

Evaluación de actividad biológica de eritropoyetina recombinante humana (rh EPO) en ratones

Unrein F¹, Taborda P¹, Rebelindo E¹, Silvestrini P^{1,2}, Etchevers L^{1,2}, Olmos F^{1,2}, Renna MS^{1,2}, Berengeno AL¹, Velazquez MML^{1,2}, Baravalle C^{1,2}.

¹Centro de Medicina Comparada, ²Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (ICIVET-Litoral, UNL-CONICET). facu_08unrein@hotmail.com

El Centro de Medicina Comparada (CMC) (ICIVET-Litoral) realiza actividades dirigidas a la provisión de animales de laboratorio, el desarrollo de modelos experimentales, asesoramiento y desarrollo de protocolos preclínicos, de investigación, extensión y servicios necesarios para el desarrollo de productos y procedimientos biométricos, siguiendo las normas de Calidad vigentes (Nacionales e Internacionales), así como las normas regulatorias y de seguridad.

A través de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs) las actividades llevadas a cabo dentro del CMC se estandarizan y se asientan en documentos específicos. En particular, la “Evaluación de actividad biológica de eritropoyetina (rh EPO) en ratones” consiste en el desarrollo y realización de una técnica de análisis descrita en la farmacopea para establecer las Unidades Internacionales (UI) de Actividad de esta hormona en un producto farmacéutico. En la ejecución de este protocolo participan profesionales y personal técnico capacitado y entrenado (graduados y estudiantes avanzados de las carreras de Medicina Veterinaria, Biotecnología, Bioquímica, etc. y estudiantes de variadas carreras) para las distintas actividades y cuyos datos son utilizados para el registro del fármaco ante la autoridad regulatoria (ANMAT) y como control de calidad del fabricante.

En el contexto de este estudio, la biomolécula analizada es la eritropoyetina (EPO), una hormona glicoproteica producida en gran proporción por el riñón que tiene la capacidad de regular la producción de glóbulos rojos siendo altamente específica sobre las células eritroides medulares^{1,4}. Los reticulocitos son glóbulos rojos inmaduros (glóbulos que aún no están totalmente desarrollados). El recuento de reticulocitos depende del estímulo proliferativo y anti-apoptótico de la eritropoyetina. La EPO humana recombinante, es una molécula de síntesis idéntica a la EPO endógena. Actúa como un regulador primario de la eritropoyesis, estimulando la proliferación y diferenciación de las células precursoras de los eritrocitos en la médula ósea. Los usos de EPO están orientados al tratamiento de la anemia asociada a la insuficiencia renal crónica, con o sin diálisis; reducción de los requerimientos transfusionales en pacientes adultos; anemia del prematuro entre otros. La EPO recombinante puede ser producida *in vitro* en células de roedores mediante la tecnología de ADN recombinante.

En relación a lo anteriormente expuesto, el objetivo del trabajo es describir cómo se lleva a cabo la *Evaluación de actividad biológica de eritropoyetina recombinante humana (rh EPO) en ratones* en el CMC.

Brevemente, la sustancia de ensayo provista por el comitente para su evaluación es ingresada al CMC siguiendo las indicaciones del POE correspondiente. De manera paralela se asigna un número de protocolo el cual identificará a todo el ensayo. Los animales en los cuales se evalúa la sustancia son ratones Balb/cMedc de un mismo sexo, de ocho semanas de edad como mínimo (rango 8 a 12 semanas). Los mismos son distribuidos en diferentes jaulas rotuladas con letras (A-H) e identificados mediante marcas no permanentes en la cola utilizando un marcador indeleble. Tres animales de cada jaula son administrados por vía subcutánea con 0,5 ml de cada dilución de la sustancia de ensayo (20UI/ml, 40UI/ml y 80UI/ml) y otros 3 animales de la misma jaula son administrados con las diluciones de un estándar o sustancia patrón (de actividad biológica conocida: 20UI/ml, 40UI/ml y 80UI/ml) pudiendo variar según requerimiento del comitente (ver ej. distribución de tratamientos/animal en Tabla 1). La preparación de las formulaciones a administrar se realiza de manera seriada y siguiendo las

VII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

Noviembre 2019. Esperanza, Santa Fe, Argentina.

Área temática: **EXTENSIÓN**

instrucciones detalladas en el POE correspondiente. Los cálculos relacionados con la preparación de formulaciones a administrar y la administración de las sustancias se registran en las planillas correspondientes al protocolo en ejecución.

Jaulas	Tratamientos/Animal					
A	E 20UI/ml	E 40UI/ml	E 80UI/ml	S1 20UI/ml	S1 40UI/ml	S1 80UI/ml
B	E 20UI/ml	E 40UI/ml	E 80UI/ml	S1 20UI/ml	S1 40UI/ml	S1 80UI/ml
C	E 20UI/ml	E 40UI/ml	E 80UI/ml	S1 20UI/ml	S1 40UI/ml	S1 80UI/ml
D	E 20UI/ml	E 40UI/ml	E 80UI/ml	S1 20UI/ml	S1 40UI/ml	S1 80UI/ml
E	E 20UI/ml	E 40UI/ml	E 80UI/ml	S1 20UI/ml	S1 40UI/ml	S1 80UI/ml
F	E 20UI/ml	E 40UI/ml	E 80UI/ml	S1 20UI/ml	S1 40UI/ml	S1 80UI/ml
G	E 20UI/ml	E 40UI/ml	E 80UI/ml	S1 20UI/ml	S1 40UI/ml	S1 80UI/ml
H	E 20UI/ml	E 40UI/ml	E 80UI/ml	S1 20UI/ml	S1 40UI/ml	S1 80UI/ml

Tabla1: Distribución de grupos de ensayo/tratamientos por animal alojados en diferentes jaulas. E: Estándar; S: Sustancia de ensayo.

Entre las 90 y 100 hs de iniciado el ensayo, los animales son anestesiados y se realiza la extracción de sangre completa por punción cardíaca de todos los animales en un intervalo no mayor a 3 horas. La sangre obtenida de cada animal es recolectada en un tubo con anticoagulante, rotulado y luego almacenado a 4°C para su procesamiento y cuantificación de reticulocitos por citometría de flujo (CF).

La técnica de citometría de flujo permite determinar la cantidad de reticulocitos (%) presentes en las muestras de sangre previo marcaje con un colorante fluorescente. Brevemente, cada muestra de sangre es incubada con el colorante Naranja de Tiazole (NT) y otro tubo de muestra es empleado como blanco de muestra (sin colorante), para normalizar en base a la autofluorescencia de cada célula. Luego de 1 hora de incubación en oscuridad, las muestras son adquiridas por CF. Una vez seleccionada la población mediante una región en un gráfico de puntos (dot plot) que relaciona la complejidad citoplasmática y el tamaño celular (SSC vs FSC), luego la misma se representa gráficamente en un histograma para evaluar la fluorescencia (emitida por el NT). El equipo arroja así un valor para cada muestra y su correspondiente blanco de muestra, el cual se resta al valor anterior. Todos los procedimientos involucrados en este POE se realizan siguiendo lo indicado por la Farmacopea Europea² y la Guía para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio³.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos de la adquisición por CF se elabora un informe final del protocolo el cual se envía al comitente. La actividad biológica de la sustancia evaluada se expresa como potencia “estimada” en UI respecto de la sustancia estándar. La misma se determina utilizando un método estadístico de comparación entre la regresión lineal de las curvas generadas por las 3 concentraciones evaluadas del estándar y las 3 concentraciones de la sustancia de ensayo.

En particular, en el CMC, durante el transcurso del 2019, se han realizado 21 ensayos bajo este POE, de los cuales un 95% fueron estadísticamente válidos. Por otro lado, el resultado arrojado en cada ensayo (“potencia biológica estimada”) aporta al comitente información valiosa a ser considerada al momento de la formulación, registro y comercialización de esta hormona. Los ensayos con animales de laboratorio no han podido ser reemplazados aun en relación a la evaluación de la actividad de este tipo de hormonas, es por ello que es fundamental realizar los ensayos con los cuidados y controles necesarios.

1. Aguilera, J.C. (1988). Eritropoyetina humana recombinante. Departamento de investigación y Desarrollo. Laboratorios CILAG, S.A. Biseden, 7, 5-10.
2. CMC-REF 0671. (2015). European Pharmacopoeia 8.3. Solución de Eritropoyetina Concentrada. 01/2008, 1316.
3. Guide for the care and use of laboratory animals: 8th Edition (2011). National Research Council.
4. Marsden, J.T. (2006). Erythropoietin- measurement and clinical applications. Ann Clin Biochem. 43(Pt 2), 97-104.