

ARTIGO

Ensaio de potência da alfaepoetina: Comparação de camundongos Swiss Webster, NIH, C57BL/6, BALB/c com o híbrido B6D2F1

Potency assay of epoetin alpha: Comparison of Swiss Webster, NIH, C57BL/6, BALB/c mice with the hybrid B6D2F1

Igor Barbosa da Silva

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil
E-mail:

igor.barbosa@bio.fiocruz.br

Paulo César Dick

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Katherine Antunes de Mattos

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Alessandra Santos Almeida

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Ricardo Gonçalves Silva

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Darcy Akemi Hokama

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Francisco José Roma Paumgarten

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

Neste estudo comparamos os resultados de ensaios de potência da alfaepoetina (EPOhr) realizados com camundongos de diferentes colônias e linhagens (Swiss Webster, NIH, C57BL/6 e BALB/c) com aqueles de ensaios conduzidos com o híbrido B6D2F1, o único camundongo recomendado pela Farmacopeia Europeia (FE). Fêmeas de diferentes colônias e linhagens, pesando 16-18 gramas, receberam uma única dose de EPOhr por via subcutânea (30, 90 ou 270 UI/animal, 0,2 mL/camundongo). As potências biológicas de apresentações de 4.000 UI/mL da EPOhr foram avaliadas utilizando um material de referência de trabalho de alfaepoetina (3.773 UI/mL) anteriormente testado junto ao padrão de referência internacional BRP (European Pharmacopeia Biological Reference Preparation). Os resultados indicaram que camundongos das colônias e linhagens examinadas atingiram critérios estatísticos (FE) para um ensaio válido de potência da eritropoietina e, portanto, podem ser considerados como alternativas ao uso do híbrido B6D2F1. Os ensaios com camundongos BALB/c, entretanto, foram os que produziram resultados mais semelhantes aos obtidos com os híbridos B6D2F1, em relação à contagem média de reticulócitos em resposta a 30, 90 e 270 UI/camundongo, e aos coeficientes angulares (inclinação) e lineares (intersecção) da curva dose-resposta (curvas paralelas praticamente superpostas).

PALAVRAS-CHAVES: Alfaepoetina; Ensaio de Potência; Bioensaio; Linhagens de Camundongos; Eritropoietina Recombinante Humana (EPOhr)

ABSTRACT

In this study we compared the outcomes of epoetin alpha (rhEPO) potency assays performed with Swiss Webster, NIH, C57BL/6 and BALB/c mice with those of the assay conducted with the B6D2F1 hybrid, the only mice recommended by the European Pharmacopeia (EP). Female mice from different breeding stocks and strains, weighing 16-18 g, received a single subcutaneous injection of (30, 90 or 270 IU per mouse, 0.2 mL per mouse) of rhEPO. Biological potencies 4000 IU/mL rhEPO pharmaceutical forms from different batches were determined using a biological reference preparation (3773 IU/mL) previously tested against the international reference standard BRP (European Pharmacopeia Biological Reference Preparation). Results showed that assays with mice from all tested breeding stocks and strains met EP statistical criteria for a valid erythropoietin potency assay and thus they are potential alternatives to the use of B6D2F1 hybrids. The assays with BALB/c mice, however, were those the results of which were most similar to those obtained with the hybrid regarding average reticulocyte counts in response to 30, 90 and 270 IU/mouse, angular (slope) and linear (intersection) coefficients of the linear dose-response curve (parallel and almost complete overlapping dose-response curves).

KEYWORDS: Epoetin Alpha; Potency Assay; Bioassay; Mouse Strains; Human Erythropoietin Recombinant (rhEPO)



Introdução

A eritropoietina humana (EPO), hormônio que controla a eritropoiese, é uma sialoglicoproteína altamente glicosilada (aproximadamente 40% da sua massa molecular) formada por 165 aminoácidos (PM 34 kDa). A eritropoietina alfa ou alfaepoetina (EPOhr) é um biofármaco produzido a partir da tecnologia do DNA recombinante em cultura de célula de mamíferos. A alfaepoetina é equivalente à eritropoietina endógena nos aspectos químico, imunológico e biológico. Tanto a EPO como a alfaepoetina (EPOhr) se ligam aos receptores da eritropoietina na superfície das células precursoras da série eritroide, ativando uma cascata de sinalização que leva à estimulação da divisão e diferenciação das células e formação de reticulócitos^{1,2,3}.

A eficácia terapêutica da alfaepoetina na correção da anemia é evidenciada pela resposta dos pacientes que exibem elevação do hematócrito e dos níveis de hemoglobina, o que reduz a necessidade de transfusão sanguínea e impacta positivamente na qualidade de vida. A EPOhr é indicada para tratar tanto a anemia de portadores de insuficiência renal crônica (IRC) ou induzida por quimioterapia ou radiação quanto a anemia apresentada por pacientes com AIDS submetidos a regime terapêutico com zidovudina^{3,4,5}.

O Ministério da Saúde (MS), por intermédio de Bio-Manguinhos / Fundação Oswaldo Cruz, é responsável pela distribuição no Brasil da EPOhr, que é conhecida comercialmente como Alfaepoetina, o que garante acesso gratuito e amplo ao medicamento com qualidade, segurança e eficácia. A distribuição gratuita da EPOhr pelo MS atende aos princípios de universalidade, integralidade e equidade que norteiam as ações do SUS⁶.

O processo biotecnológico de produção influencia a potência final do biofármaco, razão pela qual o ensaio biológico de potência de cada lote produzido é necessário para assegurar a qualidade e, conseqüentemente, a efetividade do produto. Entre os diversos testes de rotina recomendados pela FE para o controle de qualidade desse biofármaco, destaca-se o ensaio de potência em camundongos normocitêmicos⁷.

O objetivo deste ensaio é avaliar a atividade biológica do hormônio estimulador da eritropoiese^{1,8,9,10,11}. A potência de um produto biológico ou preparação farmacêutica pode ser definida como a capacidade do produto, administrado em determinada dose, desencadear uma resposta especificada (relevante para a atividade terapêutica) ou, em termos mais simples, é a medida da atividade do produto biológico ou preparação farmacêutica em um sistema biológico. O número de reticulócitos na circulação é um indicador do estado funcional da eritropoiese e o retículo nuclear torna o reticulócito facilmente reconhecível por microscopia ótica. Assim, o número de reticulócitos no sangue periférico pode ser usado para determinar a atividade biológica da EPOhr. O ensaio que envolve uma única injeção em camundongos normocitêmicos tem sido amplamente aplicado para padronização e avaliação da potência de pre-

parações farmacêuticas¹²⁻¹⁶. Entretanto, apesar de serem - via de regra - considerados robustos e confiáveis, muitos especialistas reconhecem que ainda é necessário melhorar o ensaio no que diz respeito a variabilidade e precisão, aspectos de grande relevância para a determinação da potência de lotes comerciais de EPOhr supridos por diferentes produtores^{17,18}.

A FE recomenda para o teste de potência da alfaepoetina a utilização de fêmeas com 8 semanas de vida dos híbridos B6D2F1 (originários do cruzamento de camundongos fêmeas C57BL/6 com machos DBA/2). Camundongos de outras colônias e linhagens (*e.g.*, CF1, BALB/c e Swiss Webster) já foram cogitados como alternativas viáveis para o teste. A pouca informação disponível na literatura, deficiência a que se soma a não validação *vis a vis* as metodologias de compêndio oficial utilizando o híbrido (preconizado pela FE), torna difícil a implementação de testes alternativos para fins de regulação.

Nesse sentido, é importante identificar colônias e linhagens¹ de camundongos que respondam ao biofármaco de forma consistente e dose relacionada, o que possibilitaria encontrar substituto adequado para o híbrido, que é de difícil manejo, e aprimorar (refinar) o ensaio de potência da alfaepoetina.

O objetivo deste estudo foi comparar a resposta de camundongos BALB/c, C57BL/6, NIH e Swiss Webster com a do híbrido B6D2F1, atualmente recomendado pela FE no teste de potência de alfaepoetina, e verificar se algum deles seria um substituto viável ou até mesmo superior ao híbrido.

Metodologia

Animais

Foram utilizados camundongos normocitêmicos (apenas fêmeas), provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL/FIOCRUZ) das colônias/linhagens que se seguem: B6D2F1 (híbridos), NIH (*outbred*), C57BL/6 (*inbred*) e BALB/c (*inbred*) entre 6-8 semanas (peso entre 16-18 g); Swiss Webster (*outbred*) com 3-4 semanas de vida (peso entre 16-18 g); Swiss Webster com 6-8 semanas de vida (peso entre 27-29 g). Grupos de até 7 animais foram alojados em gaiolas. Água e ração comercial para camundongos foram fornecidos *ad libitum* durante todo o experimento. Temperatura de conforto entre 21°C e 24°C, umidade relativa do ar entre 45% e 55% e ciclo de iluminação de 12/12 horas (claro/escuro) foram mantidos no biotério. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da FIOCRUZ através da licença LW-13/10.

Produtos farmacêuticos

O material de referência de trabalho biológico (MRT(B)rhEPO/0208) na concentração de 3.773 UI/mL foi certificado perante o padrão de referência internacional BRP (European Pharmacopeia Biological Reference Preparation), em um estudo colaborativo entre o Instituto Nacional de Controle de Qualida-

i O termo linhagem foi usado apenas com referência aos camundongos isogênicos, ou seja, originários de colônias geneticamente definidas e homogêneas obtidas por cruzamentos (endogâmicos) entre irmãos (*i.e.*, C57BL/6 e BALB/c). Os demais (não isogênicos) são referidos simplesmente como "colônias" (Swiss Webster, NIH).



de em Saúde (INCQS), Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), ambos da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, Brasil, e do Centro de Imunologia Molecular (CIM) localizado em Havana, Cuba, e obtidos por Bio-Manguinhos.

Um total de 10 lotes de preparações comerciais de EPOhr 4.000 UI unidades/mL foi obtido de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Tratamento

Os camundongos receberam dose única, por via subcutânea e volume fixo de 0,2 mL (0,5 mL no caso do Swiss Webster pesando 27-29 g) de cada concentração da alfaepoetina. Foram usadas seringas (1 mL) e agulhas (13 x 0,45 mm) descartáveis, e a injeção foi sempre no período matutino (antes das 11h), para minimizar possíveis interferências de oscilações dos níveis da eritropoietina endógena devido ao ciclo circadiano. O sangue foi coletado 96 horas (ou 72 horas, no caso de um dos grupos de Swiss Webster) após a injeção do biofármaco.

Efeito da EPOhr sobre a contagem de reticulócitos: Construção de curvas dose-resposta

Para a construção da curva relacionando a dose de EPOhr com a contagem de reticulócitos em camundongos normocitêmicos, utilizamos o material de referência de trabalho biológico (MRT(B)rhEPO/0208). O material de referência foi diluído em solução salina 0,9% para atingir as concentrações de 10, 30, 90 e 270 UI/ 0,2 mL de alfaepoetina. O controle negativo foi a solução de cloreto de sódio 0,9%. Utilizamos o total de 35 camundongos de cada colônia/linhagem (7 camundongos para o grupo controle e para cada dose de EPOhr), com peso entre 16-18 g (Swiss Webster: 27-29 g).

Teste da potência da EPOhr em camundongos normocitêmicos

A determinação da potência da alfaepoetina pelo teste em camundongos normocitêmicos⁷ envolveu a contagem de reticulócitos, após hemólise seletiva do sangue total, por meio de câmara de Neubauer e microscopia ótica. Foram administradas 3 doses correspondentes às concentrações de 30, 90 e 270 UI/ 0,2 mL do MRT(B)rhEPO/0208 (3.773 UI/mL), e amostras de EPOhr com potência declarada de 4.000 UI. O grupo controle negativo foi constituído por animais que receberam apenas a solução de cloreto de sódio 0,9%. Os camundongos foram destinados aleatoriamente a um dos grupos (7 animais por dose) e injetados com EPOhr como anteriormente descrito.

Contagem de reticulócitos em câmara de Neubauer

Noventa e seis horas (ou 72 horas no caso dos camundongos Swiss Webster) após a administração do biofármaco, o sangue foi coletado do plexo periorbital com auxílio de pipetas Pasteur e colocado em microtubos de 1,5 mL preparados com 4 mL da solução de heparina sódica 5.000 UI.

Para a coloração dos reticulócitos, 40 mL de sangue foram adicionados a microtubos contendo 120 mL de solução de azul de metileno e citrato de sódio e incubados por 60 minutos a 37 °C em banho-maria. Após a incubação, 40 mL de solução hemolisante (CELLMLISE II) foram adicionados ao microtubo para destruição das hemácias, facilitando a visualização dos reticulócitos. Depois

da incubação (temperatura ambiente), 10 mL do sangue corado foram diluídos em 1.960 mL de cloreto de sódio 0,9% e homogeneizados. Dez microlitros (10 mL) foram então transferidos para a câmara de Neubauer e contados com ajuda de microscópio ptico (ocular 10 X e objetiva seca 40 X). O número absoluto de reticulócitos foi plotado contra o logaritmo natural da dose de EPOhr.

Análise estatística

A análise estatística foi efetuada de acordo com o que é preconizado pela Farmacopeia Brasileira¹⁸ e FE⁷. Para o cálculo das potências biológicas da alfaepoetina empregamos o método de retas paralelas 3+3, 6 pontos. A validade de cada ensaio foi investigada pela análise de variância (ANOVA), através das significâncias da regressão linear e dos desvios da linearidade e do paralelismo, sendo o ensaio considerado válido quando a regressão apresentar $p < 0,01$ e ambos os desvios forem não significativos ($p > 0,05$).

Neste ensaio são considerados valores satisfatórios para potência aqueles situados entre 80% e 125% da potência declarada cujos limites de confiança estão entre 64% e 156%. Nos casos de ensaios considerados válidos, porém não conformes, para os limites de potência e/ou intervalo de confiança, os testes podem ser repetidos (foram permitidas no máximo 3 repetições), sendo calculados a média aritmética ponderada da potência e limites de confiança de todos os ensaios.

Para comparação dos coeficientes angulares das curvas de regressão dose-resposta das diferentes linhagens, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 5%.

Para comparação dos valores de potência e limites de confiança entre as diferentes colônias/linhagens de camundongos e o híbrido B6D2F1, cada par de resultados, dentro da dupla avaliada, foi considerado concordante quando a potência calculada usando uma das linhagens/colônias estava contida no intervalo de confiança determinado para a outra linhagem/colônia, e vice-versa. Uma alta proporção de resultados concordantes indica similaridade entre as linhagens/colônias.

Resultados

Curvas de dose (EPOhr) versus resposta (número absoluto de reticulócitos)

Uma curva padrão (injeção única) foi construída com o material de referência de trabalho, MRT(B)rhEPO/0208, nas doses de 10, 30, 90 e 270 UI/animal, empregando o método de retas paralelas com dose geométrica na base 3, conforme recomendação da FE (Figura 1 e Tabela 1). Essas curvas traduzem a magnitude e o incremento da resposta de cada colônia/linhagem ao tratamento com as diferentes doses da EPOhr em termos de produção de reticulócitos. Foram avaliados os parâmetros coeficiente linear, coeficiente angular e coeficiente de variação intraensaio (CV) de modo a possibilitar a comparação da resposta biológica das colônias/linhagens de camundongos testadas (Swiss Webster, BALB/c, NIH e C57BL/6) com a do híbrido B6D2F1 (Tabelas 1 e 2; Figura 1). Os parâmetros idade (6-8 semanas, com peso 16-18 g), tempo de coleta de sangue (4 dias) e volume do biofármaco injetado (0,2 mL) foram fixados.

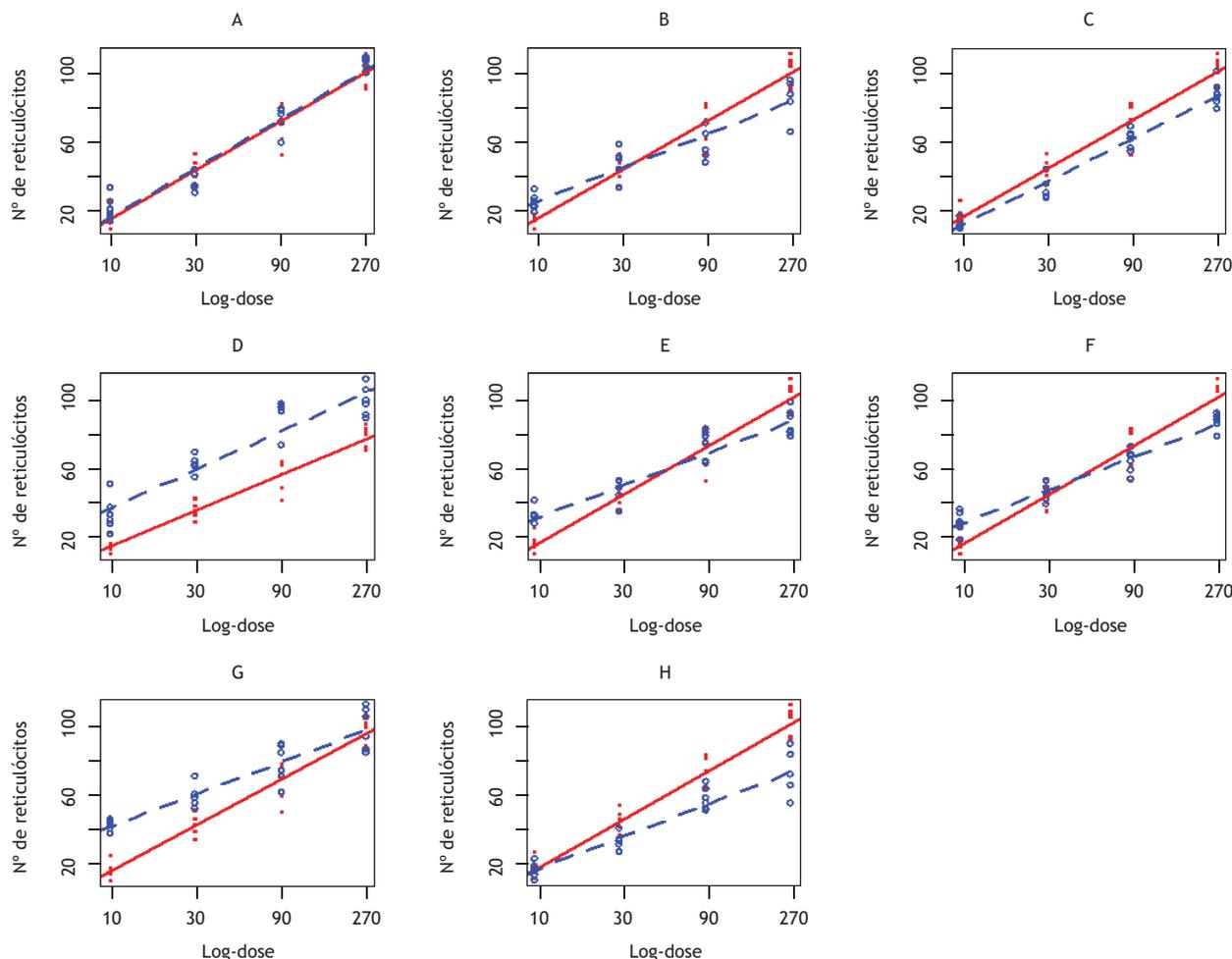


Figura 1. Resumo das comparações das curvas dose-resposta de alfaepoietina (MRT(B)rhEPO/0208) entre o híbrido B6D2F1 (linha contínua) e linhagens/colônias alternativas (linhas tracejadas). Os gráficos representam comparações respectivamente com os camundongos BALB/c (A), NIH (B), C57BL/6 (C), Swiss Webster 16-18 g 4° dia (D), Swiss Webster 16-18 g 3° dia (E), Swiss Webster 27-29 g 3° dia (0,2 mL de volume de inoculação) (F), Swiss Webster 27-29 g 3° dia (0,5 mL de volume de inoculação), (G) Swiss Webster 27-29 g 4° dia (H).

Tabela 1. Média, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV, %) do número absoluto de reticulócitos no sangue periférico de camundongos (fêmeas) B6D2F1, Swiss Webster, BALB/C, NIH e C57BL/6 (n=6) tratados com MRT(B)rhEPO/0208 (10, 30, 90 e 270 UI/animal, sc).

LINHAGEM / COLONIA	DOSES (UI por camundongo)											
	10 UI			30 UI			90 UI			270 UI		
	Média	DP	CV(%)	Média	DP	CV(%)	Média	DP	CV(%)	Média	DP	CV(%)
B6D2F1	16	3,2	20,1	43	6,4	14,9	70	11,4	16,2	102	8,0	7,9
SW 16-18 g 3° dia	41	12,1	29,6	80	5,7	7,0	115	10,9	9,5	129	12,1	9,4
SW 16-18 g 4° dia	33	6,4	19,6	44	7,2	16,5	71	8,3	11,8	87	11,4	13,2
SW 27-29 g 3° dia (0,2 mL)	30	7,4	24,7	47	4,2	8,8	63	6,8	10,7	86	5,5	6,4
SW 27-29 g 3° dia (0,5 mL)	45	3,9	8,6	62	8,1	13,1	83	14,6	17,7	103	16,6	16,1
SW 27-29 g 4° dia	18	6,3	35,7	32	7,8	24,1	56	7,8	13,9	72	14,0	19,4
BALB/C	21	6,8	32,1	38	5,6	14,6	73	7,0	9,6	105	3,8	3,6
C57BL/6	12	2,8	22,9	33	6,0	18,1	61	5,5	9,0	88	7,7	8,7
NIH	25	4,5	18,0	38	8,4	22,0	60	10,0	16,6	87	11,3	13,0



A curva dose-resposta construída com a linhagem BALB/c ($y=25,99\ln(x)-43,49$ $R^2=0,9815$) não foi diferente em relação ao coeficiente angular obtido com o híbrido B6D2F1 ($y=25,93\ln(x)-44,61$, $R^2=0,9987$) (Figura 1A). Entretanto, o coeficiente linear calculado para a curva feita com o C57BL6 ($y=23,15\ln(x)-42,91$, $R^2=0,9961$) (Figura 1C) foi menor do que o calculado com a curva construída com os híbridos.

A equação da regressão linear ($y=18,84\ln(x)-21,80$) obtida para camundongos NIH foi semelhante à calculada para os Swiss Webster ($y=17,16\ln(x)-9,37$, $R^2=0,9761$). Nos dois casos, porém, os coeficientes angulares e lineares foram significativamente menores do que os determinados como híbrido B6D2F1 (Figuras 1B e 1E).

Os coeficientes de variação (CV) obtidos nos ensaios foram considerados satisfatórios. Nas doses de 30, 90 e 270 UI/camundongo, que são as utilizadas nos ensaios de potência neste estudo, os CV foram menores que 25% para todas as colônias/linhagens analisadas (Tabela 1).

Ensaio com camundongos Swiss Webster

O resultado do ensaio inicial com camundongos Swiss Webster diferiu até certo ponto daqueles resultados obtidos com o híbrido sugerido pela FE (B6D2F1), o que aparentemente corrobora o que foi relatado por Costa e colaboradores¹⁶. Como algumas características peculiares dos camundongos Swiss Webster poderiam ter contribuído para as diferenças constatadas, realizamos o ensaio com esses camundongos modificando alguns parâmetros que poderiam influenciar a resposta da medula óssea ao estímulo com a EPOhr. Nesse sentido, modificamos a faixa de idade e peso (inicialmente de 3 a 4 semanas/16-18 g) para 6-8 semanas de vida/27-29 g, o tempo de coleta do sangue para o 3° dia pós-administração e o volume injetado (0,5 mL). Na Tabela 1 são apresentados os resultados dos ensaios da EPOhr de referência (MRT(B)rhEPO/0208) conduzidos com Swiss Webster sob diferentes condições experimentais.

Todas as curvas dose-resposta construídas com Swiss Webster apresentaram linearidade satisfatória, com coeficiente $R^2>0,95$. Os testes com camundongos Swiss Webster com peso entre 16 g e 18 g e coleta de sangue no 3° dia (Figura 1D-1H) resultaram em coeficiente angular similar, mas coeficien-

te linear maior do que o obtido com o híbrido B6D2F1 (SW, $a=-16,47$ e B6D2F1, $a=-44,61$) (Tabela 2 e Figura 1). Considerando os valores médios do número de reticulócitos por dose testada, os Swiss Webster com 16-18 g e sangue coletado no 3° dia foram os que responderam melhor (maior número de reticulócitos a cada dose de EPOhr, sendo essa condição selecionada para os testes com diferentes amostras (lotes) de alfaepoetina (Tabela 1).

Comparação das relações dose-resposta e limites de confiança

Todos os ensaios de potência biológica de alfaepoetina analisados neste estudo, independente da linhagem/colônia do camundongo usado, foram satisfatórios quanto aos parâmetros de linearidade, paralelismo, termos quadráticos e diferença de quadráticos. Para o protocolo do ensaio, as doses correspondentes à parte linear da curva dose-resposta foram selecionadas, *i.e.*, 30, 90 e 270 UI/camundongo.

A análise de 10 amostras de EPOhr no teste de potência biológica utilizando o híbrido B6D2F1 resultou em potência variando entre 91% e 102% da declarada (4.000 UI), limites de confiança inferiores entre 75% e 87% e superiores entre 107% e 119%. As mesmas amostras testadas com a linhagem BALB/c resultaram em potência entre 91% e 104% da declarada. Em relação aos limites de confiança, o limite inferior ficou entre 73% e 88% e o superior entre 106% e 124%. A resposta da linhagem BALB/c foi, portanto, semelhante à do híbrido B6D2F1 para potência e limites de confiança inferiores, sendo os limites de confiança superiores aproximadamente 20% mais altos (Tabela 3, Figura 2).

Os testes com camundongos Swiss Webster resultaram em potências da EPOhr entre 91% e 101% da declarada. Em relação aos limites de confiança, os limites inferiores variaram entre 65% e 82%, enquanto os superiores variaram de 106% a 141%. Nesse caso (SW), as amostras de EPOhr 5 e 8 foram testadas duas vezes para a obtenção de resultados satisfatórios, pois nos primeiros ensaios os limites de confiança estavam fora dos valores preconizados pela FE (64%-156%). Deve-se destacar que as mesmas amostras testadas com o híbrido B6D2F1 revelaram potência variando entre 91% e 97% da declarada (Tabela 3, Figura 2). Os testes realizados com Swiss Webster resultaram

Tabela 2. Comparação dos coeficientes angulares e lineares das curvas dose-resposta do número absoluto de reticulócitos de camundongos (fêmeas) Swiss Webster, BALB/c, NIH e C57BL/6 em relação aos híbridos B6D2F1 tratados com MRT(B)rhEPO/0208 (10, 30, 90 e 270 UI/animal, sc) (n = 7).

Linhagem/Colônia	Equação da reta	Diferença nos coeficientes com relação ao B6D2F1
B6D2F1	$y = 25,93\ln(x)-44,61$	—
Swiss Webster (16-18g 3° dia)	$y = 27,27\ln(x)-16,47$	Coeficiente linear
Swiss Webster (16-18g 4° dia)	$y = 17,16\ln(x)-9,37$	Coeficiente linear
Swiss Webster (27-29g 3° dia 0,2 mL)	$y = 16,86\ln(x)-10,05$	Coeficiente angular e linear
Swiss Webster (27-29g 3° dia 0,5 mL)	$y = 17,84\ln(x)+2,68$	Coeficiente angular e linear
Swiss Webster (27-29g 4° dia)	$y = 17,07\ln(x)-22,88$	Coeficiente angular e linear
BALB/c	$y = 25,99\ln(x)-43,49$	Sem diferenças
C57BL/6	$y = 23,15\ln(x)-42,91$	Coeficiente linear
NIH	$y = 18,84\ln(x)-21,80$	Coeficiente angular e linear

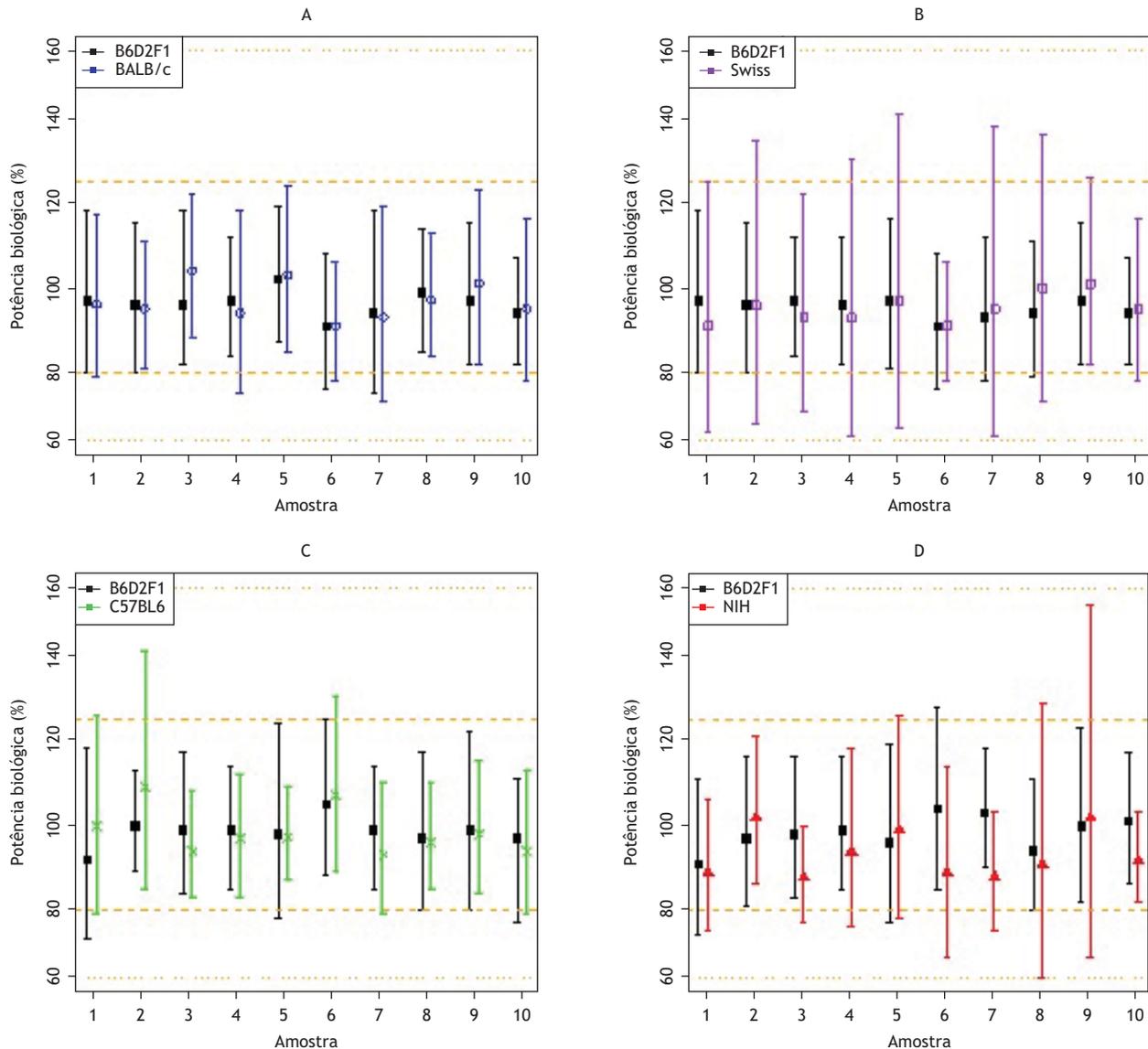


Figura 2. Estimativas da potência biológica relativa de alfaepoetina (% da potência declarada de 4.000 UI/mL) e respectivos limites de confiança (%) para 10 amostras em ensaios realizados com camundongos BALB/c, C57BL/6, NIH e Swiss Webster, comparadas as estimativas obtidas em testes conduzidos com o híbrido B6D2F1.

em respostas (potências) semelhantes às determinadas com o híbrido B6D2F1 para as mesmas amostras, embora os limites de confiança inferiores e superiores tenham exibido intervalos mais amplos de variação (Tabela 3, Figura 2).

Os resultados dos ensaios realizados com camundongos NIH mostraram potências entre 88% e 102% da declarada, com limites inferiores entre 64% e 86% e superiores variando entre 100% e 152%. Nesse caso também foram necessários dois retestes (amostras 9 e 10) porque os limites de confiança dos ensaios iniciais ficaram fora dos valores preconizados pela FE. A determinação da potência das mesmas amostras empregando o híbrido B6D2F1 resultou em potências variando entre 91% e 104% da declarada, limites de confiança inferiores entre 74% e 90% e superiores entre 111% e 128%. Portanto, os resultados dos testes realizados com

camundongos NIH foram semelhantes aos obtidos nos ensaios com o híbrido B6D2F1, embora os intervalos entre os limites de confiança inferior e superior tenham sido geralmente um pouco mais amplos no caso dos NIH (Tabela 3, Figura 2).

Nos ensaios de potência biológica de alfaepoetina utilizando a linhagem C57BL/6, a potência das amostras testadas variou entre 93% e 109% da declarada. Em relação aos limites de confiança, o limite inferior variou de 79% a 89% e o superior variou de 108% a 130%. A determinação da potência das mesmas amostras empregando a linhagem B6D2F1 resultou em potência entre 92% e 105%, limites de confiança inferiores entre 73% e 89% e superiores entre 111% e 125%, apresentando resultados similares aos da linhagem C57BL/6 para potência e ambos os limites de confiança (Tabela 3, Figura 2).



Tabela 3. Potência biológica relativa (%; 4.000 UI do padrão = 100%) e limites de confiança (%) de 10 amostras comerciais de EPOhr (4.000 UI) avaliadas em ensaios com camundongos BALB/c, NIH, Swiss Webster e C57BL/6 em comparação com o híbrido B6D2F1.

BALB/c							NIH						
Amostra	Potência (%)	UI	Potência B6D2F1 (%)	UI	Limites de confiança (%)	Limites de confiança B6D2F1 (%)	Amostra	Potência (%)	UI	Potência B6D2F1 (%)	UI	Limites de confiança (%)	Limites de confiança B6D2F1 (%)
1	96	3.840	97	3.880	79-117	80-118	1	89	3.560	91	3.640	75-106	74-111
2	95	3.800	96	3.840	81-111	80-115	2	102	4.080	97	3.880	86-121	81-116
3	104	4.160	96	3.840	88-122	82-118	3	88	3.520	98	3.920	77-100	83-116
4	94	3.760	97	3.880	75-118	84-112	4	94	3.760	99	3.960	76-118	85-116
5	103	4.120	102	4.080	85-124	87-119	5	99	3.960	96	3.840	78-126	77-119
6	91	3.640	91	3.640	78-106	76-108	6	89	3.560	104	4.160	69-114	85-128
7	93	3.720	94	3.760	73-119	75-118	7	88	3.520	103	4.120	75-103	90-118
8	97	3.880	99	3.960	84-113	85-114	8	91	3.640	94	3.760	64-129	80-111
9	101	4.040	97	3.880	82-123	82-115	9*	102	4.080	100	4.000	69-152	82-123
10	95	3.800	94	3.760	78-116	82-107	10*	92	3.680	101	4.040	82-103	86-117

Swiss Webster							C57BL/6						
Amostra	Potência (%)	UI	Potência B6D2F1 (%)	UI	Limites de confiança (%)	Limites de confiança B6D2F1 (%)	Amostra	Potência (%)	UI	Potência B6D2F1 (%)	UI	Limites de confiança (%)	Limites de confiança B6D2F1 (%)
1	91	3.640	97	3.880	66-125	80-118	1	100	4.000	92	3.680	79-126	73-118
2	96	3.840	96	3.840	68-135	80-115	2	109	4.360	100	4.000	85-141	89-113
3	93	3.720	97	3.880	71-122	84 - 112	3	94	3.760	99	3.960	83-108	84-117
4	93	3.720	96	3.840	65-130	82-112	4	97	3.880	99	3.960	83-112	85-114
5*	97	3.880	97	3.880	67-141	81 - 116	5	97	3.880	98	3.920	87-109	78-124
6	91	3.640	91	3.640	78-106	76-108	6	107	4.280	105	4.200	89-130	88-125
7	95	3.800	93	3.720	65-138	78-112	7	93	3.720	99	3.960	79-110	85-114
8*	100	4.000	94	3.760	73-136	79-111	8	96	3.840	97	3.880	85-110	80-117
9	101	4.040	97	3.880	82-126	82-115	9	98	3.920	99	3.960	84-115	80-122
10	95	3.800	94	3.760	78-116	82-107	10	94	3.760	97	3.880	79-113	77-111

* resultados obtidos com combinação de 2 ensaios.

Discussão

Os ensaios biológicos (ou bioensaios) quantitativos são utilizados para determinar a concentração, ou potência relativa de uma substância (ou preparação farmacêutica), o que é feito medindo a resposta biológica que a substância produz no organismo íntegro (*in vivo*) ou em partes dele (sistemas *in vitro*). Nos bioensaios, a determinação da potência relativa envolve comparar o efeito da substância (teste) no organismo teste com aquele produzido por preparação (ou substância) de referência ou padrão^{7, 18}.

Historicamente os ensaios *in vivo* foram empregados para padronizar preparações vegetais utilizadas como medicamentos, frequentemente de alta potência e índice terapêutico estreito (*e.g.*, folhas de *Digitalis lanata* secas e trituradas usadas como medicamento cardiotônico)¹⁹. Atualmente, o uso de ensaios *in vivo* para determinação de potência é bem mais restrito, envolvendo geralmente preparações com atividade hormonal, vitaminas e alguns produtos biológicos (hormônio²⁰, vitaminas²¹, outros produtos²²).

Entre os ensaios (*in vivo*) preconizados pela FE, o teste conduzido com camundongos normocitêmicos é um dos mais

utilizados pelas indústrias farmacêuticas para controle de qualidade da alfaepoetina, pela facilidade de realização e pelo fato de exigir menor número de animais quando comparado com o modelo de camundongos policitêmicos. Atualmente, a FE recomenda o uso de camundongos normocitêmicos híbridos B6D2F1. Híbridos de linhagens isogênicas como o B6D2F1 (filhos nascidos do cruzamento de fêmea C57BL/6 com macho DBA/2) têm o inconveniente de serem de difícil manejo (os genitores isogênicos são de baixa fecundidade em comparação com não isogênicos) e manutenção, porque somente a prole feminina da primeira geração do cruzamento das duas linhagens isogênicas é utilizada nos testes.

Embora tenha havido sugestões para aperfeiçoar o ensaio de potência para preparações de EPOhr, os estudos sobre o emprego alternativo de camundongos de outras colônias/linhagens no teste são escassos.

Neste estudo realizamos o ensaio biológico de potência da EPOhr em camundongos (normocitêmicos) híbridos B6D2F1, tal como recomendado pela FE. Os resultados obtidos confirmaram que a resposta do híbrido B6D2F1 à EPOhr (estimulação da eritropoiese medida pelo número de reticulócitos no sangue periférico) foi relacionada à dose administrada tal como in-



dicado pela linearidade (regressão linear, $R^2=0,9987$) e coeficiente angular da curva dose-resposta.

Os coeficientes angular (inclinação da curva) e linear (interseção com o eixo das ordenadas, y) da curva dose-resposta construída com camundongos BALB/c ($y=25,99\ln(x)-43,49$) foram muito semelhantes aos obtidos com o híbrido B6D2F1 ($y=25,93\ln(x)-44,61$), de modo que as curvas são paralelas e praticamente superpostas, como pode ser visualizado na Figura 1. O coeficiente angular da curva dose-resposta feita com camundongos C57BL/6 ($y=23,15\ln(x)-42,91$) é também próximo ao obtido com o híbrido e o coeficiente linear é um pouco menor, havendo um discreto desvio do paralelismo com interseção em ponto inferior do eixo dos y (Figura 1). A linearidade e ajuste à reta aos pontos indicados pelos coeficientes R^2 dos ensaios com as linhagens C57BL/6 ($R^2=0,9961$) e BALB/c ($R^2=0,9815$) foram também elevados e próximos ao registrado com o híbrido B6D2F1 (Figura 1). Digno de registro é o fato de a similaridade genética das fêmeas C57BL/6 e B6D2F1 ser significativa, já que ambas compartilham a mesma herança materna (C57BL/6). Além disso, BALB/c e C57BL/6 apresentaram fenótipo similar ao híbrido B6D2F1 para a relação ganho de peso e idade, características que podem ter contribuído para a semelhança da resposta ao tratamento com EPOhr.

O coeficiente angular da reta no ensaio com camundongos Swiss Webster (16-18g, 3° dia) foi semelhante ao coeficiente calculado para a reta no teste com o híbrido B6D2F1. Entretanto, o coeficiente linear no ensaio com o Swiss Webster foi maior, de modo que, embora a linha seja paralela, ela está localizada acima da reta que corresponde ao teste com o híbrido (Figura 1).

Os coeficientes angulares das retas obtidas em ensaios com camundongos NIH e Swiss Webster (27-29 g 4° dia de coleta) são diferentes (inclinações menores) das construídas com o híbrido, sendo diferentes também as intersecções com o eixo dos y .

É importante lembrar que as inclinações (coeficientes angulares) da reta que relaciona dose e resposta têm reflexos na precisão das estimativas da atividade biológica, pois o erro-padrão da estimativa da atividade para determinada dose é inversamente proporcional à magnitude da inclinação da reta⁷.

Neste estudo, para comparar ensaios de potência da EPOhr empregando camundongos de diferentes colônias/linhagens, construímos curvas dose-resposta com o material de referência (MRT(B)rhEPO/0208) e com 10 lotes comerciais (alfaepoetina). Todos os ensaios de potência realizados neste estudo com o híbrido B6D2F1 e demais colônias/linhagens de camundongos foram satisfatórios com relação aos parâmetros de linearidade, paralelismo, termos quadráticos e diferença de quadráticos cumprindo os requisitos estatísticos de validação, conforme preconizado pela FE. Esse resultado indica que – em princípio – é viável realizar o ensaio de potência da alfaepoetina com camundongos de todas as colônias/linhagens analisadas no estudo. Alguns ajustes, entretanto, podem ser necessários para reduzir a variância das medidas de atividade registradas em algumas das situações examinadas no estudo.

Cumprir salientar que no caso dos camundongos Swiss Webster e NIH foi necessário combinar 2 ensaios para a obtenção de dados válidos, conforme preconizado pela FE. Como essas linhagens não são isogênicas (*i.e.*, são *outbred*) a maior dispersão ou variabilidade das respostas seria esperada, em virtude da maior variabilidade do genótipo entre indivíduos. Assim, apesar das estimativas (médias) da potência determinadas em ensaios com camundongos Swiss Webster e NIH e com o híbrido B6D2F1 serem próximas, os intervalos entre os limites de confiança inferior e superior foram mais amplos para os não isogênicos, quando comparados ao híbrido de duas cepas isogênicas.

O uso de linhagens isogênicas BALB/c e C57BL6 resultou em estimativas muito similares em termos de potência e amplitude dos limites de confiança às obtidas com emprego do híbrido B6D2F1. Nesses casos não foi necessário combinar mais de um ensaio para obtenção dos valores válidos preconizados pela FE. para potência e limites de confiança.

Além da uniformidade genética é possível que a semelhança entre essas duas linhagens e o híbrido quanto às curvas de ganho de peso com a idade também tenha contribuído para reduzir a variação entre os ensaios.

A comparação entre o híbrido B6D2F1 e os demais camundongos quanto ao número de reticulócitos registrados após o tratamento com as doses de 30, 90 e 270 UI de EPOhr por animal revela que todos os coeficientes de variação foram menores que 25%. Esse coeficiente de variação para as medidas de atividade das EPOhr realizadas nos ensaios é satisfatório¹⁵.

Entre os camundongos investigados neste estudo, a linhagem BALB/c foi a mais semelhante ao híbrido B6D2F1 em relação à média de reticulócitos por dose. Por outro lado, a resposta dos camundongos Swiss Webster ao tratamento com EPOhr foi a que mais se distanciou da do híbrido. No caso dos Swiss Webster (16-18 g, 3° dia de coleta de sangue) os números médios de reticulócitos foram 80, 115 e 129 para as doses 30, 90 e 270 UI/animal, respectivamente, enquanto no ensaio com o híbrido B6D2F1 os números médios de reticulócitos foram 43, 70 e 102 para doses 30, 90 e 270 UI/animal, respectivamente.

Uma das hipóteses para explicar a discrepância entre Swiss Webster e B6D2F1 quanto aos números médios de reticulócitos é a grande diferença de ganho ponderal com a idade. O Swiss Webster atinge 16-18 g de peso corporal com aproximadamente 4 semanas de vida, enquanto o B6D2F1 alcança essa faixa de peso com cerca de 6 semanas de vida. Portanto, Swiss Webster com peso comparável ao híbrido é bem mais jovem do que este, apresenta maior atividade eritropoiética e aparentemente maior sensibilidade aos efeitos estimuladores da EPOhr¹⁴.

Apesar de ensaios comparativos entre colônias/linhagens serem escassos na literatura, encontramos alguns poucos trabalhos sobre o ensaio de potência de alfaepoetina com camundongos normocitêmicos utilizando BALB/c¹⁵, CF1^{1,12,13}, B6D2F1⁷ e Swiss Webster^{14,16}. Até a presente data – além do presente estudo – somente o trabalho de Costa e colaboradores¹⁶ e a dissertação de mestrado de Lopes¹⁴ compararam o ensaio de potência de alfaepoetina com camundongos Swiss Webster com o teste realizado com B6D2F1. Os dois estudos anteriores



sugerem que a utilização de camundongos Swiss Webster é alternativa válida ao híbrido B6D2F1 para avaliação da potência biológica da alfaepoetina, o que é em linhas gerais consistente com os resultados deste estudo. Lopes¹⁴, inicialmente, administrou dose única de alfaepoetina, obedecendo a uma sequência geométrica de base 2 entre as doses (20, 40 e 80 UI/animal), coleta de sangue no 4º dia após inoculação, animais B6D2F1 com peso entre 16 g e 20 g e Swiss Webster com peso entre 28 g e 34 g. Os resultados dos ensaios realizados nessas condições, entretanto, exibem grande variabilidade em termos das medidas do número de reticulócitos em todas as doses (CV maiores que 25%). Após a modificação da administração do biofarmaco para esquema de doses múltiplas (4 aplicações diárias) e sequência geométrica de base 3 entre as doses (2,5, 7,5 e 22,5 UI/animal), Lopes¹⁴ conseguiu uma redução dos CV que atingiram o máximo de 14,09%.

Costa *et al.*¹⁶ conduziram os seus experimentos com esquema de dose única, sequência de base 3 entre as doses (30, 90 e 270 UI/animal), coleta de sangue no 3º dia para os camundongos Swiss Webster e faixa de peso entre 16 g e 18 g. Diferentemente do que havia sido observado por Lopes¹⁴ em trabalho anterior, Costa *et al.*¹⁶ relataram CVs inferiores a 20% para medidas do número de reticulócitos nas 3 doses avaliadas, o que é consistente com os CVs obtidos em teste análogo no presente estudo.

Ramos *et al.*¹³ fizeram comparações entre métodos visuais (contagem em esfregaços sanguíneos após coloração de reticulócitos com azul de cresil brilhante e contagem em câmara de Neubauer após hemólise seletiva de eritrócitos) e a citometria de fluxo para medir a resposta (número de reticulócitos) em ensaio de potência da EPOhr com a linhagem murina CF1. Os autores adotaram esquema de dose única (10, 30 e 90 UI/ camundongo), coletaram o sangue no 4º dia após a injeção de EPOhr e constataram que eram necessários pelo menos 2 ensaios independentes por amostra para a obtenção de valores de potência e limites de confiança preconizados pela FE.

No presente estudo os ensaios comparativos entre B6D2F1 e demais colônias/linhagens foram realizados com administração de dose única de alfaepoetina, coleta de sangue no 4º dia (3º dia para os Swiss Webster), faixa de peso entre 16-18 g e sequência geométrica de base 3 entre as doses (30, 90 e 270 UI/animal). Nessas condições experimentais, exceto no caso dos testes conduzidos com NIH e Swiss Webster (que exigiram 2 repetições), os resultados de todos os ensaios foram válidos (segundo critérios da FE) sem necessidade de repetições.

Conclusões

Os resultados deste estudo mostraram que é em princípio viável realizar o ensaio de potência da alfaepoetina com camundongos normocitêmicos BALB/c, C57BL/6, NIH e Swiss Webster. Ensaios com esses camundongos, portanto, podem ser considerados como potenciais alternativas ao ensaio com o híbrido B6D2F1, o único que é atualmente recomen-

dado para ensaio de potência da EPOhr pelas Farmacopeias Europeia e Brasileira.

Os ensaios realizados com camundongos da linhagem BALB/c foram, entre todos os camundongos analisados, os que deram origem a medidas de atividade da EPOhr (valores médios de reticulócitos para as doses 30, 90 e 270 UI/animal), coeficientes angulares e lineares da curva dose-resposta e coeficientes de variação, mais próximos aos obtidos nos testes com os híbridos B6D2F1.

Agradecimentos

Agradecimentos a Lilia Ribeiro Seródio pelo constante incentivo de aprendizagem e apoio para o desenvolvimento deste trabalho e aos técnicos do Laboratório de Experimentação Animal de Bio-Manguinhos e especialmente Jhônata Willy Rocha Coelho e Luiz Gustavo de Almeida Campos. Este trabalho é parte da Tese de Doutorado de Igor Barbosa da Silva, apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública da ENSP/Fiocruz.

Referências

- Schmidt CA, Ramos AS, Silva JEP, Fronza M, Dalmora SL. Avaliação da atividade e caracterização da eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;47(2):183-9.
- Jelkmann W. Molecular Biology of Erythropoietin. *Internal Medicine.* 2004;43(8):649-59.
- Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: A common mechanism of action. *Exp Hematol.* 2008;36(12):1573-84.
- Weiss MJ. New Insights into erythropoietin and Epoetin Alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications. *The Oncologist.* 2003;8(suppl 3):18-29.
- Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA.* 2005;293(1):90-5.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.981 de 26 de novembro de 2009. Aprova o Componente Especializado da Assistência Farmacêutica. *Diário Oficial da União.* 30 nov. 2009; Seção 1, p. 725.
- Farmacopeia Europeia 7ª edição, Strasbourg: Council of Europe, 2011.
- Barbone AG, Aparício B, Anderson DW, Natarajan J, Ritchie DM. Reticulocyte measurement as a bioassay for erythropoietin. *J Pharma Biomed Anal.* 1994;12(4):515-21.
- Gilg D, Riedl B, Zier A, Zimmermann MF. Analytical methods for characterization and quality control of pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an example. *Pharma Acta Helv.* 1996;71(6):383-94.
- Choi D, Kim M, Park J. Erythropoietin: physico and biochemical analysis. *J Chromatogr B.* 1996;687(1):189-99.
- Park SS, Park J, Ko J, Chen L, Meriage D, Crouse-Zeineddini J, et al. Biochemical assessment of erythropoietin products from Asia versus US Epoetin alfa manufactured by Amgen. *J Pharm Sci.* 2009;98(5):1688-99.



12. Albertengo ME, Valcarce GA, Oliva LM, Baiges DL, Alonso BS, Chiale CA. Eritropoietina recombinante humana: método de valoración in vivo con ratones normocitêmicos. *Sangre*. 1999;44(5):357-63.
13. Ramos AS, Schmidt CA, Andrade SS, Fronza M, Rafferty B, Dalmora SL. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(11):1561-69.
14. Lopes MC. Avaliação da potência biológica da eritropoetina humana recombinante em produtos farmacêuticos: Estudo comparativo entre as linhagens de camundongos B6D2F1 e Swiss Webster. [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2004.
15. Barth T, Oliveira PR, D'Avila FB, Dalmora SL. Validation of the Normocythemmic mice Bioassay for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. *J AOAC Int*. 2008;91(2):285-91.
16. Costa RN, Abreu CLC, Nascimento MC, Nogueira ACMA, Delgado IF. Evaluation of the Applicability of Swiss Webster Lineage on the Biological Potency Test of Recombinant Human Erythropoietin. *IJBB*. 2010;1(1):49-59.
17. World Health Organization. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Geneva; 1997. p. 69-73.
18. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
19. Jacobsen E, Larsen V. Experiences with the Bioassay of Digitalis on Guinea Pigs. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1951; 7(1): 35-50.
20. Bellini MH, Bartolini P. In vivo bioassay for the potency determination of human growth hormone in dwarf "little" mice. *Endocrinology*. 1993;132(5):2051-5.
21. Chiellini G, Rapposelli S, Zhu J, Massarelli I, Saraceno M, Bianucci AM, Plum LA, Clagett-Dame M, DeLuca HF. Synthesis and biological activities of vitamin D-like inhibitors of CYP24 hydroxylase. *Steroids*. 2012;77(3):212-23.
22. Sesardic T. Bioassays for evaluation of medical products derived from bacterial toxins. *Curr Opin Microbiol*. 2012; 15(3):310-6.

Data de recebimento: 06/08/2013

Data de aceite: 29/08/2013