

Avaliação da Atividade e Caracterização de Eritropoietina Humana Recombinante em Produtos Farmacêuticos

artigo original

RESUMO

Realizou-se a identificação de eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos comerciais por eletroforese em gel de poliácridamida e detecção com anticorpos específicos, demonstrando-se típica banda larga, semelhante ao padrão de rhEPO da Farmacopéia Européia. Igualmente por focalização isoelétrica e imunodeteção, observaram-se 5-6 isoformas características de acordo com o laboratório produtor. A avaliação de potência efetuada através de ensaio biológico em camundongos normocitêmicos forneceu valores entre 67,6% e 119,4% em relação à declarada. A precisão dos ensaios combinados, calculada pela ponderação, variou de 200 a 389. Os testes de endotoxinas bacterianas, toxicidade e pH apresentaram valores variáveis conforme o lote. Concluiu-se destacando a importância dos testes e ensaios de controle para assegurar a qualidade lote a lote e garantir a eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/2:183-189)

Descritores: Eritropoietina humana recombinante; Camundongos normocitêmicos; Eletroforese; Focalização isoelétrica; Bioensaio

ABSTRACT

Activity Evaluation and Characterization of Recombinant Human Erythropoietin in Pharmaceutical Products.

The identification of rhEPO in pharmaceutical products was carried out by polyacrylamide gel electrophoresis and detection with specific antibodies that revealed a typical single broad band similar to that obtained with the European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation for erythropoietin. The isoelectric focusing with immunodetection revealed extensive heterogeneity with 5-6 isoforms, characteristic according to the manufacturer. The potency was assessed by the normocythaemic mouse assay with values within 67.6% and 119.4% calculated against the stated potency. The precision evaluated by the weight was within 200 and 389, for the combined assays. The toxicity, bacterial endotoxins, and pH gave variable results according to the batch. In conclusion, we emphasize the importance of the batch-to-batch tests and assays that would guarantee the quality and therapeutic efficacy of the pharmaceutical products. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/2:183-189)

Keywords: Recombinant human erythropoietin; Normocythaemic mice; Electrophoresis; Isoelectric focusing; Bioassay

AERITROPOIETINA HUMANA (EPO) é um hormônio que atua sobre as células progenitoras eritróides da medula óssea regulando a produção de eritrócitos. É uma glicoproteína composta de 165 aminoácidos que formam cadeia polipeptídica com duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições (Cis⁷⁻¹⁶¹ e Cis²⁹⁻³³). Apresenta três sítios de glicosilação N-ligados (Asn²⁴, Asn³⁸ e Asn⁸³) que podem formar duas a quatro cadeias sialiladas, e um O-ligado (Ser¹²⁶) com até dois resíduos. A EPO recombinante (rhEPO) pode

Cleber A. Schmidt
Andréa S. Ramos
José E.P. da Silva
Marcio Fronza
Sérgio L. Dalmora

Departamento de Farmácia Industrial (CAS, ASR, MF, SLD) e Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde (JEPS), Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Recebido em 15/10/02
Revisado em 16/12/02 e 13/03/03
Aceito em 04/04/03

conter até 14 ácidos siálicos, necessários para que o hormônio atinja os sítios alvo, evitando a rápida metabolização pelos receptores hepáticos que reconhecem as estruturas expostas de galactose, com posterior excreção. A massa molecular da estrutura glicosilada, que contém cerca de 40% de carboidratos, é de 30–34kDa, e somente da cadeia peptídica é de 18kDa (1-5). A atividade específica é de não menos que 100.000UI/mg de proteína (6).

Recentemente, o gene humano da EPO foi clonado e expresso em células de ovário de hamster Chinês (CHO) e rim de hamster jovem (BHK). A molécula apresenta estrutura peptídica idêntica ao hormônio natural, mas a composição de carboidratos é heterogênea, a atividade biológica é equivalente (7,8). Diferenças significativas entre a composição de isoformas e propriedades biológicas foram observadas entre as rhEPOs, refletindo, provavelmente, variações nas linhagens de células recombinantes usadas para expressão, condições de cultura ou processos de purificação (4,9,10). A heterogeneidade da rhEPO e da EPO urinária foi pesquisada, e foram separadas 5 a 8 isoformas que são devidas ao grau de glicosilação, bem como aos resíduos de ácido siálico com ou sem N-acetilactosamina (9,11). Por esta razão, o grau de sialilação de cadeias polissacarídicas influencia fortemente a mobilidade eletroforética, o ponto isoelétrico (pI) da molécula e a bioatividade. Os perfis isoelétricos das rhEPOs alfa e beta são bastante similares (pI na faixa de 4,42 a 5,11), mas a EPO-beta tem uma banda extra na região menos ácida (12-14).

Inicialmente, as determinações da atividade de rhEPO foram realizadas através do aumento do hematócrito, volume total de eritrócitos e da elevação da contagem de reticulócitos de animais (4,15). Os ensaios em camundongos policitêmicos e normocitêmicos foram, então, desenvolvidos e padronizados para a avaliação de potência de preparações farmacêuticas (6,16). O ensaio em camundongos policitêmicos baseia-se na incorporação de ⁵⁹Fe às células sanguíneas dos animais, previamente colocados sob pressão atmosférica reduzida. Esse procedimento utiliza radioisótopos, é de longa duração, e seu custo é elevado (4,6,17-19). O bioensaio em camundongos normocitêmicos é executado usando animais normais e a atividade é avaliada pelo estímulo da produção de reticulócitos que correspondem ao último estágio da série eritróide da medula óssea, e são identificados através do retículo endoplasmático remanescente (6,9,16,18). A contagem tem sido realizada por métodos microscópicos e, mais recentemente, por citometria de fluxo, no qual a intensidade da fluorescência na célula é proporcional à sua quantidade de RNA (19,20).

O presente trabalho teve por objetivo realizar a identificação, avaliar a pureza e potência biológica de eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos comerciais, estabelecendo especificações de qualidade para garantir a eficácia terapêutica.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e produtos farmacêuticos

Padrão biológico de referência de rhEPO da Farmacopéia Européia (E.P.), contendo 32.000UI/ 250µg/frasco (*European Department for the Quality of Medicines* – EDQM, França). Anticorpo policlonal de cabra anti-EPO (NIBSC, Inglaterra). Anticorpo monoclonal de coelho anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Reagentes para eletroforese e focalização isoelétrica (Pharmacia Biotech, Suíça). Doze amostras de produtos farmacêuticos comerciais de rhEPO com 2.000, 4.000 e 10.000UI/ml, obtidas de 5 diferentes laboratórios produtores e identificadas com números romanos de I a XII, em seu prazo de validade. Soluções reagentes e diluentes para citômetro de fluxo (ABX Diagnostics, França). Solução anticoagulante de EDTA sódico 5% (Bioclin, Brasil). Reagente Lisado de amebócitos do *Limulus* 0,06EU/ml (Cape Code, Estados Unidos). Soluções de reagentes para testes de Hepatite A, B, C e HIV (Abbott Laboratories, Estados Unidos).

Animais de laboratório

Camundongos fêmeas da linhagem CF₁ com 8 semanas de idade e peso entre 27 e 32g. Cobaias com peso entre 300 e 400g. Todos os animais provenientes do Biotério Central da UFSM foram mantidos à temperatura de 22 ± 2°C em gaiolas, com livre acesso a água e ração.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

SDS-PAGE não redutora (6,12) foi realizada em sistema vertical de eletroforese (BRL, Estados Unidos) com gel de 1,5mm de espessura (17 X 13cm). SDS e azul de bromofenol foram adicionados às amostras, com concentrações finais de 1% (p/V) e 0,1% (p/V), respectivamente. A separação das proteínas foi realizada a 340 volts, 20mA e 50W a 4°C, durante período de 10h. As bandas no gel foram reveladas utilizando nitrato de prata.

Transferência e imunodeteção

Após SDS-PAGE, a EPO foi transferida para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) sob voltagem constante de 24 volts em tampão de glicina e tris

(192mmol/l: 25mmol/l) contendo metanol (1:4) durante 1h, usando sistema semi-seco Trans-blot (Bio-Rad, Estados Unidos). A membrana de nitrocelulose foi mantida por 1h30min à temperatura ambiente em tampão de bloqueio, contendo fosfato de sódio 50mmol/l + cloreto de sódio 150mmol/l (pH 7) e leite em pó 5% (p/V). Após, incubou-se a membrana em solução contendo anticorpo de cabra anti-rhEPO e tampão de bloqueio (1:1000) durante 14h à temperatura ambiente. A ligação anticorpo-rhEPO foi detectada por reação com IgG anticabra conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, Estados Unidos) 1:5000, e revelada com solução de substrato (1:2:18) contendo respectivamente, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 5mg/ml em dimetilformamida, nitro azul de tetrazólio (NAT) 1mg/ml em água e tampão pH 9,5 (Tris 0,1M + NaCl 0,1M + MgCl₂ 5mmol) (6,12).

Focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida (IEF)

A IEF (6,12) foi realizada em lâmina gel de 1,5mm de espessura (17 X 13cm) com pH de 2,5–6,5, polimerizado a partir de solução contendo acrilamida 7,33% (p/V), N,N-metileno-bisacrilamida 0,23% (p/V), anfolina 2,5% (V/V), sacarose 22,5% (p/V), riboflavina 0,0002% (p/V), N,N,N¹,N¹-tetrametil-etilenodiamina 0,026% (V/V) e água bidestilada 49,4% (V/V). As amostras (30µl) contendo sacarose 20% (p/V) foram aplicadas no gel e submetidas à voltagem constante de 340 volts durante 18h a 4°C em sistema vertical de eletroforese, usando solução catódica de hidróxido de sódio 20mmol/l e solução anódica de ácido fosfórico 10mmol/l. Após a IEF, as isoformas de EPO foram transferidas para membrana de nitrocelulose e visualizadas por ligação específica com anticorpo anti-rhEPO, empregando os procedimentos descritos sob transferência e imunodeteção.

Ensaio biológico em camundongos normocitêmicos

Para cada ensaio, os animais foram pesados individualmente e separados em lotes com faixa de peso entre 27–32g. Os animais foram identificados e distribuídos aleatoriamente de acordo com as 3 doses do padrão, 3 da amostra e controle, respectivamente. Utilizaram-se 8 animais por grupo. Efetuou-se injeção subcutânea única das doses com 10, 30 e 90UI/0,5ml por camundongo. A coleta sanguínea foi realizada, sob anestesia, através do plexo venoso ocular 96 horas após administração, em EDTA sódico 5%. Transferiram-se 130µl de sangue com o aspi-

rador externo do aparelho ABX Pentra 120 Retic (ABX Diagnostics) e efetuaram-se as contagens de hemácias e reticulócitos, bem como a determinação do hematócrito, hemoglobina e índices de maturação dos reticulócitos por citometria de fluxo, conforme sistema padrão do equipamento fundamentado nas análises do volume da célula, complexidade nuclear e conteúdo citoplasmático. Avaliou-se a potência das amostras em relação ao Padrão Biológico de Referência de EPO, com base na determinação de reticulócitos dos animais injetados.

Análise Estatística

Realizou-se o cálculo dos resultados experimentais de potência de rhEPO pelo método de retas paralelas (3+3), utilizando programa de computação SAS para Windows versão 6.11. A validade do ensaio foi avaliada pela análise de variância, levando-se em conta a regressão linear significativa, desvio de linearidade e desvio de paralelismo não significativos. A potência e os limites de confiança (P= 0,95) que devem estar entre 80–125% e 64–156%, respectivamente, foram determinados em relação à potência declarada e realizada a combinação de ensaios independentes (6). A precisão foi expressa através da ponderação calculada como a recíproca da variância do logaritmo das potências. Os resultados foram submetidos ao teste χ^2 (P= 0,05) e as estimativas homogêneas (P> 0,05) foram combinadas como médias geométricas ponderadas (21,22).

Teste de toxicidade

Teste realizado injetando via intraperitoneal 0,5ml do produto final em 5 camundongos e 5ml em 2 cobaias. Os animais foram observados durante 7 dias (6), registrando-se perda de peso, sintomas de toxicidade e morte.

Teste de endotoxinas bacterianas

Realizou-se o teste, adicionando-se em placa de Petri, 10µl do reagente Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL) e 10µl da diluição da amostra ou do Padrão de endotoxinas bacterianas. Incubou-se em estufa a 37°C por uma hora. Observou-se a formação de gel como indicativa de resposta positiva (23,24). Estabeleceu-se a especificação do limite máximo de 2,5 Unidades Endotóxicas/2.000 UI por ml de rhEPO.

Testes de Hepatite A, B, C e HIV

As determinações micro imunoenzimáticas foram realizadas utilizando conjunto completo de reagentes comerciais e procedimentos descritos pelo fabricante.

RESULTADOS

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Demonstrou-se a presença da banda de rhEPO em produtos farmacêuticos comerciais entre 30 e 43kDa (figura 1), na região que corresponde a, aproximadamente, 34kDa. Pode-se notar na região de 67kDa, a albumina de soro humano usada como excipiente na maioria das amostras submetidas à eletroforese.

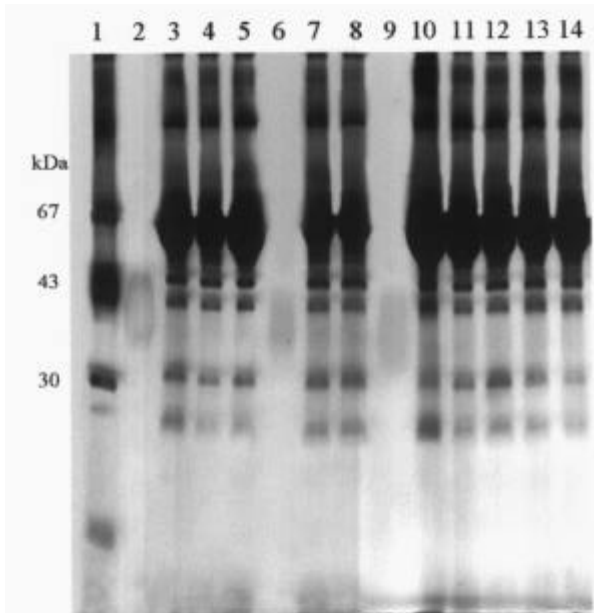


Figura 1. Perfil de separação de rhEPO por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, não redutora, e coloração com nitrato de prata. Coluna 1: marcadores de peso molecular; coluna 2: Padrão de rhEPO da Farmacopéia Européia; colunas 3-14: produtos farmacêuticos comerciais, respectivamente, I a XI (0,33µg) e XII (0,20µg).

Imunodeteção com anticorpos específicos

Observa-se uma única banda larga de rhEPO (figura 2), obtida após imunodeteção, das mesmas amostras apresentadas na figura 1, em comparação com o Padrão de rhEPO da Farmacopéia Européia.

Separação de proteínas por focalização isoelétrica (IEF)

As mesmas amostras das figuras 1 e 2 foram submetidas à IEF, demonstrando-se que a composição de isoformas apresenta-se diferente conforme a origem e o laboratório produtor da rhEPO. Foram observados 5-6 componentes (figura 3), com algumas amostras apresentando banda extra na região mais ácida (ex.: colunas 3, 4, 8 e 9).



Figura 2. Perfil em membrana de nitrocelulose com as bandas largas obtidas após imunodeteção de rhEPO com anticorpos específicos e revelação com fosfatase alcalina, da mesma seqüência de produtos farmacêuticos e padrão apresentados na figura 1. Coluna 1: Padrão de rhEPO da Farmacopéia Européia; colunas 2-13: produtos farmacêuticos comerciais, respectivamente, I a XI (0,33µg) e XII (0,20µg).

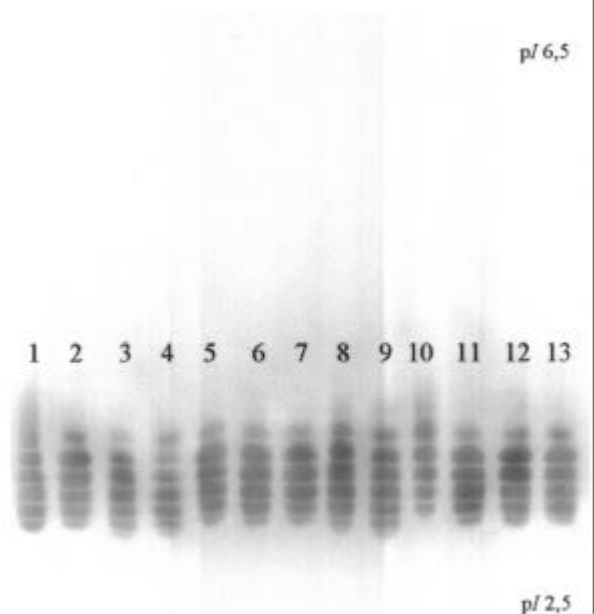


Figura 3. Perfil de separação de isoformas obtido por IEF, transferência, imunodeteção e revelação com fosfatase alcalina. Coluna 1: Padrão de rhEPO da Farmacopéia Européia; colunas 2-13: produtos farmacêuticos comerciais respectivamente, I a XI (0,66µg) e XII (0,40µg).

Avaliação de potência pela contagem de reticulócitos por citometria de fluxo (MCF)

Os valores obtidos nas contagens de reticulócitos dos ensaios biológicos foram analisados estatisticamente através do método de retas paralelas (3+3), fornecendo os resultados da tabela 1.

Determinação de pH

A determinação de pH nas preparações farmacêuticas comerciais forneceu valores entre 6,91 e 7,17, de acordo com a especificação entre 6,7-7,3.

Teste de Toxicidade

As diferentes amostras dos produtos farmacêuticos de rhEPO foram submetidas ao teste de toxicidade em

camundongos e em cobaias, não se observando efeitos toxicológicos, perda de peso ou morte.

Avaliação de endotoxinas bacterianas

Com base no limite de endotoxinas estabelecido, submetem-se as amostras de produtos farmacêuticos comerciais ao teste do lisado de amebócitos do *Limulus* (LAL) obtendo-se os resultados semi-quantitativos da tabela 2.

Testes de Hepatite A, B, C e HIV

Os produtos farmacêuticos contendo albumina humana foram submetidos aos testes de HIV e Hepatites A, B, C, para avaliar possível contaminação, encontrando-se resultados negativos em todas as amostras.

Tabela 1. Potência, limites de confiança (P= 0,95) e precisão das estimativas da avaliação de rhEPO em produtos farmacêuticos, após combinação dos ensaios independentes pelo método da contagem de reticulócitos por citometria de fluxo.

Produto farmacêutico	Potência			Limites de confiança % (P= 0,95)	Ponderação
	Declarada	Encontrada			
		UI/ml	UI/ml	%	
I**	4.000	4.524	113,18	84,87 – 150,92	255
II**	4.000	4.372	109,30	79,95 – 151,32	200
III**	4.000	4.429	110,72	79,96 – 153,32	200
IV**	10.000	11.510	115,18	85,59 – 154,99	240
V**	4.000	3.823	95,59	71,77 – 127,31	263
VI**	4.000	3.483	87,09	66,40 – 114,23	294
VII**	4.000	4.772	119,37	92,61 – 153,86	329
VIII***	4.000	3.817	95,44	74,76 – 121,85	352
IX**	10.000	10.984	109,84	87,07 – 138,57	389
X**	4.000	2.703	67,58	51,86 – 88,06	302
XI**	4.000	4.168	104,21	78,21 – 138,85	262
XII**	2.000	2.106	105,33	76,94 – 144,21	214

* = N° de ensaios independentes

Tabela 2. Resultados semi-quantitativos de endotoxinas bacterianas em produtos farmacêuticos de rhEPO, pelo teste do Lisado de Amebócitos do *Limulus*.

Amostra	Potência declarada UI/ml	Limite de endotoxinas EU/ml	Unidades endotóxicas/ml	Conclusão
I	4.000	5,0	0,96 – 1,92	A
II	4.000	5,0	< 0,06	A
III	4.000	5,0	61,44 – 122,88	R
IV	10.000	12,5	2,4 – 4,8	A
V	4.000	5,0	0,48 – 0,96	A
VI	4.000	5,0	0,24 – 0,48	A
VII	4.000	5,0	9 – 15,36	R
VIII	4.000	5,0	< 0,06	A
IX	10.000	12,5	0,48 – 0,96	A
X	4.000	5,0	0,24 – 0,48	A
XI	4.000	5,0	< 0,06	A
XII	2.000	2,5	490	R

A = Aprovado; R = Reprovado

DISCUSSÃO

O controle da qualidade de proteínas recombinantes difere em relação aos demais medicamentos, pois requer a combinação de métodos biológicos, físico-químicos e imunológicos para sua completa identificação, caracterização e avaliação de potência.

A identificação por SDS-PAGE, não redutora, conforme a figura 1, mostra a banda na região de 34kDa, de acordo com os marcadores e o padrão de rhEPO da E.P., aplicados no mesmo gel. Pode-se observar também, comparativamente, as colunas 6 e 9 com amostras sem albumina, constituindo-se em teste de identificação desse excipiente estabilizador do produto final (11,25).

A transferência e detecção imunológica observada na figura 2 apresenta somente a banda larga correspondente a cada amostra contendo rhEPO. Esses perfis são concordantes com aqueles apresentados no estudo colaborativo que estabeleceu a preparação de referência biológica de rhEPO da E.P. e a literatura (16,26). Além disso, são confirmados na figura 3, na qual se observam os perfis por IEF com a presença de 5 a 6 isoformas. Esses dados são semelhantes aos citados por outros autores, que descrevem 5 a 7 isoformas para rhEPO α e β (11,12). A IEF é importante para monitorar o ácido siálico, pois a bioatividade está diretamente relacionada ao número desses resíduos (6,27).

Realizou-se o ensaio biológico padronizado em camundongos normocitêmicos, pela sua precisão, reprodutibilidade e sensibilidade, sendo preconizado para o controle da qualidade de medicamentos (6,16). Pode-se observar que os resultados obtidos (tabela 1) variam de acordo com os lotes, destacando-se que, para uso terapêutico, os produtos devem apresentar potência entre 80 e 125% em relação ao teor declarado, e limites de confiança entre 64 e 156% (6). A precisão média calculada estatisticamente e expressa pela ponderação foi de 130 (dado não mostrado) nos ensaios independentes e entre 200 e 389 após combinação, constituindo-se como parâmetro para avaliação do bioensaio (16). Entretanto, é conveniente destacar que são necessários 2 ou mais ensaios para que a avaliação de potência cumpra os parâmetros especificados para o controle da qualidade de medicamentos (28). As análises hematológicas realizadas em paralelo, como hematócrito e concentração de hemoglobina, forneceram respostas não significativas devido às doses e duração do teste, insuficientes para alterar esses parâmetros.

As amostras foram submetidas ao teste de toxicidade inespecífica, que forneceu resultados de acordo com as especificações preconizadas para hormônios

recombinantes (6,24). Igualmente, o teste de endotoxinas bacterianas apresentou limites variáveis de acordo com os respectivos lotes, aprovando-se as amostras que cumpriam as especificações.

Pode-se concluir, destacando que os testes e ensaios realizados são essenciais para assegurar a potência e a qualidade lote a lote, especialmente considerando as diferentes origens da eritropoietina humana recombinante disponível e, desse modo, garantir a eficácia terapêutica dos produtos comercializados e em uso terapêutico no país.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Brian Rafferty pelas sugestões e ao FIPE/UFSM e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Wang FF, Kung CKH, Goldwasser E. Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology* **1985**;116:2286-92.
2. Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem* **1986**;261:3116-21.
3. Roberts D, Smith DJ. Erythropoietin: induction of synthesis to signal transduction. *J Mol Endocrinol* **1994**;12:131-48.
4. Choi D, Kim M, Park J. Erythropoietin: physico-and biochemical analysis. *J Chromatogr B* **1996**;687:189-99.
5. Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* **2001**;16:3-13.
6. **European Pharmacopoeia**. 4th edition. Strasbourg: Council of Europe, **2002**.
7. Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* **1985**;116:2293-9.
8. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **1985**;82:7580-4.
9. Storring PL, Gaines Das RE. The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J Endocrinol* **1992**;134:459-84.
10. Kinoshita M, Murakami E, Oda Y, Funakubo T, Kawakami D, Kakeki K, et al. Comparative studies on the analysis of glycosylation heterogeneity of sialic acid-containing glycoproteins using capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **2000**;866:261-71.
11. Gokana A, Winchenne JJ, Bem-Ghanem A, Ahaded A, Cartron JP, Lambin P. Chromatographic separation of

- recombinant human erythropoietin isoforms. **J Chromatogr A** 1997;791:109-18.
12. Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Stenning BE, Lamikanra A, Rafferty B, et al. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. **Br J Haematol** 1998;100:79-89.
 13. Cifuentes A, Moreno-Arribas MV, Frutos M, Diez-Masa JC. Capillary isoelectric focusing of erythropoietin glycoforms and its comparison with flat-bed isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis. **J Chromatogr A** 1999;830:453-63.
 14. Lasne F, Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. **Nature** 2000;405:635.
 15. Eder H, Roblenbroich B, Failing K. A dose-dependent effect of recombinant erythropoietin on the reticulocyte population of rats. **Blut** 1989;59:184-7.
 16. Bristow A. III Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. **Pharmeuropa** 1997;2:31-47.
 17. Kawamura A, Imai N, Kawaguchi T, Hayakawa T. Simple *in vivo* bioassay for erythropoietin. **Br J Haematol** 1991;77:424-30.
 18. Hayakawa T, Wada M, Mizuno K, Abe S, Miyashita M, Ueda M. Simple *in vivo* bioassay without radioisotopes for recombinant human erythropoietins. **Biologicals** 1992;20:243-51.
 19. Barbone AG, Aparicio B, Anderson DW, Natarajan J, Ritchie, DM. Reticulocyte measurements as a bioassay for erythropoietin. **J Pharm Biomed Anal** 1994;12:515-22.
 20. Yu PH, So CC, Wong KF, Lee KC, Chow CS, Yip LK, et al. Automated reticulocyte counting – an evaluation of GEN-S, Cell-Dyn 3500 and Cell-Dyn 4000. **Clin Lab Haematol** 1999;21:145-7.
 21. Finney DJ. **Statistical methods in biological assay**. 3rd edition. London: Charles Griffin, 1978.
 22. Gaines Das RE, Tydeman MS. Iterative weighted regression analysis of logit responses. A computer program for the analysis of bioassays and immunoassays. **Comput Programs Biomed** 1980;15:13-22.
 23. **Farmacopéia Brasileira**. 4 edição. São Paulo: Atheneu, 1988.
 24. **The United States Pharmacopeia**. 25th edition. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2001.
 25. Recny MA, Scoble HA, Kim Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. **J Biol Chem** 1987;262:17156-63.
 26. Fukuda MN, Sasaki H, Lopez L, Fukuda M. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: The role of carbohydrates. **Blood** 1989;73:84-9.
 27. Rohde MF. Erythropoietin. **Dev Biol Stand** 1998;96:123-5.
 28. 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;44:357-63.

Endereço para correspondência:

Sérgio L. Dalmora
Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria
97105-900 Santa Maria, RS
Fax: (055) 220-8805
e.mail: sdalmora@ccs.ufsm.br