

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA BIOLÓGICA DA ERITROPOETINA  
HUMANA RECOMBINANTE EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS:**

Estudo comparativo entre as linhagens de camundongos B6D2F1 e Swiss Webster.

**MÁRCIA CRISTINA LOPES**

**Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz**

**Orientadores:**

**Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado**

**Prof. Dr. Luiz Gonçalves Paulo**

**Rio de Janeiro**

**2004**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação da Potência Biológica da Eritropoetina Humana Recombinante em Produtos Farmacêuticos: Estudo comparativo entre as linhagens de camundongos B6D2F1 e Swiss Webster.

Márcia Cristina Lopes

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado por:

---

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho – UNICAMP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos – FIOCRUZ

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula de Novaes Sarcinelli – FIOCRUZ

---

Orientador Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado – USP

Rio de Janeiro

2004

## FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, Márcia Cristina

Avaliação da potência biológica da eritropoetina humana recombinante em produtos farmacêuticos: Estudo comparativo entre as linhagens de camundongos B6D2F1 e Swiss Webster.

xix; 73 p., Figs., quads., tabs.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2004. Orientadores: Alexandre Pinto Corrado e Luiz Gonçalves Paulo.

1.camundongos normocitêmicos 2.reticulócitos 3. hemólise seletiva  
4. análise de retas paralelas 5.eritropoetina.

1 – Título

*Dedico este trabalho à meus pais,  
Francisco de Assis Lopes (†) e  
Argemides Pedroza Lopes.*

## **CONFIA SEMPRE**

*Não percas a tua fé entre as sombras do mundo.  
Ainda que os teus pés estejam sangrando,  
Segue para a frente, erguendo-a por luz celeste acima de ti mesmo.  
Crê e trabalha.  
Esforça-te no bem e espera com paciência.  
Tudo passa e tudo se renova na Terra,  
Mas o que vem do céu permanecerá.  
De todos os infelizes, os mais desditosos,  
São os que perderam a confiança em Deus e em si mesmos,  
Porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo.  
Eleva, pois, o teu olhar e caminha.  
Luta e serve. Aprende e adianta-te.  
Brilha a alvorada além da noite.  
Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração  
E te atormente o ideal aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte...  
Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.*

**MEIMEI**

## **Agradecimentos a**

Deus, por oferecer saúde e perseverança a meus orientadores e à minha pessoa,  
Meus orientadores, Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado pela orientação ao longo do desenvolvimento do trabalho e ao Prof. Dr. Luiz Gonçalves Paulo, pela orientação no preparo do capítulo da Introdução, agradeço a ambos pela dedicação, apoio, paciência e carinho,  
Profs. Doutores examinadores pela colaboração e sugestões,  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Eliza Albertengo, Chefe do Departamento de Biológicos do Instituto Nacional de Medicamentos, INAME/Argentina, pela atenção e carinho,  
Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, Professor da UFSM/RS, pela atenção,  
Antônio Carlos Morais, chefe do Setor de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, pelas informações obtidas,  
Darío Pinto Miranda, Assessor em Biológicos da ANVISA/MS, por possibilitar a pesquisa nos processos de registro das empresas produtoras de eritropoetina,  
Reginelena Ferreira da Silva, Coordenadora do Grupo Técnico do Programa de Medicamentos do INCQS/FIOCRUZ, por possibilitar a aquisição das amostras analisadas,  
Mariete Ferreira Lemos, Sub-Coordenadora do Grupo Técnico do Programa de Medicamentos do INCQS/FIOCRUZ, pelo auxílio nas questões administrativas,  
Lúcia Maria Corrêa Werneck, Chefe do Departamento de Imunologia/INCQS/FIOCRUZ, pela liberação de parte dos dias de trabalho possibilitando o andamento da dissertação,  
Belmira Ferreira dos Santos, Médica Veterinária do CECAL/FIOCRUZ, pelas informações técnicas,  
Josilene Pedreira Soares de Andrea, Funcionária do CECAL/FIOCRUZ, pela atenção,  
Rodrigo Rêgo Barros Caruso, Tecnologista do Departamento de Farmacologia e Toxicologia/INCQS/FIOCRUZ, pela elaboração de planilha Excell para a análise de estimativas de potência,  
Filipe Soares Quirino da Silva e Claudia Maria Conceição, Tecnologistas do Departamento de Química/INCQS/FIOCRUZ, pelas informações científicas da área de química, e empréstimo de material,  
Flávio Rocha da Silva, Tecnologista do Departamento de Imunologia/ INCQS/FIOCRUZ, pelo empréstimo de microscópio,

Jaline Alves Cabral da Costa, Tecnologista do Departamento de Imunologia/ INCQS/FIOCRUZ, pelo empréstimo de material,

Maria Conceição de Menezes Fernandes, Dalvim Pereira dos Anjos e Néson Luiz da Silva Pedreira, Técnicos dos Departamentos de Farmacologia e Toxicologia e do de Imunologia INCQS/FIOCRUZ, pelo auxílio durante os experimentos com animais,

Mário Luiz Gonçalves Duarte, meu marido, pelo auxílio nas questões de programação visual e pela dedicação,

Enfim, à todos os citados e não citados, que demonstraram carinho e amizade, contribuindo assim para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

A avaliação da potência biológica da eritropoetina humana recombinante (rhEPO), presente em sete produtos farmacêuticos, foi efetuada, comparativamente ao Padrão biológico da Farmacopéia Européia – F.E. (2002), em camundongos normocitêmicos fêmeas, de 8 semanas de idade da linhagem Swiss Webster (SW), através da administração subcutânea do hormônio, numa seqüência logarítmica de base 3 (10, 30 e 90 UI/animal), sob o esquema de dose múltipla, subdividida em quatro sucessivas aplicações diárias, seguida da coleta de amostra sanguínea 24h após a última aplicação da dose múltipla, usando-se o método visual da hemólise seletiva, para a contagem dos reticulócitos. Com exceção de uma das sete amostras em analisadas, as potências e os limites de confiança ( $P=0,05$ ) das demais, mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pela F.E., isto é, respectivamente 80% a 125% e 64% a 156%.

Empregando o mesmo Padrão, confirmamos dados da literatura, que demonstram que a seqüência logarítmica das doses na base 2 (20, 40 e 80 UI/animal), aplicadas em esquema de dose única seguida da coleta do sangue 96 h após, preconizada pela F.E., é menos discriminativa da seqüência na base 3, bem como comprovamos a maior sensibilidade e menor variabilidade dos resultados empregando-se a metodologia de dose múltipla, a qual proporcionou ensaios biológicos altamente válidos, evidenciados através da aplicação do método das retas paralelas (3:3, 6 pontos) que revelou a elevada significância das regressões lineares ( $P<0,01$ ) bem como desvios não-significativos da linearidade e do paralelismo ( $P>0,05$ ). Uma primeira tentativa de aplicação do ensaio 2:2, 4 pontos, reduzindo significativamente o número de animais, revelou-se válida, porém, na vigência de variabilidade mínima dos resultados experimentais, meta que, embora difícil, espera-se seja atingida com o emprego do método automatizado de contagem dos reticulócitos, isto é, a Citometria de Fluxo, a qual é de precisão sensivelmente maior que o método visual.

O estudo comparativo entre as linhagens B6D2F1, preconizada pela F.E., e a SW, revelou maior sensibilidade da primeira (24%), embora este valor se afigure relativo, face a significativa diferença entre os pesos corporais das fêmeas da B6D2F1 (16,8 a 20,2 g) e da SW (29,2 a 37,9 g) e ao fato da rhEPO ser aplicada por animal e não por unidade de peso. Por outro lado, as respostas proporcionais das fêmeas da linhagem SW, aos diferentes estímulos do hormônio, se afiguram suficientes para torná-la altamente sugestiva como alternativa válida, em termos de linhagem de camundongos normocitêmicos, para o ensaio biológico de potência da rhEPO.



## ABSTRACT

The biological potency of recombinant human erythropoietin (rhEPO), present in seven pharmaceutical preparations, was evaluated, in comparison to the European Pharmacopoeia's Standard - E.P. (2002), in 8 weeks old normocythaemic female mice, of the Swiss Webster (SW) strain, by subcutaneous injections of the hormone, in logarithm sequence of basis 3 (10, 30 and 90 UI/animal), by multiple dose scheme, subdivided in four successive daily injections, followed by collection of a blood sample 24h after the last application of the multiple dose, using the visual method of selective haemolysis to measure the reticulocytes. Exception one of seven analyzed samples, the potencies and the confidence limits ( $P=0.05$ ) of the others, were within the limits established by the E.P., that is, respectively 80% to 125% and 64% to 156%.

With the employment of the same Standard, we confirmed literature data demonstrating that the logarithm sequence of doses in basis 2 (20, 40 and 80 UI/animal), applied in schemes of single dose followed by collection of blood 96 h after, recommended by the E.P., is less discriminating than the sequence in basis 3, and we also proved the occurrence of greater sensitivity and minor variability of the results using the multiple dose methodology, which provided highly valid biological assays, demonstrated by the application of the parallel line method (3:3, 6 points) in which the analysis of variance revealed a high significance of the linear regressions ( $P<0.01$ ) as well as non-significant deviations from linearity and parallelism ( $P>0.05$ ). A first tentative of application of 2:2, 4 points assay, with significant reduction of the number of experimental animals, reveals valid only during the occurrence of minimum variability of experimental results, aim, although difficult, we hope to reach with the employment of the automated method of reticulocytes counts, that is, Flow Citometry, whose precision is markedly higher than the visual method.

The comparative study between the B6D2F1, recommended by E. P., and the SW strains, revealed greater sensitivity of the former (24%), although this value become relative, due the significant difference between the body weight of the females B6D2F1 (16.8 to 20.2 g) and the SW (29.2 to 37.9 g), and to the fact of rhEPO be applied per animal and not per unit of weight. On the other hand, the proportioned responses of SW female strain, to the different stimulus of the hormone, strongly suggest that this strain can be used as a valid alternative, in order of normocythaemic mice strain, for the biological assay of the potency of rhEPO.

### **Lista de Siglas**

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CECAL – Centro de Criação de Animais para Laboratório

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

INCQS – Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

NIBSC – National Institute for Biological Standards and Control

SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia

SME – Solicitação de Medicamentos Excepcionais

SUS – Sistema Único de Saúde

WHO – World Health Organization

## Lista de Abreviaturas

- AA – aminoácido
- AMP – Adenosina - monofosfato
- ASN – Asparagina
- B6D2F1 – tipo de linhagem híbrida de camundongo
- BFU – E – Burst Forming Unit - Erythroid
- BHK – Rins de Hamster Jovem (células)
- CF<sub>1</sub> - tipo de linhagem de camundongo
- C57BL/6j - tipo de linhagem de camundongo
- CFU – Colony Forming Units
- CFU – E – Colony Forming Units - Erythroid
- CHO – Ovário de Hamster Chinês (células)
- CP – Célula Pluripotente
- CV – Coeficiente de Variação
- Da – Dalton
- DBA/2j – tipo de linhagem de camundongo
- DE<sub>50</sub> – Dose Efetiva que revela o valor correspondente a 50% da eficácia
- DL<sub>50</sub> – Dose Letal que revela o valor que causa a morte de 50% dos animais
- DM – Dose múltipla
- DU – Dose única
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EDM – Ensaio de dose múltipla
- EDU – Ensaio de dose única
- E P – European Pharmacopoeia
- F E - Farmacopéia Européia
- EPO – Eritropoetina
- FCH – Fator de Crescimento Humano
- G – CSF – Fator de Estimulação de Colônias granulócito
- GM – CSF - Fator de Estimulação de Colônias granulócito - macrófago
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- IL – Interleucina
- M – Molar
- M – CSF – Fator de Estimulação de Colônias - macrófago

PM – Peso Molecular

rhEPO – Eritropoetina humana recombinante

SCF – Fator Estimulador de Stem Cell

SER – Serina

UI – Unidade Internacional

## Lista de Quadros

Quadro 1 – Fatores de Crescimento Hematopoéticos (FCHs) e as correspondentes células sangüíneas envolvidas. ----- página 5

Quadro 2 – Número de pacientes sob hemodiálise nos Centros de Diálise contatados no Brasil. ---  
-----página 15

Quadro 3 – Valores hematológicos referentes às linhagens de camundongos empregadas no presente trabalho-----página 21

## Lista de Figuras

- Figura 1 – Seqüência de Proliferação, Manutenção e Maturação das Células Hematopoéticas e alguns FCHs envolvidos.-----Página 4
- Figura 2 – Esquema demonstrativo da Seqüência de formação das Células da Série Eritróide.-----Página 6
- Figura 3 – Imagem de esfregaço Sangüíneo em Lamina.----- Página 7
- Figura 4 – Mecanismo da regulação diária da Eritropoese envolvendo o Corpúsculo Carotídeo e o Hipotálamo.----- Página 10
- Figura 5 – Apresentação tridimensional da EPO.-----Página 13
- Figura 6 – Apresentação da estrutura química da EPO.-----Página 14
- Figura 7 – Imagem esquematizada da Câmara Neubauer, indicando área para a contagem de hemácias e/ou reticulócitos.-----Página 32
- Figura 8 – Curva dose-resposta resultante da administração subcutânea de doses crescentes de 5, 10, 20, 40, 80, 160, e 320 UI/0,5 mL/animal do Padrão Europeu da rhEPO.-----Página 37

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de doses crescentes de 5 a 320 UI/0,5 mL/animal do Padrão Europeu de rhEPO, sob a forma de dose única em camundongos fêmeas Swiss Webster.

Página 38

Tabela 2 - Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de doses de 20, 40 e 80 UI/0,5 mL/animal do Padrão Europeu de rhEPO, sob a forma de dose única em camundongos fêmeas Swiss Webster.

Página 39

Tabela 3 - Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de doses de 10, 30 e 90 UI/0,5 mL/animal do Padrão Europeu de rhEPO, sob a forma de dose única em camundongos fêmeas Swiss Webster.

Página 40

Tabela 4 - Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de doses de 2,5; 7,5 e 22,5 UI/0,2 mL/animal do Padrão Europeu de rhEPO, sob a forma de 4 sucessivas aplicações diárias em camundongos fêmeas Swiss Webster, para o total de 10, 30 e 90 UI/animal.

Página 42

Tabela 5 – Potência, limites fiduciais ( $P=0,95$ ) e precisão das estimativas de avaliação comparativa de rhEPO presente em produtos farmacêuticos, com o Padrão Europeu, em ensaios biológicos com contagem dos reticulócitos pelo método da hemólise seletiva.

Página 44

Tabela 6 – Ensaios de Retas Paralelas para a avaliação comparativa da sensibilidade entre as linhagens B6D2F1 e Swiss Webster em resposta à aplicação subcutânea do padrão Europeu de rhEPO, sob a forma de doses crescentes de 2,5; 7,5 e 22,5 UI/0,2 mL/animal em esquema de quatro sucessivas aplicações diárias em camundongos fêmeas, para o total de 10, 30 e 90 UI/animal.-----Página 46

Tabela 7 - Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de doses de 2,5; 7,5 e 22,5 UI/0,2 mL/animal do Padrão Europeu de rhEPO, sob a forma de dose múltipla, em camundongos fêmeas B6D2F1 e Swiss Webster de 8 semanas de idade.

Página 47

Tabela 8 - Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de doses de 2,5 UI/0,2 mL/animal do Padrão Europeu de rhEPO, sob a forma de dose múltipla para o total de 10 UI/animal, em camundongos fêmeas Swiss Webster de 8 semanas de idade.

Página 49



## SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO -----	2
I.1- Sistema hematopoiético (SH) – Considerações Gerais -----	2
I.1.1- Eritropoiése – Fatores Estimuladores de Colônias (CSF) ou Fatores de Crescimento Hematopoiético (FCH)-----	3
I.2 - Histórico da EPO – Papel na formação e liberação de reticulócitos -----	8
I.2.1 - Descoberta do Fator Humoral de Controle da Eritropoiése -----	8
I.2.2 – Sítio e auto-regulação da produção da EPO -----	9
I.2.3 – Obtenção da rhEPO por tecnologia da DNA recombinante-----	11
I.3 – Identificação, caracterização e propriedades químicas da EPO-----	12
I.4 – Receptores da EPO -----	14
I.5 – Papel fisiológico da EPO e Emprego Terapêutico da rhEPO -----	15
I.6 – Controle da Qualidade da rhEPO -----	17
II – OBJETIVOS-----	23
III – MATERIAL E MÉTODOS-----	25
III.1 – Material-----	25
III.1.1 – Padrão Biológico de Referência-----	25
III.1.2 – Produtos Farmacêuticos-----	25
III.1.3 – Animais de Laboratório-----	25
III.1.4 – Reagentes -----	25
III.1.5 – Soluções reagentes-----	26
III.1.6 – Equipamentos e acessórios-----	26
III.2 – Métodos-----	27
III.2.1 – Identificação das amostras-----	27
III.2.2 Tratamento dos animais de laboratório-----	27
III.2.3 – Solução Tampão de fosfato de sódio a pH 7,2 com albumina bovina para a diluição das amostras e do Padrão de rhEPO-----	28
III.2.4 – Solução Padrão estoque de rhEPO para os experimentos com dose única-----	28
III.2.5 – Solução de trabalho para a curva Padrão da rhEPO com doses de 5, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 UI de rhEPO/0,5 mL-----	28

III.2.6 – Solução de trabalho do Padrão de rhEPO para a obtenção das doses de 20, 40 e 80 UI/0,5 mL ou 10, 30 e 90 UI/0,5 mL em esquema de dose única-----	29
III.2.7 – Solução Padrão estoque de rhEPO, para experimentos com dose múltipla-----	29
III.2.8 – Solução de trabalho do Padrão de rhEPO para a obtenção das doses em esquema de dose múltipla-----	29
III.2.9 – Solução de trabalho para as preparações das amostras em ensaios com dose múltipla-	30
III.2.10 – Solução anti-coagulante de heparina sódica-----	30
III.2.11 – Solução de azul de metileno-----	30
III.2.12 – Solução hemolisante-----	30
III.2.13 – Coleta de sangue-----	31
III.2.14 – Avaliação experimental-----	31
III.2.15 – Contagem de reticulócitos por método da hemólise seletiva-----	31
III.2.16 – Análise estatística dos dados-----	32
IV – RESULTADOS -----	35
IV.1 – Curvas dose-resposta do Padrão Europeu da rhEPO administrada em camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster, sob a forma de injeção única pela via subcutânea, seguida da avaliação do efeito 96 horas após-----	36
IV.1.1 – Curva dose-resposta do Padrão Europeu da rhEPO com a administração das doses em progressão geométrica na base 2, doses de 5 a 320 UI/0,5 mL/animal-----	36
IV.1.2 - Curva dose-resposta do Padrão Europeu da rhEPO com a administração das doses em progressão geométrica na base 3, doses de 10, 30 e 90 UI/0,5 mL/animal-----	39
IV.2 - Curvas dose-resposta da rhEPO presente no Padrão Europeu e nas amostras de produtos farmacêuticos, administrada pela via subcutânea em camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster, sob a forma de dose múltipla subdividida em quatro sucessivas aplicações diárias, seguidas da avaliação dos efeitos 24 horas após a última aplicação-----	41
IV.2.1 - Curvas dose-resposta do Padrão Europeu da rhEPO, administrado pela via subcutânea em camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster sob a forma de doses múltipla-----	41
IV.2.2 – Ensaios biológicos de potência da rhEPO presente em produtos farmacêuticos em comparação com o Padrão Europeu, através da aplicação de dose múltipla do hormônio em camundongos da linhagem Swiss Webster, fêmeas-----	43

IV.3 – Estudo comparativo entre as linhagens B6D2F1 e Swiss Webster em resposta à injeção subcutânea do Padrão Europeu da rhEPO sob a forma de dose múltipla, subdividida em quatro sucessivas aplicações diárias -----	45
IV.4 – Estudo comparativo para avaliar a variável peso corporal, empregando grupos de animais da linhagem Swiss Webster, em resposta à aplicação subcutânea do Padrão Europeu da rhEPO, sob a forma de dose múltipla subdividida em quatro sucessivas aplicações diárias-----	48
V – DISCUSSÃO-----	51
VI – CONCLUSÕES-----	59
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	61

**INTRODUÇÃO:**

---

## **I - Introdução:**

### **I.1 – Sistema Hematopoiético (SH) - Considerações Gerais**

A produção de células sanguíneas decorre do permanente “turnover” das células do SH, cuja principal função consiste na constante reparação das freqüentes flutuações dos elementos figurados do sangue, mantendo as populações de leucócitos, plaquetas e eritrócitos, em quantidades requeridas para o seu desempenho adequado, frente a estímulos fisiológicos ou fisiopatológicos. Com efeito, em resposta, por exemplo, à hipóxia, ao sangramento ou à processos infecciosos, pode haver um aumento substancial na produção e/ou liberação, de determinados tipos celulares, especificamente relacionados com uma das três referidas populações, fenômeno resultante do diversificado e constantemente regulado, desenvolvimento da hematopoiése (WINTROBE, 1998).

A hematopoiése, é representada por um complexo sistema de multiplicação, proliferação, diferenciação e maturação celular que envolve todas as linhagens celulares que originam os componentes figurados do sangue, representados pelos compartimentos megacariocítico, linfóide e granulocítico, além dos macrófagos, plasmócitos e eritrócitos (WINTROBE, 1998).

Todas essas linhagens hematopoiéticas, se originam de uma célula mãe, denominada **célula tronco** ou **célula progenitora totipotencial**, que dá origem a outros progenitores celulares, **multi** ou **pluripotenciais**, que, por sua vez, induzem o aparecimento das referidas linhagens hematopoiéticas (WINTROBE, 1998).

Um progenitor pluripotencial amplamente conhecido, a **CFU-GEMM**, é a Unidade Formadora de Colônias de Granulócitos-Eritrócitos-Megacariócitos-Macrófagos, que dá origem a todos estas linhagens, através da passagem evolutiva para progenitores **oligopotenciais** e, finalmente, para progenitores comprometidos a uma determinada linhagem celular, os quais são assim chamados, porque apresentam capacidade proliferativa e de diferenciação em relação à uma única linhagem celular (WINTROBE, 1998; EAVES e EAVES, 1992).

Paralelamente a esses progenitores, tem papel igualmente relevante os Fatores Regulatórios ou Fatores Estimuladores de Colônia (CSF), que são representados por substâncias envolvidas no equilíbrio dinâmico da hematopoiése, regulando os mecanismos de proliferação, manutenção e maturação das células progenitoras hematopoiéticas a nível da medula óssea (WINTROBE, 1998; EAVES e EAVES, 1992).

### **I.1.1 - Eritropoiese – Fatores Estimuladores de Colônia (CSF) ou Fatores de Crescimento Hematopoiéticos (FCH).**

Em relação à linhagem celular eritróide, foram identificados os seguintes progenitores **bipotenciais**:

- (1°.) A CFU-EMg (Unidade Formadora de Colônias Eritróide-Megacariócito);
- (2°.) a CFU-EEo (Unidade Formadora de Colônias Eritróide-Eosinófilo);
- (3°.) a CFU-EP (Unidade Formadora de Colônias Eritróide-Célula Plasmática).

De acordo com a cinética e morfologia dessas colônias eritróides, desenvolvidas *in vitro* em meio sólido à base de agar, fibrina ou, mais comumente, de metilcelulose (ISCOVE e SIEBER, 1974), foram evidenciados os seguintes **progenitores comprometidos na linhagem eritróide** (KRANTZ, 1991; SPIVAK, 1992):

- (1°.) As – **BFU-E Primitivas**, isto é, Unidades Formadoras de “Burst” de Eritróides Primitivos ou “Early Burst Forming Units Erythroid”;
- (2°.) as **BFU-E-Tardias ou Maduras**, isto é, Unidades Formadoras de “Burst” de Eritróides Tardios ou Maduros, ou “Burst Forming Units Erythroid”;
- (3°.) as **CFU-E**, isto é, Unidades Formadoras de Colônias Eritróides ou “Colony Forming Units Erythroid” (WINTROBE, 1998; EAVES e EAVES, 1992).

Atuando sobre os progenitores da série vermelha, destaca-se a Eritropoietina (EPO), não só por ter sido o primeiro Fator de Crescimento Hematopoiético humano a ser isolado, mas principalmente pelo seu elevado emprego em terapêutica, como veremos mais adiante (WINTROBE, 1998; EAVES e EAVES, 1992).

As BFU-E Primitivas, são células que, no seu estágio inicial mais imaturo, são desprovidas de receptores à eritropoetina, sendo dependentes de fatores de proliferação hematopoiéticos de ação inespecífica, representados, principalmente, pela Interleucina 3 (IL 3) e pelo CSF-GM, isto é, Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos-Macrófagos (WINTROBE, 1998; EAVES e EAVES, 1992).

A medida que as células vão amadurecendo e se diferenciando, aumenta a sua sensibilidade à fatores específicos, tais como por exemplo, a EPO, em virtude do aparecimento progressivo de receptores à esse hormônio. De fato, as BFU-E Maduras ou Tardias, tornam-se progressivamente mais dependentes da EPO, pois expressam receptores ao hormônio de forma crescente, à medida que aumenta o seu índice de amadurecimento para, no estágio final, se converterem em CFU-E, as quais, na sua forma madura, produzem colônias de células eritróides, proeritroblastos, que expressam a maior densidade de receptores da EPO, sendo portanto, altamente dependentes do hormônio (SAWADA e cols., 1990). As

CFU-E funcionam, portanto, como uma interface entre os progenitores eritróides mais maduros (BFU-E Tardios ou Maduros) e as células eritropoiéticas conhecidas como eritroblastos da medula óssea (WINTROBE, 1998; EAVES e EAVES, 1992).

O esquema da Figura 1, exemplifica a seqüência de aparecimento e de amadurecimento de células hematopóieticas e alguns de seus FCHs envolvidos.

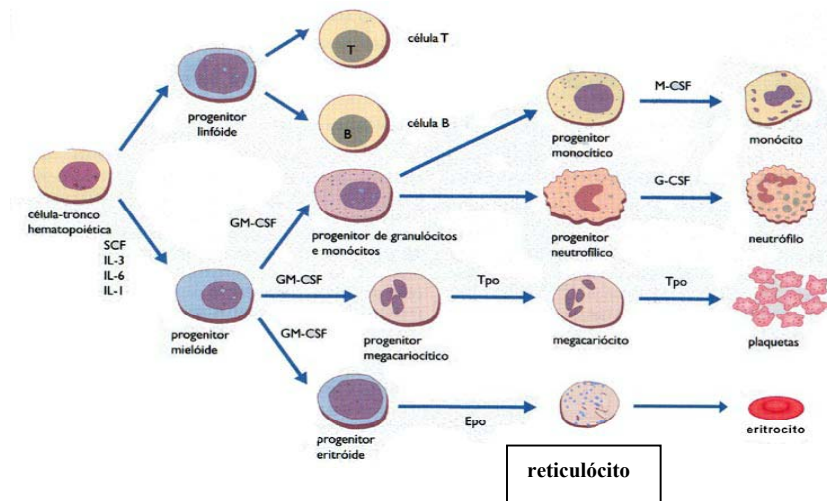


Figura 1- Seqüência de proliferação, manutenção e maturação das células hematopóieticas ao nível da medula óssea, a partir da célula tronco, com alguns FCHs envolvidos na seqüência de maturação da série mielóide. A EPO está envolvida na seqüência de aparecimento das células da linhagem eritróide dando origem aos reticulócitos que por sua vez darão origem às hemácias. (RANG, H. e cols., 1999).

O Quadro 1 apresenta exemplos de FCHs e as células resultantes da ativação das correspondentes progenitoras hematopoéticas (WINTROBE, 1998).

**Quadro 1- Fatores de Crescimento Hematopoéticos (FCH) e as correspondentes células sanguíneas envolvidas**

Células envolvidas					
<b>FCH</b>	Eritrócitos	Granulócitos	Monócitos Macrófagos	Megacariócitos Plaquetas	Outras
<b>EPO</b>	X				
<b>G-CSF</b>		X			
<b>M-CSF</b>			X		
<b>GM-CSF</b>	X	X	X	X	Eosinófilos
<b>IL-3</b>	X	X	X	X	Eosinófilos, basófilos
<b>SCF</b>	X	X	X	X	Eosinófilos, Basófilos, linfócitos
<b>IL-6</b>		X	X	X	Linfócitos
<b>IL-9</b>				X	Linfócitos

**EPO**:- Eritropoetina; **G-CSF**:- Fator de estimulação de colônias de granulócitos; **M-CSF**: - Fator de estimulação de colônias de monócitos-macrófaos; **GM-CSF**: - Fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófaos; **IL**: - interleucinas; **SCF**: - Fator de células tronco. (WINTROBE,1998).



De acordo com a cascata proliferativa eritropoiética, as CFU-E, dão origem aos proeritroblastos ou pronormoblastos, primeiras células eritróides encontradas na medula óssea, que se diferenciam em eritroblastos basófilos e, em seguida, a eritroblastos policromáticos, ortocromáticos e, finalmente, reticulócitos, que correspondem ao último estágio da série eritróide na medula óssea. Após os eritroblastos ortocromáticos ejetarem o seu núcleo, os reticulócitos resultantes atravessam a parede dos sinusóides medulares e são liberados do espaço hematopoiético para o sistema vascular periférico, onde se transformam em eritrócitos, também conhecidos por **hemácias** ou **glóbulos vermelhos** do sangue, como evidencia a Figura 2 (WINTROBE, 1998; EAVES e EAVES, 1992).

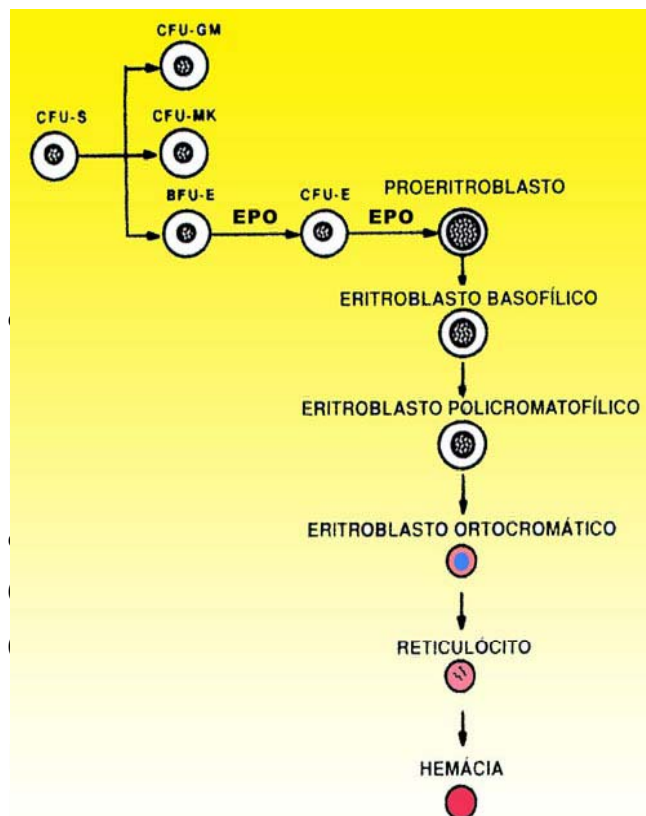


Figura 2 – As células sensíveis à EPO (BFU-E e CFU-E) transformam-se, sucessivamente, em: 1º- Proeritroblastos, 2º- Eritroblastos basófilos, 3º- Eritroblastos Policromáticos I e II, 4º- Eritroblastos Ortocromáticos, 5º- Reticulócitos, 6º- Eritrócitos. Um único Proeritroblasto produz, através de 4 divisões celulares, quatro tipos de Eritroblastos, cada um com morfologia diferente. Um único Eritroblasto basófilo gera 8 Eritrócitos no período médio de 5 dias. (SMITH, e cols.,1983).

Os reticulócitos, são desprovidos de núcleo e são cerca de 20% maiores que os eritrócitos, como evidencia a figura 3, contendo organelas citoplasmáticas representadas, principalmente, por ribossômos, mitocôndrias e complexo de Golgi. Já o eritrócito é uma célula altamente especializada, desprovida de núcleo e de várias organelas citoplasmáticas, tais como mitocôndrias, lisossômos, ribossômos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, tornando-o incapaz de sintetizar ácidos nucléicos e proteínas, e de se multiplicar. Contém hemoglobina, que é constituída por uma proteína incolor, a globina, combinada de forma não-covalente com ferroprotoporfirina, cuja relevante função é a de transportar oxigênio e dióxido de carbono, bem como de participar na manutenção do pH sangüíneo (WINTROBE, 1998).

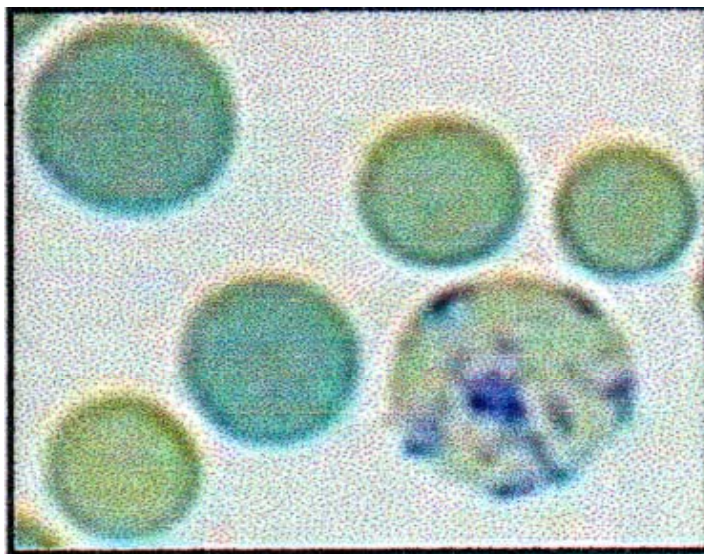


Figura 3 – Imagem de um esfregaço sangüíneo em lâmina apresentando cinco hemácias e um reticulócito. Neste último, os resíduos de RNA ribossômico em presença de corantes supravitais como o azul de metileno, precipitam e se agregam numa rede de cordões ou grumos - **rede de reticulina** – aspecto morfológico que gerou a sua denominação, bem como para distingui-lo da hemácia completamente madura (RAPAPORT, 1990 GROTTO e cols., 1999).

Fonte [http://imc.gsm.com/demos/hsdemo/Data/Data\\_E/Info/PaRB.htm](http://imc.gsm.com/demos/hsdemo/Data/Data_E/Info/PaRB.htm).

## **I.2 Histórico da EPO – Papel na formação e liberação de reticulócitos**

Desde o século XIX é reconhecida a inter-relação entre saturação de oxigênio e produção de glóbulos vermelhos em seres humanos (KEOWN, 1989). Destacam-se a este propósito, os trabalhos de BERT (1878, 1882), referentes à influência da altitude e das câmaras de descompressão no fenômeno em estudo, demonstrando que os efeitos fisiológicos dos gases dependem de sua pressão parcial e que a anemia da altitude se deve à hipoxemia, bem como evidenciaram a elevada capacidade do sangue de captar o oxigênio nos residentes nas montanhas (FISHER, 1988).

Os efeitos da hipoxemia na eritropoiese foram primeiramente descritos pelo histologista francês VIAULT em 1890, ao constatar que o número de glóbulos vermelhos no seu sangue aumentou de 5 para  $8 \times 10^6 / \mu\text{L}$ , após três semanas de excursão às montanhas de Morococha (4.400 m) no Peru, fato que levou MIESCHER (1893) a preconizar os benefícios da altitude em pacientes portadores de tuberculose ou anemia, bem como induziu KUHN (1907) tentar estimular a eritropoiese em pacientes anêmicos diminuindo a sua ventilação pulmonar, diferentes modalidades de estímulo, que se estendem até nossos dias, como, por exemplo, a que envolve o treinamento físico de atletas em lugares montanhosos para aumentar a concentração de hemoglobina e, conseqüentemente, o seu desempenho atlético (FISHER, 1988).

### **I.2.1 – Descoberta de Fator Humoral de controle da EPO**

A hipótese referente ao controle da eritropoiese por um fator humoral foi primeiramente formulada por CARNOT e DE FLANDE, (1906 a, b) ao verificarem um aumento de 20 a 40% no número de glóbulos vermelhos em coelhos, dois dias após receberem uma única injeção de alguns mililitros de soro proveniente de coelhos tornados anêmicos por flebotomia, dando a esse provável fator o nome de hemopoietina. Posteriormente, os resultados de HJORT (1936), KRUMDIECK (1943) e ERSLEV (1953), demonstrando que a injeção de grandes volumes de plasma ou soro, provenientes de coelhos submetidos a sangramento determinava em coelhos normais um rápido aumento de reticulócitos no sangue periférico, representou a demonstração definitiva da existência de um fator humoral no controle da eritropoiese. Somente quase meio século após ter recebido o nome de hemopoietina, BONSDORFF e JALAVISTO (1948), propuzeram a denominação mais apropriada de Fator Estimulante da Eritropoiese, “Erythropoiesis Stimulating Factor” ou eritropoietina (**EPO**), cujo papel humoral foi definitivamente demonstrado no clássico trabalho de REISSMANN

em 1950, que a evidenciou, no sangue de animais submetidos à hipóxia. A experiência pioneira de REISSMANN (1950), em ratos em parabiose, na qual somente um dos animais era submetido a estímulo hipóxico, demonstrou que tanto um como o outro, apresentavam eritropoese acelerada, provando dessa forma a liberação do fator com propriedade de agir por via sangüínea, no outro animal. A prova definitiva da existência de um fator estimulante da eritropoese, conseguida por ERSLEV em 1953, ao demonstrar reticulocitose em coelhos injetados com o plasma proveniente de coelhos tratados pela fenilidrazina que causa acentuada anemia hemolítica (FISHER, 1988).

### **I.2.2 – Sítio e auto-regulação da produção da EPO**

O sítio de produção da EPO foi muito controverso até 1957, quando JACOBSON e cols. apresentaram hipótese altamente sugestiva da sua produção pelos rins, pois a nefrectomia bilateral em ratos sob sangria, abolia a resposta eritropoética. Comprovando esta hipótese, KURATOWSKA e cols.(1961), bem como FISHER e BIRDWELL (1961), demonstraram que a EPO podia ser produzida por rins isolados e perfundidos, bem como que a sua produção não era evidenciada em pacientes anêmicos, porém portadores de insuficiência renal crônica (FISHER, 1988).

Com base a esses dados, a partir de 1970, as pesquisas no campo da eritropoese foram muito intensificadas, com a obtenção de evidências que possibilitaram aventar a hipótese da existência de uma célula renal sensora ao oxigênio (FISHER, 1972), bem como apresentar a proposta do mecanismo de retro-alimentação, na regulação diária da produção de glóbulos vermelhos (PAULO, 1973a). De fato, a sua produção e liberação estão direta e estreitamente relacionadas com a demanda e oferta de oxigênio pelos tecidos, estabelecendo-se um circuito no qual a hipóxia ativa um sensor ao oxigênio, presente em sítios celulares renais responsáveis pela elaboração da EPO, promovendo a síntese e secreção da EPO, ao contrário da hiperóxia que inibe esses processos, concluindo-se que a eritropoese é modulada por um típico mecanismo de retro-alimentação (CHOI e cols., 1996; KOISTINEN e cols., 2000). O local de produção renal do hormônio, foi evidenciado ao nível das células intersticiais fibroblásticas do capilar peritubular (FISHER e cols., 1996).

Associam-se ao rim, nessa importante regulação da eritropoese, o corpúsculo carotídeo e o hipotálamo posterior, formando um triângulo de atividades integradas. Com base nos resultados experimentais realizados para esclarecer essa integração, concluiu-se que o corpúsculo carotídeo reage às alterações do conteúdo de oxigênio do sangue, emitindo influências inibitórias ao hipotálamo posterior, via nervo de Hering-Castro, na vigência de um

aumento da oferta de oxigênio, com conseqüente queda da formação da eritropoetina (PAULO, 1973a; FISHER, 1988). Esta seria a situação de pacientes portadores de policitemia ou de residentes a grandes alturas que fossem transferidos para o nível do mar. A situação diametralmente oposta, seria a dos indivíduos anêmicos, nos quais a redução da taxa de oxigênio do sangue leva a uma diminuição do efeito inibitório do corpúsculo carotídeo sobre o hipotálamo posterior, com o conseqüente aumento da produção do Fator Eritropotéico Renal (REF) que influencia a liberação da EPO ou ESF (Fator Estimulador da Eritropoiése) (Figura 4) (PAULO, 1973).

### MECANISMO “FEED BACK” PROPOSTO NA REGULAÇÃO DIÁRIA DA ERITROPOESE

Reproduzida de: PAULO, L.G. - Estudo Experimental sobre o Possível Mecanismo de Produção da Eritropoietina. Prêmio ABIFARMA, 1973.

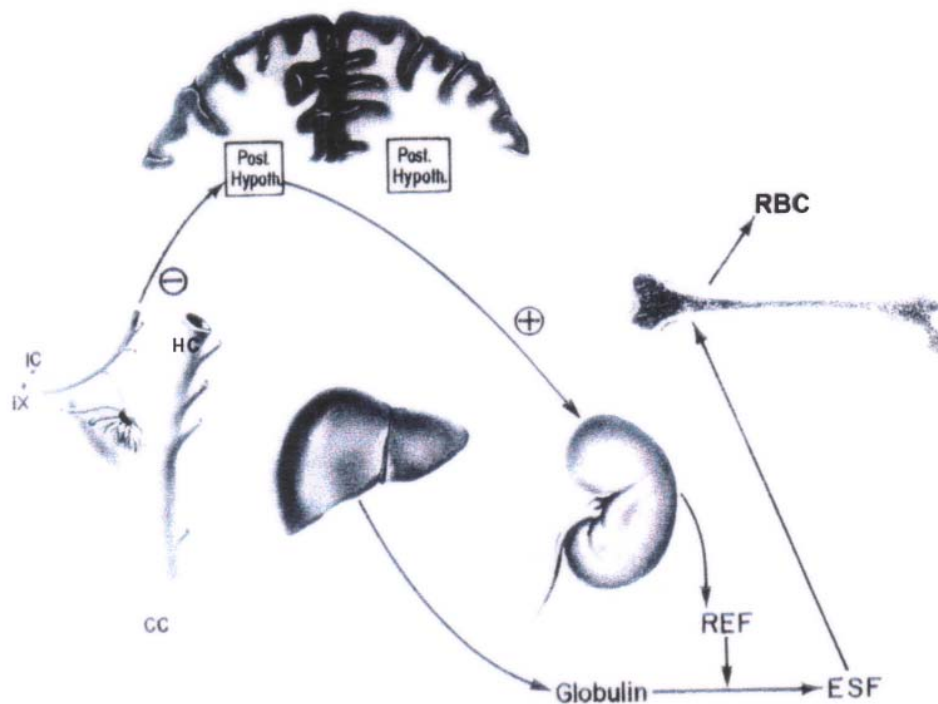


Figura 4 – Mecanismo proposto por PAULO (1973) para a regulação diária da eritropoese envolvendo o corpúsculo carotídeo, o qual exerceria influência sobre o hipotálamo posterior, inibindo-o ou não e acarretando, respectivamente, uma menor ou maior produção da EPO.

O fígado é o principal órgão de produção extra-renal da EPO e é o maior sítio para sua síntese durante a fase fetal (SMITH e cols., 1983; WINTROBE, 1998), que gradualmente passa esta função para o rim logo após o nascimento. Este desvio da produção da EPO ocorre entre os dias 120 e 140 de gestação e encontra-se completo 40 dias após o nascimento

(ZANJANI e cols., 1977; 1981). Em pacientes anéfricos ou que sofrem de severa degeneração funcional dos rins, foi observado a produção da EPO extra-renal pelo fígado, e que as células de Kupffer e os hepatócitos tem sido indicadas por alguns investigadores como células produtoras da EPO (PAUL e cols., 1984; NAUGHTON e cols., 1985) e durante severa hipóxia, cerca de 10% do total de produção de EPO é de origem hepática (TABARA, 1993).

A produção da EPO, de acordo com mecanismo proposto por FISHER (1988), se dá através da participação de diversos mediadores liberados após a diminuição dos níveis de oxigênio. Esses mediadores ativam a Adenilato ciclase que gera AMP cíclico, responsável pela produção de proteínas diversas envolvidas na transcrição e tradução da biosíntese e secreção da EPO.

### **I.2.3 – Obtenção da rhEPO por tecnologia do DNA recombinante**

A EPO foi primeiramente isolada do plasma de ovelha anêmica em 1971 (DERBY e cols., 1996). Posteriormente, MYAKE e cols. (1977) isolaram e purificaram o hormônio da urina de indivíduos portadores de Ancilostomose ou de anemia aplástica, sendo então utilizada, embora de forma limitada, para fins farmacêuticos. Com o advento da engenharia genética, LIN e cols., (1985), bem como JACOB e cols., (1985), clonaram o gene codificado para a EPO humana obtendo-se então a Eritropoetina Humana Recombinante (rhEPO), em cultura de células de mamíferos, isto é as de ovário de hamster chinês (CHO) e de rim de hamster jovem (BHK). A partir desse evento, a EPO passou a ser obtida por tecnologia do DNA recombinante, em escala elevada e altamente purificada, dando-se o início, em 1988, da produção industrial biotecnológica da rhEPO, fato que possibilitou o seu vasto emprego clínico no tratamento de anemias, evitando as problemáticas transfusões sanguíneas (COTES, 1988).

O termo Biotecnologia é denominado ao procedimento que utiliza organismos vivos, incluindo células isoladas de mamíferos, empregando a tecnologia do DNA recombinante (rDNA), destinados à produção de produtos biológicos (EUROPEAN Pharmacopoeia, 1997; THE UNITED States Pharmacopeia, 2002).

Outros produtos obtidos por tecnologia do DNA recombinante estão sendo utilizados amplamente e oferecendo grandes vantagens em termos de quantidade de produção e eficiência, entre os quais destacam-se os FCHs, que são hoje produzidos por este tipo de tecnologia, como Filgrastima, Lenograstima e Nartograstima, utilizados para a estimulação de colônia de granulócitos, e Molgrasmostima que é um fator humano recombinante estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (MARTINDALE, 1999).

### I.3 – Identificação, caracterização e propriedades químicas

A Eritropoetina, hormônio glicoprotéico, consiste de 165 aminoácidos com 2 pontes disulfídicas intramoleculares nas posições CIS<sup>7, 161</sup> e CIS<sup>29, 33</sup>, contém 4 sítios de glicosilação localizados nas porções ASN<sup>24</sup>; ASN<sup>38</sup>; ASN<sup>83</sup> (N glicosilados) e SER<sup>126</sup> (O glicosilado), sua fórmula química é C<sub>809</sub> H<sub>1301</sub> N<sub>229</sub> O<sub>240</sub> S<sub>5</sub> (GOLDWASSER e cols., 1974; DORDAL e cols., 1985; LAI e cols., 1986; TRAN e cols., 1991; CHOI e cols., 1996). A análise da porção carboidrada da EPO demonstrou ter um conteúdo de 40% de sua Massa Molecular de aproximadamente de 36000 Da (GILD e cols., 1996).

A glicosilação da EPO é um processo pós-tradução que é influenciado pelo tipo de célula na qual a EPO é expressa. Foi demonstrado que a rhEPO produzida em sistemas bacterianos, não apresenta estrutura de carboidratos, conseqüentemente, sua atividade biológica *in vivo* é mínima devido a reduzida meia-vida biológica na circulação sangüínea (DORDAL e cols., 1985; GRIFFITHS, 1991; GRUNWALD, 1995). Por outro lado, as rhEPOs produzidas por 3 diferentes linhagens de células de mamíferos, demonstraram diferentes composições de isoformas e diferentes graus das propriedades biológicas *in vivo* (STORRING, 1998).

A rhEPO produzida por cultura de células de ovário de hamsters chinês (CHO) tem similares estruturas de carboidratos, comparativamente à EPO humana de origem urinária (SASAKI e cols., 1987; IMAI e cols., 1990; GILD e cols., 1996), e é caracterizada pela presença de cadeias  $\alpha$  (31 a 39% de carboidratos) e  $\beta$  (24% de carboidratos). A cadeia  $\alpha$  apresenta maior quantidade das isoformas ácidas em razão da presença de variadas razões molares de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico), o qual é o único glicídio que configura a carga negativa ao hormônio. As 3 cadeias de carboidratos N-ligados podem conter duas ou até quatro ramificações (antenas) com ácido siálico em suas terminações, e a cadeia de carboidrato O ligada pode conter até duas ramificações com moléculas de ácido siálico (SASAKI e cols., 1987; TAKEUCHI e cols., 1988; TSUDA e cols., 1990), então, a perda total de resíduos de ácido siálico resulta na completa perda da atividade biológica *in vivo* da EPO (MIYAKE e cols., 1977; DUBÉ e cols., 1988; FUKUDA e cols., 1989), provavelmente decorrente da rápida depuração metabólica, oferecida pelas proteínas de ligação das células hepáticas para a galactose, a qual é o penúltimo sacarídeo de algumas cadeias de oligosacarídeos da EPO (DUBÉ e cols., 1988; FUKUDA e cols., 1989).

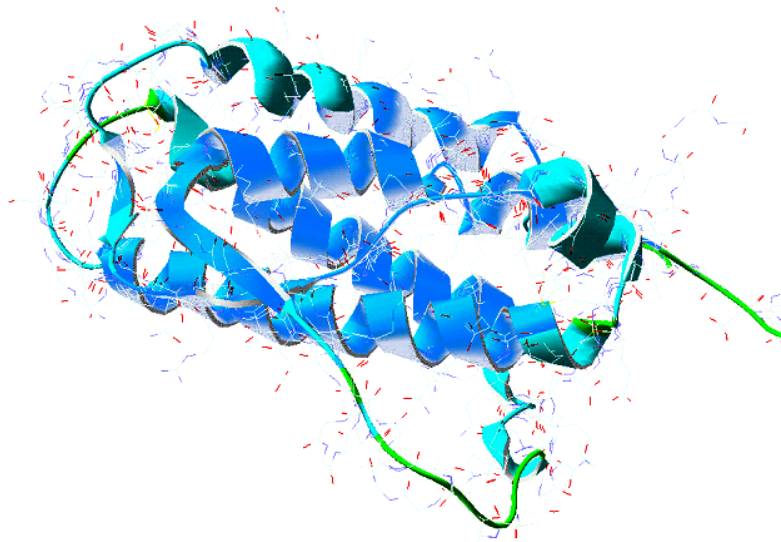


Figura 5 - Apresentação tri-dimensional da EPO, demonstrando a conformação ativa [www.expasy.org](http://www.expasy.org), nº depósito PO1588.

Em estudos empregando métodos *in vitro*, a asialo EPO apresentou atividade específica 4 a 6 vezes maior quando comparada com a EPO intacta (IMAI e cols., 1990), e através do emprego de  $I^{125}$ , foi possível verificar que a asialo rhEPO desapareceu após 6 minutos do plasma de ratos estudados, determinando-se também que o fígado apresentou 85% da radioatividade, sugerindo-se assim, o envolvimento de receptores mediados por endocitoses específicas para a galactose na sua depuração. A análise da rhEPO intacta incorporada pelo fígado continha menos ácido siálico ou mais repetições de N-acetilactosamina do que a rhEPO que permaneceu na circulação (DORDAL e cols., 1985), comprovando-se dessa maneira, que o ácido siálico é essencial para aumentar a meia-vida do hormônio, evitando-se a rápida metabolização hepática.



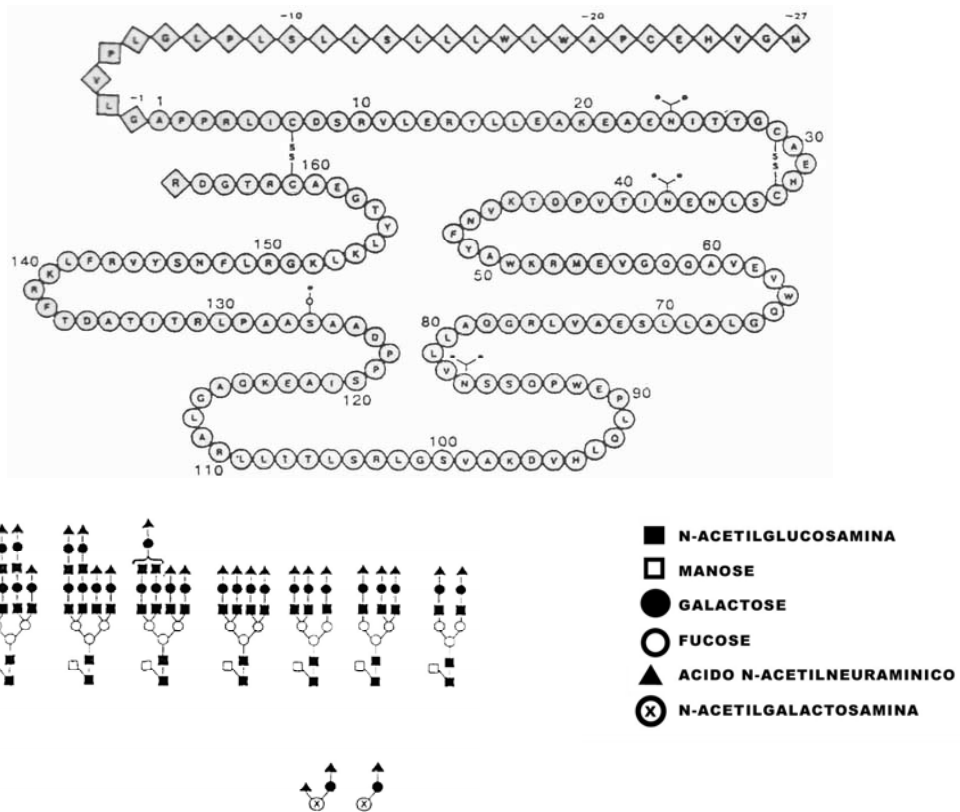


Figura 6 - Estrutura química da EPO, uma glicoproteína com PM ~ 36000 Da com 166 AA e 2 pontes dissulfídicas. Possui 2 subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ). A EPO é rica em carboidratos e contém vários oligossacarídeos ligados. O esquema acima demonstra os sítios de ligação na molécula (AAs 24; 38; 83), dos complexos mono a tetra antenados representados nas suas formas mais comuns. (GILD, e cols., 1996).

## I.4 Receptores da EPO

A partir dos estudos de YOUSSEFIAN e cols. (1993) e de FURUKAWA e cols. (1997), foi possível a descoberta do receptor da EPO em células BFU-E, as quais foram classificadas, através de estudos em pacientes portadores de policitemia vera, em BFU-E classe I que são EPO-dependentes e as BFU-E classe II que são EPO-independentes (FISHER e cols., 1994).

A redução dos níveis de  $O_2$  induz a expressão do gene da EPO nos rins (BONDURANT e KOURY, 1986; BERU e cols., 1986; SCHUSTER e cols., 1987) e no fígado (BONDURANT e KOURY, 1986; BERU e cols., 1986), conseqüentemente, a EPO ao ser liberada na corrente sanguínea é diretamente ligada à seus receptores específicos. Existem 2 subtipos de receptores, de acordo com a sua afinidade (alta ou baixa), e uma vez ligados, o complexo hormônio/receptor é rapidamente internalizado com subseqüente degradação (YU e cols., 1995; PHILO e cols., 1996). A interação da EPO ao receptor causa ativação de uma proteína

tirosina cinase (MIURA e cols., 1991) que induz a fosforilação da tirosina no próprio receptor da EPO (DUSANTER – FOURT e cols., 1992; BARBER e cols., 1997).

Cabe assinalar que, à medida que os eritroblastos vão se diferenciando, diminui progressivamente o número de receptores da EPO, chegando a quase desaparecer no estágio de eritroblasto ortocromático (SAWYER e KOURY, 1987; SAWADA e cols, 1987; FRASER, LIN e BERRIDGE, 1988 a e b), tornando-se desnecessária a presença do hormônio no processo de diferenciação dos reticulócitos em eritrócitos, ao contrário do relevante papel da EPO na formação dos reticulócitos. Os reticulócitos e os eritrócitos maduros não possuem receptores da EPO em sua membrana celular.

As células CFU-E representam o alvo principal para a ação da EPO (FISHER, 1997).

### **I.5 Papel fisiológico da EPO e emprego terapêutico da rhEPO**

Atuando sobre os progenitores da série vermelha destaca-se a Eritropoetina (EPO), principalmente pelo seu amplo emprego em terapêutica, devido ao número crescente de pacientes com anemia normocrômica- normocítica resultante de insuficiência renal crônica, nos quais a rhEPO pode reduzir ou anular a necessidade por transfusões sanguíneas, proporcionando uma melhora no quadro clínico, pois a anemia se agrava com o declínio da função renal e o hematócrito pode alcançar níveis tão baixos como de 20 a 15% (BERNADO, 2003). No Brasil, os pacientes submetidos à hemodiálise, atingem elevados índices, da ordem de 58.989 pacientes em 578 centros de diálise, segundo o censo realizado em dezembro de 2003 pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), sendo observado um crescente índice anual do número de pacientes sob hemodiálise (Quadro 2).

Quadro 2 – Número de pacientes sob Hemodiálise nos Centros de Diálise contatados no Brasil. (SBN.ORG.BR, 2004).

<u>Data do censo</u>	<u>Centros de Diálise</u>	<u>Número de pacientes</u>
Dezembro/2001	518	43.700
Dezembro/2002	560	48.874
Dezembro/2003	578	58.989

A EPO também vêm sendo utilizada no tratamento da anemia provocada por efeitos adversos à medicamentos, como o caso da Zidovudina, que utilizada no tratamento de

pacientes HIV positivos, produz anemia e leucopenia como efeito colateral em poucas semanas de tratamento, bem como, de anemia resultante de desordens inflamatórias, tal como artrite reumatóide (MARTINDALE, 1999).

Medicamentos de alto custo e obtidos por tecnologia de recombinação genética estão inseridos no Programa de Assistência Farmacêutica do SUS como medicamentos excepcionais (grupo 36), (BRASIL. PORTARIA 125, 2001). O Setor de Assistência Farmacêutica da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, em maio de 2002, informou que esse Estado, cuja população na época era de 14 milhões de habitantes, contava com 12.500 pacientes inseridos no programa de medicamentos excepcionais, tendo um gasto médio de R\$500,00/habitante/ano.

Segundo informações do Departamento de Farmácia da Secretaria Estadual de Saúde, o Estado do Rio de Janeiro possui cerca de 7.500 pacientes cadastrados no programa de renais crônicos, que consomem, atualmente, no mínimo,  $39.365 \times 10^5$  UI de rhEPO/ano.

Os medicamentos excepcionais são fornecidos através de uma guia de Solicitação de Medicamentos Excepcionais (SME), que além de prescrever o medicamento, informa os resultados dos exames hematológicos, de particular importância para justificar a prescrição médica, principalmente em relação ao hematócrito (KOPPENSTEINER e cols., 1990; GRAF e cols., 1990; BESARAB e cols., 1998), pois embora o objetivo do tratamento com rhEPO, nos pacientes com falência renal crônica, é o de aumentar esse parâmetro para 30 a 36%, a dosagem de rhEPO deve ser cuidadosamente controlada, para evitar o rápido aumento do hematócrito, que poderá induzir o aparecimento de efeitos adversos, como hipertensão e trombose. Deverá também ser considerada a taxa de aumento de hemoglobina, que deverá ser gradual, não excedendo 2 g/dL/mês. Portanto a dose máxima do hormônio não deverá exceder as 200 UI/Kg (MARTINDALE, 1999; RANG e cols., 1999).

Segundo SUASSUNA (2000), a rhEPO pode ser administrada por via endovenosa, subcutânea ou intraperitoneal, porém, a melhor relação custo-benefício é a administração subcutânea subdividida em duas ou três vezes/semana. Em estudo com pacientes sob hemodiálise, após a conversão da via endovenosa para a via subcutânea, verificou-se uma redução de 32% na dose média da rhEPO, de 140 UI/Kg/semana para 95 UI/Kg/semana.

Em indivíduos saudáveis, para a manutenção de níveis normais de hemoglobina, o organismo produz semanalmente aproximadamente 1500 UI de EPO, sendo diariamente destruídos cerca de 1% de todos os eritrócitos, que são imediatamente substituídos por reticulócitos. A produção basal normal de  $2-3 \times 10^{11}$  células/dia aumenta consideravelmente quando a disponibilidade de  $O_2$  diminui e a privação súbita de EPO acarreta hemólise de hemácias jovens através da neocitólise. A variação fisiológica humana diária do hormônio caracteriza-

se pelo aparecimento do pico da EPO sangüínea no início da madrugada e pelo registro do seu nível mais baixo, cerca de 12 horas após. A variação circadiana é pequena e não ultrapassa 20% entre os extremos. No âmbito fisiológico a liberação da EPO é promovida por hipóxia ou anemia, condições em que pode ser alcançada, cerca de 1000 vezes, a concentração normal da EPO sérica ( $6 \times 10^{-10}$  M) (SMITH e cols., 1983), ou de 4 a 36 mUI/mL com uma média de 14,9 mUI/mL registrada em 175 indivíduos envolvendo homens e mulheres, hematologicamente normais (REGE e cols., 1982).

## **I.6 - O Controle da Qualidade da rhEPO**

Diferentemente da maioria dos demais medicamentos, o controle de qualidade das proteínas recombinantes, se afigura mais complexo, pois requer a combinação de metodologias de natureza físico-química, imunológica e biológica, para a completa identificação, caracterização química e, principalmente, avaliação da potência biológica (GILD e cols., 1996).

Com relação à rhEPO, a sua identificação é obtida através da eletroforese em gel de poliacrilamida não-redutora, seguida da imunodeteção com anticorpos específicos, bem como da focalização isoeletrica, que nos irá revelar a composição das diferentes isoformas (GILD e cols., 1996).

De fato, as variações da atividade biológica da rhEPO, poderão resultar das alterações da sua estrutura molecular, reconhecidamente complexa e onde se destacam número variável de isoformas, de 5 a 8, que se diferenciam pela composição heterogênea de cadeias de carboidratos N-ligados à fração peptídica da molécula, contendo 2, 3 ou 4 ramificações ou antenas que, nas suas extremidades, apresentam uma molécula de ácido siálico. Diferenças significativas entre a composição dessas isoformas e propriedades biológicas do hormônio, foram observadas entre as rhEPOs de diferentes procedências, refletindo, muito provavelmente, variações relacionadas com: (1) a linhagem das células recombinantes usadas para a expressão do hormônio e/ou (2) as condições de cultura dessas células e/ou (3) os processos empregados para a identificação do hormônio (STORRING e GAINES, 1992; CHOI e cols., 1996; KINOSHITA e cols., 2000).

O evento complementar, porém mais importante desse controle, envolve a avaliação da potência da rhEPO, presente em produtos farmacêuticos comerciais de diferentes origens. A sua determinação, foi inicialmente realizada através do aumento do hematócrito, seguido da medida do volume total de eritrócitos e, finalmente, pela contagem do número de reticulócitos em animais de experimentação (EDER e cols., 1989; BARBONE e cols., 1994; CHOI e cols.,

1996). Para estas finalidades, os ensaios em camundongos, inicialmente policitêmicos, ou seja, camundongos com aumento do número de hemácias, e posteriormente, normocitêmicos, ou seja, camundongos com normal número de hemácias, foram sucessivamente desenvolvidos e padronizados para a avaliação da potência de produtos farmacêuticos (BRISTOW, 1997; F.E., 1999 e 2002).

O ensaio com camundongos policitêmicos, baseia-se na incorporação de  $^{59}\text{Fe}$  às células sanguíneas de animais previamente colocados em uma câmara hipobárica, isto é, sob pressão atmosférica reduzida, com a finalidade de induzir o quadro de policitemia. Além de ser um ensaio de longa duração, pois requer 3 semanas para a sua execução, utiliza radioisótopos e seu custo é elevado (KAWAMURA e cols., 1991; BARBONE e cols., 1994; CHOI e cols., 1996; F.E., 1999 e 2002). Em virtude destes inconvenientes, este teste vem sendo progressivamente substituído pelo ensaio em camundongos normocitêmicos, de duração e custo sensivelmente menores.

O ensaio com camundongos normocitêmicos baseia-se no aumento da produção de reticulócitos que, como vimos anteriormente, correspondem à última etapa da série eritróide na medula óssea. Ao passarem do espaço hematopoiético para o sangue periférico, os reticulócitos são identificados morfológicamente através do retículo endoplasmático remanescente (HAYAKAWA e cols., 1992; STORRING e GAINES, 1992; BRISTOW, 1997; F.E., 1999 e 2002).

A contagem dos reticulócitos foi inicialmente realizada através dos métodos visuais (microscópicos), representado pela coloração desses precursores dos eritrócitos com azul de cresil brilhante ou com azul de metileno, ou pela hemólise seletiva, e mais recentemente, pelo método automatizado de citometria de fluxo fluorescente, no qual a intensidade de fluorescência no reticulócito, é proporcional à quantidade de RNA presente no retículo endoplasmático remanescente (BARBONE e cols., 1994; YU e cols., 1999). Os métodos microscópicos, são mais trabalhosos e apresentam maior variabilidade e menor sensibilidade, sendo considerados menos precisos quando comparados com o método automatizado, pois analisam número reduzido de células, em torno de 2.000 (FAILACE, 1995; RAMOS, 2001), ao contrário da citometria de fluxo que, além de analisar número significativamente maior de células, cerca de 30.000 (CHANG e KASS, 1997; RUDENSKY, 1997; BRUGNARA, 1998; SANDBERG e cols., 1998; FERRAZOLI e CESCONE, 1999), exclui a possibilidade de erro humano, freqüente durante o desenvolvimento de processos manuais/visuais. O custo elevado do método automatizado é contrabalançado, não só por ser menos laborioso e pela rapidez na sua execução mas, principalmente, por apresentar reduzido índice de variabilidade e elevado

nível de sensibilidade, proporcionando, conseqüentemente, maior precisão e exatidão ao ensaio.

A avaliação da potência da rhEPO, empregando camundongos normocitêmicos, atualmente é realizada através de ensaio *in vivo* padronizado por SCHMIDT (2003) e SCHMIDT e cols., (2003), os quais se basearam nos parâmetros inicialmente indicados por ALBERTENGO e cols., (1999) e posteriormente padronizados por RAMOS (2001) e RAMOS e cols., (2003), referentes à: (1º) idade e número dos animais experimentais, (2º) seqüência logarítmica das doses, (3º) via de administração da rhEPO, (4º) modalidade de aplicação das doses, sob uma forma única ou múltipla, (5º) do período de espera para a colheita da amostra sangüínea, (6º) da metodologia de contagem dos reticulócitos.

No que se refere às linhagens de camundongos utilizados, são citadas, em literatura mais recente, fundamentalmente a CF1 e a B6D2F1, esta última indicada pela E.P. (1999; 2002), que preconiza a idade de 8 semanas como ideal para o ensaio de potência da rhEPO. A CF1, empregada por ALBERTENGO e cols. (1999) e por RAMOS (2001), RAMOS e cols. (2003), SCHMIDT (2003), SCHMIDT e cols. (2003), é também representada por camundongos de 8 semanas, de peso corporal variável entre 27 e 32 g, que revelaram razoável nível de sensibilidade aos estímulos hormonais pela rhEPO, embora estudo comparativo com a linhagem B6D2F1 não ter sido realizado.

Com relação ao sexo, está perfeitamente estabelecido que as fêmeas se comportam de forma superior aos machos, em termos de sensibilidade e de proporcionalidade nas respostas às doses crescentes de rhEPO (HAYAKAWA e cols., 1992; CHOI e cols., 1996; BRISTOW, 1997, RAMOS, 2001, ; SCHMIDT., 2003). Além disso, MALGOR e FISHER (1970) e PAULO e cols. 1974), já haviam demonstrado a influência fisiológica da testosterona na produção da EPO, estimulando a sua formação em rins isolados e perfundidos de animais, após a indução da hipóxia, fato que, seguramente, poderia interferir na avaliação biológica da potência do hormônio.

No que se refere ao número de animais empregados para cada dose, a literatura recente refere 6 (ALBERTENGO e cols., 1999) a 8 (F.E., 1999 e 2002; RAMOS, 2001; RAMOS e cols., 2003; SCHMIDT, 2003; SCHMIDT e cols., 2003) camundongos. Como veremos mais adiante, no capítulo referente a Materiais e Métodos deste trabalho, decidimo-nos pela indicação da ALBERTENGO e cols. (1999), no sentido de utilizar o menor número de animais, atendendo à Regra dos 3 erres (“Refinement, Reduction, Replacement”) em termos de redução do número de animais, de forma a empregar um total de 36 camundongos por ensaio, isto é, número 25% inferior aos 48 recomendados pela F.E., 1999 e 2002).

Diferentemente da seqüência de aplicação das doses na base 2 (20, 40 e 80 UI/animal), preconizada pela F.E. (1999; 2002), ALBERTENGO e cols. (1999) demonstraram ser mais discriminativa a curva dose-resposta da rhEPO aplicada numa seqüência geométrica de base 3 (10, 30 e 90 UI/animal), modalidade que foi posteriormente padronizada por RAMOS (2001), que aplicou o hormônio sob a forma de dose única, seguida da coleta da amostra sangüínea 96 horas após. Entretanto, para obter a precisão preconizada pelos Órgãos Reguladores, para a avaliação da potência da rhEPO presente em produtos farmacêuticos, que estabelece a obrigatoriedade da potência se situar entre 80 e 125% da declarada pelo produtor, bem como, dos seus limites de confiança não ultrapassarem os valores de 64 e 156%, foi necessária a combinação de 2 a 3 ensaios independentes para cada amostra, indistintamente das metodologias empregadas para a contagem dos reticulócitos, isto é, as manuais ou a automatizada (ALBERTENGO e cols., 1999; RAMOS, 2001).

Considerando que o emprego do hormônio na espécie humana revelou-se mais eficaz quando administrado sob a forma de doses repetidas, comparativamente à injeção única (ESCHBACH e ADAMSON, 1989; CHEUNG e cols., 1998), SCHMIDT (2003) após confirmar os resultados de ALBERTENGO e cols., 1999 e de RAMOS, 2001, decidiu otimizar o ensaio com o objetivo de reduzir o número de animais, então, introduziu a modalidade de dose múltipla, subdividida em 4 sucessivas aplicações diárias de 1, 3 e 9 UI/camundongo, seguidas da coleta do sangue 24 h após a última aplicação.

Além de potencializar os efeitos do hormônio, possibilitando usar doses totais bem menores de rhEPO, da ordem de 4, 12, 36 UI/camundongo, conferindo, portanto, maior sensibilidade ao ensaio, esta modalidade proporcionou, igualmente, respostas altamente satisfatórias com a realização de um único ensaio para cada amostra, suficiente para alcançar os limites preconizados pela EP (1999 e 2002). Além disso, os reduzidos valores dos CV%, propiciaram intervalos de confiança menores, aumentando a precisão do ensaio, a qual é consubstanciada pelo emprego da metodologia automatizada de contagem dos reticulócitos, reconhecidamente considerada de maior precisão comparativamente às metodologias manuais (ALBERTENGO e cols., 1999; RAMOS, 2001; RAMOS e cols., 2003; SCHMIDT, 2003; SCHMIDT e cols., 2003).

Entre os sistemas de ensaios estudados, visando o estabelecimento de alternativas de dosagem da rhEPO *in vitro* destacam-se o radioimunoensaio (KAWAMURA e cols., 1991; HAYAKAWA e cols., 1992; TANEBE e cols., 1992; CHOI e cols., 1996) e os bioensaios usando cultura de células de medula óssea, fígado fetal e baço. Entretanto, estes métodos apresentam a desvantagem de não diferenciarem a eritropoietina natural das formas destituídas de ácido siálico ou deglicolisadas, como a rhEPO produzida por DNA

recombinante em sistemas bacterianos (GOLDWASSER e cols., 1974; KAWAMURA e cols., 1991). Por outro lado, os imunoenaios são importantes para a determinação da EPO no soro, no acompanhamento de casos clínicos (SCHLAGETER e cols., 1990; HAYAKAWA e cols., 1992; TANEBE e cols., 1992). Já o bioensaio *in vivo* revelou-se de escolha para a avaliação da atividade eritropoiética, que reflete a eficiência clínica (HAYAKAWA e cols., 1992).

Em relação às linhagens estudadas no presente trabalho, podemos citar que a B6D2F1, linhagem híbrida, é o resultado do acasalamento utilizando como mãe a linhagem C57Bl/6J (Black 6 ou B6), e como pai a linhagem DBA/2J (DBA ou D2), (WWW.JAX). Sua curva de crescimento indica que com 8 semanas de idade, como média e DP do peso corporal, as fêmeas B6D2F1 apresentam a faixa de  $18 \pm 1$ g, sua pelagem é de cor preta. O camundongo Swiss Webster (SW), linhagem “outbred” (não consanguíneo), têm sido utilizado extensivamente por décadas para todos os propósitos na pesquisa e em testes de segurança de drogas. Sua curva de crescimento indica que com 8 semanas de idade, como média e DP para o peso corporal, as fêmeas SW apresentam a faixa de  $28 \pm 2$ g, sua pelagem é de cor branca (WWW.TACONIC).

Quadro 3 - Valores hematológicos referentes as linhagens de camundongos empregadas no presente trabalho (WWW.TACONIC).

Linhagens	hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	hemoglobina (g/dL)	hematócrito (%)
B6D2F1	$8,31 \pm 0,41$	$13,9 \pm 0,50$	$40,6 \pm 1,70$
Swiss Webster	$6,29 \pm 0,62$	$12,44 \pm 0,64$	$37,31 \pm 2,84$

De acordo com o Quadro 3, observa-se que a linhagem B6D2F1 apresenta valores hematológicos da série vermelha bem maiores, em comparação com os apresentados para a SW, a qual apresenta faixa de peso corporal mais ampla e de valores muito superiores à B6D2F1, características que podem influenciar a análise dos resultados referentes à avaliação da potência da rhEPO.

A pesquisa dos processos de registro ou de importação de medicamentos à base de rhEPO, realizada em Maio/2002 na ANVISA, demonstrou a existência de 11 marcas de produtos registrados ou importados, com um total de 8 marcas de produtos com maior abertura no mercado Brasileiro, abrangendo Alemanha, Argentina, China, Coréia do Sul, Índia e Porto Rico (USA), como países produtores da rhEPO. Esse levantamento serviu de base para a condução dos procedimentos preliminares na aquisição dos produtos para o presente estudo.



***OBJETIVOS:***

---

## II Objetivos:

O presente trabalho teve como **Objetivo Geral** a avaliação biológica da potência da EPO, sob a forma de rhEPO, presente em amostras de 7 produtos farmacêuticos comerciais, em atenção ao Programa Nacional coordenado pela **ANVISA**, referente ao Controle da Qualidade de medicamentos de elevado valor agregado e de largo emprego pela população, como ocorre com a eritropoetina, face ao crescente aumento do número de pacientes em tratamento paliativo crônico por hemodiálise.

Por outro lado, com base ao exposto no capítulo da Introdução, referente à evolução temporal do estudo desse hormônio, desde o seu isolamento até a obtenção da rhEPO, ao longo da qual foram sucessivamente incluídos novos parâmetros referentes ao seu emprego terapêutico e, principalmente, ao seu Controle da Qualidade, propuzemo-nos desenvolver os seguintes **Objetivos Específicos**:

**II.1** Reavaliar os parâmetros preconizados pela Farmacopéia Européia (F.E., 2002), no sentido de otimizar o ensaio de potência biológica da rhEPO, em termos do emprego de:

- a) linhagens de camundongos normocitêmicos, comparando a sensibilidade das linhagens B6D2F1, preconizada pela F.E. (2002) e Swiss Webster, disponível na grande maioria dos biotérios do país, em relação ao Padrão Europeu da rhEPO, devido a impossibilidade do CECAL em fornecer periodicamente a quantidade necessária para cada ensaio,
- b) modalidades de aplicação das doses da rhEPO, em seqüência geométrica de base 2 ou 3, bem como, em doses única ou múltipla,
- c) metodologia de contagem dos reticulócitos pela hemólise seletiva, comparando-a com as descritas na literatura,
- d) curva dose-resposta da rhEPO, em camundongos fêmeas, no sentido de selecionar o segmento mais apropriado dessa curva, para a obtenção da melhor relação logarítmica de potência entre o Padrão Europeu e amostras de produtos contendo a rhEPO, objetivando a primeira tentativa de comparar o ensaio biológico do tipo 3:3, 6 pontos, unanimemente aceito para a avaliação da potência da EPO, com o ensaio tipo 2:2, 4 pontos, que requer número sensivelmente inferior de animais.

***MATERIAL E MÉTODOS:***

### **III Material e métodos:**

#### **III. 1 Material**

##### **III.1.1 Padrão Biológico de Referência**

Empregou-se o Padrão Biológico de Referência de Eritropoetina Humana Recombinante da Farmacopéia Européia contendo 32.500 UI/250 µg/frasco.

##### **III.1.2 Produtos Farmacêuticos**

Recebemos o total de 8 amostras provenientes de 8 produtores de rhEPO.

##### **III.1.3 Animais de Laboratório**

Foram utilizados camundongos normocitêmicos fêmeas, pertencentes às linhagens B6D2F1 e Swiss Webster, com idade de 8 semanas e cujos pesos corporais variaram, respectivamente, de 16 a 23 g e de 25 a 42 g, animais provenientes do **CECAL/FIOCRUZ**. Na elaboração dos ensaios de potência, procurou-se utilizar os animais cujos pesos apresentassem valores próximos da média. Protocolo experimental autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), nº. PO135-02 procedimento nº. 15.

##### **III.1.4 Reagentes**

- Ácido orto - fosfórico, MERCK
- Albumina de soro Bovino, fração V, SIGMA
- Azul de Metileno, MERCK
- Citrato de sódio, MERCK
- Cloreto de sódio p.a., MERCK
- Éter etílico p.a., MERCK
- Fosfato de sódio dibásico p.a., MERCK
- Hidróxido de sódio p.a., MERCK

### **III.1.5 Soluções reagentes**

- Solução anti - coagulante, Heparina sódica 5000 UI/5 mL, Liquemine, ROCHE
- Solução hemolizante, Cianeto de potássio, Cellmlise II, CELLM.

### **III.1.6 Equipamentos e acessórios**

- Agitador de tubos AP56, PHOENIX
- Agulhas descartáveis 13 x 4,5 G, INJEX
- Autoclave mod. 39206, LUTZ FERRANDO
- Balança analítica AG204, METTLER TOLEDO
- Balança analítica HK160, METTLER
- Balança para pesagem de animais, 3000D, PRECISA
- Balões volumétricos, 10; 25; 50; 100; 500; 1000 mL, PIREX
- Banho maria DUBNOFT 145, FANEM
- Beckers, 25; 50; 100 mL, PIREX
- Bi - destilador, QUIMIS
- Bomba de vácuo, FANEM
- Caixas para tubos, criogênicas, NUNC
- Câmaras Neubauer improved, ASSISTENT
- Câmara de vidro para anestesia
- Conjuntos Stericup com membrana de 0,22 µm, MILLIPORE
- Contador de células Leuconor 2, RATHENOW
- Dispensador seriado de 10 µL, KLOEHN
- Destilador, FANEM
- Erlenmeyers, 50; 100; 250 mL, PIREX
- Estantes para tubos de ensaio
- Estufa de secagem, REVCO
- Fluxo Laminar classe II/A, VECO
- Fluxo Laminar classe II tipo B2, VECO
- Freezer – 20°C, BRASTEMP
- Freezer –70°C, REVCO
- Gaiolas plásticas, com grade metálica para contenção de animais
- Microcomputador, IBM
- Microscópio E400, NIKON

- pHmetro MP220, METTLER TOLEDO
- Pipetadoras automáticas ajustáveis, 10; 100; 200; 500; 1000 µL, EPPENDORF
- Pipetas graduadas, 10 mL, PIREX
- Pipetas volumétricas, 1; 5 mL, PIREX
- Pipetas Pasteur para coleta de sangue via plexo venoso ocular
- Ponteiras, EPPENDORF
- Refrigerador, CONSUL
- Relógio alarme, HERWEG
- Seringas descartáveis, 1 e 3 mL, BD
- Tubos criogênicos ST- 200- SS, AXYGEN
- Tubos com tampa, 0,5 mL, EPPENDORF
- Tubos de ensaio, BD
- Termo - higrômetro, TFA
- Termômetro 0-110°C, ARBA

## **III.2 Métodos**

### **III.2.1 Identificação das amostras**

As amostras foram identificadas por ordem de chegada ao INCQS, de A à H, e armazenadas em condições indicadas pelo fabricante, após a verificação do tempo de validade, excluindo-se a amostra H que chegou em condições inadequadas, sendo portanto excluída do estudo.

### **III.2.2 Tratamento dos animais de laboratório**

Os experimentos foram realizados utilizando-se 36 camundongos fêmeas/ensaio, distribuídas aleatoriamente em 6 gaiolas, de forma a elaborar um ensaio 3:3, 6 pontos. Injetou-se o hormônio por via subcutânea, ao nível da nuca dos animais, utilizando-se seringas descartáveis de 3 mL com divisões de 0,5 mL, para o esquema de dose única e de 1 mL com divisões de 0,01 mL, para o esquema de dose múltipla, com agulhas 13 x 4,5 G. As administrações de 0,5 mL para o esquema de dose única e de 0,2 mL para o esquema de dose múltipla, subdividida em 4 sucessivas aplicações diárias, foram realizadas sempre no período compreendido entre 11 às 12 horas.

Os animais foram mantidos com temperatura de  $21 \pm 2$  °C, iluminação de 12 horas/claro e 12 horas/escuro, com livre acesso a água e ração. Os animais durante o período de quarentena, de uma semana, e de teste foram manipulados sempre pelos mesmos técnicos.

### **III.2.3 Solução Tampão de fosfato de sódio a pH 7,2 com albumina bovina para a diluição das amostras e do Padrão de rhEPO**

A solução tampão foi preparada a partir da adição de 1,075 g de fosfato de sódio dibásico; 0,76 g de cloreto de sódio e 0,1 g de albumina de soro bovino, fração V, em balão volumétrico aferido para 100 mL, completando-se a capacidade nominal com água destilada.

O pH de  $7,2 \pm 0,1$ , foi ajustado com hidróxido de sódio 1N ou com ácido orto- fosfórico 1N.

Utilizou-se membrana Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ , para filtração da solução que foi armazenada em geladeira (4 °C), pelo período máximo de um mês.

### **III.2.4 Solução Padrão estoque de rhEPO para os experimentos com dose única**

O conteúdo de um frasco - ampola do Padrão Europeu, da Farmacopéia Européia, com 32.500 UI de rhEPO/frasco, foi dissolvido com solução tampão, até completar o volume de um balão volumétrico aferido para 25 mL, obtendo-se uma concentração final de 1.300 UI/mL. Em seguida, a partir desta solução, 15 frascos estoques com 1000  $\mu\text{L}$ , 10 frascos estoques com 500  $\mu\text{L}$ , 10 frascos estoques com 250  $\mu\text{L}$  e 25 frascos estoques com 100  $\mu\text{L}$ , foram preparados e mantidos por um período de uma hora em freezer a  $-70^\circ\text{C}$ , e em seguida armazenados em freezer a  $-20$  °C até o momento de uso.

### **III.2.5 Solução de trabalho para a curva padrão da rhEPO, com doses de 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 UI de rhEPO/0,5 mL**

O volume de 4923  $\mu\text{L}$  de solução padrão estoque de rhEPO, foi colocado em balão volumétrico aferido para 10 mL, completando-se a capacidade nominal com solução tampão. Desta solução, contendo 320 UI de rhEPO/0,5 mL, foram transferidos 5 mL para um 2º balão volumétrico de 10 mL que, completada a capacidade nominal com solução tampão, obteve-se a dose correspondente a 160 UI de rhEPO/0,5 mL. Para as demais doses, 5 ml da solução anterior foram transferidos para um terceiro balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se a dose de 80 UI/0,5 mL. Procedendo-se assim, sucessivamente, para a obtenção das demais doses,

isto é, 40, 20, 10 e 5 UI/0,5 mL, as quais foram transferidas para frascos apropriados que foram colocados em caixa com gelo até o momento da aplicação das injeções nos animais.

### **III.2.6 Solução de trabalho do Padrão de rhEPO, para a obtenção das doses de 20, 40 e 80 UI/0,5 mL ou de 10, 30 e 90 UI/0,5 mL em esquema de dose única, para o ensaio de potência.**

Antecedendo cada ensaio, 1231  $\mu$ L da solução padrão estoque de rhEPO foram utilizados para a obtenção das doses de 80, 40 e 20 UI/0,5 mL e 1384  $\mu$ L para a obtenção das doses de 90, 30 e 10 UI/0,5 mL.

Colocados os referidos volumes em balões volumétricos aferidos para 10 mL e completada a capacidade nominal com solução tampão, foram obtidas as doses de 80 UI/0,5 mL e de 90 UI/0,5 mL. A partir destas, foram preparadas as demais doses, transferindo 5 mL de cada dose elaborada, para o preparo da dose seguinte referente à seqüência de doses de 40 e 20 UI/0,5 mL, e 3.333  $\mu$ L de cada dose elaborada, para o preparo da dose seguinte, referente à seqüência de doses de 30 e 10 UI/0,5 mL. Em ambas as seqüência, foram utilizados balões de 10 mL, completados com solução tampão até a sua capacidade nominal. As soluções finais foram transferidas para frascos apropriados, e os mesmos colocados em caixa com gelo, até o momento da aplicação das injeções nos animais.

### **III.2.7 Solução Padrão estoque de rhEPO, para experimentos com dose múltipla**

O conteúdo de um frasco - ampola do Padrão Europeu, da Farmacopéia Européia, com 32.500 UI de rhEPO, foi dissolvido, com solução tampão, até completar a capacidade nominal de um balão volumétrico aferido para 25 mL, obtendo-se uma concentração final de 1300 UI/mL. Em seguida, a partir desta solução, 15 frascos estoques com 900  $\mu$ L e 23 frascos estoques com 500  $\mu$ L foram preparados e mantidos por um período de uma hora em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , seguindo-se por armazenagem definitiva em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento do uso.

### **III.2.8 Solução de trabalho do Padrão de rhEPO para a obtenção das doses em esquema de dose múltipla**

A cada ensaio, o volume de 865  $\mu$ L da solução padrão estoque foi utilizado para o preparo da dose de 22,5 UI/0,2 mL, completando-se a capacidade nominal do balão de 10 mL com solução tampão. Para o preparo das demais doses, 7,5 e 2,5 UI/0,2 mL, foram sucessivamente



transferidos 3.333  $\mu\text{L}$  de cada solução elaborada para balão volumétrico de 10 mL e, em seguida, completado para a capacidade nominal. Foram preparados 4 frascos/dose, para as administrações diárias, por 4 dias. O primeiro frasco de cada dose foi utilizado imediatamente e os 3 restantes de cada dose, colocados em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. Os frascos para as administrações imediatas foram mantidos em caixas com gelo até o momento da aplicação das injeções.

### **III.2.9 Solução de trabalho para as preparações das amostras, em ensaios com dose múltipla**

Foi preparada, a partir da potência declarada pelo produtor, em balão volumétrico de 10 mL, solução de cada amostra contendo 1125 UI, obtendo-se assim, a dose de 22,5 UI/0,2 mL. Para o preparo das demais doses, 7,5 e 2,5 UI/0,2 mL, foram sucessivamente transferidos 3.333  $\mu\text{L}$  de cada solução elaborada para balão volumétrico de 10 mL e, em seguida, completado para a capacidade nominal. Foram preparados 4 frascos/dose para as administrações diárias, por 4 dias. O primeiro frasco de cada dose foi utilizado imediatamente e os 3 restantes de cada dose, colocados em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. Os frascos para as administrações imediatas foram mantidos em caixas com gelo até o momento da aplicação das injeções.

### **III.2.10 Solução anti - coagulante de Heparina sódica**

O volume de 250  $\mu\text{L}$  de heparina, foi adicionado à 750  $\mu\text{L}$  de solução fisiológica (solução de NaCl a 0,9 % P/V), obtendo-se uma concentração de 250 UI/mL, que foi imediatamente utilizada.

### **III.2.11 Solução de azul de metileno**

A partir da adição de 0,03 g de azul de metileno à 3 ml de solução estoque de citrato de sódio a 4% P/V (estocada em geladeira), a solução corante foi imediatamente utilizada.

### **III.2.12 Solução hemolisante**

Adicionaram-se 80  $\mu\text{L}$  de reagente “Cellmlise II” em 1720  $\mu\text{L}$  de solução fisiológica que foi imediatamente utilizada.

### **III.2.13 Coleta de sangue**

A coleta de 200 µL de sangue de cada animal ocorreu sempre no período de 8 às 10 horas seguindo-se os Procedimentos Operacionais Padrões, (POPs) do INCQS/FIOCRUZ.

O sangue foi coletado, empregando-se pipetas Pasteur, heparinizadas com 10 µL da solução anti – coagulante, via plexo venoso ocular, em animais anestesiados pelo éter etílico.

### **III.2.14 Avaliação experimental**

A avaliação experimental foi realizada através da contagem dos reticulócitos, no sangue periférico, 96 horas após a administração da rhEPO nos grupos de animais injetados em esquema de dose única e 24 horas após a última aplicação de rhEPO nos animais em esquema de dose múltipla, períodos específicos necessários para a produção do número máximo de reticulócitos (ALBERTENGO e cols., 1999).

### **III.2.15 Contagem de reticulócitos por método da hemólise seletiva**

Dos 200 µL de sangue, coletados de acordo com o procedimento descrito no item III.2.14, 40 µL foram transferidos para tubo de ensaio contendo 40 µL de solução fisiológica e 70 µL de solução de azul de metileno a 1%. Homogeneizou-se a mistura através de um agitador orbital por 3 segundos, após os quais os tubos foram colocados em banho de água a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 1 hora. Em seguida, foram adicionados em cada tubo, 40 µL de solução hemolisante, descrita no item III.2.13, agitando-se novamente os tubos por 3 segundos e voltando a colocá-los no banho de água a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , permanecendo durante 7 minutos. Ao final deste período os tubos foram novamente agitados por 3 segundos, retirando-se, em seguida, o volume de 10 µL e transferindo-o para o segundo tubo contendo 500 µL de solução fisiológica. Deste último, foram retirados 10 µL que foram transferidos para a câmara Neubauer, para a contagem dos reticulócitos, usando microscópio com aumento de 400x, e focalizando os retículos correspondentes à área de leitura das hemácias, indicados na figura 7, utilizando 5 retículos, 4 retículos das extremidades e 1 retículo central. O procedimento descrito acima foi realizado em série de 12 tubos, correspondentes a cada dose e abrangendo 6 animais que receberam o padrão e 6 animais injetados com a amostra.

As leituras foram repetidas até 2 vezes após o término das leituras de todos os tubos, para que fosse obtido uma média e considerada como resposta para cada animal. (ALBERTENGO e cols., 1999, MOURA, 1982; GILMER, 1976; PEEBLES, 1981).

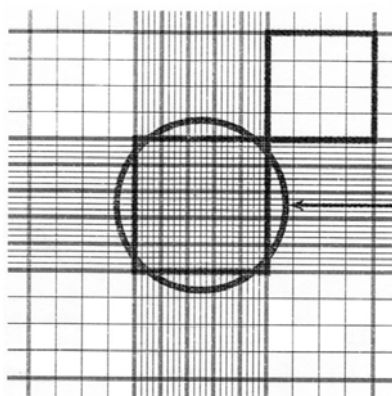


Figura 7: Imagem esquematizada da câmara Neubauer, indicando com um círculo a área para a contagem de hemácias e/ou reticulócitos.

### III.2.16 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas aplicadas no presente trabalho, basearam-se nas Farmacopéias Brasileira (1988) e Européia (F.E., 2002). Para o cálculo da potência das amostras dos produtos farmacêuticos, aplicou-se o método de Retas Paralelas, tipo 3:3, 6 pontos, descrito por Finney (1978). A validade de cada ensaio, foi evidenciada pela análise da variância, através da avaliação das significâncias da regressão linear e dos desvios da linearidade e do paralelismo, sendo considerado válido o ensaio no qual a regressão foi altamente significativa ( $P < 0,01$ ) e ambos os desvios não-significativos ( $P > 0,05$ ).

A potência e os limites de confiança ( $P = 0,05$ ) das amostras, que devem se situar, respectivamente, entre 80 e 125% e 64 e 156% (F.E., 2002), foram expressos em relação à potência declarada pelo produtor. A precisão da estimativa da potência, foi expressa pelo coeficiente para a ponderação de estimativas ( $W$ ), o qual foi também utilizado para o cálculo da potência média ponderada, na vigência da combinação de ensaios independentes. Nesta eventualidade, as estimativas de potência foram inicialmente submetidas ao teste do  $\chi^2$  ( $P = 0,05$ ), e somente as homogêneas ( $P > 0,05$ ) foram combinadas para o cálculo das médias geométricas ponderadas (Finney, 1978), que foram também utilizados para a aplicação de ensaios 2:2, 4 pontos. Para isto foram selecionados os 6 resultados referentes às doses de 30 e

90 UI/animal, do padrão e de cada amostra, fornecidos pelo ensaio 3:3, 6 pontos em esquema de doses diárias, sendo os 24 dados restantes, analisados sob a forma de blocos ao acaso.

A validade de cada ensaio, foi evidenciada pela análise da variância, através da avaliação das significâncias da regressão linear e do desvio do paralelismo, sendo considerado válido, na vigência da regressão ser altamente significativa ( $P < 0,01$ ) e o desvio do paralelismo não-significativo ( $P > 0,05$ ). A potência da amostra e os seus respectivos limites de confiança, devem respeitar os mesmos critérios assinalados no ensaio de 3:3, 6 pontos.

Para facilitar o cálculo das estimativas de potência empregando o método 3:3, 6 pontos, foram empregadas planilhas Excel, elaboradas e validadas pelo Laboratório de Farmacologia do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS/FIOCRUZ.

Os gráficos representativos das curvas dose - resposta, foram obtidos aplicando programa de computador da GraphPad Prism (4ª versão), abrangendo tanto as relações não - lineares, como as lineares, fornecendo os respectivos coeficientes de correlação,  $r^2$  e  $r$ , bem como os valores das inclinações (b). Para as análises estatísticas referentes às comparações entre 2 ou entre 3 ou mais médias, foram também utilizados programas de computação da GraphPad Prism, através da aplicação de, respectivamente, Teste t não-pareado e análise da variância, esta última complementada pelo Teste de Tukey.

***RESULTADOS:***

---

#### **IV. Resultados**

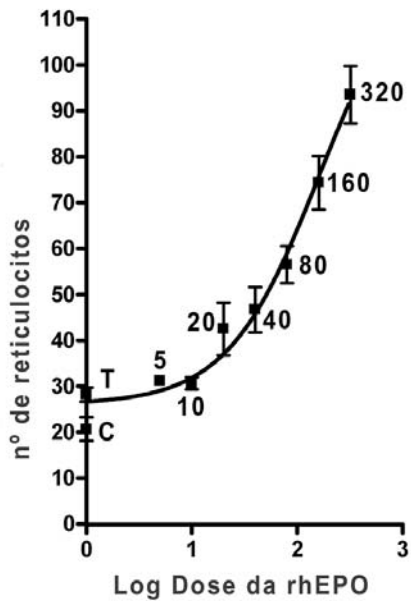
O delineamento experimental, elaborado para a execução dos ensaios biológicos para a avaliação da potência da rhEPO baseou-se, inicialmente, na análise do perfil da curva dose - resposta padrão resultante da administração de doses crescentes do hormônio, aplicado sob a forma de dose única e numa seqüência geométrica de base 2, preconizada pela Farmacopéia Européia (F.E., 2002). Entretanto, embora os primeiros resultados sugerissem o perfil de uma curva sigmóide, abrangendo, porém, somente o seu trajeto não linear inicial e parte do seu característico segmento retilíneo, tornou-se logo evidente a impraticabilidade de obtermos o efeito máximo induzido pelo hormônio. Este valor, seguramente elevado pois não foi obtido mesmo após a aplicação de doses da ordem de 320 UI/animal, (Figura 8), acarretaria um dispêndio acentuado da rhEPO, constituindo-se em fator limitante na execução dos ensaios de controle da qualidade de produtos farmacêuticos contendo a eritropoetina como princípio ativo. Muito provavelmente, este deve ter sido o motivo da literatura oficial (F.E., 2002), preconizar a delimitação de um segmento que, embora situado na porção inicial da referida curva, o seu trajeto retilíneo fosse demonstrado através da ocorrência de desvio não significativo da linearidade. Esta possibilidade, foi devidamente contemplada, através da análise estatística das retas de regressão resultantes da administração de três diferentes doses do hormônio, presente na solução do padrão de referência bem como nos produtos farmacêuticos em análise. O estabelecimento destes parâmetros, propiciou um delineamento experimental adequado para a realização de ensaios de retas paralelas do tipo 3:3, seis pontos, os quais, além da potência biológica da rhEPO presente nas amostras, analisa estatisticamente também as significâncias da regressão linear e dos desvios de linearidade e do paralelismo, além da precisão dos ensaios.

#### **IV.1 CURVAS DOSE-RESPOSTA DO PADRÃO EUROPEU DA rhEPO ADMINISTRADA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS DA LINHAGEM SWISS WEBSTER SOB A FORMA DE INJEÇÃO ÚNICA PELA VIA SUBCUTÂNEA, SEGUIDA DA AVALIAÇÃO DO EFEITO 96 HORAS APÓS.**

##### **IV.1.1 Curva dose-resposta do Padrão Europeu de rhEPO com a administração das doses em progressão geométrica na base 2, doses de 5 a 320 UI/0,5 mL/animal**

Doses crescentes da rhEPO padrão (Padrão Europeu), aplicadas numa progressão geométrica na base 2 (5, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 UI/0,5 mL/animal), proporcionaram o aumento dos reticulócitos no sangue periférico, cujos valores médios, embora proporcionais às doses, não se revelaram discriminativos em todos os níveis, devido à acentuada variabilidade intra-doses, principalmente quando do emprego das menores doses (5 a 40 UI) como evidenciam a **Figura 8** e a **Tabela 1**.

De fato, não se revelaram discriminativos os efeitos induzidos por 5 UI, em relação a 10 UI, bem como os causados por 20 UI comparativamente a 40 UI. Além disso, estas duas últimas doses apresentaram os DPs e os correspondentes CVs mais elevados, comparativamente aos demais encontrados ao longo da curva (**Tabela 1**), aspecto importante pois o CV elevado se constitui no principal fator responsável pelo aumento do intervalo entre os limites fiduciais da potência da rhEPO, com implicações diretas na precisão e na validade do ensaio.



	$r^2$	b
*	0,870	19,38 ± 5,30
**	0,948	23,25 ± 5,43
***	0,884	27,80 ± 4,10
****	0,981	52,60 ± 5,15
*****	0,999	61,46 ± 1,28

**Figura 8 – Curva dose-resposta resultante da administração subcutânea de doses crescentes de 5, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 UI/0,5 mL/animal do Padrão Europeu da rhEPO, sob a forma de dose única em camundongos fêmeas Swiss Webster. Coletou-se o sangue 96 h após. Cada ponto corresponde à média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ) de 6 animais, referente ao número de reticulócitos presentes em 5 retículos da câmara Neubauer. Os animais controles (T) foram tratados com igual volume do tampão de diluição do padrão e das amostras. **Notar os diferentes valores das inclinações (b) e dos coeficientes de correlação não linear ( $r^2$ ), nos trechos abrangendo o intervalo entre as doses de: \* 5 a 40 UI; \*\* 20 a 80 UI; \*\*\* 5 a 320 UI; \*\*\*\* 40 a 320 UI e \*\*\*\*\* 80 a 320 UI, verificando-se que este último intervalo apresenta maior inclinação e melhor correlação, sugerindo que esse segmento se encontra próximo do ponto central da curva.****



**Tabela 1 - Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de doses crescentes de 5 a 320 UI/0,5 mL/animal do Padrão Europeu de rhEPO sob a forma de dose única em camundongos fêmeas Swiss Webster.**

doses (UI/animal)	M	DP	CV (%)
0	20,67	6,28	30,38
T	28,16	3,76	13,35
5	31,17	2,23	7,15
10	30,67	3,20	10,43
20	42,50	14,05	33,06
40	46,67	12,18	26,10
80	56,50	9,89	17,50
160	74,33	14,22	19,13
320	93,50	15,31	16,37

Coletou-se o sangue 96 h após a administração das doses. Resultados correspondentes à média (**M**), desvio padrão (**DP**) e coeficiente de variação (**CV**) de 6 animais/grupo, referentes ao número de reticulócitos presentes em 5 retículos da câmara Neubauer. **0** e **T** representam os grupos controles, respectivamente o negativo e o tratado com 0,5 mL de solução tampão de diluição.

Confirmando os resultados assinalados na Figura 8 e na Tabela 1, verificamos que a administração do Padrão Europeu, em concordância com a seqüência de doses preconizada pela F.E (2002) para a execução dos ensaios de potência do hormônio, isto é de 20, 40 e 80 UI/0,5 mL/animal sob a forma de aplicação de dose única, apresentaram sistematicamente elevados DPs e índices de CV, respectivamente 4,35 a 18,46 e 12,88 a 42,96, como claramente mostra a **Tabela 2** na qual verifica-se também que em 100% dos ensaios os CVs apresentam valores superiores a 10%, condição que tornou impraticável a análise de potência das amostras dos diferentes lotes de produtos farmacêuticos, empregando-se essa modalidade de administração da rhEPO.

**Tabela 2 - Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea das doses de 20, 40 e 80 UI/0,5mL/animal do Padrão Europeu de rhEPO sob a forma de dose única em camundongos fêmeas Swiss Webster.**

Doses Ensaio	20 UI			40 UI			80 UI		
	M	DP	CV(%)	M	DP	CV(%)	M	DP	CV(%)
1°	35,17	09,64	27,41	54,67	<b>18,46</b>	33,77	62,83	15,39	24,49
2°	33,33	05,32	15,96	44,33	07,82	17,64	54,67	07,31	13,37
3°	31,60	05,89	18,64	34,33	08,48	24,70	54,00	17,86	33,07
4°	28,00	10,71	38,25	40,83	17,54	<b>42,96</b>	52,33	15,94	30,46
5°	38,67	11,55	29,87	46,00	10,92	23,74	55,83	10,44	18,70
6°	35,50	12,34	34,76	55,83	07,19	<b>12,88</b>	64,17	17,52	27,30
7°	29,83	06,24	20,92	38,17	14,32	37,52	48,00	08,88	18,50
8°	33,00	08,34	25,27	43,50	06,89	15,84	56,17	09,72	17,30
9°	31,83	<b>04,35</b>	13,67	32,50	12,16	37,41	50,00	08,51	17,02
10°	33,83	10,80	31,92	46,33	08,82	19,04	59,17	13,95	23,27

Coletou-se o sangue 96 h após a administração das doses. Valores correspondentes à **M**, **DP** e **CV(%)**, como referido na tabela 1, de 6 animais/dose, referentes ao número de reticulócitos presentes em 5 retículos da câmara Neubauer. **Notar** os elevados valores de DP e CV, cujos respectivos extremos (04,35 a 18,46 e 12,88 a 42,96) estão assinalados em negrito.

#### **IV.1.2 Curva dose-resposta do Padrão Europeu de rhEPO com a administração das doses em progressão geométrica na base 3, doses de 10; 30 e 90 UI/0,5 mL/animal**

Frente a essas condições inadequadas, recentemente optou-se por um espaçamento geométrico de fator 3, inicialmente sugerido por ALLBERTENGO e cols. (1999), e posteriormente padronizado por RAMOS (2001), que selecionaram as doses de 10, 30 e 90 UI/0,5 mL/animal, mantendo, porém, a modalidade de dose única. Embora esta nova condição tenha proporcionado efeitos mais discriminativos, continuaram presentes os elevados índices de variabilidade intra-doses (CVs de 9,66 a 31,69), como mostra na **Tabela 3**, na qual se afigura evidente a proximidade de efeitos induzidos pelo hormônio e pela solução tampão diluente da rhEPO, cuja diferença não é significativa ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 3 - Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea das doses de 10, 30 e 90 UI/ 0,5 mL/ animal de Padrão Europeu de rhEPO, sob a forma de dose única em camundongos fêmeas Swiss Webster.**

	0			T			10 UI			30 UI			90 UI		
<b>Ensaio</b>	<b>M</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>	<b>M</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>	<b>M</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>	<b>M</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>	<b>M</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>
1°-	-	-	-	-	-	-	35,60	06,36	17,86	42,70	05,58	13,07	60,90	09,16	15,04
2°-	22,17*	04,45	20,07	33,00*	05,21	15,79	33,67*	05,43	16,13	43,83	04,71	10,75	59,83	05,78	<b>09,66</b>
3°-	-	-	-	-	-	-	35,50	11,25	<b>31,69</b>	46,33	07,53	16,25	68,00	11,15	16,40
4°-	20,67**	06,28	30,38	28,16**	03,76	13,35	30,67**	03,20	10,43	45,17	07,28	16,12	72,17	09,91	13,73
<b>MM</b>	<b>0</b>			<b>T</b>			<b>10 UI</b>			<b>30 UI</b>			<b>90 UI</b>		
	21,42			30,58			33,86			44,51			65,22		

Coletas de sangue e valores correspondentes à **M**, **DP** e **CV(%)** de 6 animais/dose, como indicado na Tabela 1. **MM**, refere-se à média dos valores médios (**M**). **0** e **T**, representam os grupos controles, respectivamente o negativo e o tratado com 0,5 mL de solução tamponada de diluição da rhEPO. As análises das variâncias, envolvendo os resultados desencadeados por estes grupos controles e pela dose 10 UI, indicados por um asterisco (\*) no 2° ensaio e dois (\*\*) no 4° ensaio, revelaram em ambas as análises, diferenças significativas entre **0** e **10 UI** ( $P < 0,01$ ) e **0** e **T** ( $P < 0,01$  no 2° ensaio e  $P < 0,05$  no 4° ensaio) e diferenças não-significativas ( $P > 0,05$ ) entre **T** e **10 UI**. Notar que os elevados valores de **CV** continuam presentes, embora seus limites extremos, evidenciados em negrito (**09,66** e **31,69**), se revelem inferiores aos assinalados na **Tabela 2**.

## **IV.2 CURVAS DOSE-RESPOSTA DA rhEPO PRESENTE NO PADRÃO EUROPEU E NAS AMOSTRAS DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS, ADMINISTRADA PELA VIA SUBCUTÂNEA EM CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, FÊMEAS, SOB A FORMA DE DOSE MÚLTIPLA SUBDIVIDIDA EM QUATRO SUCESSIVAS APLICAÇÕES DIÁRIAS SEGUIDAS DA AVALIAÇÃO 24 HORAS APÓS A ÚLTIMA APLICAÇÃO.**

Nesta nova programação, padronizada por SCHMIDT (2003), o hormônio foi aplicado na mesma seqüência de doses de 10, 30 e 90 UI/animal, porém cada uma delas subdividida em quatro sucessivas aplicações diárias de, respectivamente, 2,5; 7,5 e 22,5 UI/0,2 mL/camundongo. A injeção repetida do hormônio, além de proporcionar resultados sensivelmente maiores, comparativamente aos obtidos com dose única, os mesmos se revelaram mais consistentes e homogêneos além de bem discriminativos, notando-se acentuada diminuição das variabilidades intra - doses, com conseqüente queda dos DPs e dos CVs, como ilustra mais adiante a **Tabela 4**, referente aos resultados obtidos com o Padrão Europeu de rhEPO ao longo de todos os ensaios realizados para a análise de potência do hormônio presente em produtos farmacêuticos, empregando-se a linhagem Swiss Webster, apresentados na **Tabela 5**, bem como nos experimentos, na **seção IV.4**, em que se comparou a sensibilidade desta linhagem com a linhagem B6D2F1, preconizada pela F.E. (2002).

### **IV.2.1 Curvas dose-resposta do Padrão Europeu de rhEPO administrado pela via subcutânea em camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster sob a forma de dose múltipla.**

Foram realizados 7 ensaios em que se aplicou o Padrão Europeu da rhEPO, sob a forma de doses repetidas de 2,5; 7,5 e 22,5 UI/0,2 mL/animal/dia, para o total de 10, 30 e 90 UI/animal, a fim de poder comparar os resultados descritos na Tabela 4, com os correspondentes da Tabela 3 obtidos com o mesmo Padrão e pelas mesmas doses, aplicadas porém sob a forma de dose única. Em dois desses ensaios (**1°** e **6°**), foi incluído um quarto grupo de 6 animais que foram injetados com a solução tampão diluente da rhEPO, na seqüência de 0,2 mL/animal/dia, durante 4 dias. Como evidencia a Tabela 4, o valor da média das médias (**MM**) deste Tampão (**T**) é praticamente da mesma ordem de grandeza do correspondente da Tabela 3, embora tenha sido injetado uma única vez. Entretanto, os aumentos altamente significativos (**P<0,001**) dos efeitos induzidos indistintamente pelas 3 doses (10, 30 e 90 UI) sob a forma de doses repetidas, em comparação aos correspondentes valores registrados na Tabela 3,

proporcionaram uma diferença também altamente significativa ( $P<0,001$ ) entre os efeitos induzidos pelo tampão e pela dose de 10 UI (Tabela 4).

**Tabela 4 - Contagens microscópicas de reticulócitos, pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de doses de 2,5; 7,5 e 22,5 UI/0,2 mL/animal de Padrão Europeu da rhEPO sob a forma de 4 sucessivas aplicações diárias em camundongos fêmeas Swiss Webster para um total de 10, 30 e 90 UI/animal.**

DOSES – (UI/animal)												
T			10			30			90			
M	DP	CV	M	DP	CV	M	DP	CV	M	DP	CV	
<b>Ensaio</b>												
1°-	36,17*	08,23	22,78	65,17*	05,38	08,25	89,17	05,04	05,65	102,17	08,38	08,20
2°-	-			73,83	08,61	<b>11,66</b>	96,83	11,12	<b>11,48</b>	115,00	07,65	06,64
3°-	-			71,67	05,24	07,31	90,66	06,15	06,78	115,33	04,18	03,62
4°-	-			63,33	04,63	07,31	85,00	06,39	07,52	106,33	08,26	07,77
5°-	-			64,17	09,04	<b>14,09</b>	89,33	04,92	05,52	106,33	05,95	05,59
6°-	31,00*	05,40	17,42	60,83*	04,35	07,15	92,50	06,53	07,06	110,00	07,82	07,11
7°-	-			81,83	08,75	<b>10,69</b>	96,50	07,37	07,64	113,33	05,89	05,20
<b>T</b>			<b>10 UI</b>			<b>30 UI</b>			<b>90 UI</b>			
<b>MM</b>	33,58			68,69			91,43			109,35		

Coletou-se o sangue 24 h após a última aplicação das doses repetidas. Valores **M**, **DP** e **CV(%)**, como assinalado nas **Tabelas 1, 2 e 3**. **T**, indica a aplicação repetitiva de 0,2 mL/animal, da solução tampão, em grupos de 6 animais. **Notar: 1°)** que a grande maioria dos **CVs**, são sensivelmente inferiores aos encontrados no esquema de dose única (**Tabelas 1, 2 e 3**); **2°)** que os únicos valores de **CVs** superiores a 10%, assinalados em negrito, ocorreram com as menores doses de rhEPO; **3°)** que a **MM** do grupo **T** é da mesma ordem de grandeza do valor correspondente assinalado na **Tabela 3**, porém bem inferior ao efeito induzido por 10 UI, cuja análise estatística revelou diferença altamente significativa ( $P<0,0002$ ). Resultado análogo ( $P<0,0001$ ) foi obtido analisando-se o 1° e/ou o 6° ensaios, usando-se as médias e os respectivos 6 valores de cada grupo, assinalados por um asterisco (\*); **4°)** que os efeitos (**MM**) induzidos pelas 3 doses (**10, 30 e 90 UI/animal**), são marcadamente superiores aos correspondentes obtidos com o esquema de dose única (**Tabela 3**), cuja análise da variância revelou diferenças altamente significativas ( $P<0,001$ ), indistintamente, para as 3 doses.

#### **IV.2.2 Ensaios biológicos de potência da rhEPO presente em produtos farmacêuticos em comparação com o Padrão Europeu através da aplicação de dose múltipla do hormônio em camundongos da linhagem Swiss Webster, fêmeas.**

Os resultados da Tabela 4, onde se destacam os reduzidos valores de DP e, conseqüentemente, dos CVs, estes últimos apresentando valores variáveis entre 3,62 e 14,09, dos quais, a grande maioria (81%) abaixo de 10, proporcionaram condições adequadas para uma análise comparativa da rhEPO Padrão, com a presente nas amostras provenientes de produtos farmacêuticos.

Com efeito, os resultados obtidos nessas avaliações de potência, ao serem submetidas ao cálculo estatístico de Retas Paralelas 3:3, seis pontos, demonstraram a sua validade por cumprir os requisitos de regressão, paralelismo e linearidade.

Com exceção da amostra F, cujo resultado se afigura bem inferior ao declarado, em virtude dos demais ensaios apresentarem reduzidos valores de CVs intra - doses, variáveis de 1,38 a 14,09, incluindo-se os valores do padrão e das amostras, executou-se somente um único bioensaio para cada produto, cujas precisões são evidenciadas pelos elevados valores do coeficiente para a ponderação das estimativas (W), variáveis entre 230 e 1012, e pelos valores menores que 1,1 e próximos da unidade, apresentados pelo fator C, referente à precisão da inclinação das retas.

Somente a amostra F foi submetida a um segundo bioensaio, confirmando o resultado insatisfatório do primeiro. Da combinação das estimativas dos dois bioensaios da amostra F, resultou a potência transcrita na **Tabela 5**, a qual não indica o valor para o fator C da análise da amostra F, pois o resultado do fator C é característico para os testes independentes e não para a combinação das estimativas de potência.

**Tabela 5 - Potência, limites fiduciais (P=0,95) e precisão das estimativas de avaliação comparativa de rhEPO presente em produtos farmacêuticos com o Padrão Europeu em ensaios biológicos com injeção múltipla do hormônio e contagem dos reticulócitos pelo método da hemólise seletiva.**

**Potência estimada para as amostras e seus coeficientes de avaliação da precisão.**

Amostra	Potência			Limites de confiança (P=0,95)	Precisão	
	declarada (UI/mL)	encontrada (UI/mL)	%		C	W
A	1000	1159,30	115,93	92,38 - 146,19	1,02	427
B	2000	2214,62	110,73	81,23 - 151,88	1,03	230
C	1500	1593,07	106,20	84,61 - 133,56	1,01	432
D	4000	4202,07	105,05	80,19 - 137,93	1,02	306
E	1000	1026,08	102,61	88,41 - 119,13	1,01	1012
F**	2000	1008,95	50,45	41,15 - 61,85	-	516
G	16.666	17230,07	103,39	81,99 - 130,51	1,02	416

Coletou-se o sangue 24 h após a última aplicação das doses. **W** = coeficiente para a ponderação da estimativa; **C** = precisão da inclinação das retas, e \*\* indicam que foram realizados 2 ensaios independentes combinados cujo resultado é expresso em potência média ponderada (**R**) e seus limites de confiança.

#### **IV.3 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS LINHAGENS B6D2F1 E SWISS WEBSTER EM RESPOSTA À INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DO PADRÃO EUROPEU DA rhEPO SOB A FORMA DE DOSE MÚLTIPLA SUBDIVIDIDA EM QUATRO SUCESSIVAS APLICAÇÕES DIÁRIAS.**

Embora as curvas dose-resposta do hormônio em relação às duas linhagens, apresentem perfil análogos, as **Tabelas 6 e 7** mostram com evidência que nos três bioensaios realizados, os camundongos fêmeas da linhagem B6D2F1, preconizada pela F.E. (2002), se revelaram 24% mais sensíveis ao Padrão Europeu da rhEPO (**Tabela 6**), comparativamente à linhagem Swiss Webster. Este valor resultou da combinação desses três bioensaios, a qual proporcionou um elevado valor referente ao coeficiente para a ponderação (W), da ordem de 1.541, resultado que indica a alta precisão desses ensaios. Em virtude da significativa diferença entre os pesos corporais das duas linhagens, no mesmo período de crescimento de 8 semanas, esses valores ponderais foram incluídos na **Tabela 6**, pois serão analisados em termos de prováveis integrantes dos fatores responsáveis por essa diferença de sensibilidade das duas linhagens à produção de reticulócitos induzida pela rhEPO.



**Tabela 6 - Ensaio de Retas Paralelas para a avaliação comparativa da sensibilidade entre as linhagens B6D2F1 e Swiss Webster em resposta à aplicação subcutânea do Padrão Europeu de rhEPO sob a forma de doses crescentes de 2,5; 7,5 e 22,5 UI/0,2 mL/animal em esquema de quatro sucessivas aplicações diárias em camundongos fêmeas, para um total de 10, 30 e 90 UI/animal.**

<u>Estimativa da sensibilidade de Swiss Webster frente ao B6D2F1</u>															
Peso corporal (g)							Estimativas				Combinação das estimativas				
Ensaio	B6D2F1			Swiss Webster			S (%)	S.inf. - S.sup. (%)		C	W	S (%)	S.inf. - S.sup. (%)		W
	M	DP	CV	M	DP	CV									
1°	18,08	01,29	07,13	31,42	01,85	05,89	75	58	-	96	1,02	360			
2°	18,78	01,06	05,64	35,91	02,05	05,71	78	60	-	101	1,02	340	76	67 - 85	1541
3°	19,16	01,06	05,53	30,89	01,63	05,28	75	64	-	88	1,01	841			
<b>MM</b>	18,67			32,74											

Os valores indicados por **M**, **MM**, **DP** e **CV**, como assinalados nas tabelas anteriores, porém em relação ao peso de 6 animais de cada grupo de ambas as linhagens, cuja análise estatística revelou diferenças altamente significativas (**P<0,01**) entre os pesos das duas linhagens que foram avaliadas separadamente através de ensaios independentes, ou globalmente comparando-se as **MMs** resultantes dos 3 ensaios de cada linhagem. O percentual de sensibilidade (**S%**) da B6D2F1, revelou-se 76% superior à Swiss Webster, com limites fiduciais próximos além de elevados índices de exatidão, revelados pelos valores de **C** (fator de precisão da inclinação da reta) em torno de 1,0 e pelos elevados valores de **W** (coeficiente para a ponderação) que na combinação das 3 estimativas da sensibilidade, atingiu valores da ordem de 1541.

**Tabela 7 - Contagens microscópicas de reticulócitos, pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de doses de 2,5; 7,5 e 22,5 UI/0,2 mL/animal de Padrão Europeu da rhEPO sob a forma de 4 sucessivas aplicações diárias em camundongos fêmeas B6D2F1 e Swiss Webster para um total de 10, 30 e 90 UI/animal.\***

Ensaio	doses	B6D2F1			Swiss Webster		
		M	DP	CV	M	DP	CV
1°	10	73,83	05,11	06,96	69,67	07,53	10,81
	30	98,50	05,61	05,69	91,17	09,09	09,97
	90	113,33	06,98	06,16	109,50	05,32	04,86
2°	10	71,33	05,08	07,12	65,50	07,26	11,08
	30	96,83	05,42	05,60	92,00	07,64	08,30
	90	112,00	06,35	05,67	108,67	09,69	08,97
3°	10	77,33	07,89	10,20	70,83	02,64	03,73
	30	97,17	01,60	01,65	88,17	06,49	07,36
	90	118,50	04,04	03,41	117,00	02,00	01,71

\* Resultados referentes ao estudo comparativo entre as duas linhagens, ilustrado resumidamente na tabela 6. Os valores assinalados por **M**, **DP** e **CV**, como indicados nas tabelas anteriores, em relação ao número de reticulócitos de 6 animais de cada grupo de doses para ambas as linhagens estudadas. Notar que os valores de CVs maiores referem-se ao emprego da menor dose (10 UI/animal).

#### **IV.4 ESTUDO COMPARATIVO PARA AVALIAR A VARIÁVEL PESO CORPORAL, EMPREGANDO GRUPOS DE ANIMAIS DA MESMA IDADE, PORÉM, DE PESOS DIFERENTES DA LINHAGEM SWISS WEBSTER, EM RESPOSTA À INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DO PADRÃO EUROPEU DA rhEPO SOB A FORMA DE DOSE MÚLTIPLA SUBDIVIDIDA EM QUATRO SUCESSIVAS APLICAÇÕES DIÁRIAS.**

No sentido de evidenciarmos uma possível correlação entre o peso corporal dos animais, com a amplitude das respostas induzidas pela rhEPO em termos de produção de reticulócitos, foram realizados ensaios preliminares empregando-se fêmeas de camundongos da linhagem Swiss Webster, de 8 semanas de idade, porém com acentuada variação ponderal. Isto possibilitou a formação de dois grupos de animais, bem delineados em termos de homogeneidade de peso, com amplitude suficiente para se diferenciarem significativamente (**P<0,05**) dos integrantes do grupo oposto, recebendo as denominações de grupos **leve** e **pesado**, assinalados na **Tabela 8**.

Foram realizados 3 ensaios com cada grupo, através da aplicação de 10 UI de rhEPO, sob a forma de doses repetidas ou múltipla, subdividida em 4 aplicações de 2,5 UI/0,2 mL/dia. Os resultados ilustrados na **Tabela 8**, mostram diferenças significativas (**P<0,05**), entre os pesos dos 2 grupos, verificando-se que os animais mais leves respondem de forma mais acentuada aos estímulos hormonais da rhEPO em termos de produção de reticulócitos, com diferenças significativas (**P<0,05**) em relação aos animais pesados. Complementando esta particularidade, merece ser destacada a resposta bem mais homogênea dos animais leves, cujos valores médios são acompanhados por DPs e CVs de expressão bem inferior aos encontrados nos animais pesados (**Tabela 8**), aspecto da maior relevância em termos de maior exatidão e precisão dos ensaios biológicos e que poderá desempenhar papel importante no eventual emprego rotineiro dessa linhagem para a avaliação de potência da rhEPO.

**Tabela 8 - Contagens microscópicas de reticulócitos pelo método da hemólise seletiva em resposta à administração subcutânea de 2,5 UI/0,2 mL/animal de Padrão Europeu da rhEPO, sob a forma de dose múltipla para o total de 10 UI/animal, em camundongos fêmeas, Swiss Webster de 8 semanas de idade, porém de pesos diferentes.**

Grupos	<u>Peso corporal (g)</u>						<u>Número de reticulócitos</u>					
	Leve			Pesado			Leve			Pesado		
Ensaio	M	DP	CV	M	DP	CV	M	DP	CV	M	DP	CV
1°	28,80	0,45	1,56	38,04	0,79	2,08	80,00	<b>4,30</b>	<b>5,37</b>	70,40	<b>7,30</b>	<b>10,37</b>
2°	33,50	2,22	6,62	41,82	1,14	2,72	74,20	<b>1,30</b>	<b>1,75</b>	66,80	<b>4,21</b>	<b>06,30</b>
3°	32,48	1,74	5,36	40,62	1,19	2,93	75,40	<b>4,50</b>	<b>5,97</b>	65,00	<b>8,45</b>	<b>13,00</b>
	<b>Leve</b>			<b>Pesado</b>			<b>Leve</b>			<b>Pesado</b>		
<b>MM</b>	31,59*			40,16*			76,53**			67,40**		

**M, DP, CV e MM**, como indicados nas tabelas anteriores. As **MMs**, assinaladas com um (\*) asterisco, referente ao peso corporal e com dois (\*\*), referente à produção de reticulócitos, submetidas à análise estatística pelo Teste t, revelaram-se significativamente diferentes (**P<0,05**). **Notar**: que os grupos significativamente mais leves (**31,59\***) causaram uma resposta significativamente (**P<0,05**) maior de produção de reticulócitos (**76,53\*\***), além de mais homogênea, pois são evidentes as menores variações dos **DP** e **CV**, **assinaladas em negrito**, nos animais mais leves comparativamente aos mais pesados, indistintamente, nos 3 ensaios biológicos.

***DISCUSSÃO:***

---

## V – DISCUSSÃO

A produção de EPO pela tecnologia do DNA recombinante, obtendo-se a rhEPO, que é representada por uma glicoproteína complexa com grau variável de isoformas, tornou absolutamente necessário o emprego de ensaios *in vivo* para a avaliação de sua potência biológica (LOWRY e cols., 1960; TRAN e cols., 1991; MORIMOTO e cols., 1996; RHODE, 1998). Analogamente aos congêneres, esses ensaios se caracterizam pela sua elevada variabilidade, a qual torna-se particularmente evidente quando os produtos em análise não são administrados por unidade de peso, mas por animal, como ocorre no ensaio da potência da rhEPO.

Devido à existência dessa variabilidade, que é avaliada pela medida dos coeficientes de variação (CV%), que podem atingir graus elevados, às vezes suficientes para invalidar os ensaios, depreende-se facilmente a primordial finalidade na elaboração dos testes *in vivo*, qual seja a de minimizar ao máximo o nível de variabilidade das respostas fisiológicas ou farmacológicas dos animais, aos estímulos induzidos por agentes químicos de origem endógena ou exógena. A inobservância deste controle, poderá inviabilizar a aplicação de análises estatísticas sofisticadas, especificamente elaboradas para cada ensaio biológico *in vivo*.

O ensaio de potência da rhEPO, não fugiu a essa regra e as considerações descritas a seguir, exemplificam com evidência a evolução de alguns aspectos envolvidos no amplo estudo visando determinar os níveis adequados de sensibilidade e de variabilidade biológicas para a elaboração de um ensaio dessa natureza. Com efeito, fundamentando-se no aumento do número de reticulócitos no sangue periférico, em resposta a doses crescentes do hormônio pela via subcutânea em camundongos de pesos variando entre 16 e 20 g e entre 28 e 34 g, respectivamente das linhagens B6D2F1 e Swiss Webster, elevado índice de variabilidade revelou-se de forma evidente e comparável ao previamente descrito empregando-se outra linhagem de camundongos, a CF1, de peso variando entre 26 e 32 g (ALBERTENGO e cols., 1999; RAMOS, 2001; RAMOS e cols., 2003; SCHMIDT e cols., 2003). De fato, nossos primeiros resultados, administrando doses crescentes do hormônio, sob a forma de aplicação única, segundo uma seqüência geométrica de base 2, seguida da colheita de sangue, 96h após, revelou elevados CVs, que inviabilizaram a grande maioria dos nossos ensaios preliminares (**Tabelas 1 e 2; págs 38 e 39**). Assinale-se que, procurando realizar ensaios mais precisos e exatos, em analogia à linhagem CF1, colhemos as amostras sangüíneas no período em que o nível de resposta do hormônio, é mais significativo e os valores de CV menos acentuados (ALBERTENGO e cols., 1999; RAMOS, 2001), bem como usamos somente as fêmeas, cujo

CV médio intra-doses é sensivelmente menor (13,1%) do observado com os machos (20,3%) (SCHMIDT e cols., 2003), este último resultado corrobora com dados da literatura (HAYAKAWA e cols.,1992; CHOI e cols., 1996, BRISTOW, 1997; RAMOS, 2001;F.E., 2002).

Não obstante a adoção desses cuidados, o fator de variação ocorreu indistintamente e praticamente na mesma intensidade, nas duas linhagens empregadas em nossos experimentos, bem como na CF1 (ALBERTENGO e cols., 1999; RAMOS, 2001; SCHMIDT e cols., 2003), sugerindo que essa variabilidade não deva estar fundamentalmente relacionada com determinada linhagem mas, muito provavelmente, com as modalidades do estímulo hormonal empregado, bem como as diferentes metodologias usadas para a contagem dos reticulócitos.

Em termos de estímulo hormonal, destacam-se os dois modelos de aplicação das doses, isto é sob as formas de doses única ou múltipla, bem como a amplitude do intervalo entre elas. Com relação a este último, embora a FE (2002), preconize uma seqüência geométrica das doses na base 2, verificamos que o emprego da seqüência de 5, 10 20, 40, 80, 160 e 320 UI do hormônio, induz efeitos pouco discriminativos, principalmente com as menores doses que estão situadas muito próximas (**Fig. 8, Tab. 1; págs 37 e 38**), resultados que corroboram com os obtidos por ALBERTENGO e cols.(1999), que sugeriram uma seqüência geométrica na base 3, indicando as doses de 10, 30 e 90 UI/animal. O aumento de forma nítida dos espaçamentos entre as doses proporcionou uma curva mais discriminativa, como demonstrou RAMOS (2001) ao padronizá-la experimentalmente, aplicando o hormônio sob a forma de dose única, embora continuassem elevados os níveis de CV, principalmente em relação às duas primeiras doses, com implicações diretas sobre o desenvolvimento dos ensaios de potência da rhEPO. Além dos CVs elevados, observou-se que a dose de 10 UI/0,5mL/animal, aplicada sob a forma de dose única, promove resultados próximos dos induzidos pelo tampão usado para diluir a rhEPO (**Tabela 3, pg 40**), em relação ao qual comprovou-se não existirem diferenças significativas (**P>0,05**), fato que chegou a determinar a exclusão de animais, dos cálculos estatísticos dos ensaios de avaliação da potência da rhEPO, caso evidenciassem respostas inadequadas (STORRING e GAINES, 1992; BRISTOW, 1997), aspecto inegavelmente importante mas que foi recentemente minimizado, com a introdução da modalidade de aplicação do hormônio sob a forma de aplicações repetidas, padronizada por SCHMIDT (2003) e SCHMIDT e cols., 2003) e por nós confirmados neste trabalho, como veremos mais adiante.

Entretanto, a avaliação da potência da rhEPO, continua a ser preconizada pela F.E. (2002), através da aplicação do hormônio sob a forma única, embora RAMOS (2001), ao comparar os métodos visuais, de coloração com azul de cresil brilhante e de hemólise seletiva, com o

método automatizado de citometria de fluxo, verificou que, indistintamente, são necessários, pelo menos, 2 ou mais ensaios independentes, para os limites de confiança da potência da rhEPO se situarem no intervalo preconizado pela literatura oficial (F.E., 2002), isto é, entre 64 e 156%, embora o ensaio automatizado tenha propiciado maior exatidão, confiabilidade e rapidez, ao contrário dos dois primeiros que são mais trabalhosos e demorados e com maiores riscos de erros inerentes aos métodos visuais (ALBERTENGO e col., 1999; RAMOS, 2001; RAMOS e cols., 2003).

Frente a esse uso excessivo de animais e considerando que o emprego do hormônio na espécie humana, baseou-se em estudos farmacocinéticos que proporcionaram esquemas terapêuticos nos quais, em geral, o hormônio é administrado sob a forma de injeções múltiplas, isto é, 3 vezes por semana (ESCHBACH e ADAMASON, 1989). SCHMIDT (2003) aprimorou e padronizou o ensaio de potência da rhEPO, complementando os trabalhos de ALBERTENGO e cols. (1999) e RAMOS, 2001), utilizando o método automatizado de citometria de fluxo, para a contagem dos reticulócitos sangüíneos e aplicando o hormônio sob a forma de dose múltipla, isto é, subdividida em 4 sucessivas aplicações diárias, comparando-o com o de dose única. SCHMIDT (2003) verificou que o estímulo diário dos animais produziu aumento significativo no nível de reticulócitos, resultado que se estendeu até com doses totais reduzidas de rhEPO da ordem de 4, 12 e 36 UI/animal, sensivelmente inferiores às usadas, porém na mesma proporção, nos ensaios de dose única (EDU), isto é de 10, 30 e 90 UI/animal. Este resultado, além de conferir maior grau de sensibilidade, ao ensaio de dose múltipla (EDM), revelou também que este último utiliza menores quantidades de hormônio. A associação destes dados, com as acentuadas quedas dos CVs intra-doses (**Tabela 4, pág 42**) e o aumento significativo da precisão, calculada através dos elevados valores de ponderação estatística (W), possibilitou a realização de um único ensaio de potência para a avaliação de amostras de 12 produtos farmacêuticos SCHMIDT (2003), em virtude de todos eles apresentarem, valores de potência e respectivos limites fiduciais cumprindo os parâmetros indicados pelo Órgãos Reguladores (F.E., 2002), que preconizam os intervalos de 80% a 125% e de 64% a 156%, respectivamente, para a potência e para os seus limites de confiança. Os EDUs, pelo contrário, necessitaram a combinação de, pelo menos, 2 ensaios independentes (RAMOS, 2001; SCHMIDT, 2003), para o seu “ajuste” nas referidas especificações, embora o intervalo dos limites fiduciais da potência apresentassem maiores amplitudes, comparativamente aos EDMs, aspectos que demonstram que, além da economia de hormônio, verifica-se também uma evidente redução do número de animais, revelando-se o EDM uma alternativa altamente válida em relação à metodologia preconizada pela F.E. (1999 e 2002).



A padronização desses novos parâmetros biológicos, para a elaboração do EDM, proporcionou uma avaliação adequada da potência biológica da rhEPO, presente nos produtos farmacêuticos analisados no presente trabalho, como mostra a **Tabela 5 (pág 44)** na qual estão elencados os resultados obtidos com todas as amostras. Com exceção da catalogada com a letra F, cuja potência se revelou marcadamente inferior à declarada, os resultados obtidos com as demais amostras, corroboram com os descritos por SCHMIDT (2003), em vários aspectos. Com efeito, submetidos ao cálculo estatístico de retas paralelas, os resultados dos nossos ensaios demonstram a sua validade ao cumprir os requisitos de paralelismo, linearidade e regressão, além de proporcionarem valores de potência e dos respectivos limites fiduciais, que se enquadram perfeitamente dentro dos intervalos estabelecidos pelas Agências Reguladoras Internacionais (F.E., 2002). Além disso, o acentuado aumento do número médio de reticulócitos, resultantes da aplicação do EDM, comparativamente maior (89%) do observado com o EDU (**Tabelas 3 e 4, págs 40 e 42**), e que proporcionou valores bem distantes dos controles (**Tabela 4, pág. 42**), excluindo a necessidade de suprimir ou rejeitar valores, bem como, os reduzidos valores de CV intra-doses, 81% dos quais abaixo de 10%; e variáveis entre 3,62 e 8,25 (**Tabela 4 pág 42**) e, finalmente, os elevados valores das ponderações (W), variáveis entre 230 e 1012 (**Tabela 5, pág 44**), representativos dos nossos experimentos, dispensaram a realização de mais ensaios independentes, sistematicamente requeridos nos EDUs (ALBERTENGO e cols., 1999; RAMOS, 2001; SCHMIDT, 2003). Cabe assinalar ainda, que a expressão desses valores se revelou de amplitude análoga aos obtidos por SCHMIDT (2003), SCHMIDT e cols. (2003) aplicando o mesmo desenho experimental, usando porém a citometria de fluxo fluorescente para a contagem dos reticulócitos, método automatizado reconhecidamente mais sensível, preciso e exato (CHANG e KASS, 1997; RUDENSKY, 1997; BRUGNARA, 1998; SANDBERG e cols., 1998; FERRAZOLI e CESCONE, 1999), comparativamente ao método visual de hemólise seletiva por nós utilizado, pois, além de analisar número significativamente maior de células (FAILACE, 1995; RAMOS, 2001), a citometria de fluxo exclui a possibilidade de erros inerentes à leitura microscópica. Portanto, é de se esperar que a introdução do método automatizado, poderá aumentar a precisão dos nossos ensaios. Frente a essa possibilidade, consideramos válida uma reavaliação do ensaio de retas paralelas do tipo 3:3, seis pontos, preconizado pela FE (1999 e 2002) para o ensaio de potência da rhEPO.

Inicialmente cabe assinalar, que é inegável a importância de constarem, pelo menos, três pontos para estabelecer de forma precisa o trajeto retilíneo de um segmento da curva dose-efeito para a realização de um ensaio biológico do tipo gradual, principalmente quando o reagente usado é o animal inteiro. Entretanto, sendo o perfil global dessa curva,

caracteristicamente do tipo não-linear, ele irá expressar-se sob a forma de uma hipérbole equilátera, quando doses sucessivas são aplicadas numa base aritmética ou sob a forma de uma sigmóide, quando essas aplicações seguem uma base logarítmica. Obviamente, a curva sigmóide é a mais freqüentemente empregada, pois a mesma fornece um longo trajeto linear, o qual é muito utilizado nas análises estatísticas aplicadas à biologia. A esse propósito e a guisa de exemplos, poderíamos citar a avaliação das Doses Letal ( $DL_{50}$ ) e Efetiva ( $DE_{50}$ ) de produtos farmacêuticos em geral, bem como a avaliação das potências biológicas de outros hormônios, como a ocitocina, a octapressina (felipressina) e as gonadotrofinas, que empregam a curva sigmóide para a análise quantitativa desses fenômenos biológicos através do ensaio 2:2, quatro pontos. De fato, o trajeto retilíneo suficientemente amplo dessa curva, possibilita a aplicação desse ensaio, que requer número significativamente menor de animais comparativamente ao de 3:3, 6 pontos, através da seleção da relação logarítmica mais adequada entre as duas doses, e cuja validade é evidenciada através da avaliação do desvio do paralelismo.

Frente ao exposto, torna-se óbvia a pergunta, porque não estudar a possibilidade do emprego do ensaio 2:2, 4 pontos, também para a avaliação da potência da rhEPO, fato que possibilitaria a aplicação da regra dos três R's em termos de redução do número de animais preconizada pelos órgãos internacionais, que coordenam e regulam a elaboração dos testes biológicos para o Controle de Qualidade de drogas e medicamentos?

Provavelmente, a razão primordial que deve ter desestimulado a realização desse estudo seria, como já comentamos no capítulo dos resultados, a impraticabilidade de obtermos uma curva dose-efeito completa do hormônio, face à necessidade do emprego de elevadas doses do mesmo (**Fig. 8, pág 37**).

De fato, desconhecendo toda a extensão dessa curva, torna-se impossível estabelecer os limites inferior e superior do seu trajeto linear bem como a localização do seu ponto central, onde o erro estatístico é o menor possível e a inclinação (b) e o coeficiente de correlação não linear ( $r^2$ ) apresentam os valores máximos, como exemplifica a tentativa de obter esses parâmetros ilustrada na **Fig. 8, pág 37**. Nestas condições, torna-se também impossível estabelecer a relação logarítmica mais adequada para as duas doses do hormônio, no sentido de obter, preferencialmente, efeitos próximos e equidistantes do referido ponto central que, seguramente, se posicionariam linearmente.

Por outro lado, ao constatar nos ensaios de 3:3, 6 pontos um trajeto demonstradamente linear, embora provavelmente situado nas proximidades do limite inferior do trajeto linear da curva dose efeito da rhEPO, realizamos a primeira tentativa de avaliar a potência do hormônio aplicando o ensaio 2:2, 4 pontos. Para isto, selecionamos os resultados correspondentes às

doses de 30 e 90 UI/animal, do padrão e de cada amostra dos ensaios de 3:3, 6 pontos. Excluímos a menor dose (10 UI/animal), para não correremos o risco de incluir efeitos situados na zona de transição entre os trajetos não-linear e o limite inferior do trajeto linear, condição esta possível de ocorrer com a dose de 10 UI/animal, como indica a **Fig. 8, pág 37**.

Entretanto, ao aplicarmos o ensaio 2:2, verificamos que o mesmo se revelou uma alternativa válida, em substituição ao de 3:3, somente na vigência de um reduzido índice de variabilidade dos resultados experimentais, como observado no ensaio de avaliação da potência da rhEPO referente à amostra E, no qual os CVs se cingiram a valores compreendidos entre 6,78 e 3,62 para o padrão, e 4,57 e 1,38 para a amostra, em relação ao ensaio 3:3, resultados que proporcionaram valores da potência e de seus limites de confiança no ensaio 2:2, 4 pontos, bem próximos aos encontrados no ensaio 3:3, 6 pontos, além da análise da variância haver demonstrado uma regressão altamente significativa ( $P < 0,01$ ) e um desvio do paralelismo não-significativo ( $P > 0,05$ ), cumprindo, portanto, as exigências estabelecidas pelos Órgãos Reguladores (F.E., 1999 e 2002).

O mesmo não ocorreu com as demais amostras, nas quais a potência da rhEPO e os intervalos entre os limites de confiança, resultantes da aplicação do ensaio 2:2, apresentaram valores bem superiores aos encontrados nos ensaios de 3:3, chegando em alguns casos a inviabilizar o ensaio 2:2, embora em todos eles tenha-se verificado o cumprimento dos parâmetros referentes à elevada significância da regressão ( $P < 0,01$ ) e a não-significância do desvio do paralelismo ( $P > 0,05$ ).

Seguramente, a maior variabilidade encontrada nesses ensaios, foi a responsável pelos resultados insatisfatórios e se afigura como fator crítico no emprego do ensaio 2:2, que requer índices marcadamente reduzidos de CV, condição difícil face ao número limitado de animais, 24 contra 36 usados no 3:3 em nossos ensaios. Não optamos pela realização de mais ensaios 2:2 e a sua combinação, com a finalidade de conseguirmos valores que se “ajustassem” nos limites estabelecidos pelos Órgãos Reguladores, pois iríamos frontalmente contra o nosso enfoque de empregar menor número de animais. Isto deverá ser revisto e possivelmente contornado, após a inclusão do método automatizado de contagem dos reticulócitos, nas nossas condições experimentais, com a finalidade de aumentar a precisão e diminuir a variabilidade dos ensaios, abordagem que pretendemos realizar em seguida à instalação de um citômetro de fluxo no INCQS.

Outro aspecto que merece ser reavaliado, é a linhagem de camundongos a ser definitiva e rotineiramente empregada na realização dos ensaios de potência da rhEPO no INCQS. Na impossibilidade do fornecimento adequado pelo CECAL / FIOCRUZ, da linhagem B6D2F1, preconizada pela F.E. (2002) e frente à premência do tempo, utilizamos a Swiss Webster na

mesma faixa de idade, cujas respostas proporcionais às diferentes doses do hormônio revelaram-se adequadas para a realização dos ensaios, tornando-a uma alternativa aparentemente válida para essa finalidade, aspecto importante visto a sua maior disponibilidade na maioria dos Biotérios existentes no país.

Entretanto, o fato da linhagem B6D2F1, tenha se revelado bem mais homogênea quer em termos de variação do peso corporal para a idade de 8 semanas, como de resposta às diferentes doses de rhEPO (**Tabelas 6 e 7, págs 46 e 47**), consideramos que o estudo comparativo entre as duas linhagens deverá merecer uma análise complementar. Torna-se necessário estabelecer o período ideal de resposta da linhagem Swiss Webster ao hormônio, em termos de idade e de peso corporal, pois com oito semanas o seu peso corporal de 29,2 a 37,9 g, é sensivelmente superior ao da linhagem B6D2F1, de 16,8 a 20,2 g, diferença substancial que poderia explicar a maior “sensibilidade” desta última, em torno de 24%, em comparação com a Swiss Webster (**Tabela 6, pág 46**), face à aplicação do hormônio por animal e não por unidade de peso corporal.

De fato, utilizando esta linhagem, uma primeira tentativa efetuada para avaliar o fator ponderal, revelou que os grupos de animais significativamente mais leves (**P<0,05**), induziram não só respostas significativamente (**P<0,05**) mais elevadas, em termos de produção de reticulócitos, como também mais homogêneas, com **DP** e **CV** evidentemente inferiores comparativamente aos registrados nos grupos dos animais pesados (**Tabela 8, pág. 49**), sugerindo a necessidade de seleção de animais mais leves e pertencentes a uma estreita faixa de peso corporal. Estes resultados iniciais, que se revelaram promissores em termos de aprimoramento dos ensaios de Potência Biológica da rhEPO, utilizando a linhagem Swiss Webster, deverão ser complementados, como salientamos anteriormente, através do estabelecimento do período ideal, provavelmente em torno de 7 semanas, para a sua utilização mais adequada nos referidos ensaios.

***CONCLUSÕES:***

---

## VI- Conclusões:

Com base nos nossos resultados experimentais e nas considerações tecidas a respeito, chegamos às seguintes conclusões:

- 1) demonstramos, confirmando dados da literatura, que as curvas dose-resposta, resultantes da administração subcutânea de rhEPO em camundongos normocitêmicos fêmeas de 8 semanas, revelaram-se discriminativas e apresentaram reduzidos coeficientes de variação, na vigência do emprego de doses numa seqüência geométrica de base 3, isto é, 10, 30 e 90 UI/animal, sob a forma de dose múltipla, subdividida em quatro sucessivas aplicações diárias,
- 2) os ensaios válidos de potência biológica da rhEPO, proporcionaram uma avaliação adequada da potência do hormônio presente em sete produtos farmacêuticos, dos quais, somente um não cumpriu os parâmetros preconizados para aprovação de produtos farmacêuticos,
- 3) o método visual empregado para a contagem dos reticulócitos, revelou índices de sensibilidade, exatidão e precisão, de expressão análoga aos descritos em literatura usando, porém, o método automatizado de contagem dos reticulócitos,
- 4) demonstramos que a linhagem Swiss Webster, responde de forma proporcional às doses crescentes da rhEPO, sugerindo a possibilidade da mesma se tornar uma alternativa válida para o controle da qualidade do hormônio. Comparativamente à linhagem B6D2F1, preconizada pela Farmacopéia Européia (F.E., 2002) para avaliação da potência biológica do hormônio, a Swiss Webster revelou-se 24% menos sensível, embora este valor se afigure relativo, face à significativa diferença entre os pesos corporais das fêmeas das linhagens B6D2F1 e Swiss Webster,
- 5) na primeira tentativa de aplicação do ensaio 2:2, 4 pontos, em substituição ao ensaio 3:3, 6 pontos, evidenciamos que, frente a um número tão reduzido de animais, o ensaio 2:2, 4 pontos, somente fornece resultados satisfatórios na vigência de grau mínimo de variabilidade, condição que esperamos conseguir com o emprego do método automatizado de contagem dos reticulócitos.

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:***

---

## VII. Referências Bibliográficas:

ALBERTENGO, M. E.; VALCARCE, G. A.; OLIVA, L. M.; BAIGES, D. L.; ALONSO, B.S.; CHIALE, C. A.. Eritropoyetin recombinante humana: Método de valoración *in vivo* com ratones normocitémicos. **Sangre** 44 (5), p- 357-363, 1999.

ANNABLE, L.; COTES, P. M.; MUSSETT, M. V. The Second International reference preparation of erythropoietin human urinary, for bioassay. **Bull WHO**, v. 47, nº 1, p – 99 – 112, 1972.

BARBER, D. L.; MASON, J. M.; FUKUZAWA, T.; REEDQUIST, K. A.; DRUKER, B. J.; BAND, H.; D' ANDREA, A. V. Erythropoietin and interleucina-3 activate tyrosino phosphorylation of CBL and association with CRK adaptor proteins. **Blood** 89 (9), p- 3166-3174, 1997.

BARBONE, A. G., APARICIO, B.; ANDERSON, D. W. et al. Reticulocyte measurement as a bioassay for erythropoietin. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 12, n. 4, p. 515-522, 1994.

BERNADO Boaventura Liberato. Medstudents'Home page. **Nephrology**. 2003.

BERU, N., MCDONALD, J., LACOMBE, C. and GOLDWASSER, E. Expression of erythropoietin gene. **Mol. Cell. Biol.** 6, p- 2571-2575, 1986.

BERT, P.- Pression barométrique. **Recherche de physiologie expérimentale**. Paris. Masson, 1878.

BERT, P. Sur la richesse em hémoglobine du sang des animaux vivant sur les hauts lieux. **C. R. Acad. Sci.** Paris 94: p- 802, 1882.

BESARAB, A.; BOLTON, W. K.; BROWNE, J. K.; EGRIE, J. C.; NIESSEN, A. P.; OKAMOTO, D. M.; SCHWAB, S. J.; GOODKIN, D. A.. The Effects of Normal as compared with Low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and Epoetin. **The New England Journal of Medicine**. Aug. -27; p- 584-590, 1998.



BOAS práticas em Biotério de Experimentação Animal. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, seção 10. (65.3340.002).

BONDURANT, M. C. & KOURY, M. J. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. **Mol. Cell. Biol.** 6, p- 2731-2732, 1986.

BONSDORFF, E. & JALAVISTO, E.: A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. **Acta Physiol. Scand**; 16, p-150-170, 1948.

BRASIL. PORTARIA 125; de 19/04/2001, SAS/MS – **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília nº 77-E de 20/04/2001.

BRISTOW, A. III Colaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. **Pharmeuropa**, v. 2; p- 31-37, 1997.

BRITISH Pharmacopeia. Statistical analysis of results of biological assays and tests, 2000.

BRUGNARA, C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 28, n. 1, p. 1-11, 1998.

CARNOT, P. & DE FLANDRE, C. Sur L'activité hematopoiétique des différents organes au cours de la régénération du sang. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 143, p- 432, 1906.

CHANG, C. C.; KASS, L. Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. **Am. J. Clin. Pathol.** , v. 108, n. 1, p- 69-73, 1997.

CHEUNG, W. K.; GOON, B. L.; GUILFOYLE, M. C. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses to healthy subjects. **Clin. Pharmacol. Ther.** V. 64, n. 4, p – 412-423. 1998.

CHOI, D., KIM, M., PARK, J. Erythropoietin: physico and biochemical analysis. **J. Chromatogr. B.** v. 687, p. 189-199, 1996.

COSTA NETO P. L. de O. **Estatística**. Editora Edgard Blucher Ltda. P- 120, 1977.

COTES, P. M. Erythropoietin: The developing story. **Br. Med. J.** 226 (6625), p- 805-806, 1988.

DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas. EPUB, Rio de Janeiro, 31ª ed., 2003

DERBY, P. L.; STRICKLAND, T. W.; ROHDE, M. F. et al. Identification of the residues involved in homodimer formation of recombinant human erythropoietin. **Int. J. Pept. Protein. Res.**, v. 47, n. 3, p. 201-208, 1996.

DESCARTE de Lixo patológico e Lixo Infecioso. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, seção 10. (65.1120.002).

DESCARTE de Material Perfurocortante. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, seção 10. (65.1120.003).

DORDAL, M. S.; WANG, F. F.; GOLDWASSER, E. et al.: The role of carbohydrate in erythropoietin action. **Endocrinology.** 116, p- 2293-2299, 1985.

DOWNEY, H. **Handbook of Hematology.** New York: PB Hoeber, 1938.

DUBÉ, S.; FISHER, J. W.; POWELL, J. S. et al. Glycosylation at specific sites of Erythropoietin is essential for Biosíntesis, Secretion, and Biological function. **J. Biol. Chem.** 263 (33), p- 17516-17521, 1988.

DUSANTER-FOURT, I.; CASADEVALL, N.; LACOMBE, C.; MULLER, O.; BILLAT, C.; FISCHER, S.; MAYEUR, P. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of its own receptor in human erythropoietin-responsive cells. **J. Biol. Chem.**, 267, p- 10670-10675, 1992.

EAVES, C. J., EAVES, A. C. Fundamental control of hematopoiesis. J. W. FISHER (Ed). Biochemical Pharmacology of Blood and Bloodforming Organs. **Handbook of Experimental Pharmacology.** v. 101,p. 5-31, 1992

EDER, H.; ROBLEINBROICH, B.; FAILING, K. A dose-dependent effect of recombinant erythropoietin on the reticulocyte population of rats. **Blut**, v. 59, p. 184-187, 1989.

- ERSLEV, A. J.: Humoral regulation of red cell production. **Blood**. 8, p- 349-357, 1953.
- ESCHBACH, J. W.; ADAMSON, J.W. Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. **Am. J. Kidney Dis**. v. 14, n. 1, p. 2-8, 1989.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. Products of Recombinant DNA Technology, 1997.
- EUROPEAN Pharmacopoeia 4<sup>a</sup> ed., 2002.
- EUROPEAN Farmacopéia. Vol II, Statistical analysis of results of biological assays and tests, 1971.
- FAILACE, R. **Hemograma,, manual de interpretação**. 3<sup>a</sup> ed., ARTMED. Porto Alegre, 1995.
- FARMACOPÉIA Brasileira, 4<sup>a</sup> edição. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FERRAZOLI, C. R. P.; CESCONE, E. M. B. Estudo preliminar comparativo entre reagentes hematológicos. **Laes & Laes**, p. 132-144, 1999.
- FINNEY, D. J. **Statistical Methods in Biological Assay**. 3<sup>a</sup> ed., London. Charles Griffin, 1978.
- FISHER, J.W.& BIRDWELL, B. J. . The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused Kidney. **Acta Haematol**. 26, p- 224-232, 1961.
- FISHER, J.W. Erythropoietin: Pharmacology, Biogenesis and control of production. **Pharm. Revs**. 24, p- 459-508, 1972.
- FISHER, J.W. Pharmacologic Modulation of Erythropoietin Production. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol**. 28, p- 101-122, 1988.
- FISHER, M. J.; PRCHAL, J. F.; PRCHAL, J. T.; and D'ANDREA, A. D. Anti-Erythropoietin (EPO) receptor monoclonal antibodies distinguish EPO- dependent and EPO-independent erythroid progenitors in polycythemia vera. **Blood** 84 (6), p-1982-1991, 1994.

FISHER, J. W.; KOURY, S.; DUCEY, T.; MENDEL, S. Erythropoietin (Epo) production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. **Br. J. Haematol.** 95, p- 27-32, 1996.

FISHER, J. W. Erythropoietin: Physiologic and Pharmacologic Aspects. **Proc. Soc. Expl. Biol. Med.** 216, p- 358-369, 1997.

FRASER, J. K., LIN, F. K. and BERRIDGE, M. V. Expression of high affinity receptors on human bone marrow and HEL cells. **Exp. Hematol.**, 16, p- 836-842, 1988a.

FRASER, J. K., LIN, F. K. and BERRIDGE, M. V. Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemia cell line, K562. **Blood**, 71, p- 104-109, 1988b.

FUKUDA, M. N.; SASAKI, H.; LOPEZ, L.; FUKUDA, M.. Survival of the Recombinant Erythropoietin in the circulation. The Role of Carbohydrates. **Blood**. 73, n° 1 (Jan): p- 84-89, 1989.

FURUKAWA, T.; NARITA, M.; SAKAUE, M.; OTSUKA, T.; KUROHA, T.; MASUKO, M.; AZEGAMI, T.; KISHI, K.; TAKAHASHI, M.; UTSUMI, J.; KOIKE, T. and AIZAWA, Y.. Primary familial polycythemia associated with a novel point mutation in the erythropoietin receptor. **Br. J. Hematol.** 99, p - 222-227, 1997.

GILD, D.; RIEDL, B.; ZIER, A.; ZIMMERMANN, M. F. Analytical methods for characterization and quality control of Pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an exemple. **Pharmac. Acta Helvetiae.**71, p- 383-394, 1996.

GILMER, P. R. , KOEPKE, J. A. The Reticulocyte. An Approach to definition. **A. J. C. P.**, vol 66, July, p- 262-267, 1976.

GOLDWASSER, E.; KUNG, C. K.; ELIASON, J. On the mecanisn of erythropoietin-induced differentiation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, n. 13, p. 4202-4206, 1974

GRAF, H.; WATZINGER, U.; LUDVIK, B.; WAGNER, A.; HÖCKER, P.; ZWEYMÜLLER, K. K.. Recombinant human erythropoietin as adjuvant treatment for autologous blood donation, **Br. Med. J.** 300, p- 1627-1628, 1990.

GRIFFITHS, E. In polypeptide and proteins drugs production, characterization and formulation. England: **ELLIS HORWOOD**, 1991.

GROTTO, H. Z., NORONHA, F. A. Z., BORBA, R. O Reticulócito: Um enfoque para um clássico parâmetro hematológico. **NewsLab**, nº 35, p- 142- 151, 1999.

GRUNWALD, P. Neue Horizonte in der Biotechnologie. **Nachr. Chem. Tech. Lab.** 43, p- 1292-1297, 1995.

HAYAKAWA, T.; WADA, M.; MIZUNO, K. Simple *in vivo* bioassay without radioisotopes for recombinant human erythropoietins. **Biologicals**, v. 20 , p. 243-251, 1992.

HJORT, E. Reticulocyte increase after injection of anemic serum. **Norsk Mag. F. Laegevidensk.** v. 97, p. 270-277, 1936.

IMAI, N.; KAWAMURA, A.; HIGUCHI, M.; TOMONOH, K.; OH-EDA, M.; FUJIWARA, M.; SHIMONAKA, Y. and OCHI, N. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. **Eu. J. Biochem.** 194, p- 457-462, 1990.

IMAI, N.; KAWAMURA, A.; HIGUCHI, M.; OH-EDA, M.; ORITA, T.; KAWAGUCHI, T.; OCHI, N. Physicochemical and Biological Comparison of Recombinant Human Erythropoietin with Human Urinary Erythropoietin. **J. Biochem.** 107, p- 352-359, 1990.

ISCOVE, N. N.; SIEBER, S. Eritroid Colony Formation in Cultures of Mouse and Human Bone Marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose concanavalin. **A. J. Cell Physiol.**, v. 83, p. 309-320, 1974.

JACOBS, K.; SCHOEMAKER, C.; RUDERSDORF, R.; NEILL, S.D.; KAUFFMAN, R. J.. Isolation and characterization of genomic cDNA clones of human erythropoietin. **Nature** 313, p- 806-810, 1985.

JACOBSON, L.O.; GOLDWASSER, E.; FRIED, W.; PLZAK, L. Role of the Kidney in erythropoiesis. **Nature** 170, p- 633-634, 1957.

KEOWN, P. A. - Recombinant human erythropoietin; from concept to clinic. **Transplantation Proceedings** 21 (6), p- 49-53, 1989.

KAWAMURA, A.; IMAI, N.; KAWAGUCHI, T. et al. Simple *in vivo* bioassay for erythropoietin. **Br. J. Haematol.** v. 77, p. 424-430, 1991.

KINOSHITA, M.; MURAKAMI, E.; ODA, Y. et al. Comparative studies on the analysis of glycosylation heterogeneity of sialic acid-containing glycoproteins using capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A.**, v. 866, p- 261-271, 2000.

KOISTINEN, P. O.; RUSKO, H.; IRJALA, K. et al. EPO, red cells and serum transferrin receptor in continuous and intermittent hypoxia **Of. J. Am.Coll.Sports Med.** v. 32, p- 800-804, 2000.

KOPPENSTEINER, R.; STOCKENHUTER, F.; JAHN, C; BALCKE, P.; MINAR, E.; EHRINGER, H. Changes in Determinants of blood rheology during treatment with haemodialysis and recombinant human erythropoietin, **Br. Med. J.** 300, p- 1626-1627, 1990.

KRUNDIEK, N. Erythropoietic substance in the serum of anemic animals. **Proc.Soc. Espl. Biol. Med.** v. 54, p. 14-17, 1943.

KUHN, E. Vermehrung der roten und weissen Blutkörperchen und des Hämoglobins durch die Lungensangmaske und ihre Beziehung zum Höhenklein. **Munc. Med. Wochenschr.** v. 35, p. 1713-1720, 1907

KURATOWSKA, Z.; LEWARTOWSKI, B.; MICHALAK, E. al. Studies on the production of erythropoietin by the isolated perfused organs. **Blood**, 18, p -527-534, 1961.

KRANTZ, S. B. , JACOBSON, L. O. Erythropoietin and the regulation of erythropoiesis. **University of Chicago Press.** Chicago, 1991.

LAI, P. H.; EVERETT, R.; WANG, F.F. Structural characterization of human erythropoietin. **J. Biol. Chem.** v. 261, p. 3116-3121, 1986.

LEITMAN, S. F. & READ, E. J.- Hematopoietic progenitor cells. **Seminars in Hematology.** 33 (4): p- 341-358, 1996.

LIN, F. K.; SUGGS, S.; LIN, C.H. et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 82, p- 7580-7584, 1985.

LOWRY, P. H. ; KEIGHLEY, G. ; BORSOOK, H. Inactivation of erithropoietin by neuraminidase and mild substitution reactions. **Nature**, v. 185, p. 102-103, 1960.

MALGOR, L. A. & FISHER, J.W. Effects of Testosterone on Erythropoietin production in isolated perfused kidneys. **Am. J. of Physiol.** 218 (6) Jun, 1970.

MARTINDALE. **The Complete Drug Reference**, 32<sup>a</sup> ed., 1999.

MIESCHER, F. Über die Beziehungen zwischen meereshöhe und Beschaffenheit des Blutes. **Corres. Bl. Schweiz Aerzte.** v.23, p. 809-830, 1893.

MIURA, Y.; D'ANDREA, A. D.; KABAT, D. and IHLE, J. N. Induction of tyrosino phosphorylation by erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. **Mol. Cel. Bio.** 11, p- 4895-4899, 1991.

MIYAKE, T.; KUNG, C. K. H.; GOLDWASSER, E. Purification of human erythropoietin, **J. Biol. Chem.**, 252, p- 5558-5564, 1977.

MORIMOTO, K.; TSUDA, E.; SAID, A. A. et al Biological and Physicochemical chacacterization of recombinant human erythropoietins fractionated by mono Q column chromatography and their modification with sialyltranferase. **Glicoconj. J.**, v. 13, p. 1013-1020, 1996

MOURA, R. A. de A. **Técnicas de Laboratório.** Editora Atheneu Ltda 2<sup>a</sup> ed., 1982.

NAUGHTON, G. K.; NAUGHTON, B. A.; GORDON, A. S. Erythropoietin production by macrophages in the regenerating liver. **J. Surg. Oncol.** 30, p-184-197, 1985.

PAUL, P.; ROTHMAN, S. A.; McMAHON, J. T.; GORDON, A. S. Erythropoietin secretion by isolated rat Kupffer cells. **Exp. Hematol.** 12, p- 825-830, 1984.

PAULO, L. G. Estudo experimental sobre o possível mecanismo de produção da Eritropoetina. **Prêmio ABIFARMA**, 1973a.

PAULO, L. G.; FINK, G.D.; BYUND, L. R. and FISHER, J. W. . Effects of several androgens and steroid metabolites on erythropoietin production in the isolated perfused dog kidney. **Blood** 43, p- 39-47, 1974.

PEEBLES, D. A.; HOCHBERG, A.; CLARKE, T. D. Brief Scientific Reports. Analysis of Manual Reticulocyte Counting. **A. J. C. P.**, vol. 76. Nov, p- 713-717, 1981.

PHILO, J. S.; AOKI, K. H.; ARAKAWA, T.; NARHI, L. O. and WEN, J. Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: One high-affinity and one low-affinity interactions. **Biochemistry**. 35, p- 1681-1685, 1996.

RAMOS, A. S. **Avaliação Biológica, Caracterização Físico-química e Imunológica de Eritropoietina humana recombinante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, R. S. 129 p, 2001.

RAMOS, A. S.; SCHMIDT, C. A.; ANDRADE, S. S.; FRONZA, M.; RAFFERTY, B.; DALMORA, S. L.. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 36, p- 1561-1569, 2003.

RANG, H.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.. **Farmacologia Integrada**. 4ª edição, Editora Manole Ltda. 1999.

REGE, A. B.; BROOKINS, J.; FISHER, J. W. A radioimmunoassay for erythropoietin: serum level in normal human subjects and patients with hemopoietic disorders. **J. Lab. Clin. Med.** 100, p- 829-843, 1982.

REISSMANN, K. R.: Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation of parabiotic rats during hypoxia. **Blood**. 5, p- 372-80, 1950.

ROHDE, M. F. Erythropoietin. In: Characterization of Biotechnology Pharmaceutical Products. **Dev . Biol. Stand. Basel.**: Karger, v.96, p. 123-125, 1998.



RUDENSKY, B. Comparison of a semi-automated new Coulter methylene blue method with fluorescence flow cytometry in reticulocyte counting. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 57, n. 4, p. 291-296, 1997.

RAPAPORT, S. I. **Hematologia. Introdução.** 2ª ed., ROCA, São Paulo, 1990.

SANDBERG, S.; RUSTAND, P.; JOHANNESSEN, B. et al. Within-subject biological variation of reticulocytes and reticulocyte-derived parameters. **Eur. J. Haematol.**, v. 61, n. 1, p. 42-48, 1998.

SANGRIA de Animais de Laboratório. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, seção 10. (65.3340.005).

SASAKI, H.; BOTHNER, B.; DELL, A. et al. Carbohydrate structure of Erythropoietin expressed in Chinese hamsters ovary cells by a human Erythropoietin cDNA. **J. Biol. Chem.** 262, p- 12059, 1987

SAWADA, K.; KRANTZ, S. B.; KANS, J. S.; DESSYPRIS, E. N.; SAWYER, S. T.; GLICK, A. D.; CIUIN, C. I. Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. **J. Clin. Invest.**, 80, p- 357-366, 1987.

SAWADA, K.; KRANTZ, S. B.; DAI, C. H.; KOURY, S. T.; HORN, S. T.; GLICK, A. D. and CIVIN, C. I. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. **J. Cell. Biol.**, 142, p- 219-230, 1990.

SAWYER, S. T. & KOURY, M. J. Erythropoietin requirements during terminal erythroid differentiation: The role of surface receptors for erythropoietin. **J. Cell. Biol.**, 105, p- 1077-1081, 1987.

SBN.ORG.BR. Página na internet da **Sociedade Brasileira de Nefrologia**. Jan, 2004. Acesso em junho, 2004.

SCHLAGETER, M. H.; TOUBERT, M.E.; PODGORNIK, M.P. et al. Radioimmunoassay of Erythropoietin: Analytical Performance and Clinical Use: **Haematology Clin Chem.**, v. 36, n. 10, p. 1731-1735, 1990.

SCHMIDT, C. A. **Avaliação de Potência Biológica e Caracterização de Eritropoietina humana recombinante.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, R. S. 101 p, 2003.

SCHMIDT, C. A.; RAMOS, A. S.; SILVA, J. E. P.; FRONZA, M.; DALMORA, S.L. Avaliação da atividade e caracterização da Eritropoietina Humana Recombinante em Produtos Farmacêuticos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 47, n. 2, Abril 2003.

SCHUSTER, S. J.; WILSON, J. H.; ERSLEV, A. J. et al. Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. **Blood** 70, p- 316-318, 1987.

SIMINOVITCH, L. Radiation response of hemopoietic colony forming cells derived from different sources. **Radiat. Res.** 24: p- 482,1965.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R.; LEFKOWITZ, R. J.; HANDLER, P. and WHITE, A. **Bioquímica. Mamíferos.** editora Guanabara Koogan S. A. 7<sup>a</sup> ed., 1983.

SPIVAK, J. L. The Mecanism of Action of Erythropoietin: Erythroid cell response. Biochemical pharmacology of blood and bloodforming organs. J. W. Fischer (Ed.) Springer-Verlag Berlin. **Handbook of Experimental Pharmacology.** v.101, p. 49-114, 1992.

STORRING, P. L.; TIPLADY, R. J.; GAINES DAS, R. E.; STENNING, B. E; LAMIKANRA, A.; RAFFERTY, B. and LEE, J. Epoetin Alfa and Beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. **British J. of Hematol.** 100, p- 79-89, 1998.

STORRING, P. L; GAINES DAS, R.E. The International Standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: Collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly puified human urinary erythropoietins. **J.Endocrinol.**, v. 134, n° e p.459-484, 1992.

SUASSUNA, J. H. R. Via de administração da Eritropoetina. **J. Brasil. Nefrol.** 22 (suppl 5), p- 29-31, 2000.

TABARA, I. A. Erythropoietin. Biology and Clinical applications. **Archives of Internal Medicine**; Feb-8, 153, p- 298, 1993.

TAKEUCHI, M.; TAKASAKI, S.; MIYAZAKI, H. et al. Comparative study of asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.** , v. 263, n. 8, p. 3657-3663, 1988.

TANEBE, M.; TESHIMA, S.; HANYU, T. et al . Rapid and Sensitive Method for Erythropoietin Determination in Serum. **Clin. Chem.** v. 38, n. 9, p. 1752-1755, 1992.

THE UNITED States Pharmacopeia. 24<sup>a</sup> edition, Rockville, 2000.

TRAN, A. D.; PARK, S.; LISI, P. J. et al. Separation of carbohydrate mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of Ph, buffer type and organic additives. **J. Chromatogr. A.**, v. 542, n. 2, p. 459-471, 1991.

TSUDA, E.; KAWANISHI, G.; VEDA, M.; MASUDA, S.; SASAKI, R. The Role of carbohydrate in Recombinant Human Erythropoietin. **Eur. J. Biochem.** 188, p- 405-411, 1990.

VIAULT, F. Sur L' augmentation considérable du nombre des gloules rouges dans le sang chez les habitants des hauts plateaux de L' Amerique du Sud. **C. R. Acad. Sci.** Paris 111: p- 918-919, 1890.

WINTROBE. **Hematologia Clínica.** 1<sup>a</sup> edição Brasileira; editora Manole Ltda, 1998.2vs.

WWW.JAX.org/jaxmice;hybrid mice.

WWW.TACONIC.com/anmodels/obsweb.

YI, T., ZANG, J., MIURA, O. and IHLE, J.N. hematopoietic cell phosphatase associates with erythropoietin (EPO) receptor after Epo-induced receptor tyrosine phosphorylation: Identification of potential binding sites. **Blood** 85, p- 87-90, 1995.

YOUSSEFIAN, H.; LONGMORE, G.; NEUMANN, D.; YOSHIMURA, A. and LODISH, H. F. Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. **Blood**, 81 (9), p- 2223-2236, 1993.

YU, P. H.; SO, C. C.; WONG, K. F. et al. Automated reticulocyte counting on evaluation of GEN-S, CELL-DYN 3500 and CELL-DYN 4000. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 21, n. 2, p. 145-147, 1999.

ZANJANI, E. D. Liver as the primary site of the erythropoietin production in the fetus. **J.Lab. Clin. Med.** 89, p- 640-644, 1977.

ZANJANI, E. D.; ASCENSAO, J. L.; McGLAVE, P. B.;BANISADRE, M.; ASH, R. C. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. **J. Clin. Invest.** 67, p- 1183-1188, 1981.