

Avaliação da concordância entre as linhagens de camundongos Swiss Webster e B6D2F1 no teste de potência da Eritropoietina Humana Recombinante (rhEPO): a experiência do Laboratório Nacional de Controle

Evaluation of the agreement between Swiss Webster and B6D2F1 mice lineages in the potency test of Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO): the Brazilian National Control Laboratory experience

RIALA6/1668

Michele Cardoso do NASCIMENTO*, Clarice Lima do Canto ABREU, Rodrigo Netto COSTA, Wlamir Corrêa de MOURA, Isabella Fernandes DELGADO

*Endereço para correspondência: Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células, Setor de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Avenida Brasil, 4365, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel: 21 3865-5262. E-mail: michele.nascimento@incqs.fiocruz.br

Recebido: 15.09.2015 - Aceito para publicação: 27.11.2015

RESUMO

A eritropoietina humana recombinante (rhEPO) é um hormônio glicoproteico. Diante da gama de produtos contendo rhEPO disponíveis no mercado, da abrangência da indicação terapêutica e das características dos usuários de rhEPO, o ensaio de atividade biológica é de grande importância para o processo de liberação de lotes deste produto. O teste de potência é uma avaliação laboratorial para averiguar a eficácia do produto final, recomendada pela Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.). Este trabalho teve como objetivo avaliar a concordância entre os valores de potência biológica obtidos quando a linhagem de camundongos preconizada pela Ph. Eur. (B6D2F1) foi utilizada em comparação com a Swiss Webster (SW). Vinte e dois lotes foram testados usando-se estas duas linhagens, e 44 ensaios válidos foram obtidos com resultados satisfatórios. Em nenhuma das análises houve necessidade de efetuar repetição de ensaios, bem como a combinação de resultados. A variação entre linhagens e a veracidade foram avaliadas, obtendo-se os seguintes resultados: Coeficiente de Variação (CV) < 10 %; Erro Relativo % (ER %) < 10 %, respectivamente. As linhagens testadas geraram resultados homogêneos sem diferença estatisticamente significativa entre elas. A linhagem SW mostrou características adequadas para ser empregada como alternativa à linhagem B6D2F1 na avaliação da potência biológica de rhEPO.

Palavras-chave. eritropoietina humana recombinante, biológicos, vigilância sanitária, concordância, Swiss Webster, B6D2F1.

ABSTRACT

The recombinant human erythropoietin (rhEPO) is a glycoprotein hormone. In face of the broad range of rhEPO-containing products in the market, the scope of their therapeutic indication and the characteristics of the rhEPO users, the biological activity testing is of high relevance for their batches releasing process. The potency testing is a laboratory evaluation for assessing the effectiveness of the final product, recommended by the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). This paper aimed at evaluating the agreement between the biological activity results obtained when the strain of mice-B6D2F1, recommended by Ph. Eur., was used in comparison to the Swiss Webster (SW). Twenty-two batches were assayed using these two mice strains, and a total of 44 valid assays were obtained with satisfactory results. In none of these analyses, neither repeating assays nor results combination were needed. The inter-strains variation and the accuracy were evaluated, and the following results were detected: Coefficient of Variation (VC) < 10 % and Relative Error % (RE) < 10 %, respectively. The tested lineage provided homogeneous results, and no statistically significant difference between them was found. The SW strain might be used as an alternative in place of B6D2F1 for performing the biological potency evaluation of rhEPO.

Keywords. recombinant human erythropoietin, biologicals, sanitary surveillance, agreement, Swiss Webster, B6D2F1.

INTRODUÇÃO

A eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoproteico essencial à vida. É produzido no indivíduo adulto principalmente pelas células do córtex renal e tem como principal função a regulação da eritropoiese¹⁻⁵.

Em 1977, a EPO foi extraída e purificada da urina de pacientes anêmicos. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante (rDNA), baseado na sequência de aminoácidos dos dados da purificação, o gene da EPO humana foi então clonado para obter a Eritropoietina Humana Recombinante (rhEPO), um avanço tecnológico que revolucionou o tratamento da anemia^{6,7}.

Antes do desenvolvimento da rhEPO, a transfusão de sangue era o mais comum tratamento para pacientes com anemia, contudo, desde o seu advento, a rhEPO vem sendo amplamente utilizada na prática clínica, para redução da necessidade de transfusão sanguínea em processos cirúrgicos⁸ e no tratamento de anemias de várias etiologias^{9,10}.

Um fator de grande relevância, quando do uso da rhEPO, diz respeito à sobrevida dos pacientes e à melhora da qualidade de vida, ocorrendo um decréscimo na sensação de fadiga. O uso da rhEPO permite normalizar o apetite de pacientes anêmicos e acelerar o seu retorno às atividades de rotina^{11,12}.

A patente das primeiras formulações de eritropoietina disponíveis comercialmente começou a expirar em 2007, o que levou ao surgimento de eritropoietinas similares no mercado mundial, chamadas de biossimilares. Este fato causa preocupação aos órgãos regulatórios, sobretudo quanto à eficácia e segurança de tais produtos, uma vez que os mesmos não são idênticos aos originais^{13,14}.

Diante da gama de produtos disponíveis no mercado, da abrangência da indicação terapêutica e das características dos pacientes usuários de rhEPO, é de grande importância o efetivo controle da qualidade deste produto previamente ao seu ingresso no mercado. Dentre os testes preconizados pela Farmacopeia Europeia (*Ph. Eur.*)¹⁵ para controle da qualidade deste produto, está o ensaio de potência ou

atividade biológica, que é uma avaliação laboratorial de suma importância, uma vez que seu resultado está relacionado à eficácia do produto final.

Atualmente, esta avaliação pode ser realizada por dois métodos distintos. Um método utiliza camundongos policitêmicos (método A) e outro utiliza camundongos normocitêmicos (método B)¹⁵. O método B tem sido o método de escolha, uma vez que o método A - em camundongos policitêmicos - causa maior sofrimento e estresse aos animais que devem ser mantidos por longos períodos em câmaras hipobáricas e expostos a radioisótopos¹⁶.

Como resultado dessa escolha, diferentes linhagens de camundongos normocitêmicos têm sido testadas para a avaliação da potência de rhEPO, tais como CF1, BALB/c, *Swiss Webster* (SW), NIH, C57BL6, e B6D2F1^{15, 17-21}.

A linhagem B6D2F1 é um híbrido de primeira geração do cruzamento de duas linhagens *inbred*, (fêmea de C57BL/6 com o macho de DBA/2)²² tem menor porte, menor número de filhotes por ninhada e menor fertilidade, quando comparada aos animais *outbred*. Camundongos híbridos de primeira geração (F1) têm como vantagens a uniformidade genética e fenotípica, a maior resistência a doenças e maior longevidade²²⁻²⁴.

Animais *outbred* são também chamados animais heterogênicos. Este estado de alta heterozigose (99 %) deve ser conhecido e mantido. São animais de constituição genética variada, por serem obtidos por cruzamentos aleatórios, evitando que os animais em acasalamento sejam parentes próximos. Com isso, busca-se manter um baixíssimo grau de consanguinidade, cerca de 1 %²³⁻²⁵.

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

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar os resultados de

potência de rhEPO obtidos pelo Laboratório Nacional de Controle (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/Fiocruz) com as linhagens B6D2F1 e SW de forma a avaliar a concordância entre essas linhagens.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras e reagentes utilizados

Foram utilizadas 22 amostras de rhEPO recebidas no INCQS para análise, modalidade orientação, no período de 2010-2012, com apresentação de 4.000 UI/mL.

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

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

Animais de laboratório

Foram utilizados em cada teste, 36 camundongos normocitêmicos de cada uma das linhagens SW e B6D2F1, fêmeas com peso variando entre 15 e 17 g provenientes do CECAL/Fiocruz (Centro de Criação de Animais de Laboratório).

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

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

Avaliação da potência biológica

Foram realizados 22 ensaios para a avaliação da potência biológica de rhEPO utilizando cada uma das linhagens SW e B6D2F1, conforme metodologia descrita na *Ph. Eur.*¹⁵ - método B e POP 65.3430.042²⁶. Este método tem como base a medida do estímulo da produção de reticulócitos após a injeção de rhEPO, sem qualquer exposição prévia.

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

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

O mesmo procedimento foi aplicado em ambas as linhagens, B6D2F1 e SW, para cada amostra testada.

Cálculos e análise estatística

O método de linhas paralelas, ensaio 3+3 doses, com delineamento de blocos ao acaso foi utilizado para avaliar a validade do ensaio e para o cálculo da estimativa de potência. Para tal, utilizou-se o programa computacional CombiStats^{®27} desenvolvido segundo o capítulo 5.3 da *Ph. Eur.*²⁸, o qual foi alimentado com os

dados da contagem dos reticulócitos.

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

- **regressão linear:** deve ser significativa, ou seja, a probabilidade calculada deve ser menor que 0,05;
- **linearidade:** não deve haver desvios significativos, ou seja, a probabilidade calculada deve ser maior ou igual a 0,05;
- **paralelismo:** não deve haver desvios significativos, ou seja, a probabilidade calculada deve ser maior ou igual a 0,05;

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

Foi realizada uma análise estatística para avaliar a variabilidade e o grau de concordância entre as linhagens estudadas. Para tal foram aplicados os seguintes testes: (a) Análise de variância; (b) Teste qui-quadrado; (c) Gráfico de Bland-Altman e (d) Regra 4-6-30 % com Erro Relativo e Coeficiente de Variação.

(a) Análise de variância

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

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

(b) Teste qui-quadrado

A concordância entre os resultados das diferentes linhagens foi avaliada, utilizando o programa CombiStats^{®27}, por meio do teste qui-quadrado para determinar a homogeneidade entre os dados utilizando os intervalos de confiança da potência como fator de ponderação, com $\alpha = 0,05$. Quando o valor calculado no teste qui-quadrado foi maior do que o valor tabulado, as potências foram consideradas heterogêneas, o que foi demonstrado pela obtenção de $p < 0,05$. Isto significa que a variação entre as estimativas individuais foi

maior do que havia sido previsto a partir das estimativas dos limites de confiança, isto é, que existe uma variabilidade significativa entre os ensaios²⁸.

(c) Gráfico de Bland-Altman

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

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

Segundo Bland e Altman²⁹, medir as diferenças entre dois métodos para cada amostra e testá-las contra as médias é a melhor maneira de avaliar a relação entre os métodos. A dispersão das diferenças ao longo da linha zero é uma indicação da concordância entre os dois métodos²⁹.

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

Os critérios de aceitação para a validação de ensaios do *Food and Drug Administration* – FDA³⁰ preconizam que pelo menos 66,7 % (4 em 6 resultados) das amostras de controle da qualidade estejam entre 15 % do seu valor nominal. Porém, em certas circunstâncias, critérios de aceitação mais amplos podem ser justificáveis. Este critério ficou conhecido como a regra 4-6-15³¹.

Bioensaios normalmente usados para estimar a potência de drogas podem ser distinguidos de testes químicos por serem realizados em substratos biológicos (e.g. animais, células vivas ou complexos funcionais de receptores alvo), e desta forma, devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos advindos da base biológica, eles tipicamente exibem uma maior variabilidade do que os testes químicos³². Assim, foi avaliada a proporção de Erro Relativo (ER) de resultados de potência obtidos nas duas linhagens utilizadas no estudo, que se apresentou dentro do intervalo esperado para Tendência de ± 30 %, visando determinar se o ensaio obedece ao critério de aceitação 4-6-n %, como descrito pelo FDA³⁰, adotando o ER máximo aceito de 30 % (4-6-30). Desta

forma, o método utilizando a linhagem SW é considerado satisfatório se pelo menos 4 (66,7 %) em 6 ensaios apresentarem resultados dentro da faixa de ± 30 %.

Para calcular as tendências (do termo inglês *bias*, diferença entre a expectativa de resultado de um teste ou medição e um valor verdadeiro³³) entre os resultados obtidos pelas duas linhagens, os valores de potência em porcentagem obtidos com a linhagem B6D2F1, foram considerados como o valor verdadeiro e a diferença entre os valores percentuais destes resultados com os da linhagem SW, para cada par de resultados, foram considerados como o ER, sendo também calculados os coeficientes de variação (CV %) para cada par de resultados.

A Veracidade (do termo inglês *trueeness*, grau de concordância entre a expectativa de um resultado de teste ou um resultado de medição e um valor verdadeiro³³) expressa como Erro Relativo percentual (ER %) foi calculada utilizando a equação 1. Neste caso, a potência nominal foi considerada como 100 %.

Equação 1

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

Onde:

ER% = Erro Relativo percentual

μ = média dos resultados obtidos

μ_T = Potência nominal

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados de potência para cada amostra em cada linhagem. Os valores de potência na linhagem SW variaram entre 80 e 113 %. Os limites entre 70 e 129 % e a média entre as 22 amostras testadas foi 92,77 %, com uma veracidade (expressa pelo ER %) de -7,23 %. Os valores de potência na linhagem B6D2F1 variaram de 80 a 102 %. E os limites entre 70 e 116 %. A média dos valores de potência para as 22 amostras testadas foi de 92,95 %, com uma veracidade (expressa pelo ER %) de -7,05 %.

Tabela 1. Valores de potência e limites de confiança obtidos para 22 amostras de rhEPO testadas utilizando as linhagens de camundongos SW e B6D2F1

Amostra	Linhagem							
	SW			B6D2F1			SW x B6D2F1	
	Pot (%)	LI (%)	LS (%)	Pot (%)	LI (%)	LS (%)	CV%	ER
1	92	72	116	98	84	115	4,87	-6
2	98	85	112	93	76	113	3,53	5
3	88	76	102	93	80	107	3,72	-5
4	83	73	95	98	86	112	11,83	-15
5	80	70	91	99	85	116	15,28	-19
6	113	99	129	80	64	99	24,37	33
7	96	76	121	94	83	106	1,83	2
8	94	80	109	93	78	110	0,61	1
9	90	78	103	93	80	109	2,55	-3
10	98	90	106	97	87	108	0,73	1
11	94	73	121	86	76	103	4,36	8
12	102	91	114	98	82	118	2,81	4
13	110	97	126	95	81	112	10,48	15
14	86	74	101	88	75	103	1,38	-2
15	92	81	104	97	89	106	3,90	-5
16	81	71	93	95	82	109	10,59	-14
17	98	85	113	102	92	114	21,13	-4
18	85	71	102	96	81	112	7,94	-11
19	87	74	101	82	70	95	4,13	5
20	93	82	106	86	73	102	5,25	7
21	88	77	101	90	81	100	1,39	-2
22	93	78	110	92	83	103	0,36	1
μ	92,77			92,95				
ER%	-7,23			-7,05				

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

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

Com a finalidade de avaliar o grau de concordância entre os resultados, a homogeneidade foi determinada. Os resultados obtidos por amostra nas duas linhagens foram submetidos ao teste qui-quadrado utilizando o programa CombiStats²⁷. Os resultados da comparação dos ensaios podem ser vistos na Tabela 2. Foi adotado um nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$), onde 20 dos 22 pares de resultados (90,90 %) foram considerados homogêneos ($p > 0,05$). Apenas as amostras 5 e 6 foram consideradas heterogêneas ($p < 0,05$).

Tabela 2. Valores de p obtidos no teste qui-quadrado entre pares de resultados de potência obtidos nas linhagens de camundongos SW x B6D2F1 em 22 amostras testadas

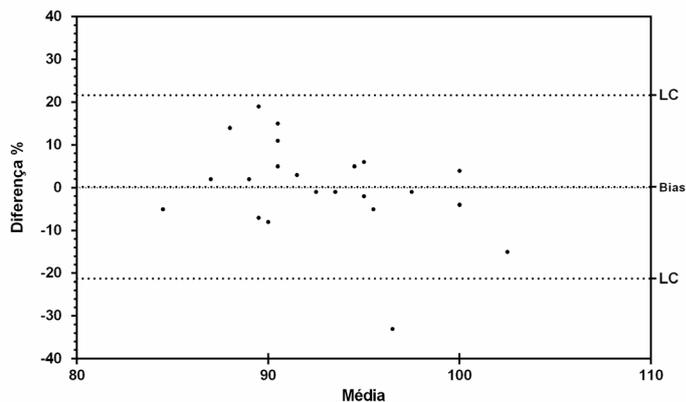
Amostra	valor p	Amostra	valor p
1	0,618	12	0,704
2	0,668	13	0,142
3	0,597	14	0,860
4	0,069	15	0,454
5	0,027	16	0,114
6	0,006	17	0,646
7	0,840	18	0,335
8	0,936	19	0,577
9	0,721	20	0,466
10	0,879	21	0,812
11	0,666	22	0,959

SW: Swiss Webster

Para avaliar a concordância entre as linhagens de camundongos SW e B6D2F1 foi aplicado o método de Bland-Altman²⁹, o qual foi realizado utilizando o programa de computador GraphPad Prism®, analisando os valores de potência das 22 amostras testadas nas duas

linhagens. A Figura 1 apresenta as diferenças e as médias entre as duas linhagens, de cada amostra testada, com a tendência ($bias = 0,1818$) e os limites de concordância (LC: -21,29 a 21,66). Apenas um valor ficou fora do LC.

No eixo x estão representadas as médias ($[B6D2F1+SW]/2$) e no eixo Y as diferenças (B6D2F1-SW). Foi calculado o Erro Relativo (ER) entre os valores percentuais de potência para a mesma amostra testada nas duas linhagens.



LC: Limite de Concordância; *bias*: Tendência

Figura 1. Bland-Altman para as linhagens de camundongos SW x B6D2F1

Observando a Figura 2 e a Tabela 1, podemos ver que a maior parte dos valores de ER (16/22) encontra-se dentro de ± 10 %, apenas um ER ficou acima de ± 30 % (ER = 33; amostra 6).

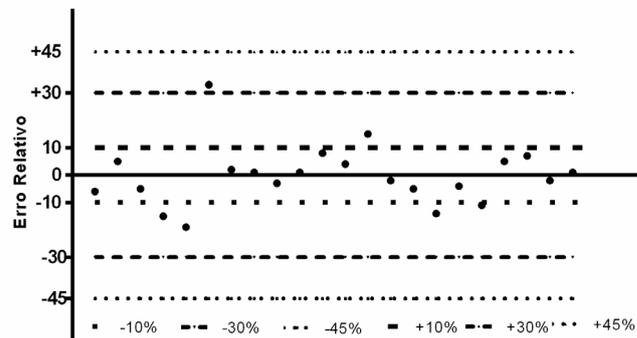
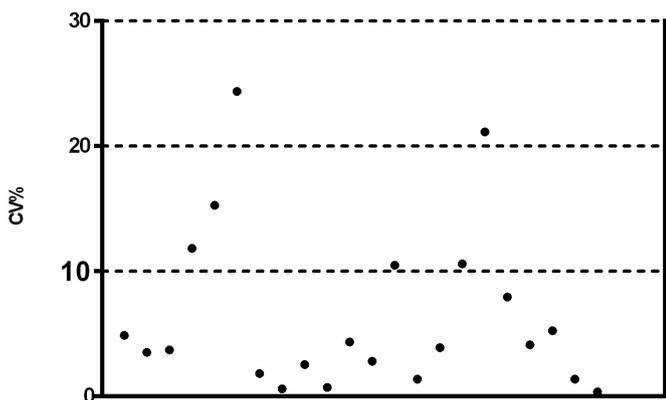


Figura 2. Erro Relativo entre as linhagens de camundongos SW e B6D2F1 (n=22)

O CV% entre as linhagens SW e B6D2F1 foi calculado a cada ensaio e 16 dos 22 valores ficaram abaixo de 10 % (tabela 1). A figura 3 apresenta a distribuição desses valores. Podemos observar que todos os valores de CV% ficaram abaixo de 30 %.



CV%: Coeficiente de Variação %

Figura 3. Coeficiente de Variação % entre as linhagens de camundongos SW e B6D2F1 (n=22)

DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta, purificação, clonagem e produção pela tecnologia do DNA recombinante, dando origem a rhEPO, a EPO vem sendo amplamente estudada. Na seleção de ensaios a serem realizados durante o processo de controle da qualidade da rhEPO, deve se levar em consideração a complexidade deste medicamento biológico, com padrão de glicosilação heterogêneo, onde o conteúdo de ácido siálico pode influenciar significativamente em seu metabolismo. Deste modo e dada tal complexidade, não há ainda modelos *in vitro* para a avaliação da atividade biológica da rhEPO, e internacionalmente, preconiza-se a realização de testes *in vivo* para determinação de sua potência^{15,17}.

Todos os ensaios realizados - tanto na linhagem SW quanto na B6D2F1 - cumpriram com os critérios de validade (regressão, linearidade e paralelismo) e apresentaram resultados dentro dos limites estabelecidos pela *Ph. Eur.*¹⁵, isto é, a potência entre 80 % e 125 % e limites entre 64 % e 156 % da potência rotulada. Em todos os

grupos de dados avaliados, não existe evidência estatística que comprove que a distribuição não seja normal pelo teste de KS, $p > 0,05$.

Cabe ainda ressaltar, que segundo recomendação da *Ph. Eur.* é possível a combinação de resultados válidos obtidos em ensaios independentes de potência biológica para a liberação de um lote de rhEPO e que no presente estudo, não houve a necessidade de combinação de ensaios para obtenção de resultados satisfatórios em nenhuma das duas linhagens testadas. Esses dados diferem de estudos anteriores, onde foi necessária a combinação de dois ou até três ensaios independentes para obtenção de resultados satisfatórios para uma mesma amostra, tanto na linhagem SW^{21,34,35} como em outras linhagens¹⁷⁻²⁰. Este fato se deve, provavelmente, à padronização alcançada em nosso Instituto em termos de controle de fatores sistemáticos que podem interferir no resultado final de um ensaio, tais como faixa de peso corpóreo e idade dos animais; temperatura e umidade ambiental do biotério; precisão no preparo das amostras e na leitura de reticulócitos; uso de instrumentos calibrados etc. que consequentemente geraram resultados com variabilidade adequada ao tipo do ensaio.

A variabilidade de ensaios *in vivo* é bem conhecida e muito maior que aquela esperada para outros tipos de ensaios, como e.g. ensaios químicos. Segundo a OMS³⁶ ensaios biológicos, sejam eles *in vitro* ou *in vivo*, podem apresentar variabilidade acima de 50 %. Neste contexto, Fitzgerald et al³⁷ recomendam a utilização do padrão de referência, incluído em cada ensaio, para avaliar e auxiliar no controle desta variabilidade.

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

Observando a média de quadrados (MQ) entre grupos (variância entre grupos) e a MQ dentro dos grupos (variância dentro dos grupos) vimos que a variação entre grupos não contribui

mais que a variação dentro dos grupos. Isto também demonstra a homogeneidade entre os grupos avaliados.

A concordância também pode ser demonstrada por meio da avaliação da homogeneidade entre as linhagens pelo teste do qui-quadrado (Tabela 2). Um total de 90,90 % dos pares de resultados foram considerados homogêneos, uma proporção significativa de ensaios concordantes.

Segundo Bland e Altman²⁹, medir as diferenças entre dois métodos para cada amostra e testá-las contra as médias é a melhor maneira de avaliar a relação entre os métodos. Aplicando essa regra aos nossos dados (Figura 1), ficou demonstrada considerável concordância entre as linhagens avaliadas. Tendo em vista a tendência de 0,1818, ou seja, as diferenças não se afastaram de zero de forma significativa, além de ser possível observar a dispersão aleatória das diferenças em torno da média, uma vez que os resultados se mantiveram dentro dos limites de concordância (-21,29 a 21,66), com exceção de apenas um valor que ficou fora. A dispersão das diferenças ao longo da linha zero é uma indicação da concordância entre dois métodos²⁹.

A concordância entre as linhagens SW e B6D2F1 pode ainda ser demonstrada pela avaliação dos Erros Relativos entre as linhagens (Figura 2). Apenas um ER, dos 22, ficou fora do intervalo $\pm 30\%$ (-33 %), sendo que a maioria ficou dentro de $\pm 10\%$.

A regra 4-6-30³² para veracidade foi atendida, ou seja, 1 resultado em 22 (4,54 %) se apresentou fora do limite de aceitação de $\pm 30\%$, logo 95,45 % dos resultados se mantiveram dentro do limite de aceitação de $\pm 30\%$. A regra preconiza que 4 em 6 amostras (66,67 %) devem estar dentro os limites de aceitação de 30 %.

O CV% máximo esperado entre as linhagens era de 30 %, no entanto todos os valores de CV (Tabela 1 e Figura 3) ficaram abaixo de 30 % e a maioria dentro de 10 %, demonstrando uma baixa variabilidade (imprecisão) entre as linhagens.

Outro ponto importante é em relação ao custo de obtenção dessas duas linhagens. Uma fêmea de seis semanas de idade da linhagem SW custa cerca de US 5,20, o custo da linhagem

B6D2F1 é de cerca de US 25,40²⁵. Se calcularmos o custo de um ensaio com 36 animais da linhagem SW, o valor por ensaio ficaria em torno de US 187,20. Já o custo do ensaio para a linhagem B6D2F1 ficaria em torno de US\$914,40.

CONCLUSÃO

O ensaio de potência utilizando a linhagem SW demonstrou estar padronizado e apresentou alta concordância com os resultados utilizando a linhagem B6D2F1.

Para os parâmetros avaliados, tais como precisão intra- e inter-ensaios e veracidade, com ambas as linhagens testadas, os valores obtidos foram conformes e satisfatórios para os 22 lotes analisados.

Cabe ressaltar que camundongos das linhagens SW e B6D2F1 geraram resultados estatisticamente semelhantes e homogêneos, portanto, podem ser consideradas linhagens com resposta concordantes na avaliação da potência biológica de rhEPO. Por fim, pode-se concluir que esta linhagem pode ser empregada na avaliação da potência biológica de rhEPO para fins regulatórios.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é parte da dissertação de mestrado de Michele Cardoso do Nascimento apresentada no Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz. Isabella Fernandes Delgado é bolsista de produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (DT-II/CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Jacobson LO, Goldwasser L, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*. 1957; 170: 633-4. [DOI:10.1038/179633a0].
2. Fried W. The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. *Blood*. 1972;40: 671-7.

3. Zanjani ED, Ascensão JL, Mcglave PB, Banisadre M, Ash RC. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest*.1981;67:1183-8. [DOI: 10.1172/JCI110133].
4. Koury ST, Bondurant MC, Semenza GL, Koury MJ. The use of *in situ* hybridization to study erythropoietin gene expression in murine kidney and liver. *Microsc Res Tech*. 1993;25(1):29-39. [DOI: 10.1002/jemt.1070250106].
5. Fisher JW, Koury S, Ducey T, Mendel S. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br J Haematol*. 1996;95(1):27-32. [DOI: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1864.x].
6. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1977;252: 5558-64.
7. Lin F, Suggs S, Lin C, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(22):7580-4. [DOI: 10.1073/pnas.82.22.7580].
8. Faris PM, Ritter MA, Abels RI. The effects of recombinant human erythropoietin on perioperative transfusion requirements in patients having major orthopedic operation. The American Erythropoietin Study Group. *J Bone Joint Surg Am*.1996;78(1):62-72.
9. Rizzo JD, Seidenfeld J, Piper M, Aronson N, Lichtin A, Littlewood TJ. Erythropoietin: a paradigm for the development of practice guidelines. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;10-30. [DOI: 10.1182/asheducation-2001].
10. Saag MS, Bowers P, Leitz GJ, Levine AM. Once-weekly epoetin alfa improves quality of life and increases hemoglobin in anemic HIV+ patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20(10):1037-45. [DOI:10.1089/aid.2004.20.1037].
11. Aapro MS, Dale DC, Blasi M, Sarokhan B, Ahmed F, Woodman RC. Epoetin alfa increases hemoglobin levels and improves quality of life in anemic geriatric cancer patients receiving chemotherapy. *Support Care Cancer*. 2006;14(12):1184-94. [DOI: 10.1007/s00520-006-0076-z].
12. Guan X, Chen L. Role of erythropoietin in cancer-related anaemia: a double-edged sword? *J Int Med Res*. 2008;36(1):1-8. [DOI: 10.1177/147323000803600101].
13. World health Organization - WHO. WHO Drug Information. Geneva, Switzerland. 2010;24(1):40p.
14. Brinks V, Hawe A, Basmeleh AHH, Joachin-Rodriguez L, Somsen GW, Jiskoot W, et al. Quality Original and Biosimilar Epoetin Products. *Pharm. Res*. 2011;28(2):386-93. [DOI: 10.1007/s11095-010-0288-2].
15. Council of Europe. Erythropoietin concentrated solution, Monograph 1316. Strasbourg, France. Pharmeuropa. 2011.[DOI: 180.168.103.34:7947/zl/EP7/1316E].
16. European Centre for the Validation of Alternative Methods - ECVAM. Statement on the batch potency testing of erythropoietin concentrated solution. *Altern Lab Anim*. 2002;30:487-9.
17. Albertengo ME, Valcarce GA, Oliva LM, Baiges DL, Alonso BS, Chiale CA. Eritropoietina recombinante humana: método de valoración *in vivo* con ratones normocitémicos. *Sangre (Barc)*.1999;44:357-63.
18. 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):1561-9. [DOI: 10.1590/S0100-879X2003001100014].
19. Schmidt CA, Ramos AS, da Silva JEP, Fronza M, Dalmora SL. Avaliação da atividade e caracterização de Eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003;47:183-9. [DOI: 10.1590/S0004-27302003000200012].
20. 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. [DOI: 10.1590/S1516-8913201500228].
21. Silva IB, Mattos KA, Dick PC, Almeida AS, Silva RG, Hokama DA, Paumgartten FJR. Ensaio de potência da alfaepoetina: Comparação de camundongos *Swiss Webster*, NIH, C57BL6, BALB/c com o híbrido B6D2F1. *Vig Sanit Debate*. 2013;1:49-58.

22. Taconic. Animals models list. B6D2F1. 2011. [acesso 2011 ago 22] Disponível em: [http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=763].
23. Universidade Federal Fluminense. 2011. Classificação Genética dos Animais de Laboratório. [acesso 2011 ago 22]. Disponível em: [www.uff.br/animaislab/ap6.doc].
24. Mouse Genome Informatics – MGI. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. Guidelines for nomenclature of mouse and rat strains. Revised: September 2010. [acesso 2011 mai 25]. Disponível em: [www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml#definition]. [DOI: 10.1177/0300985810374837].
25. Taconic. Animals models list. 2013. [acesso 2013 mar 10]. Disponível em: [http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=856].
26. Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde - INCQS. POP 65.3430.042: ensaio para avaliação “in vivo” da potência biológica de eritropoietina humana recombinante. Rev.01. Rio de Janeiro. 2012. 17p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).
27. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM. CombiStats, version 5.0, 2013.
28. Council of Europe. Statistical analysis. Strasbourg, France. Pharmeuropa. 2012.
29. Bland JM, Altman DG. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1:307-10. [DOI: 10.1590/S1678-77572011000500009].
30. Food and Drug Administration - FDA. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville, 2001.
31. Hoffman D, Kringle R. A total error approach for the validation of quantitative analytical methods. *Pharm Res*. 2007;24(6):1157-63.
32. United States Pharmacopoeia – USP. Mon. <1033>; Biological Assay Validation, in: USP 35 NF30, 1st Sup. Rockville, 2012.
33. International Organization for Standardization - ISO. ISO N° 3534-2. Statistics - Vocabulary and Symbols. Applied Statistics. Part 2. Geneva, Switzerland, 2006.
34. Lopes MC. Avaliação da potência biológica da eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos: estudo comparativo entre as linhagens de camundongos B6D2F1 e Swiss Webster [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2004. [DOI: 10.1590/S0004-27302003000200012].
35. 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. *Int J Biosaf Biosec*. 2010;1:49-59.
36. World Health Organization – WHO. Validation. In: WHO, A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Geneva, Switzerland, 1997.
37. Fitzgerald EA, Gallagher M, Hunter WS, Seligmann EB Jr. Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. *Dev Biol Stand*. 1978;40:183-6.