordo com o protocolo do fabricante do corante (Becton Dickinson Biosciences 2000).

3.8- Leitura das amostras em citômetro de fluxo e análise dos dados

As amostras foram lidas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), equipado com laser de argônio (488nm) e um laser diodo vermelho (635nm), no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), da vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) de Bio-Manguinhos.

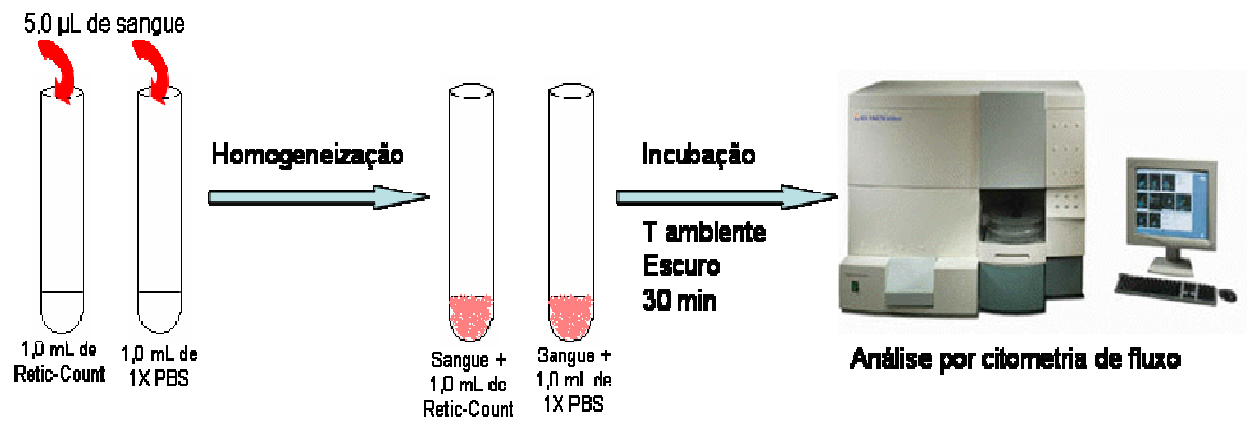


Figura 3.3 – Processamento das amostras e contagem de reticulócitos por citometria de fluxo. 5,0 µL do sangue coletado para cada amostra ou material de referência foram adicionados a um tubo contendo 1,0 mL de Retic-Count e a um tubo contendo 1,0 mL de tampão 1X PBS pH 7,2, com 0,1% de azida sódica. Após homogeneização, os tubos foram incubados por 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente. Após incubação, amostras e material de referência foram analisados por citometria de fluxo.

O protocolo de aquisição foi montado de acordo com o documento de instruções e dados técnicos (*technical data sheet*) do marcador fluorescente Retic-COUNT, utilizando-se o programa *CellQuest*. As avaliações foram baseadas nos gráficos de tamanho (dispersão frontal) e granulosidade (dispersão lateral) e no gráfico de intensidade de marcação para FL1 (fluorescência). Os ganhos de dispersão frontal, dispersão lateral e fluorescência foram ajustados para o modo log. Para a fluorescência não houve necessidade de ajustes de compensação, uma vez que foi utilizado apenas um corante. Os tubos foram homogeneizados antes da análise e para cada amostra de controle negativo ou marcada por laranja de tiazol foram adquiridos 50.000 eventos na região (*gate*) de reticulócitos, excluindo-se da análise as células mortas e plaquetas. A fluorescência do marcador laranja de tiazol foi avaliada no canal FL1 com utilização do filtro 530/30.

A análise dos dados da aquisição foi realizada com auxílio do programa Summit (Dako, EUA). Um gráfico de FSC (*forward-scatter*) x SSC (*side-scatter*) foi feito para os dados obtidos com o controle negativo e com o Retic-COUNT, estabelecendo-se uma janela de marcação (*gate* R1) ao redor da população de células vermelhas, excluindo plaquetas e *debris* celulares, como mostrado na figura 3.4.

Um histograma de fluorescência (FL1) foi feito para os dados, delimitados pelo *gate* R1, obtidos a partir do controle negativo. Este histograma mostra, na parte delimitada pelo cursor R2, a autofluorescência gerada pelas células vermelhas do sangue – se houver –, além das células negativas para a presença do corante laranja de tiazol (à esquerda do cursor R2). O cursor R2 foi ajustado de forma que sua borda esquerda coincidissem com o local em que o pico de células não fluorescentes encontra pela primeira vez a linha de base. Abaixo do histograma é gerada uma tabela onde na primeira linha é apresentado o total de células vermelhas

presentes no *gate* R1 e na segunda linha é apresentado o número de células fluorescentes, delimitadas pelo cursor R2, e o percentual destas em relação ao total de células vermelhas (figura 3.5). Possíveis eventos na região R2 representam a pequena concentração de células cuja autofluorescência está dentro da faixa de sinal fluorescente gerado pelo Retic-COUNT. Caso haja células nessa condição, seu valor percentual é subtraído do percentual total de células positivas marcadas com Retic-COUNT.

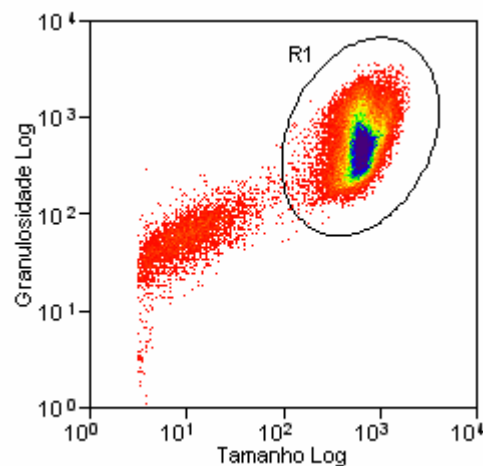


Figura 3.4 – Gráfico FSC x SSC com o *gate* (R1) delimitando a população de células vermelhas.

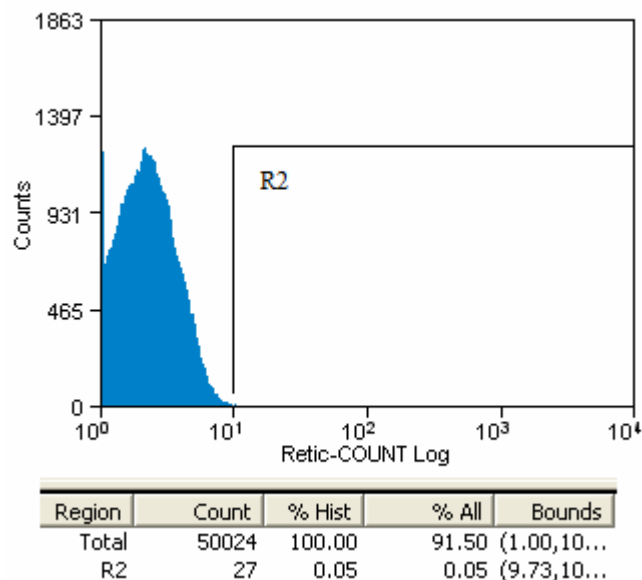


Figura 3.5 – Histograma FL1 para uma amostra controle negativo (sem Retic-COUNT), gerado a partir da população total de células vermelhas, delimitadas pelo *gate* R1.

O histograma de fluorescência (FL1) para as amostras marcadas com o Retic-COUNT é gerado mantendo-se o cursor R2 na mesma posição do histograma de fluorescência utilizado para o controle negativo, de forma que o número de eventos autofluorescentes possa ser

subtraído do total de células fluorescentes presentes na região R2. Neste caso, o número de eventos delimitados pelo cursor R2 representa as células positivas para a marcação com laranja de tiazol (reticulócitos) e os eritrócitos não marcados, mas com autofluorescência. A tabela abaixo do histograma apresenta o total de células vermelhas presentes no *gate* R1, o número de células fluorescentes, delimitadas pelo cursor R2, e o percentual destas em relação ao total de células vermelhas (figura 3.6).

O percentual real de reticulócitos na amostra marcada com Retic-COUNT foi obtido pela subtração dos eventos em R2 presentes no tubo não marcado dos eventos presentes em R2 no tubo marcado:

$$\% \text{ de reticulócitos} = \% \text{ de reticulócitos na região R2 do tubo marcado} - \% \text{ de reticulócitos na região R2 do tubo não marcado.}$$

Após a contagem de reticulócitos por citometria, são obtidos sete valores, em percentual, por cada dose de amostra e material de referência de trabalho. Para o cálculo de potência foram utilizados apenas seis valores de cada dose, sendo excluído o valor mais aberrante.

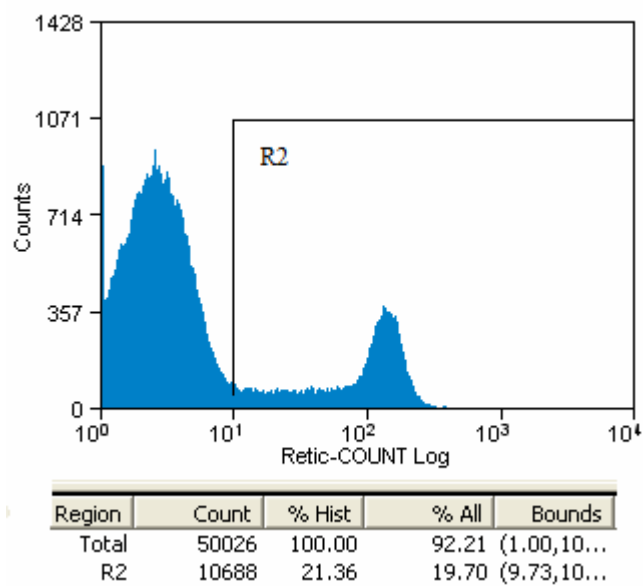


Figura 3.6 – Histograma FL1 para uma amostra marcada com Retic-COUNT e a porcentagem de reticulócitos na população total de células vermelhas, representada pela região R2.

3.9- Cálculo de potência e validade do teste

A potência de cada lote de alfaeopetina humana recombinante foi calculada de acordo com o recomendado pela Farmacopéia Européia 6ª edição (2008), em planilha do Excel validada para este fim. Foi aplicada a comparação da amostra com o material de referência para determinar quanto da amostra analisada produz o mesmo efeito biológico que o padrão.

Para a análise por citometria, a porcentagem de reticulócitos obtida para cada uma das três doses da amostra foi comparada com a porcentagem obtida para as mesmas doses do material de referência. Para a análise por microscopia, compararam-se os valores absolutos de reticulócitos obtidos para a contagem de cada uma das doses de amostra e material de referência. Apesar dos resultados primários de contagem por citometria de fluxo serem expressos em porcentagem e os resultados primários de contagem por microscopia serem expressos em valores absolutos, ambas as formas de expressão podem ser usadas para o cálculo da razão da potência final. A razão da potência é calculada pela relação somente das contagens obtidas a partir da amostra com as contagens obtidas a partir do material de referência com valor nominal estabelecido, não havendo mudanças no cálculo para diferentes formas de expressão dos resultados da contagem.

A comparação entre as contagens de reticulócitos obtidas para amostras e material de referência foi feita utilizando-se os dados de dose-resposta e sua análise pelo modelo de retas paralelas e desenho de blocos ao acaso com cálculo dos contrastes lineares, que se relacionam às inclinações das curvas de logaritmo natural (ln) da dose pela contagem de reticulócitos.

A validade estatística de cada ensaio foi demonstrada pela análise da variância, através da avaliação da significância da regressão linear e dos desvios de paralelismo e linearidade. É considerado válido o teste em que a regressão linear é significativa ($P < 0,05$), de forma a garantir que os limites possam ser calculados com 95% de confiança. O desvio de paralelismo não pode ser significativo ($P > 0,05$), garantindo que uma curva do ln dose x quantificação de reticulócitos obtida para as respostas da amostra é paralela à curva obtida para as respostas do material de referência. O desvio de linearidade também deve ser não significativo ($P > 0,05$), indicando que a relação entre o logaritmo da dose e a resposta pode ser representada por uma linha reta na faixa das doses utilizadas.

Se o ensaio apresentar validade estatística, a potência e os limites de confiança podem ser estimados. O cálculo da inclinação comum para o ensaio com três doses foi feito a partir do ln da razão entre as doses adjacentes de cada preparo. O logaritmo da razão da potência da amostra foi calculado pela subtração do somatório dos valores obtidos para a amostra pelo somatório dos valores obtidos para o padrão, seguida pela divisão deste resultado pelo produto do número de doses e da inclinação comum:

$$\ln \text{ da razão da potência} = \frac{\sum \text{valores da amostra} - \sum \text{valores do padrão}}{\text{número de doses} * \text{inclinação comum}}$$

A partir do valor do logaritmo da razão da potência, o cálculo de seu antilogaritmo forneceu o valor da razão da potência. O valor da potência calculada para a amostra foi obtido

pela multiplicação da potência assumida pelo valor da razão da potência. Para expressão dos resultados e comparação entre as diferentes metodologias, utilizaram-se os valores de percentual da potência calculada em relação à potência declarada no rótulo.

Os valores da razão dos limites de confiança foram calculados pelo antilogaritmo de:

$$C * \ln da \text{ razão da potência} \pm \sqrt{(C - 1) * [C * (\ln da \text{ razão da potência})^2 + 2V]}$$

Em que:

$$C = \frac{\sum \text{quadrados da regressão linear}}{\sum \text{quadrados da regressão linear} - \text{quadrado médio do erro residual} * (\text{valor } t \text{ crítico para } p = 0,05 \text{ e } 25 \text{ g.l.})^2}$$

$$V = \frac{\sum \text{quadrados da regressão linear}}{\text{quadrado da inclinação comum} * \text{número de doses} * \text{número de réplicas por dose}}$$

Os valores dos limites de confiança foram obtidos pela multiplicação da potência assumida pelos valores da razão dos limites de confiança. A potência e os limites de confiança das amostras devem ser, respectivamente, entre 80 e 125% e 64 e 156%, de acordo com a Farmacopéia Européia 6ª edição (2008).

3.10- Análise estatística e comparação dos métodos

Para avaliar a concordância entre os métodos de citometria de fluxo e microscopia, foi utilizado o teste estatístico de Bland-Altman, com comparação de vinte resultados obtidos com os mesmos lotes, analisados a partir das mesmas amostras de sangue. O número de experimentos foi restringido devido à utilização de animais nesta comparação.

Para a análise de Bland-Altman, foram calculadas as médias dos resultados obtidos por citometria e microscopia para o mesmo lote, além das diferenças entre estes dois resultados. A partir das diferenças entre os resultados obtidos pelos dois métodos, foram calculados a média (m), o desvio padrão (s), e os valores da média mais ou menos 1,96 vezes o desvio padrão ($m \pm 1,96s$), conforme exemplo na tabela 3.1. Estes valores foram usados para se traçar um gráfico da média entre os dois resultados pela diferença entre eles, utilizando-se os valores de $m \pm 1,96s$ como limites de concordância. Se as diferenças apresentarem uma distribuição normal, 95% destas se localizarão dentro destes limites. Uma vez que as diferenças entre os resultados dos dois métodos localizem-se todas entre os limites de concordância estabelecidos, os dois métodos são considerados equivalentes e podem ser usados um em substituição ao outro.

Tabela 3.1 – Exemplo da comparação entre os resultados obtidos por microscopia e citometria de fluxo. Para cada lote, são calculadas as médias entre os resultados de cada método de contagem de reticulócitos, a diferença entre esses resultados, e a média e o desvio padrão entre todas as diferenças. Os valores obtidos pela média $\pm 1,96x$ o desvio padrão das diferenças representam os limites de concordância.

Lote	Citometria	Microscopia	Média	Diferença	Média das diferenças	Desvio padrão das diferenças	Média das diferenças $\pm 1,96 x$ desvio padrão
1	99	96	97,5	-3
2	89	99	94	10			
...			

3.11- Variação intra-analista e inter-analistas para a contagem de reticulócitos pelo método de citometria de fluxo

Para avaliar a variação intra-analista do método de citometria de fluxo para contagem de reticulócitos, foi calculado o coeficiente de variação dos resultados de contagem para um mesmo lote, nas doses de 30, 90 e 270 UI/animal, obtidos pelo mesmo analista em seis preparos diferentes. Para cada dose, a inoculação de um preparo de lote resultou em amostras de sangue de seis diferentes camundongos, que foram processadas, coradas e analisadas por citometria de fluxo, gerando seis resultados por preparo de lote e trinta e seis resultados no total.

Para avaliar a variação inter-analistas, foi calculado o coeficiente de variação dos resultados de contagem de reticulócitos para um mesmo lote, nas doses de 30, 90 e 270 UI/animal, obtidos por três analistas diferentes, num total de 26 resultados por dose.

3.12- Testes para validação do método de citometria de fluxo para uso na rotina da Seção de Controle Biológico (SEBIO) de Bio-Manguinhos

O método de determinação de potência da alfaeopetina humana recombinante com contagem de reticulócitos já é validado para uso pela SEBIO (Informe de Validação de 15/6/2007 e relatório de validação analítica nº 138788 modificado em novembro/2010). De acordo com a Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, quando ocorrem modificações no método bioanalítico já validado, devem ser realizadas validações parciais. A modificação ocorrida em relação ao método já validado refere-se à substituição do sistema de detecção. Assim, para verificar a adequabilidade do novo método para uso na rotina, foi realizada a validação parcial do mesmo, a partir da análise de sua repetitividade e precisão intermediária.

Para avaliação da repetitividade, foram realizadas seis determinações de potência (de acordo com a Resolução da Anvisa RE nº 899 de 2003, que preconiza no mínimo cinco determinações) no mesmo lote de alfaeopetina recombinante pelo mesmo analista, sendo

determinados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação, não sendo admitidos valores maiores que 15% para este.

Para avaliação da precisão intermediária, três analistas realizaram os ensaios no mesmo lote de alfaepoetina humana recombinante em dias diferentes e a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos resultados foram determinados, não sendo admitidos valores maiores que 15% para este.

4 – RESULTADOS

4.1- Resultados gerados pela citometria de fluxo para os vinte lotes de alfaeopetina humana recombinante utilizados na comparação entre os métodos

A análise por citometria de fluxo no citômetro FACSCalibur, com obtenção de dados pelo programa *CellQuest* e análise pelo programa Summit, gerou gráficos de tamanho (FSC) x granulosidade (SSC), sendo possível separar as células vermelhas (selecionadas pelo *gate* R1) dos outros componentes presentes no sangue, como plaquetas e *debris* celulares.

A figura 4.1 mostra um gráfico FSC x SSC representativo de uma amostra de sangue inoculada com alfaeopetina humana recombinante. No *gate* R1 estão as células vermelhas. O quadro abaixo do gráfico apresenta a porcentagem de células vermelhas (R1) em relação ao total de células na amostra de sangue (93,46%).

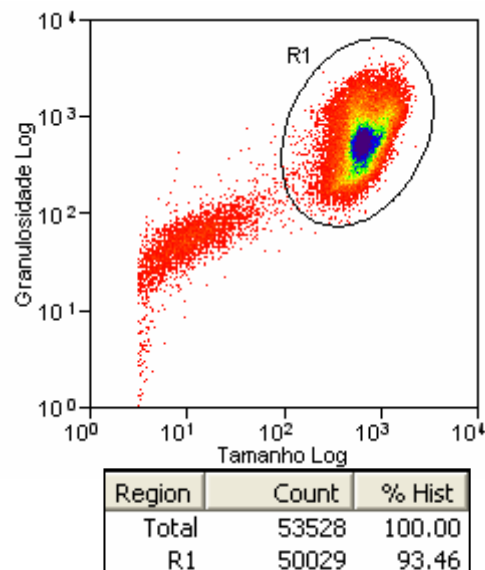


Figura 4.1 – Gráfico FSC x SSC representativo de uma amostra de sangue inoculada com alfaeopetina humana recombinante. As células vermelhas são separadas pelo *gate* R1. O quadro abaixo do gráfico apresenta a porcentagem de células vermelhas (R1) no total de eventos adquiridos.

A partir das células vermelhas separadas pelo *gate* R1, foram gerados histogramas de fluorescência x número de células, sendo possível calcular a porcentagem de células fluorescentes (selecionadas pelo cursor R2) no total de células vermelhas. As células fluorescentes são as que contêm ácidos nucleicos, ou seja, os reticulócitos. Dessa forma, a

partir da área delimitada pelo cursor R2 no histograma de fluorescência x número de células, tem-se o percentual de reticulócitos em relação ao total de células vermelhas.

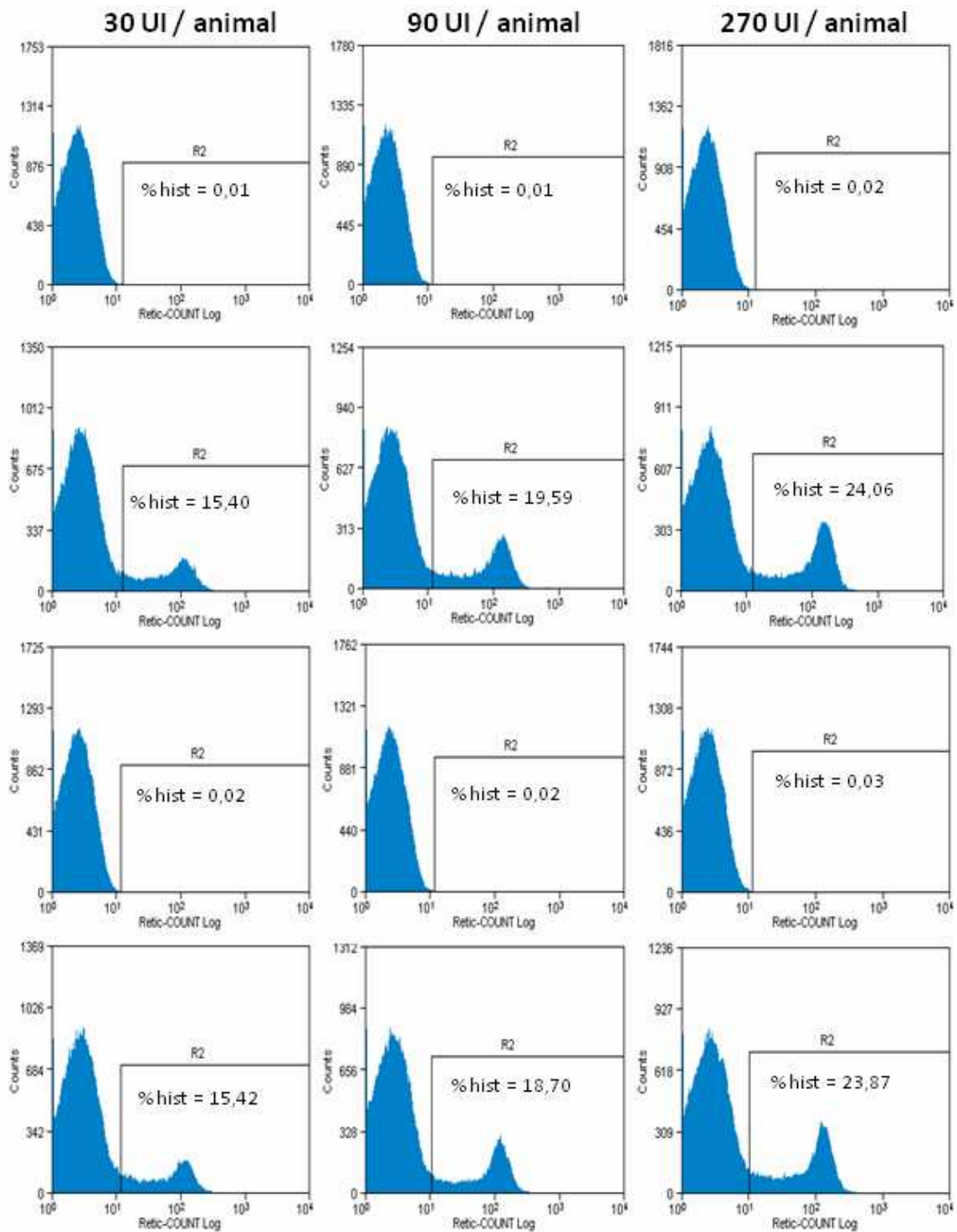


Figura 4.2 – Histogramas de fluorescência x número de células representativos das três doses inoculadas nos camundongos. A coluna da esquerda mostra os histogramas para a dose de 30 UI por animal; a coluna do centro mostra os histogramas para a dose de 90 UI por animal; e a coluna da direita mostra os histogramas para a dose de 270 UI por animal. Na primeira linha estão representados os histogramas obtidos após inoculação com material de referência e marcação com tampão 1XPBS; na segunda linha, após inoculação com material de referência e marcação com Retic-COUNT; na terceira linha, após inoculação com a amostra e marcação com tampão 1X PBS; e na quarta linha, após inoculação com amostra e marcação com Retic-COUNT. O percentual de células fluorescentes em relação ao total de células vermelhas é mostrado na área delimitada pelo cursor R2 de cada histograma.

A figura 4.2 apresenta histogramas de fluorescência x número de células representativos de amostras de sangue obtidas pela inoculação das três diferentes doses de amostra e material de referência, marcadas com Retic-COUNT ou tampão 1XPBS, utilizadas na avaliação da potência da alfaepoetina. Observa-se comportamentos semelhantes nos gráficos apresentados nas linhas 2 e 4. Os valores da contagem representados nestes histogramas mostram que as percentagens de reticulócitos no sangue dos animais que receberam material de referência e alfaepoetina são similares. Nesta figura é também possível observar uma maior concentração de reticulócitos mais imaturos que os mais maduros. Este fato é evidenciado pela maior altura do pico dos histogramas na região de maior fluorescência, indicando um maior teor de ácidos nucléicos e, conseqüentemente, reticulócitos menos maduros. Uma grande quantidade de reticulócitos imaturos no sangue periférico sugere uma alta taxa de liberação pela medula óssea e, assim, uma atividade eritropoiética elevada.

A figura 4.3 mostra um gráfico FSC x SSC representativo de uma amostra de sangue de um camundongo não inoculado com alfaepoetina humana recombinante. No *gate* R1 estão as células vermelhas. O quadro abaixo do gráfico apresenta a porcentagem de células vermelhas (R1) em relação ao total de células na amostra de sangue (90,39%).

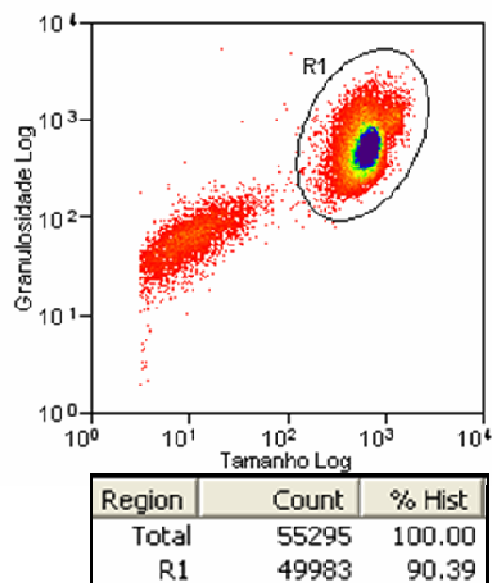


Figura 4.3 – Gráfico FSC x SSC representativo de uma amostra de sangue de camundongo não inoculado com alfaepoetina humana recombinante. As células vermelhas são separadas pelo *gate* R1. O quadro abaixo do gráfico apresenta a porcentagem de células vermelhas (R1) no total de eventos adquiridos.

A figura 4.4 apresenta o histograma de fluorescência x número de células representativo de amostra de sangue obtida de camundongo não inoculado com alfaepoetina humana recombinante. Observa-se que o percentual de células fluorescentes (3,14%), que representam os reticulócitos, é significativamente menor que os valores obtidos para as

amostras após inoculação de rhEPO. Isto demonstra que a amostra e o material de referência inoculados geraram aumento na produção de reticulócitos.

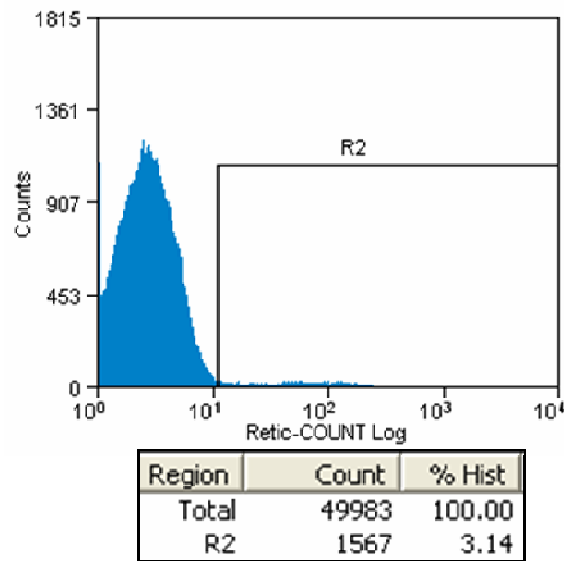


Figura 4.4 – Histograma de fluorescência x número de células representativas das amostras de sangue obtidas de camundongos não inoculados com rhEPO. O percentual de células fluorescentes, que representam os reticulócitos, é significativamente menor que os valores obtidos para as amostras de sangue provenientes de camundongos inoculados com rhEPO.

4.2- Validade estatística dos ensaios

A tabela 4.1, baseada na Farmacopéia Européia 6ª edição, representa os valores estatísticos considerados nos testes de regressão, paralelismo e linearidade para os resultados dos ensaios por citometria e microscopia. Os resultados de ambos os ensaios foram avaliados por esses testes para terem sua validade estatística comprovada antes da estimativa da potência da alfaepoetina nas amostras de sangue avaliadas.

Os resultados da potência dos vinte lotes de alfaepoetina avaliados pelos dois métodos foram considerados válidos segundo os critérios estatísticos descritos na tabela 4.1.

A figura 4.5 mostra um gráfico representativo da dose x percentual de reticulócitos com o material de referência e com uma amostra, avaliados por citometria de fluxo onde foram observados valores estatisticamente significativos para as análises de paralelismo, linearidade e regressão linear.

4.3- Resultados de potência

Todas as amostras avaliadas por citometria e por microscopia neste estudo obtiveram valores estatísticos válidos segundo os critérios estabelecidos para avaliação da potência da alfaepoetina. A tabela 4.2 apresenta os resultados de potência e os limites de confiança obtidos pela contagem de reticulócitos por citometria, bem como os anticoagulantes utilizados

em cada ensaio. Os valores estimados para a razão da potência nos vinte lotes de alfaepoetina variaram de 82 a 112%. Os limites de confiança inferior variaram de 64 a 88% e o superior de 104 a 156%. As médias dos resultados obtidos com os anticoagulantes EDTA e heparina sódica apresentaram desvio padrão de 2,92% e coeficiente de variação de 2,99% (tabela 4.3), não havendo diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$).

Tabela 4.1 – Exemplo dos resultados esperados para os testes de regressão, paralelismo e linearidade para os resultados da amostra e do material de referência obtidos por citometria ou microscopia. Para que o ensaio seja considerado válido, é necessário que os resultados obtidos para as amostras ou o material de referência por microscopia ou citometria de fluxo apresentem linearidade e paralelismo entre si.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Razão F	Probabilidade	Validade estatística
Preparos	1	0,816	0,816	---	---	---
Regressão linear	1	384,88	384,90	253,90	0,000	Válido* ¹
Não paralelismo	1	4,01	4,01	2,64	0,116	Válido* ²
Não linearidade	2	10,02	5,01	3,30	0,053	Válido* ³
Tratamentos	5	399,72	---	---	---	---
Blocos (camundongos)	5	2,61	0,523	0,345	0,881	---
Erro residual	25	37,90	1,516	---	---	---
Total	35	440,24	---	---	---	---

*¹ Termo de regressão linear significativa – probabilidade calculada menor que 0,05.

*² Termo para não paralelismo não significativa – probabilidade calculada maior ou igual a 0,05. Indica que as linhas do material de referência e da amostra são paralelas.

*³ Termo para não linearidade significativa – probabilidade calculada maior ou igual a 0,05. Indica que a relação entre os logaritmos da dose e da resposta pode ser representada por uma linha reta na faixa das doses utilizadas.

Os resultados obtidos por microscopia utilizando somente a heparina como anticoagulante foram similares aos valores de potência obtidos com a citometria. Os valores da razão da potência variaram de 80 a 117% e os valores dos limites de confiança inferior variaram entre 58 a 107% e o superior de 104 a 151% (tabela 4.4). Portanto, os resultados obtidos com a contagem de reticulócitos por citometria estão de acordo com os valores preconizados pela Farmacopéia Européia (2008), onde as especificações para a razão da potência e os limites de confiança superior e inferior são 80-125% e 64-156%, respectivamente. As médias dos resultados obtidos por citometria de fluxo e microscopia

apresentaram desvio padrão de 0,57% e coeficiente de variação de 0,59% (tabela 4.5), não havendo diferença estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$).

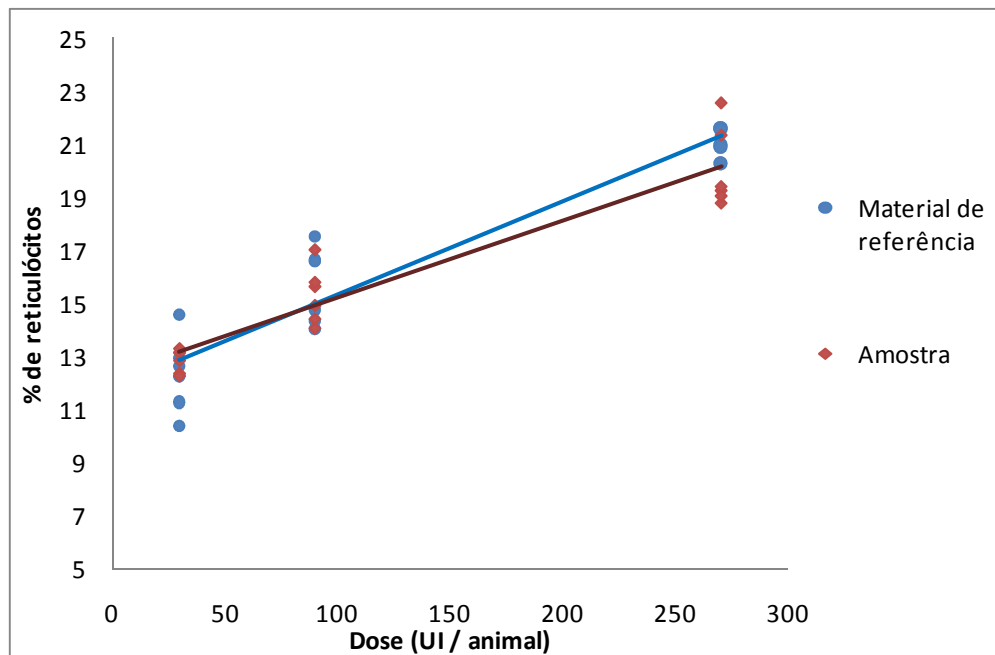


Figura 4.5 – Gráfico dose x resposta para amostra e material de referência, indicando que os resultados apresentam paralelismo, linearidade e regressão linear satisfatórios. Cada dose apresenta seis resultados para amostra e seis resultados para material de referência.

Tabela 4.2 – Resultados de potência e limites de confiança para os lotes de alfaepoetina testados por citometria e anticoagulantes utilizados.

Lote	Anticoagulante	Razão de potência (%)	Limites de confiança (%)	
			Inferior	Superior
1	Heparina	99	71	136
2	Heparina	112	85	149
3	EDTA	103	69	156
4	EDTA	106	88	127
5	EDTA	91	65	128
6	EDTA	103	71	152
7	EDTA	106	73	155
8	Heparina	96	75	123
9	EDTA	90	66	122
10	EDTA	93	64	135
11	EDTA	89	66	119
12	EDTA	99	65	151
13	EDTA	100	64	155
14	EDTA	82	64	104
15	EDTA	89	67	118
16	EDTA	100	70	142
17	EDTA	95	68	132
18	EDTA	92	64	130
19	Heparina	91	72	115
20	EDTA	88	65	118

Tabela 4.3 – Comparação entre as médias dos resultados obtidos com heparina e EDTA. Foram obtidos, no total, 4 resultados com heparina e 16 resultados com EDTA. Os valores apresentados nesta tabela são as médias dos resultados.

	Heparina	EDTA
Média dos resultados (%)	99,50	95,38
Média das médias (%)	97,44	
Desvio padrão (%)	2,92	
Coefficiente de variação (%)	2,99	

Tabela 4.4 – Resultados de potência e limites de confiança para os lotes de alfaepoetina testados por microscopia. Neste caso, foi utilizada somente a heparina como anticoagulante.

Lote	Razão de potência (%)	Limites de confiança (%)	
		Inferior	Superior
1	92	74	115
2	97	77	123
3	117	91	151
4	103	107	137
5	95	74	122
6	102	77	135
7	109	89	133
8	95	76	118
9	97	102	130
10	100	81	123
11	99	81	121
12	96	80	115
13	94	70	126
14	92	70	129
15	80	58	109
16	88	68	111
17	95	85	106
18	100	87	115
19	105	92	121
20	84	68	104

Tabela 4.5 – Comparação entre as médias dos resultados obtidos por citometria de fluxo e microscopia.

	Citometria	Microscopia
Média dos resultados (%)	96,20	97,00
Média das médias (%)	96,60	
Desvio padrão (%)	0,57	
Coefficiente de variação (%)	0,59	

4.4- Análise de concordância entre os métodos de citometria e microscopia

Os resultados obtidos por microscopia e citometria foram comparados pelo teste estatístico de Bland-Altman para avaliar a concordância entre os dois métodos. Os valores desta análise estão apresentados na tabela 4.6, contendo a média e a diferença entre cada par de resultados de citometria e microscopia, a média (M) das diferenças entre cada par de resultados, o desvio padrão (S) das diferenças entre os resultados e a média entre os resultados mais ou menos 1,96 vezes o desvio padrão das diferenças entre os resultados ($M \pm 1,96S$). O cálculo de $M \pm 1,96S$ representa os limites de concordância, dentro dos quais os pontos de um gráfico da média de cada par de resultados de citometria e microscopia pela diferença entre estes valores devem estar contidos para que os resultados dos dois métodos de contagem de reticulócitos sejam concordantes entre si.

Tabela 4.6 – Análise de Bland-Altman para comparação entre os métodos de citometria e microscopia. M = média das diferenças entre os resultados. S = desvio padrão das diferenças entre os resultados.

Lote	Resultado citometria	Resultado microscopia	Média dos resultados	Diferença entre os resultados	M	S	$M \pm 1,96S$
1	99	92	95,5	-7	1,2	8,34	17,54 -15,14
2	112	97	104,5	-15			
3	103	117	110	14			
4	106	103	104,5	-3			
5	91	95	93	4			
6	103	102	102,5	-1			
7	106	109	107,5	3			
8	96	95	95,5	-1			
9	90	97	93,5	7			
10	93	100	96,5	7			
11	89	99	94	10			
12	99	96	97,5	-3			
13	100	94	97	-6			
14	82	92	87	10			
15	89	80	84,5	-9			
16	100	88	94	-12			
17	95	95	95	0			
18	92	100	96	8			
19	91	105	98	14			
20	88	84	86	4			

A figura 4.6 apresenta a distribuição dos valores da média e da diferença entre cada par de resultados de potência obtidos pela contagem de reticulócitos por citometria e microscopia. Os resultados mostrados no gráfico de dispersão de Bland-Altman estão dentro dos limites superior e inferior de concordância (LSC e LIC, respectivamente). Este gráfico também mostra o viés, que indica o quanto as diferenças se afastam do valor zero, e o erro, que representa a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média, além de possíveis valores fora da linha de dispersão (*outliers*).

O resultado da análise estatística pelo teste de Bland-Altman demonstrou que os resultados obtidos pelos métodos de contagem por citometria e microscopia apresentam concordância satisfatória, indicando que podem ser utilizados um em substituição ao outro.

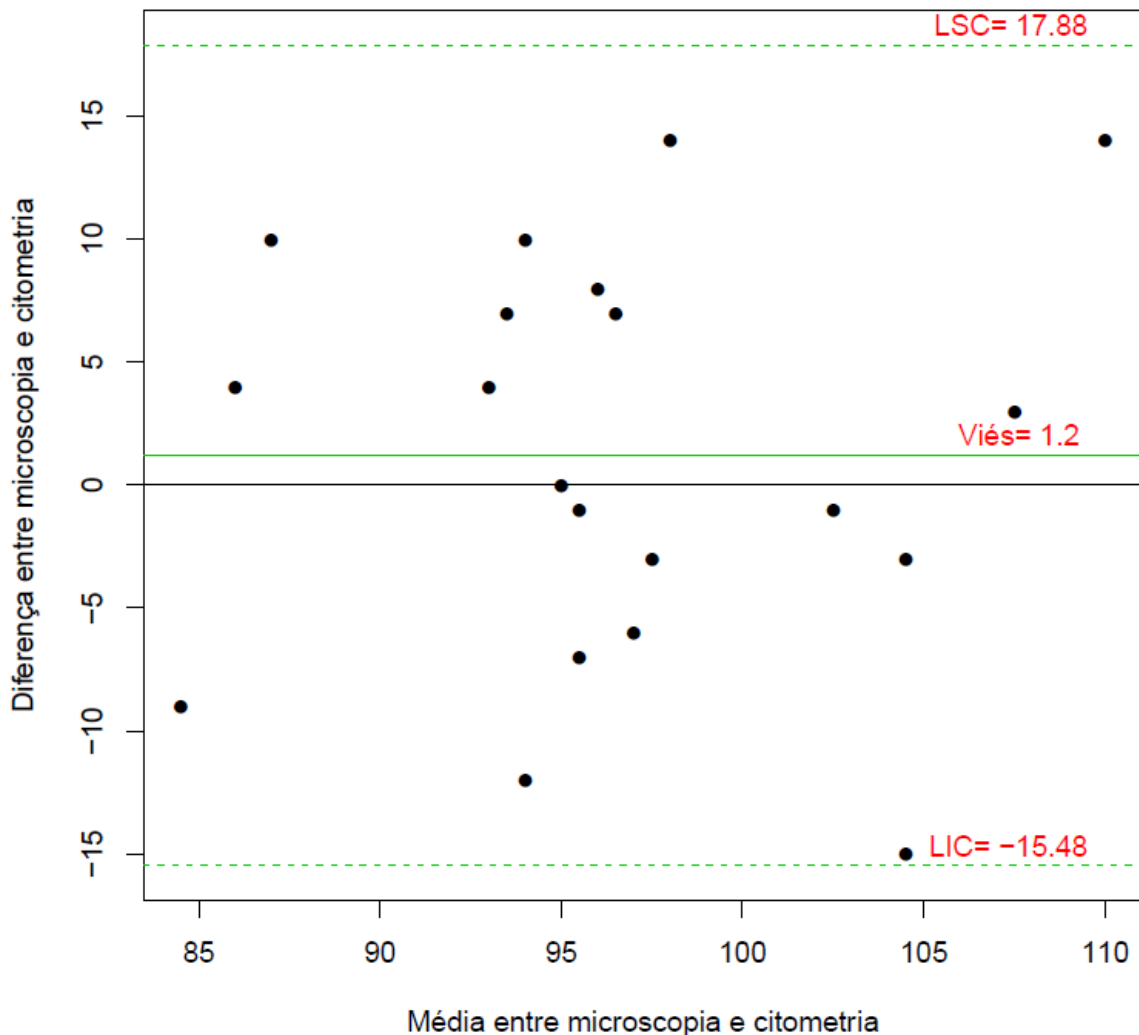


Figura 4.6 – Gráfico de Bland-Altman para os resultados obtidos pela contagem por citometria e microscopia, mostrando o LSC, o LIC e o viés.

Tabela 4.7- Variação intra-analista para a contagem de reticulócitos por citometria de fluxo. Resultados obtidos por um mesmo analista em seis preparos diferentes de um mesmo lote, com seis resultados por preparo em cada dose, num total de 36 resultados por dose.

	Dose		
	30 UI/animal	90 UI/animal	270 UI/animal
Contagem de reticulócitos (%)	12,34	14,07	17,80
	9,12	12,89	16,48
	13,05	15,44	16,36
	11,63	15,59	20,78
	11,94	16,42	17,57
	10,95	14,41	17,41
	10,47	16,02	19,40
	11,12	12,82	16,63
	9,69	12,69	17,51
	13,64	12,45	17,17
	10,62	15,25	19,63
	11,80	15,41	15,14
	12,04	15,19	21,35
	13,43	14,83	21,44
	12,02	15,89	20,57
	11,25	16,53	19,80
	11,80	14,89	19,81
	11,92	16,72	20,02
	10,53	14,47	22,83
	9,86	14,45	20,60
	11,71	13,74	18,37
	11,53	14,30	21,46
	13,58	14,94	24,33
	13,06	17,15	20,85
	15,02	18,43	22,38
	14,87	19,28	23,34
	15,49	19,21	20,29
	15,88	18,62	22,04
	15,62	17,02	23,25
	14,77	19,27	19,44
	12,84	15,52	21,23
	12,10	15,50	19,06
	12,01	15,36	20,60
	13,42	18,54	20,11
	12,55	16,87	22,68
	13,55	16,27	18,90
Média (%)	12,42	15,73	19,91
Desvio-padrão (%)	1,70	1,86	2,22
Coefficiente de variação (%)	13,71	11,85	11,17

4.5- Variação intra-analista e inter-analistas para a contagem de reticulócitos por citometria de fluxo

Para o teste de repetitividade do método, os resultados para a contagem de reticulócitos em preparos diferentes de um mesmo lote apresentaram variação intra-analista de 13,71% para a dose de 30 UI/animal, 11,85% para a dose de 90 UI/animal e 11,17% para a dose de 270 UI/animal, conforme apresentado na tabela 4.7.

Os resultados para a contagem de reticulócitos em preparos diferentes de um mesmo lote apresentaram variação inter-analistas de 11,24% para a dose de 30 UI/animal, 10,68% para a dose de 90 UI/animal e 9,15% para a dose de 270 UI/animal, conforme apresentado na tabela 4.8.

Tabela 4.8- Variação inter-analistas para a contagem de reticulócitos por citometria de fluxo. Resultados obtidos por três analistas em três preparos diferentes de um mesmo lote, com seis resultados por preparo em cada dose, num total de 18 resultados por dose.

	Dose		
	30 UI/animal	90 UI/animal	270 UI/animal
Contagem de reticulócitos (%)	12,21	15,62	20,83
	11,75	14,69	19,59
	12,33	15,39	18,95
	12,89	16,01	20,23
	12,69	15,90	21,21
	12,68	16,54	18,63
	15,41	18,52	22,88
	15,83	19,21	20,95
	16,10	20,77	23,59
	14,55	17,04	24,53
	16,63	17,86	21,66
	15,04	18,05	24,21
	12,39	17,04	19,26
	13,17	14,95	21,34
	13,19	15,66	19,41
	12,30	15,82	22,55
	13,33	14,09	18,79
	12,88	14,44	19,06
Média (%)	13,63	16,55	20,98
Desvio-padrão (%)	1,53	1,77	1,92
Coefficiente de variação (%)	11,24	10,68	9,15

4.6- Repetitividade dos resultados de potência obtidos pela contagem de reticulócitos por citometria

A repetitividade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo considerando-se o mesmo analista e a mesma instrumentação. A repetitividade do método de citometria de fluxo para contagem de reticulócitos e determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante foi avaliada pelo coeficiente de variação entre os resultados de seis determinações de potência executadas pelo mesmo analista em um mesmo lote de amostra. O coeficiente de variação calculado para os seis resultados foi 5,59%, atendendo ao critério de aceitação ($CV < 15\%$) (tabela 4.9).

Tabela 4.9 – Repetitividade entre os resultados de um mesmo analista para a determinação de potência da alfaepoetina humana recombinante pela contagem de reticulócitos por citometria de fluxo.

Resultados (%)	
99	
97	
100	
86	
99	
100	
Média (%)	96,83
Desvio padrão (%)	5,42
Coefficiente de variação (%)	5,59

4.7- Precisão intermediária dos resultados de potência obtidos pela contagem de reticulócitos por citometria

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, obtidos em dias diferentes, por analistas diferentes. A precisão intermediária do método de citometria de fluxo para contagem de reticulócitos e determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante foi avaliada pelo coeficiente de variação entre os resultados de potência de um mesmo lote, obtido por três analistas diferentes em dias distintos. O valor considerado para o analista A é a média dos seis resultados utilizados para a avaliação da repetitividade do método. O coeficiente de variação calculado para os três resultados foi 3,73 %, mostrando grau de precisão adequado ($CV < 15\%$) (tabela 4.10).

Tabela 4.10 – Precisão intermediária para os resultados de três analistas, em dias diferentes, para a determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante pela contagem de reticulócitos por citometria de fluxo.

Analista	Resultados (%)
A	96,83
B	92
C	99
Média (%)	95,94
Desvio padrão (%)	3,58
Coefficiente de variação (%)	3,73

5 – DISCUSSÃO

5.1- A citometria de fluxo para a contagem de reticulócitos

A contagem de reticulócitos é essencial à avaliação da atividade eritropoiética da medula óssea e, conseqüentemente, à determinação da atividade biológica da alfaepoetina humana recombinante. Assim, é importante que os resultados obtidos pelo método utilizado para a contagem de reticulócitos apresentem precisão, exatidão e sensibilidade satisfatórias.

A microscopia ótica aliada ao uso de corantes supravitais como o novo azul de metileno é ainda o método mais utilizado para a contagem de reticulócitos em razão do baixo custo instrumental em relação aos métodos automatizados, em uso desde 1990 (Riley et al. 2001, Riley et al. 2002, Pereira et al. 2008, Simionatto et al. 2009). Entretanto, este método é subjetivo e está sujeito a vários fatores que aumentam a variabilidade dos resultados. A variação inter-analista pode alcançar 50% (Corberand 1997, Yu et al. 1999), – o que requer atenção especial aos critérios de diferenciação e identificação dos reticulócitos, ao preparo e à distribuição dos reticulócitos nos esfregaços, e à qualidade da marcação, – reforçando, assim, a necessidade de analistas muito bem treinados. Apesar de ser um método bem menos sujeito a variações do que a contagem de reticulócitos por microscopia, com a citometria de fluxo também podem ser esperadas pequenas variações na porcentagem de reticulócitos, assim como em sua contagem absoluta, sendo estas causadas principalmente por diferenças na atividade eritropoiética e na taxa de maturação de reticulócitos entre os indivíduos ou animais utilizados. Além disso, a concentração de reticulócitos na amostra de sangue pode apresentar pequena variação ao longo do tempo devido ao seu processo de maturação *ex vivo*, dependente do tempo e da temperatura (Bowen et al. 1991, Rudensky 1997, Lopes 2004).

As contagens de reticulócitos por citometria de fluxo, para preparos diferentes do mesmo lote, realizadas neste trabalho, apresentaram variações inter-analista de 11,24%, 10,68% e 9,15% para as doses de 30, 90 e 270 UI/animal, respectivamente, como mostra a tabela 4.8. Estes dados são consideravelmente menores que os valores de variação inter-analista que a contagem por microscopia ótica pode alcançar e devem-se, principalmente, a preparos diferentes e ao fato de o sangue ter sido obtido de camundongos distintos.

O pequeno número de células contado pela microscopia e a variabilidade inter e intra-analista reduzem bastante a exatidão, a precisão e a reprodutibilidade do método, além do fato

de a contagem por microscopia não apresentar sensibilidade suficiente para detectar pequenas mudanças na concentração de reticulócitos (Lee et al. 1986, Ferguson et al. 1990, Nobes e Carter 1990, Bowen et al. 1991, Rowan 1991, Hansson et al. 1992, Evans e Fagg 1994, Corberand 1997, Rudensky 1997, Yu et al. 1999, Preložnik-Zupan et al. 2000, Buttarello et al. 2001, Riley et al. 2001, Riley et al. 2002, Weiss 2002, NCCLS 2004, Witt et al. 2007, Pereira et al. 2008, Simionatto et al. 2009). A contagem de reticulócitos por citometria de fluxo apresenta precisão e sensibilidade superiores à contagem por microscopia, permitindo resultados com maior confiabilidade. A contagem automatizada praticamente elimina o erro inter-analista, reduz o coeficiente de variação ao contar um número muito maior de células e é de rápida e simples execução, com alto rendimento (Tanke et al. 1983, Lee et al. 1986, Ferguson et al. 1990, Nobes e Carter 1990, Bowen et al. 1991, Rowan 1991, Hansson et al. 1992, Davis et al. 1995, Corberand 1997, Rudensky 1997, England et al. 1998, Yu et al. 1999, Buttarello et al. 2001, Riley et al. 2001, Riley et al. 2002, Weiss 2002, NCCLS 2004, Witt et al. 2007, Pereira et al. 2008, Simionatto et al. 2009). As análises por citometria de fluxo para esta dissertação foram realizadas pela contagem de aproximadamente 50.000 células, fato que, aliado à alta sensibilidade do sistema de detecção do equipamento e ao uso dos parâmetros de tamanho, granulosidade e fluorescência para discriminação entre os tipos de células (figuras 4.1 e 4.2), possibilita a obtenção de resultados mais exatos, precisos e reprodutíveis.

Além da variabilidade dos resultados, o tempo necessário ao preparo das amostras e à contagem de reticulócitos por microscopia é bastante longo, causando desgaste ao analista e dificultando o cumprimento de demandas por análise de um maior número de amostras (Nobes e Carter 1990, Rowan 1991, Corberand 1997, Rudensky 1997, Yu et al. 1999, Buttarello et al. 2001, Pereira et al. 2008). As determinações de potência da alfaepoetina humana recombinante por citometria de fluxo realizadas neste trabalho foram obtidas em tempo bastante reduzido, no que diz respeito ao preparo e análise das amostras de um lote, quando comparado ao tempo gasto para as mesmas etapas por microscopia ótica. O acréscimo de lotes ao ensaio aumenta muito pouco o tempo total de análise e permite que apenas um analista realize todos os procedimentos. Para a análise de um lote, incluindo o preparo das amostras e a contagem de reticulócitos, foram necessárias três horas e meia, em média, para a citometria de fluxo, enquanto para a microscopia foi necessário um dia de trabalho. O acréscimo de lotes requer a mobilização de mais analistas para o processo de contagem por microscopia ótica.

Ainda que o custo instrumental da citometria de fluxo para a contagem de reticulócitos seja maior (Simionatto et al. 2009), a redução considerável no tempo de análise, a necessidade

de menos analistas e a maior exatidão e precisão do método são compensatórios (Ferguson et al. 1990, Rowan 1991, Hansson et al. 1992, Yu et al. 1999, Riley et al. 2001, Riley et al. 2002). Com o aumento da demanda da alfaetopetina humana recombinante pelo Ministério da Saúde e a previsão de crescimento da produção deste biofármaco por Bio-Manguinhos, a redução no tempo de análise permitirá maior rapidez na liberação de lotes pelo teste de potência, ao mesmo tempo em que a maior exatidão e precisão do método contribuirão para resultados mais confiáveis.

Estudos de equivalência entre os métodos vêm sendo realizados desde o advento da citometria como ferramenta para contagem de reticulócitos, com o intuito de se empregar uma análise que forneça resultados mais precisos, exatos e confiáveis, além de um rendimento bastante superior. Estes estudos têm demonstrado resultados com boa equivalência entre os métodos, apesar das diferenças quanto à precisão, à exatidão e à reprodutibilidade (Tanke et al. 1983, Ferguson et al. 1990, Kienast e Schmitz 1990, Nobes e Carter 1990, Hansson et al. 1992, Davis et al. 1994, Evans e Fagg 1994, Corberand 1997, Rudensky 1997, Yu et al. 1999, Preložnik-Zupan et al. 2000, Buttarello et al. 2001, Weiss 2002). Devido à falta de um método referência universalmente aceito para a contagem de reticulócitos, a microscopia é utilizada como o método de comparação para novas técnicas (Lee et al. 1986, Buttarello et al. 2001, NCCLS 2004). A microscopia para contagem de reticulócitos é também recomendada pelo Conselho Internacional para Padronização em Hematologia (*International Council for Standardisation in Haematology – ICSH*) como método de comparação para avaliação de métodos automatizados, portanto, esta técnica permanece como método padrão, contra o qual os novos testes devem ser comparados (England et al. 1998, Buttarello et al. 2001).

Assim, tal como proposto neste trabalho, antes da substituição do método de microscopia, que já se encontra estabelecido, é necessário avaliar a concordância e a comparabilidade entre os métodos e validar o novo ensaio para uso na rotina.

5.2- Uso de EDTA e heparina como anticoagulante

Embora as instruções do corante Retic-COUNT (BD Biosciences) recomendem o uso de EDTA como anticoagulante, dados da literatura mostram o uso da heparina sem prejuízos à contagem de reticulócitos por citometria de fluxo (Kawamura et al. 1991, Weiss 2002, Torous et al. 2003, Nakage et al. 2005, Witt et al. 2008, Costa et al. 2010). Considerando que o próprio fabricante do corante Retic-COUNT não possui estudos que desaconselhem o uso da heparina como anticoagulante, além do fato de ser este o anticoagulante utilizado no método de contagem de reticulócitos por microscopia validado para uso na rotina da SEBIO, alguns dos experimentos deste estudo foram realizados com heparina. A escolha dos lotes e do

número de vezes em que a heparina foi utilizada não seguiu nenhum critério pré-estabelecido, tendo dependido somente da disponibilidade ou não de EDTA no dia da contagem.

Como não houve comparação entre os resultados obtidos com EDTA e heparina para um mesmo lote, não se pode afirmar que não há diferenças entre o uso dos dois anticoagulantes. Entretanto, os resultados obtidos com ambos apresentaram validade estatística no que diz respeito à precisão, ao paralelismo e à linearidade, estando todos localizados dentro das especificações de razão de potência e de limites de confiança. Além disso, o uso de EDTA ou heparina não interferiu na concordância entre os resultados de citometria de fluxo e microscopia (tabelas 4.2, 4.4 e 4.6), podendo-se supor que, em princípio, a utilização de um ou outro anticoagulante não é determinante no resultado final. Ainda assim, testes com os mesmos lotes de amostra e um maior número de repetições são necessários para confirmar essa hipótese.

5.3- Comportamento das amostras e material de referência

Pelo método de citometria de fluxo, amostras e material de referência certificado comportaram-se de forma semelhante, gerando contagens de reticulócitos próximas para cada dose e respostas lineares e paralelas, como mostram a tabela 4.1 e a figura 4.3. Estes resultados, além de serem um indicativo da qualidade da amostra, permitem o cálculo da potência desta com base na potência do material de referência.

5.4- Comparação e avaliação da concordância entre os métodos de citometria de fluxo e microscopia

A comparabilidade é a habilidade de um equipamento gerar resultados que concordam satisfatoriamente com os obtidos pelo procedimento de rotina (NCCLS 2004). Na comparação de um novo método de análise com um já estabelecido, é necessário avaliar se seus resultados são concordantes o suficiente para que o novo método substitua o antigo (Bland e Altman 1986).

O método de Bland-Altman foi a ferramenta escolhida para se comparar as técnicas de citometria de fluxo e microscopia e se avaliar se estes apresentam resultados concordantes, possibilitando a substituição da microscopia pela citometria de fluxo.

A maioria dos estudos de comparação entre dois ou mais métodos utiliza o coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman para avaliação de sua concordância. Entretanto, o coeficiente de correlação não avalia concordância, e sim associação. Um alto coeficiente de correlação não garante que dois métodos sejam concordantes. Por ser uma medida de

associação, o coeficiente de correlação não é apropriado para avaliar a concordância entre dois métodos (Bland e Altman 1986, Carstensen et al. 2008, Hirakata e Camey 2009).

É muito difícil que diferentes métodos concordem exatamente, resultando em valores idênticos. Portanto, deve-se avaliar o quanto os resultados do novo método se diferenciam dos resultados do método já estabelecido: se a diferença estiver dentro dos limites aceitáveis determinados por ferramentas estatísticas adequadas, como por exemplo os limites de concordância de Bland-Altman, pode-se substituir o método antigo pelo novo ou usar os dois em intercâmbio.

Para avaliação da concordância entre os resultados de dois diferentes métodos, um gráfico da diferença entre um par de resultados pela sua média é bastante informativo. Como não se sabe o valor verdadeiro, a média das duas medidas é a melhor estimativa disponível. As diferenças entre cada par de resultados devem estar dentro dos limites de concordância do gráfico, calculados pela média mais ou menos o desvio padrão, para que os métodos sejam considerados concordantes.

Todos os resultados obtidos pelo método de Bland-Altman para a comparação dos resultados de citometria de fluxo e microscopia ótica localizaram-se dentro dos limites de concordância calculados, demonstrando que os dois métodos geram resultados concordantes para a potência da alfaepoetina humana recombinante (tabela 4.6, figura 4.4).

5.5- Testes para validação do novo método

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (Brasil, Anvisa 2003). Quando ocorrem modificações no método bioanalítico já validado, como por exemplo, substituição do sistema de detecção, mudança em algum procedimento de preparo da amostra, alterações na faixa de concentração, ou modificação do anticoagulante utilizado, devem ser realizadas validações parciais para garantir sua adequabilidade após as modificações.

Neste caso, foram alterados o sistema de detecção, algumas etapas no preparo das amostras e o anticoagulante. Assim, para validação parcial do método, foram realizados os testes de precisão, divididos em repetitividade e precisão intermediária. A precisão pode ser expressa como coeficiente de variação, não se admitindo valores superiores a 15% (Brasil 2003). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo (tabelas 4.9 e 4.10), os coeficientes de variação de 5,59% e 3,73% para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente, indicam que o método de contagem de reticulócitos por citometria de fluxo

apresenta repetitividade e precisão intermediária satisfatórias para uso na rotina da Seção de Controle Biológico e pode ser validado.

Considerando-se que métodos bioanalíticos normalmente apresentam coeficientes de variação de até 15%, a precisão intermediária de 3,73% obtida pelos resultados de potência de diferentes analistas sugere que a citometria de fluxo é responsável pela diminuição das variações entre os resultados.

6 – CONCLUSÕES

- A citometria de fluxo mostrou-se uma técnica adequada para identificação e quantificação de reticulócitos. Os resultados obtidos para amostras e material de referência apresentaram resultados semelhantes para cada dose, além de linearidade e paralelismo satisfatórios.
- As doses de amostra e material de referência inoculadas nos camundongos, com sequencia geométrica de base 3, ao gerarem contagens de reticulócitos lineares e paralelas, mostraram-se apropriadas para uso na rotina.
- Os resultados de potência gerados por citometria de fluxo atenderam às especificações da Farmacopéia Européia 6ª edição (2008), estando todos entre 80 e 125%, com limites de confiança entre 64 e 156%.
- Os resultados obtidos com o uso de EDTA ou heparina como anticoagulante não apresentaram diferenças significativas entre si.
- A ferramenta estatística de Bland-Altman mostrou que os resultados dos métodos de citometria de fluxo e microscopia ótica localizam-se dentro dos limites de concordância calculados, demonstrando que os dois métodos são estatisticamente concordantes para a potência da alfaepoetina humana recombinante. Desta forma, conclui-se que o método de citometria de fluxo pode ser usado em substituição à microscopia no ensaio de determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante.
- A utilização do método de citometria de fluxo para contagem de reticulócitos apresentou melhorias ao ensaio de determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante, tais como drástica redução do tempo de contagem de reticulócitos e de preparo das amostras, necessidade de menor número de analistas envolvidos com o ensaio, e resultados mais confiáveis, originados de um método automatizado e não sujeito aos resultados subjetivos de identificação e contagem pelo olho humano.

- Para a validação parcial do método de citometria de fluxo foram avaliados a repetitividade e a precisão intermediária, obtendo-se coeficientes de variação de 5,59% e 3,73%, respectivamente. Estes resultados atendem as exigências da Resolução (RE) nº 899 de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que estabelece o limite máximo de 15% para o coeficiente de variação da repetitividade e da precisão intermediária de métodos bioanalíticos.

- O estudo de comparação dos métodos e os testes de repetitividade e precisão intermediária realizados indicam que o método de citometria de fluxo para a contagem de reticulócitos pode substituir o método por microscopia tradicional e está apto para validação e uso na rotina de controle de qualidade da alfaepoetina humana recombinante produzida por Bio-Manguinhos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar IFVP, Krebs VLJ, Vaz FAC. **Utilização clínica da eritropoetina recombinante humana em pediatria.** Sinopse de Pediatria 2003; 9(3): 63-66.

Akihiko Y, Arai K. **The erythropoietin receptor and signal transduction.** Oncologist 1996; 1: 337-339.

Asanuma M, Seino K, Mizuno T, Nasu F, Yamauchi F, Fujishima M. **Plasma thrombopoietin level and platelet indices in hemodialysis patients receiving recombinant human erythropoietin.** International Journal of Laboratory Hematology 2010; 32: 312-319.

Bacal NS, Faulhaber MHW. **Aplicação prática em citometria de fluxo.** Rio de Janeiro: Atheneu; 2003.

Bain J. **The many faces of testosterone.** Clinical Interventions in Aging 2007; 2(4): 567-576.

Becton Dickinson Biosciences (Estados Unidos). **Technical data sheet. Retic-COUNT (Thiazole Orange) Reagent for in vitro diagnostic use.** San Jose, California: BD; 2000.

Bland JM. **Measuring agreement between measurements.** [online] Trabalho apresentado no Centro para Estatística em medicina; 2005 [capturado 8 dez 2010]; Oxford. Disponível em: <http://www-users.york.ac.uk/~mb55/talks/oxtalk.htm>

Bland JM, Altman DG. **Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.** Lancet 1986; i: 307-310.

Bowen D, Bentley N, Hoy T, Cavill I. **Comparison of a modified thiazole orange technique with a fully automated analyzer for reticulocyte counting.** J Clin Pathol 1991; 44: 130-133.

Brasil. Instrução de Trabalho (IT) número 0919 – SEBIO / Bio-Manguinhos / Fiocruz. **Teste para a determinação da potência de alfaepoetina pelo método de camundongos normocitêmicos.** Aprovado em agosto/2009.

..... Instrução de Trabalho (IT) número 4642 – LATED / Bio-Manguinhos / Fiocruz. **Operação e limpeza do citômetro de fluxo FACSCalibur Marca: Becton & Dickinson Modelo: FACSCalibur com loader 4 cores.** Aprovado em abril/2010.

..... Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Publica o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Revoga a resolução RE n° 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 2 jun 2003.

Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Agência Fiocruz de Notícias [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2007. [capturado 15 jan. 2011] Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1084&sid=9>

..... Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS n°226, de 10 de maio de 2010. **Protocolos e diretrizes terapêuticas – Anemia em pacientes com insuficiência renal crônica – alfaepoetina.** (Retificada em 27.8.2010)

Brun A, Gaudernack G, Sandberg S. **A new method for isolation of reticulocytes: positive selection of human reticulocytes by immunomagnetic separation.** Blood 1990; 76(11): 2397-2403.

Bryl E, Mysliwska J, Debska-Slizien A, Rachon D, Bullo B, Lizakowski S, et al. **The influence of recombinant human erythropoietin on tumor necrosis factor α and Interleukin-10 production by whole blood cell cultures in hemodialysis patients.** Artificial Organs 1998; 22(3): 177-181.

Bryl E, Myliwska J, Debska-Slizien A, Trzonkowski P, Rachon D, Bullo B, et al. **Recombinant human erythropoietin stimulates production of interleukin 2 by whole blood cell cultures of hemodialysis patients.** Artificial Organs 1999; 23(9): 809-816.

Butarello M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Trabuo E, et al. **Flow cytometric reticulocyte counting – parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach.** Am J Clin Pathol 2001; 115: 100-111.

Cançado RD. **Mieloma múltiplo e anemia.** Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2007; 29(1): 67-76.

Carstensen B, Simpson J, Gurrin L. **Statistical models for assessing agreement in method comparison studies with replicate measurements.** The International Journal of Biostatistics 2008; 4(1): article 16.

Cavill I. **Quantitative reticulocyte counting: clinical applications.** Pure & Appl. Chem 1996; 68(10): 1903-1905.

Cheetham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, Syed RS, et al. **NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation.** Nature Structural Biology 1998; 5(10): 861-866.

Choi D, Kim M, Park J. **Erythropoietin: physico- and biochemical analysis.** Journal of Chromatography B 1996; 687: 189-199.

Constantinescu SN, Ghaffari S, Lodish HF. **The erythropoietin receptor: structure, activation, and intracellular signal transduction.** TEM 1999; 10(1): 18-23.

Corberand JX. **Reticulocyte analysis using flow cytometry.** Hematology and Cell Therapy 1997; 38(6): 487-494.

Costa RN, Abreu CLC, Nascimento MC, Nogueira ACMA, Delgado IF. **Evaluation of the applicability of Swiss Webster lineage on the biological potency test of recombinant human erythropoietin.** International Journal of Biosafety and Biosecurity 2010; 1(1): 48-59.

Coviello AD, Kaplan B, Lakshman KM, Chen T, Singh AB, Bhasin S. **Effects of graded doses of testosterone on erythropoiesis in healthy young and older men.** J Clin Endocrinol Metab 2008; 93(3): 914-919.

Craig FE, Foon KA. **Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms.** Blood 2008; 111(8):3941-67.

Davis BH, Bigelow NC, Koepke JA, Borowitz MJ, Houwen B, Jacobberger JW, et al. **Flow cytometric reticulocyte analysis. Multiinstitutional interlaboratory correlation study.** Am J Clin Pathol. 1994; 102(4): 468-477.

Davis BH, Ornvold K, Bigelow NC. **Flow cytometric reticulocyte maturity index: a useful laboratory parameter of erythropoietic activity in anemia.** Cytometry 1995; 22: 35-39.

Delanghe JR, Bollen M, Beullens M. **Testing for recombinant erythropoietin.** Am. J. Hematol. 2008; 83: 237-241.

Dewitte K, Fierens C, Stöckl D, Thienpont LM. **Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice.** Clinical Chemistry 2002; 48(5): 799-801. (Letter)

Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. **Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology.** Cytometry B Clin Cytom 2008; 74(4):201-10.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembrowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, et al.. **Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial.** Mol Med 2002; 8: 495-505.

England JM, Rowan RM, van Assendelft, Bull BS, Coulter WH, Fujimoto K, et al. **Proposed reference method for reticulocyte counting based on the determination of the reticulocyte to red cell ratio.** Clin. Lab. Haem. 1998; 20:77-99.

Evans GO, Fagg R. **Reticulocyte Counts in Canine and Rat Blood made by Flow Cytometry.** J Comp Path, 1994, 111: 107-111.

Farmacopéia Européia. **Erythropoietin concentrated solution;** Monograph 1316, 6 ed., vol.1, Council of Europe; Strasbourg, France, 2008.

..... **General Texts – Statistical analysis of results of biological assays and tests.** 6 ed., vol.1, Council of Europe; Strasbourg, France, 2008.

Ferguson DJ, Lee SF, Gordon PA. **Evaluation of reticulocyte counts by flow cytometry in a routine laboratory.** American Journal of Hematology 1990; 33: 13-17.

Ferretto RM. **Avaliação de eritropoetina humana recombinante por métodos cromatográficos validados e correlação com o bioensaio.** Santa Maria; 2009. Mestrado [Dissertação em Ciências Farmacêuticas] – Universidade Federal de Santa Maria.

Ferrucci L, Maggio M, Bandinelli S, Basaria S, Lauretani F, Ble A et al. **Low testosterone levels and the risk of anemia in older men and women.** Arch Intern Med 2006; 166: 1380-1388.

Fisher JW. **Minireview - Erythropoietin: physiology and pharmacology update.** Society for Experimental Biology and Medicine 2003; 1-14.

Hammerling U, Kroon R, Wilhelmsen T, Sjödin. **In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity.** J. Pharm. Biomed. Anal. 1996; 14: 1455-1469.

Hansson GK, Andersson M, Jarl H, Stemme S. **Flow cytometric analysis of reticulocytes using an RNA-binding fluorochrome.** Scand J Clin Lab Invest 1992; 52: 35-41.

Hirakata VN, Camey SA. **Análise de concordância entre métodos de Bland-Altman.** Rev HCPA 2009; 29(3):261-268.

Imagawa S, Izumi T, Miura Y. **Positive and negative regulation of the erythropoietin gene.** J Bio Chem 1994; 269: 9038-9044.

Imagawa S, Yamamoto M, Miura Y. **Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors.** Blood 1997; 89: 1430-1439.

Invitrogen Tutorials. **Introduction to flow cytometry** [online]. Califórnia, Estados Unidos; 2011. [capturado 14 fev. 2011] Disponível em:
http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html

Jelkmann W. **Molecular biology of erythropoietin.** Internal Medicine 2004; 43(8): 649-659.

Kaempfer ROR, Rosenthal A, Manor D, Marsh S, inventores; Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem, depositante. **In-vitro bioassay of erythropoietin.** IL patente 0183404 A2. 4 junho 1986.

Kato S, Amano H, Ito Y, Eshima K, Aoyama N, Tamaki H, et al. **Effect of erythropoietin on angiogenesis with the increased adhesion of platelets to the microvessels in the Hind-Limb ischemia model of mice.** Journal of Pharmacological Sciences 2010; 112: 167-175.

Kawamura A, Imai N, Kawaguchi T, Hayakawa T. **Simple in vivo bioassay for erythropoietin.** British Journal of Haematology 1991; 77: 424-430.

Kienast J, Schmitz G. **Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders.** Blood 1990; 75(1): 116-121.

Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Masuda S, Sasaki R, Mihawa H. **Human recombinant erythropoietin directly stimulates B cell immunoglobulin production and proliferation in serum-free medium.** Clin Exp Immunol 1991; 85: 151-156.

Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ. **New insights into erythropoiesis.** Opin Hematol 2002; 9: 93-100.

Krantz SB. **Erythropoietin.** Blood 1991; 77(3): 419-434.

Lacombe C, Mayeux P. **Biology of erythropoietin.** Haematologica 1998; 83: 724-732.

Lacombe C, Mayeux P. **The molecular biology of erythropoietin.** Nephrol Dial Transplant 1999; 14(2): 22-28.

Lappin T. **The cellular biology of erythropoietin receptors.** The Oncologist 2003; 8(1): 15-18.

Lee LG, Chen CH, Chiu LA. **Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis.** Cytometry 1986; 7: 508-517.

Liefooghe EC, Tiplady R, Gerson P, Lloyd P, Heath A, Bristow AF. **A sialylation-sensitive cell-based in vitro bioassay for erythropoietin; incorporation of the galactose-binding *Erythrina crista-galli* lectin.** Biologicals 2005; 33: 161-167.

Lisowska KA, Debska-Slizien A, Bryl E, Rutkowski B, Witkowski JM. **Erythropoietin receptor is expressed on human peripheral blood T and B lymphocytes and monocytes and is modulated by recombinant human erythropoietin treatment.** Artificial Organs 2010; 34(8): 654-662.

Lisowska KA, Debska-Slizien A, Radzka M, Witkowski JM, Rutkowski B, Bryl E. **Recombinant human erythropoietin treatment of chronic renal failure patients normalizes altered phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes.** Artificial Organs 2010; 34(3): E77-E84.

Liu J, Guo X, Mohandas N, Chasis JA, An X. **Membrane remodeling during reticulocyte maturation.** Blood 2010; 115(10): 2021-2027.

London Laboratory Services Group – LLSG. **Flow cytometry – thiazole orange** [online]. Londres, Reino Unido, 2008. [capturado 4 jul. 2010]
Disponível em: <http://www.lhsc.on.ca/lab/flow/28pr.htm>

Lopes MC. **Avaliação da potência biológica da eritropoetina humana recombinante em produtos farmacêuticos: Estudo comparativo entre as linhagens de camundongos B6D2F1 e Swiss Webster.** Rio de Janeiro; 2004. Mestrado [Dissertação em Vigilância Sanitária] – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Łuczyński W, Ratomski K, Wysocka J, Krawczuk-Rybak M, Jankiewicz J. **Immature reticulocyte fraction (IRF) – an universal marker of hemopoiesis in children with cancer?** *Advances in Medical Sciences* 2006; 51:188-190.

Maconi M, Danise P, Cavalca L, Formisano D. **Flow cytometric reticulocyte counting: a comparison between two methods.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2010; 24: 252-255.

Maier RF, Obladen M, Scigalla P, Linderkamp O, Duc G, Hieronimi G et al. **The effect of epoetin beta (recombinant human erythropoietin) on the need for transfusion in very-low-birth-weight infants.** *N Engl J Med* 1994; 330(17): 1173-1178.

Mast AE, Blinder MA, Dietzen DJ. **Reticulocyte hemoglobin content.** *Am. J. Hematol.* 2008; 83: 307-310.

Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. **A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes.** *J Biol Chem* 1994; 269: 19488-19493.

Mocini D, Leone T, Tubaro M, Santini M, Penco M. **Structure, production and function of erythropoietin: implications for therapeutical use in cardiovascular disease.** *Curr Med Chem* 2007; 14(21):2278-87.

Nakage APM, Santana AE, Cápua MLB, Coelho PS. **Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária.** *Ciência Rural* 2005; 35(4): 966-973.

National Comitee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for reticulocyte counting (automated blood cell counters, flow cytometry, and supravital dyes);** Approved Guideline – Second Edition. NCCLS document H44-A2 [ISBN 1-56238-527-5]. Pensilvânia, Estados Unidos: NCCLS; 2004.

Ng T, Marx G, Littlewood T, Macdougall I. **Recombinant erythropoietin in clinical practice.** *Postgrad Med J* 2003; 79: 367-376.

Nobes PR, Carter AB. **Reticulocyte counting using flow citometry.** *J Clin Pathol* 1990; 43: 675-678.

Österborg A, Brandberg Y, Molostova V, Iosava G, Abdulkadyrov K, Hedenus M et al. **Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Recombinant Human Erythropoietin, Epoetin Beta, in Hematologic Malignancies.** *J Clin Oncol* 2002; 20(10): 2486-2494.

Palmeira CA, Oliveira PA, Seixas F, Pires MA, Lopes C, Santos L. **DNA image cytometry in bladder cancer: state of the art.** *Anticancer Res* 2008; 28(1B):443-50.

Pereira PM, Seki MC, Palma PVB, Morais FR, Santana AE, Pereira GT. **Contagem de reticulócitos de cães saudáveis ou anêmicos pela citometria de fluxo.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2008; 59(1): 66-70.

Pérez-Écija RA, Estepa JC, Mendoza FJ. **Citología sanguínea em pequenos animais. Hallazgos más comunes y su interpretación – Análisis y estudio del frotis sanguíneo.** *Argos – Informativo Veterinário* 2010; 117: 495. [capturado 16 jun. 2011]
Disponível em: [http://argos.portalveterinaria.com/noticia/7130/ART%C3%8DCULOS-\(ARCHIVO\)/an%C3%A1lisis-estudio-frotis-sangu%C3%ADneo.html](http://argos.portalveterinaria.com/noticia/7130/ART%C3%8DCULOS-(ARCHIVO)/an%C3%A1lisis-estudio-frotis-sangu%C3%ADneo.html)

Pianetti A, Manti A, Boi P, Citterio B, Sabatini L, Papa S, et al. **Determination of viability of *Aeromonas hydrophila* in increasing concentrations of sodium chloride at different temperatures by flow cytometry and plate count technique.** *Int J Food Microbiol* 2008; 127(3):252-60.

Pierre RV. **Reticulocytes – Their usefulness and measurement in peripheral blood.** *Clinics in Laboratory Medicine* 2002; 22(1): 63-79.

Preložnik-Zupan I, Černelč P, Žontar D. **Reticulocyte analysis using light microscopy and two different flow cytometric procedures.** *Eur J Physiol* 2000; 440(suppl): R185-R187.

Riley RS, Ben-Ezra JM, Goel R, Tidwell A. **Reticulocytes and Reticulocyte Enumeration.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2001; 15: 267-294.

Riley RS, Ben-Ezra JM, Tidwell A, Romagnoli G. **Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques.** *Hematol Oncol Clin N Am* 2002; 16: 373-420.

Rishpon-Meyerstein N, Kilbridge T, Simone J, Fried W. **The effect of testosterone on erythropoietin levels in anemic patients.** *Blood* 1968; 31: 453-460.

Rudenski B. **Comparison of a semi-automated new Coulter methylene blue method with fluorescence flow cytometry in reticulocyte counting.** *Scand J Clin Invest* 1997; 57: 291-296.

Rowan RM. **Reference method, quality control and automation of reticulocyte count.** *Pure & Appl Chem*, 1991, 63(8): 1141-1145.

Sasakis H, Bothner B, Dell A, Fukudall M. **Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA.** *The Journal of Biological Chemistry* 1987; 25: 12059-12076.

Sawyer ST, Penta K. **Association of JAK2 and STAT5 with Erythropoietin Receptors.** *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 32430-32437.

Schmidt CA, Ramos AS, Silva JEP, Fronza M, Dalmora SL. **Avaliação da Atividade e Caracterização de Eritropoietina Humana Recombinante em Produtos farmacêuticos.** Arq Bras Endocrinol Metab 2003, 47(2): 183-189.

Schimenti KJ, Lacerna K, Wamble A, Maston L, Iaffaldano C, Straight M, et al. **Reticulocyte quantification by flow cytometry, image analysis, and manual counting.** Cytometry 1992; 13: 853-862.

Sepehrizadeh Z, Tabatabaei Yazdi M, Zarrini GH, Hashemi Bozchlou S, Khoshakhlagh P. **Comparison of real time RT-PCR and flow citometry methods for evaluation of biological activity of recombinant human erythropoietin.** DARU 2008, 16(2): 102-105.

Simionatto M, Paula JP, Nascimento AJ, Leonart MSS, Cicchetti D. **Contagem manual de reticulócitos em laboratórios de análises clínicas de Ponta Grossa e Campos Gerais, PR, Brasil.** Ver. Brás. Hematol. Hemoter. 2009; 31(5): 315-320.

Spahlinger D, King L. **Erythropoietin** [online]. Kenyon College, Ohio, Estados Unidos, 2007. [capturado 5 mai. 2010] Disponível em:
<http://biology.kenyon.edu/BMB/Chime2/2004/eryth/FRAMES/start.htm>

Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Stenning BE, Lamikanra A, Rafferty B et al. **Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties.** British Journal of Haematology 1998; 100: 79-89.

Tanke HJ, Rothbarth PH, Vossen JMLL, Koper GJM, Ploem JS. **Flow Cytometry of Reticulocytes Applied to Clinical Hematology.** Blood 1983; 61(6): 1091-1097.

Telen MJ. **Erythrocyte adhesion receptors: Blood group antigens and related molecules.** Transfusion Medicine Reviews 2005; 19: 32-44.

Torous DK, Hall NE, Murante FG, Gleason SE, Tometsko CR, Dertinger SD. **Comparative scoring of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood by flow cytometry and microscopy.** Toxicological Sciences 2003; 74: 309-314.

Tsiftoglou AS, Vizirianakis IS, Strouboulis J. **Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs.** IUBMB *Life* 2009; 61(8): 800-830.

Weiss DJ. **Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology.** Veterinary Clinical Pathology 2002; 31(2): 72-82.

Witt KL, Livanos E, Kissling GE, Torous DK, Caspary W, Tice RR et al.. **Comparison of flow cytometry- and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals.** Mutation Research 2008; 649: 101-113.

Wiwanitkit V. **Correlation among different automated reticulocyte counts: an appraisal by serial correlative evaluation.** Haema 2004; 7(4): 541-542.

Yoshimura A, Arai K. **The erythropoietin receptor and signal transduction.** The Oncologist 1996; 1: 337-339.

Yu PH, So CC, Wong KF, Lee KC, Chow CS, Yip LK, et al. **Automated reticulocyte counting – an evaluation of GEN-S, Cell-DYN 3500 and Cell-Dyn 4000.** Clin Lab Haem, 1999, 21: 145-147.

Zochodne B, Truong AHL, Stetler K, Higgins RR, Howard J, Dumont D, et al. **Epo regulates erythroid proliferation and differentiation through distinct signaling pathways: implication for erythropoiesis and Friend virus-induced erythroleukemia.** Oncogene 2000; 19: 2296-2304.