

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Mestrado Profissional De Formação Para Pesquisa Biomédica
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – CCS - UFRJ
LADETEC/IQ – UFRJ

Sabrina Nascimento de Souza Muniz

Agentes estimuladores de eritropoiese (ESAs): Avaliação do perfil eletroforético de bioanálogos em humanos e detecção por ELISA em equinos.

Dissertação de Mestrado

2019

Agentes estimuladores de eritropoiese (ESAS): Avaliação do perfil eletroforético de biossimilares em humanos e detecção por ELISA em equinos.

Sabrina Nascimento de Souza Muniz

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestra ao Programa de Pós-graduação em Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientador: Pedro Antônio Castelo Teixeira

Rio de Janeiro

2019

Ao meu filho Caio

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e por permitir que eu conclua mais essa etapa.

A minha amada mãe Ligia por todo amor incondicional e dedicação a mim. Por ter me incentivado e sempre se preocupar com os meus estudos, apesar de não ter tido a mesma oportunidade.

Ao meu filho Caio, por compreender as minhas ausências ao longo dessa jornada. Meu amor maior.

Ao meu esposo Alexandre pelo companheirismo, amizade, amor, paciência (muita) e por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando.

Ao meu orientador Dr. Pedro Antônio pela atenção, incentivo e apoio dedicados a mim durante todo o processo do mestrado e da elaboração desta tese.

A Rachel Levy, por toda dedicação e ajuda essencial para que eu pudesse concluir este trabalho e com quem pude aprender muito sobre Eritropoietina.

Ao prof. Dr. Henrique Marcelo, pela sua contribuição nesse trabalho e por estar sempre disponível a ajudar e ensinar.

A Rafaela que juntas compartilhamos todas as angústias do mestrado, como provas, trabalho e tese. Também por proporcionar um ambiente de trabalho harmonioso.

A todos do LBCD por tornarem o ambiente de trabalho prazeroso.

As minhas amigas, Ana, Luana e Carol por todo apoio e incentivo desde da faculdade e pelos momentos de descontração que aliviaram muitas das minhas tensões e anseios.

RESUMO

MUNIZ, Sabrina Nascimento de Souza. Agentes estimuladores de eritropoiese (ESAS): Avaliação do perfil eletroforético de bioequivalentes em humanos e detecção por ELISA em equinos. 2019. Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, na Biofísica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoproteico produzido principalmente pelos rins e responsável por estimular a produção de glóbulos vermelhos (eritropoiese) no organismo. A sua forma recombinante humana (rHuEPO) e seus análogos são muito utilizados pela medicina no tratamento de anemias, principalmente em pacientes com doença renal crônica (DRC). No entanto, esta glicoproteína também vem sendo utilizada indevidamente por atletas, tanto humanos quanto equinos, devido à sua capacidade de aumentar o aporte de oxigênio nos tecidos, levando a um ganho de resistência. A detecção do abuso de rHuEPO por atletas humanos é realizada utilizando-se técnicas eletroforéticas acreditadas pela Agência Mundial Anti Dopagem (WADA, do inglês *World Anti-Doping Agency*). Após a expiração das primeiras patentes de rHuEPOs desenvolvidas, a indústria farmacêutica disponibilizou no mercado um grande número de bioequivalentes de rHuEPO, que, devido às disparidades nos processos de fabricação, apresentam pequenas diferenças entre si. Tais diferenças, principalmente na glicosilação, podem influenciar na migração eletroforética, gerando dúvidas durante a análise de um resultado. Sendo assim, um dos objetivos desse trabalho foi o de avaliar o comportamento eletroforético de 9 medicamentos bioequivalentes de rHuEPO de diferentes países pelas duas principais metodologias de detecção de rHuEPO utilizadas pelos laboratórios acreditados pela WADA, Isoeletrofocalização (IEF-PAGE) e Sarcosyl-PAGE (SAR-PAGE). Foi observado, que dos 9 medicamentos testados, apenas 3 geraram resultados claramente positivos, sendo 6 de difícil detecção pela técnica de SAR-PAGE. Em contrapartida, todas as drogas foram facilmente detectadas por IEF-PAGE.

Paralelamente, estimulados por uma demanda crescente de controle de dopagem em corridas de cavalos, um novo método de detecção de ESAs em amostras equinas baseado na técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi desenvolvido, validado e implementado no escopo analítico do LBCD. A nova técnica desenvolvida neste trabalho apresentou limites de detecção (LODs) de 6,25, 100, 50 mU/mL para rHuEPO, NESP e CERA, respectivamente, além de tempo de análise reduzido em comparação com os métodos atuais, que apresentam outras desvantagens como altos LODs e alto custo. Essa nova metodologia, desenvolvida e validada em nosso laboratório, mostrou-se eficaz para detecção do abuso de ESAs tanto em sangue quanto em urina de equinos.

Palavras-chave: Eritropoietina, IEF-PAGE, SAR-PAGE, cavalo, ELISA, dopagem.

ABSTRACT

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone produced mainly by the kidneys and responsible for stimulating the production of red blood cells (erythropoiesis) in the body. Its human recombinant form (rHuEPO) and its analogues are widely used by medicine to treat anemia, especially in patients with chronic kidney disease (CKD). However, this glycoprotein has also been misused by athletes, both human and equine, due to its ability to increase oxygen supply to tissues, leading to a gain in endurance. Detection of rHuEPO abuse by human athletes is performed using electrophoretic techniques accredited by the World Anti-Doping Agency (WADA). Following the expiration of the first developed rHuEPO patents, the pharmaceutical industry made a large number of rHuEPO biosimilars available on the market, which, due to disparities in manufacturing processes, differ slightly. Such differences, especially in glycosylation, may influence electrophoretic migration, generating doubts during the analysis of a result. Thus, one of the objectives of this work was to evaluate the electrophoretic behavior of 9 rHuEPO biosimilar drugs from different countries by the two main rHuEPO detection methodologies used by the WADA-accredited laboratories, Isoelectro-focusing (IEF-PAGE) and Sarcosyl-PAGE (SAR-PAGE). Of the 9 drugs tested, only 3 showed clearly positive results, 6 of which were difficult to detect by the SAR-PAGE technique. In contrast, all drugs were easily detected by IEF-PAGE.

At the same time, spurred by a growing demand for doping control in horse racing, a new method for detection of ESAs in equine samples based on the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique has been developed, validated and implemented within the analytical scope of the LBCD. The new technique developed in this study presented detection limits (LODs) of 6.25, 100, 50 mU / mL for rHuEPO, NESP and CERA, respectively, and reduced analysis time compared to current methods, which have other disadvantages such as high LODs and high cost. This new methodology, developed and validated in our laboratory, has been shown to be effective in detecting ESA abuse in both equine blood and urine.

Keywords: Erythropoietin, IEF-PAGE, SAR-PAGE, horse, ELISA, doping.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lista de substâncias proibidas em 2019. Extraído do site: https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents	6
Figura 2: Número de análises do ano de 2012-2017. Extraído do site: https://www.wada-ama.org	7
Figura 3: Estrutura primária da Eritropoietina já processada, após a perda da sequência de 27 aminoácidos e da arginina c- terminal. Os sítios de ponte dissulfetos e glicosilação estão indicados como S-S e CH, respectivamente. Fonte: LAPPIN, 2003.	10
Figura 4: Demonstração do processo de eritropoiese. O potenciador da EPO é ativado pelo complexo de fator de transcrição indutível por hipóxia HIF, com a participação de co-fatores, como p300, ativando a expressão da EPO. Na medula óssea, a Epo promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação de progenitores eritrocitários, particularmente as unidades formadoras de colônias-eritróides (CFUEs). Fonte: JELKMANN, 2013.....	12
Figura 5: Mecanismo de atuação das HIFs em situações de hipóxia e normóxia. Extraído de: Expert Reviews in Molecular Medicine: http://www.expertreviews.org/ Acessado em 09/01/2019.....	13
Figura 6: Posições e diferenças dos resíduos de aminoácidos das estruturas peptídicas da rHuEPO e da NESP. Fonte: BENTO, 2008.....	16
Figura 7: Diagrama esquematizado de comparação entre as estruturas oligossacarídicas da Epoetina alfa (eritropoietina humana recombinante alfa) e da Aranesp® (darbepoetina alfa, NESP). A sequência proteica está representada por linhas e círculos (N-glicanos por estruturas maiores e mais ramificados e O- glicanos, mais curtos). pI, ponto isoelétrico. Adaptado de EGRIE, BROWNE, 2001.	16
Figura 8: Composição do dímero da EPO-Fc. Esta molécula compreende a fusão da Eritropoietina humana recombinante alfa (Epoetina alfa) com a porção Fc da IgG1.....	18

Figura 9: Exemplos de alguns medicamentos de eritropoietina disponíveis no mercado. Linhagem celulares: CHO- ovário de hamster chinês. BHK- células renais de hamster bebê. Fonte: THEVIS, 2010.....	21
Figura 10: Imagem dos lanes de identificação correspondente à análise dos padrões de referência rEPO e/ou rHuEPO, uEPO e/ou HuEPO, NESP e CERA. As áreas básicas e ácidas são definidas pela posição das bandas apresentadas pelo padrão. A área endógena é a região existente entre as duas áreas. Imagem obtida através do TD2014EPO.....	23
Figura 11: Imagem SAR-PAGE mostrando o padrão de bandejamento correspondente à análise dos padrões de referência Epoetin- δ , NESP, CERA, EPO-Fc em comparação com endógeno uEPO / bEPO. Imagem obtida através do TD2014EPO.....	25
Figura 12: Diferenças entre a sequência de aminoácidos da EPO humana (hEPO) e equina (eEPO), representado em vermelho. Adaptado de Yu, <i>et al.</i> , 2010.	27
Figura 13: Tipos de ELISA que podem ser utilizados. Ensaio direto, indireto e sanduíche. Fonte: extraído de THERMO FISHER, 2019. https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html	29
Figura 14: Padrão eletroforético de biossimilares de rHuEPO aplicados diretamente no gel de SAR-PAGE. Linha 1: BRP/NESP/EPO-Fc, 71/59/400 pg, respectivamente. Linhas 2-10: Shanpoetin, Zyrop, Beijing Four Rings, Repoetin, Eritromax, Hemax, Alfaepoetina, Neorecormon e Recormon. Linha 11: HuEPO, EPO endógena, controle negativo. Linha 12: Dynepo/NESP/CERA, 78/59/157 pg, respectivamente. Linha 13: HuEPO + rHuEPO a 100 pg, controle positivo. A seta indica os medicamentos de difícil detecção.....	42
Figura 15: Padrão eletroforético de biossimilares de rHuEPO adicionados á urina humana, por SAR-PAGE. Linha 1: BRP/NESP/EPO-Fc, 71/59/400 pg, respectivamente. Linha 2-10: Shanpoetin, Zyrop, Beijing Four Rings, Repoetin, Eritromax, Hemax, Alfaepoetina, Neorecormon e Recormon. Linha 11: HuEPO, EPO endógena, controle negativo. Linha 12: Dynepo/NESP/CERA, 78/59/157 pg, respectivamente. Linha 13: HuEPO + rHuEPO a 100 pg, controle positivo. A seta indica os medicamentos claramente positivos.....	43

Figura 16: Padrão eletroforético dos biosimilares de rHuEPO aplicados diretamente no gel de IEF-PAGE. pH do gel 2-6. Linha 1: rHuEpo. Linhas 2 - 10: Recormon, Neorecormon, Hemax, Zyrop, Eritromax, Alfaepoetina, Repoetin, Beijing four ring e Shanpoetin. Linha 11: uEPO 4 µg.....	44
Figura 17: Padrão eletroforético de biossimilares de rHuEPO adicionados á urina humana, por IEF-PAGE. pH do gel 2-6.. Linha 1: BRP 400 pg. Linhas 2- 10: Recormon, Neorecormon, Hemax, Zyrop, Eritromax, Alfaepoetina, Repoetin, Beijing Four Rings, Shanpoetin. Linhas 11: HuEPO 4 µg.	45
Figura 18: Padrão eletroforético do biosimilar Hemax produzido em diferentes lotes e adicionado a urina humana, por SAR-PAGE. Linha 1: Dynepo/NESP/CERA, 78/59/157 pg, respectivamente. Linhas 2 - 4: Hemax (lote:1609996) 150 pg. Linhas 5 - 7: Hemax (lote: 6090731) 150 pg, ambos em triplicta. A seta indica os medicamentos de difícil detecção (lote:1609996).....	48
Figura 19: Gráfico da curva de calibração de sangue + rEPO.	55
Figura 20: Gráfico da curva de calibração de sangue + NESP.	56
Figura 21: Gráfico da curva de calibração de sangue + CERA.	57
Figura 22: Gráfico da curva de calibração de urina + rEPO.....	58
Figura 23: Gráfico curva padrão para análise da linearidade para rHuEPO em sangue.	69
Figura 24: Gráfico curva padrão para análise da linearidade para CERA em sangue.	69
Figura 25: Gráfico curva padrão para análise da linearidade para NESP em sangue.	70
Figura 26: Gráfico curva padrão para análise da linearidade para rHuEPO em urina.	70
Figura 27: Representação gráfica do estudo de excreção de rHuEPO em sangue equino.....	72
Figura 28: Representação gráfica do estudo de excreção de NESP e CERA em sangue equino.....	74
Figura 29: Representação gráfica do estudo de excreção de rHuEPO em urina equina.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados analíticos adversos para Agentes Estimuladores de Eritropoiese (ESAs). Fonte: adaptado de https://www.wada-ama.org	7
Tabela 2: Resultado obtido para determinação da especificidade do método analítico em sangue.	53
Tabela 3: Resultado obtido para determinação da especificidade do método analítico em urina.	54
Tabela 4: Determinação da especificidade em sangue + rEPO.	55
Tabela 5: Determinação da especificidade em sangue + NESP.	56
Tabela 6: Determinação da especificidade em sangue + CERA.	57
Tabela 7: Determinação da especificidade em urina + rEPO.	58
Tabela 8: Concentrações obtidas para rHuEPO em vinte replicatas em três dias diferentes.....	60
Tabela 9: concentrações obtidas para NESP em vinte replicatas em três dias diferentes.....	61
Tabela 10: concentrações obtidas para CERA em vinte replicatas em três dias diferentes.....	62
Tabela 11: concentrações obtidas para rHuEPO (urina) em vinte replicatas em três dias diferentes.	63
Tabela 12: LOD dos analitos rEPO/NESP/CERA em sangue e rEPO em urina nas concentrações em mU/mL e ng/mL.....	63
Tabela 13: Valores de absorvância obtidos para precisão intermediária da CERA, a 200 mU/mL, em sangue.	66
Tabela 14: Valores de absorvância obtidos para a precisão intermediária da NESP, a 400 mU/mL, em sangue.	66
Tabela 15: Valores de absorvância para a precisão intermediária da BRP.	67
Tabela 16: Valores de absorvância para a precisão intermediária da BRP.	67
Tabela 17: Estudo de excreção em sangue rHuEPO / Hemax por ELISA.	72
Tabela18: Estudo de excreção de NESP e CERA por ELISA em sangue.....	73
Tabela19: Estudo de excreção de rHuEPO por ELISA em urina.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMA – Agência Mundial Antidopagem
- BHK – Linhagem celular proveniente de rins de hamster, do inglês *Baby Hamster Kidney*
- CERA – Continuous erythropoietin receptor activator
- CHO – Linhagem celular de ovário de hamster, do inglês Chinese Hamster Ovary cell
- DRC – Doença Renal Crônica
- DTT – Ditioneitol (agente redutor)
- EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético
- eEPO – Eritropoietina equina
- ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
- EPO - Eritropoietina
- EPO-Fc – Eritropoietina conjugada à IgG
- ESAs – Agentes estimuladores da eritropoiese
- FEI – Federação Equestre Internacional
- HIF – Fator de indução à hipóxia
- HRP – Horseradish peroxidase
- HuEPO – Eritropoietina humana urinária
- IEF – Isoeletrofocalização
- IgG – Imunoglobulina G
- ISL – International Standards for Laboratories
- JCB – Jockey Club Brasileiro
- LADETEC – Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico
- LBCD – Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem
- LC-MS – Cromatografia líquida com espectrômetro de massas
- LOD – Limite de Detecção
- NESP – Novel erythropoiesis stimulating protein
- PBS – Phosphate buffered saline
- PEG – Polietilenoglicol
- pI – Ponto Isoelétrico

pO₂ – Pressão parcial de oxigênio

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

reEPO – Eritropoietina equina recombinante

rHuEPO – Eritropoietina recombinante humana

TD2014EPO – Documento técnico da WADA para análises de EPO

THP – Glicoproteína Tamm-Horsfall

uEPO – Eritropoietina urinária

WADA – World Antidoping Agency

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. História do controle de Dopagem no Esporte	1
1.2. Agência Mundial Antidopagem	3
1.2.1. Lista de Substâncias Proibidas	5
1.3. Eritropoietina	8
1.3.1. Indução hipóxica de EPO	9
1.3.2. Estrutura e Fisiologia da EPO	9
1.4. Agentes Estimuladores de Eritropoiese (ESAs)	14
1.4.1. Eritropoietina recombinante (rHuEPO)	14
1.4.2. NESP (<i>Novel Erythropoiesis Stimulating Protein</i>)	15
1.4.3. ATIVADOR CONTÍNUO DO RECEPTOR DE ERITROPOIETINA (CERA)	17
1.4.4. PROTEÍNA DE FUSÃO RECOMBINANTE DA EPO (EPO-FC)	17
1.5 Biossimilares	19
1.6 Técnicas de análise	22
1.6.1 Isoeletrofocalização (IEF-PAGE)	22
1.6.2 SARCOSYL – PAGE (SAR-PAGE)	24
1.7 Dopagem Equina	26
1.7.1 Detecção da Eritropoietina recombinante humana (rHuEPO) em Equinos	28
1.8 Validação de Métodos de Análise	29
2. OBJETIVOS	31
3. METODOLOGIA	32
3.2 Metodologia aplicada para análise de biossimilares (Etapa 1)	32
3.2.1 Materiais de Referência	32
3.2.2 Obtenção e preparo das amostras de urina humana	33

3.2.3	Imunopurificação da amostra de urina para eletroforese em SAR-PAGE	33
3.2.4	Eletroforese em SAR-PAGE, Imunotransferência e Detecção por Quimiluminescência	34
3.2.5	Imunopurificação da amostra de urina para eletroforese em IEF-PAGE	35
3.2.6	Eletroforese em IEF-PAGE, Dupla Imunotransferência e Detecção por Quimiluminescência	36
3.3	Metodologia aplicada para análise de rHUEPO em Equinos (Etapa 2)	38
3.3.1	Materiais de Referência	38
3.3.2	Estudo em animais	38
3.3.3	Amostras fortificadas	38
3.3.4	ELISA das amostras de sangue equino	39
4.	RESULTADOS e DISCUSSÕES	41
4.1.	Análise de biossimilares de rHuEPO (Etapa 1)	41
4.2.	Detecção de ESAs em equinos por ELISA (Etapa 2)	50
4.2.1	Otimizações/ Adaptações:	51
4.2.2	Especificidade	52
4.2.3	Limite de Detecção (LOD)	59
4.2.4	Arraste	65
4.2.5	Precisão Intermediária	65
4.2.6	Linearidade	68
4.2.7	Estudo de Excreção	71
5.	CONCLUSÕES:	76
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. História do controle de Dopagem no Esporte

A utilização de métodos e substâncias com a finalidade de aumentar o desempenho de um indivíduo é tão antiga quanto a própria humanidade. O ser humano sempre busca sistemas alternativos destinados a melhorar suas potencialidades naturais (ROSE, 1989). A palavra “doping” foi mencionada pela primeira vez em 1889 em um dicionário em inglês, sua origem etimológica vem da população africana ou holandesa, onde “doop” era uma infusão utilizada como estimulante em combates, procedimentos religiosos e em cavalos (MÜLLER, 2010).

Vários relatos de dopagem aconteceram ao longo da história. Os primeiros casos ocorreram na Grécia por volta de 400 a.C. quando pagamentos e benefícios como moradia, alimentação, isenção de impostos entre outros eram oferecidos aos atletas vencedores, levando à profissionalização do esporte e a corrupção do sistema. Devido às vantagens oferecidas aos atletas gregos vencedores, como modo de se beneficiar eles começaram a utilizar estricnina (substância encontrada em plantas do gênero *Strychnos*) como estimulantes antes dos jogos (PEREIRA *et al.*, 2010).

Na China ocorreu a ação com estimulantes quando médicos chineses recomendaram o uso de Ma Huang (um extrato de a planta Ephedra) para melhorar o desempenho de desportistas chineses. Com o mesmo objetivo cogumelos alucinógenos foram consumidos nas olimpíadas que foram realizadas no período de 776 a.C. a 393 d.C. (MÜLLER, 2010).

O primeiro caso fatal ocorreu em 1886, dez anos antes dos Jogos Olímpicos Modernos (Atenas, 1896), no qual o ciclista Arthur Linton morreu pelo uso excessivo de estimulantes (AQUINO NETO, 2001). A purificação e elucidação de estruturas de alcaloides e outros ingredientes ativos de plantas, em paralelo ao surgimento dos primeiros medicamentos sintéticos, foram as pré-condições para o início da "era moderna" da dopagem no século XIX (MÜLLER, 2010).

No século XX, o contexto da guerra favoreceu o abuso de estimulantes e drogas contra a fadiga, que foram desenvolvidas para o exército soviético e difundiram-se pelo meio desportista. Após a segunda guerra mundial, anfetaminas e esteróides anabolizantes foram amplamente utilizados. Em 1953, foi produzido o primeiro esteroide sintético que tinha um efeito muito maior do que a testosterona que já era bastante utilizada para aumentar a virilidade (AQUINO NETO, 2001).

Numerosos casos de doping foram relatados desde o final do século XIX, porém o uso de algumas substâncias farmacêuticas só foi proibido, em meados do século XX, quando os testes em atletas foram iniciados. Em paralelo, surgiram as primeiras definições e regulamentos contra a dopagem no esporte, sendo a Federação Internacional de Atletismo (IAAF) a primeira a proibir o uso de substâncias estimulantes no esporte. Entretanto devido à ausência de métodos de detecção eficientes essas restrições não foram capazes de reprimir o uso de maneira eficaz (MÜLLER, 2010).

Mediante vários casos de morte de atletas associadas ao abuso de drogas, o Comitê Olímpico Internacional (COI) criou uma comissão médica que elaborou sua primeira Lista de Substâncias Proibidas em 1967, que descrimina o uso de substâncias e/ou métodos proibidos capazes de alterar o desempenho dos atletas no esporte. A Comissão Médica também desenvolveu métodos e equipamentos para laboratórios de controle de dopagem. Assim criando condições para que o controle oficial de dopagem acontecesse nos Jogos Olímpicos de 1968 no México (MÜLLER, 2010). A análise sistemática de amostras de urina foi introduzida nos Jogos Pan-Americanos de Caracas em 1983 e testes sanguíneos foram implementados somente em 1994, nos Jogos Olímpicos de Inverno de Lillehammer (BARROSO *et al.*, 2008).

Na década de 1980 houve um grande avanço no setor de biotecnologia, principalmente na produção de proteínas em larga escala, como a eritropoietina (EPO), o hormônio do crescimento (GH), a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e a insulina, para auxiliar no tratamento de diversas doenças, que logo passaram a ser utilizadas também de modo ilícito no esporte (PEREIRA *et al.*, 2010). Na luta contra o uso de substâncias que alteram o desempenho dos atletas, no final do século XXI, o controle de dopagem no esporte engloba

também em seu controle as drogas sociais, como por exemplo, o metabólito característico do consumo de *Cannabis sativa* (maconha) (AQUINO NETO, 2001).

No Brasil, organizações desportivas nacionais se uniram para desenvolver políticas e planos para combater a dopagem em suas respectivas modalidades. Sob metodologia do COI em 1989, foi criado o Laboratório de Controle de Dopagem (LAB DOP) no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com o intuito de realizar o controle de dopagem da Copa América de Futebol que o Brasil sediou no mesmo ano. O antigo LAB DOP, atual Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD) é o único laboratório brasileiro acreditado pela Agência Mundial Antidopagem (AMA), tendo sido o primeiro laboratório Latino-Americano a obter tal acreditação (AQUINO NETO, 2001). Desde então, o laboratório analisa amostras de atletas de vários eventos esportivos importantes, com destaque para os Jogos Panamericanos de 2007 e Jogos Olímpicos & Paralímpicos de 2016 que foram sediados no Rio de Janeiro. Os laboratórios antidopagem são dedicados à pesquisa e análise de agentes dopantes em amostras provenientes de federações esportivas nacionais e internacionais e, para atender ao Código Mundial Antidopagem, devem obter e manter a acreditação da AMA.

1.2. Agência Mundial Antidopagem

Em 1999 foi criada a AMA, uma agência internacional independente que atua em conjunto com os laboratórios de controle de dopagem unificando a qualidade e segurança dos resultados empregados por eles (BARROSO *et al.*, 2008). Desde a sua criação, a AMA passou a controlar a Lista de Substâncias Proibidas, que é dividida por classes de substâncias, de acordo com a sua atividade farmacológica como: agentes anabolizantes, estimulantes, narcóticos, canabinóides, corticosteroides, diuréticos, hormônios peptídicos, e métodos proibidos (manipulação química ou física da urina e do sangue e/ou seus componentes). Esta lista é anualmente revisada e atualizada para acompanhar o desenvolvimento da indústria farmacêutica e a sofisticação da dopagem. De acordo com o Código Mundial Anti-dopagem, para uma substância ser incluída na Lista de Substâncias Proibidas, a mesma deverá reunir ao menos dois dos três critérios seguintes: aumentar ou ter o potencial de melhorar o desempenho

esportivo, representar um risco à saúde do atleta, ou ser contrário ao espírito do esporte. O Código também estabelece o princípio da "responsabilidade objetiva", afirmando que a presença de uma substância proibida (ou seus metabólitos) em amostras de um atleta é suficiente para constituir violação das regras antidopagem, independentemente da existência de culpa pessoal do atleta (intenção ou negligência) (BARROSO *et al.*, 2008). O atleta que tem em sua urina ou sangue a presença de alguma dessas substâncias sofre sanções previstas no Código Mundial Anti-dopagem (The World Anti-Doping Code, 2015).

A identificação de substâncias proibidas que aumentam ou melhoram o desempenho em esportes é um desafio global crescente, dificultado pela evolução da farmacologia com drogas cada vez mais sofisticadas e métodos avançados que dificultam a detecção (BARROSO *et al.*, 2008).

Para que as análises das amostras sejam realizadas de forma homogênea, os laboratórios credenciados pela AMA precisam seguir o Padrão Internacional para Laboratórios (ISL, do inglês *International Standards for Laboratories*), que inclui requisitos para que os mesmos mantenham-se acreditados. Além da lista de substâncias e métodos proibidos e do ISL, a AMA também publica periodicamente o documento técnico, no qual constam determinações obrigatórias e específicas a serem seguidas pela área técnica antes de qualquer análise e liberação de resultado (WADA, 2014). Os laboratórios de controle de dopagem enfrentam diariamente desafios, pois além das análises de rotina, estes estão sempre buscando aprimorar e desenvolver sua abordagem analítica, a fim de identificar novas substâncias e métodos que possam vir a ser usados visando burlar o sistema de controle de dopagem (THEVIS *et al.*, 2018).

1.2.1. Lista de Substâncias Proibidas

Nesta lista as substâncias estão separadas de acordo com a sua classe farmacológica. Estas substâncias também podem ser diferenciadas de acordo com as suas origens: substâncias exógenas, que não podem ser produzidas naturalmente pelo organismo, ou endógenas, substâncias naturalmente produzidas pelo corpo. Esteróides anabólicos androgênicos sintéticos são exemplos da primeira categoria, já hormônios endógenos, como hormônio de crescimento humano (hGH), eritropoietina (EPO) e insulina, pertencem ao segundo grupo. Além dos compostos exógenos e endógenos existem também os bioequivalentes, análogos de compostos endógenos contendo modificações estruturais que melhoram efeitos biológicos, que oferecem uma clara vantagem para os atletas que querem se dopar, à medida em que são mais difíceis de detectar (BARROSO *et al.*, 2008).

Os hormônios peptídicos endógenos com potenciais para melhorar o desempenho dos atletas estão listados na Lista de Substâncias Proibidas da AMA na classe S2 (*Peptide Hormones, Growth Factors, Related Substances, And Mimetics*) (Figura 1) e entre as moléculas listadas nessa classificação, encontra-se a eritropoietina (EPO) (WADA, 2019). Devido ao avanço nas pesquisas, um maior número de métodos vem sendo implementado para detectar substâncias proibidas (Figura 2) tendo, conseqüentemente, um impacto no aumento do número de casos positivos (Resultados Analíticos Adversos - RAA) (Tabela 1). Como essas substâncias são estruturalmente idênticas aos hormônios endógenos, uma das estratégias utilizadas para sua detecção são os ensaios imunológicos que são mais custosos e requerem desenvolvimento individual, diferentemente das outras classes de moléculas que são analisadas por técnicas cromatográficas e espectrometria de massas (BARROSO *et al.*, 2008).

b. Endogenous AAS and their Metabolites and isomers, when administered exogenously, including but not limited to:**

4-Androstenediol (androst-4-ene-3 β ,17 β -diol);
4-Hydroxytestosterone (4,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one);
5-Androstenedione (androst-5-ene-3,17-dione);
7 α -hydroxy-DHEA;
7 β -hydroxy-DHEA;
7-keto-DHEA;
19-Norandrostenediol (estr-4-ene-3,17-diol);
 19-Norandrostenedione (estr-4-ene-3,17-dione);
Androstanolone (5 α -dihydrotestosterone, 17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one);
 Androstenediol (androst-5-ene-3 β ,17 β -diol);
 Androstenedione (androst-4-ene-3,17-dione);
Boldenone;
 Boldione (androsta-1,4-diene-3,17-dione);
Epiandrosterone (3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one);
 Epi-dihydrotestosterone (17 β -hydroxy-5 β -androstan-3-one);
 Epitestosterone;
Nandrolone (19-nortestosterone);
Prasterone (dehydroepiandrosterone, DHEA, 3 β -hydroxyandrost-5-en-17-one);
Testosterone.

2. OTHER ANABOLIC AGENTS

Including, but not limited to:

Clenbuterol, selective androgen receptor modulators (SARMs, e.g. andarine, LGD-4033, enobosarm (ostarine) and RAD140), tibolone, zeranol and zilpaterol.

For purposes of this section:

* "exogenous" refers to a substance which is not ordinarily produced by the body naturally.

** "endogenous" refers to a substance which is ordinarily produced by the body naturally.

S2 PEPTIDE HORMONES, GROWTH FACTORS, RELATED SUBSTANCES, AND MIMETICS

The following substances, and other substances with similar chemical structure or similar biological effect(s), are prohibited:

1. Erythropoietins (EPO) and agents affecting erythropoiesis, including, but not limited to:

1.1 Erythropoietin-Receptor Agonists, e.g.

Darbepoetin (dEPO);
 Erythropoietins (EPO);
 EPO based constructs (e.g. EPO-Fc, methoxy polyethylene glycol-epoetin beta (CERA));
 EPO-mimetic agents and their constructs (e.g. CNTO-530, peginesatide).

1.2 Hypoxia-inducible factor (HIF) activating agents, e.g.

Argon;
 Cobalt;
 Daprodustat (GSK1278863);
 Molidustat (BAY 85-3934);
 Roxadustat (FG-4592);
 Vadadustat (AKB-6548);
 Xenon.

1.3 GATA inhibitors, e.g.

K-11706.

1.4 TGF-beta (TGF- β) inhibitors, e.g.

Luspatercept;
 Sotatercept.

1.5 Innate repair receptor agonists, e.g.

Asialo EPO;
 Carbamylated EPO (CEPO).

Figura 1: Lista de substâncias proibidas em 2019. Extraído do site: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents>.

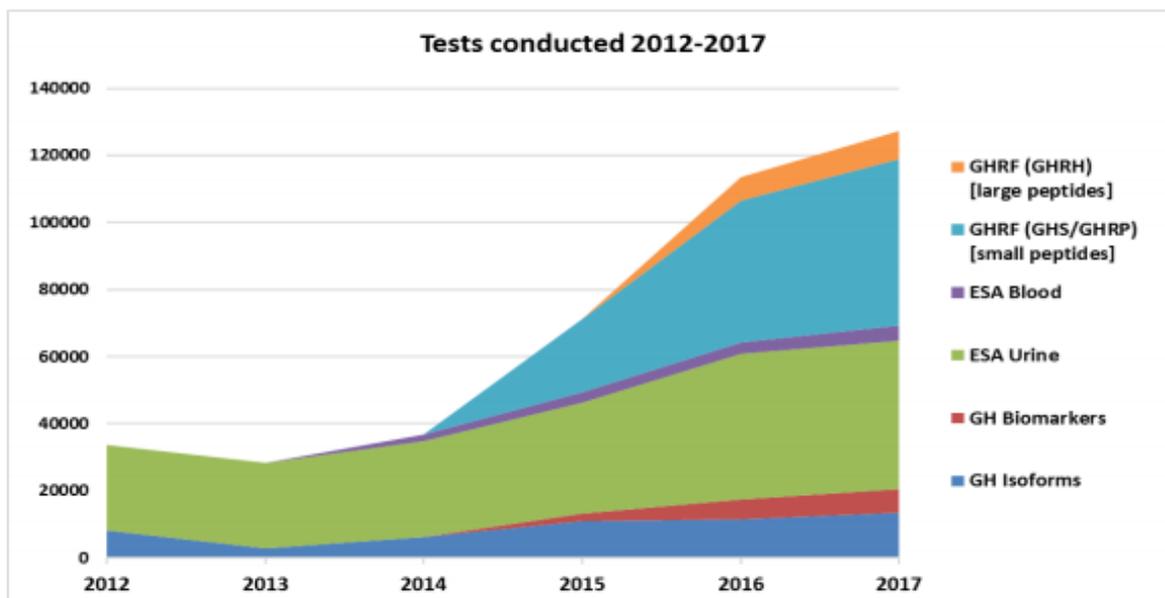


Figura 2: Número de análises do ano de 2012-2017. Extraído do site: <https://www.wada-ama.org>

Tabela 1: Resultados analíticos adversos para Agentes Estimuladores de Eritropoiese (ESAs).
Fonte: adaptado de <https://www.wada-ama.org>

Ano	Amostras	Resultados Adversos
2017	48,853	85
2016	46,710	67
2015	36,218	46
2014	30,563	66

1.3. Eritropoietina

Em 1948, o termo eritropoietina foi introduzido para referenciar o hormônio estimulador da eritropoiese. A eritropoietina humana (HuEPO) foi isolada pela primeira vez em 1977 e só teve seu gene clonado em 1985. O isolamento e a caracterização química da EPO humana urinária permitiram a identificação da sua sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, o desenvolvimento da primeira eritropoietina recombinante humana (rHuEPO). O desenvolvimento das tecnologias de DNA recombinante permitiu a fabricação de produtos biofarmacêuticos a partir de cultura em células de bactérias, leveduras e animais e que são de grande valor terapêutico (JELKMANN, 2007).

A EPO é um hormônio glicoprotéico produzido pelas células de revestimento capilar peritubular do rim. Ela estimula a produção de glóbulos vermelhos (eritropoiese), promovendo a proliferação e a diferenciação de células progenitoras contribuindo para a manutenção da concentração de hemoglobina no sangue em condições normais (JELKMANN, 2011). Sendo assim, a deficiência na sua produção leva a um quadro de anemia. Pacientes com Doença Renal Crônica (DRC) frequentemente desenvolvem anemia, devido à baixa capacidade de produção de EPO pelos rins doentes. Estudos mostram que cerca de 25% desses pacientes precisavam de transfusões sanguíneas antes da rHuEPO estar disponível no mercado para uso clínico (JELKMANN, 2013). A rHuEPO é também administrada para o tratamento de anemias não renais, tais como aquelas associadas a doenças malignas ou auto-imunes e em situações cirúrgicas (JELKMANN, 2007b). Existem também outras indicações para o seu uso como, a anemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A terapia com rHuEPO e seus análogos visa evitar a necessidade de transfusão de hemácias (JELKMANN, 2007a).

O papel importante do rim na produção de EPO ficou claro quando JACOBSON e colaboradores publicaram, em 1957, que ratos nefrectomizados não respondem com o aumento normal o nível plasmático de EPO no estresse hipóxico. Existem também outros órgãos produtores de EPO, além dos rins, fígado, baço, pulmão, medula e cérebro são capazes de expressar EPO mRNA. Em fetos humanos, como em outros mamíferos, o fígado é o principal local da síntese de EPO (MARTI *et al*, 1996). Em um indivíduo com função renal normal,

o aumento da anemia ou hipoxemia faz com que haja um aumento na produção de eritropoietina. Os níveis de eritropoietina endógena, em indivíduos saudáveis variam de 10-25 mU / mL (ADMSOM, 1998).

1.3.1. Indução hipóxica de EPO

Uma das funções da EPO é manter a concentração normal de hemoglobina no sangue durante condições de estado estacionário e de recuperação de massa celular após hemorragia. Quando ocorre uma queda nos níveis de hemoglobina, que não seja em decorrência de doença renal, a concentração de EPO circulante aumenta exponencialmente. Isso ocorre devido à pressão de oxigênio arterial (pO_2), que depende da concentração de hemoglobina, da afinidade da hemoglobina pelo O_2 e da taxa de fluxo sanguíneo. (JELKMANN, 2013).

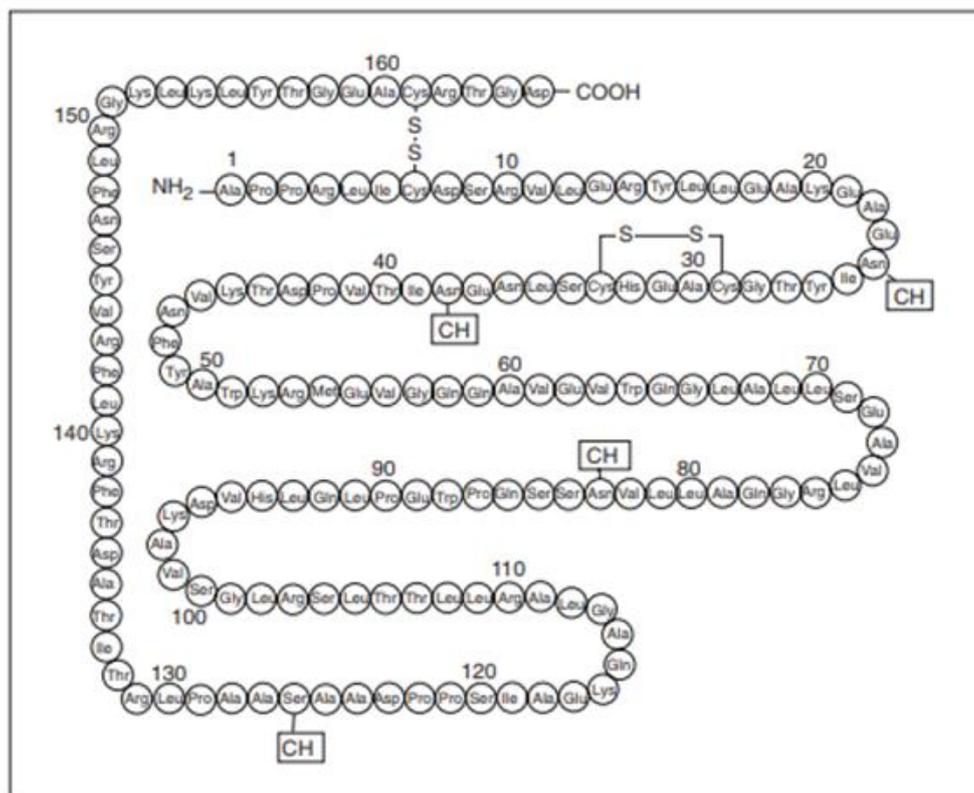
Segundo FAURA *et al.*, 1969, as grandes altitudes promovem a estimulação da eritropoiese, levando, a longo prazo, à eritrocitose e à doença crônica das montanhas. Já BEALL e colaboradores demonstraram, em 1998, que os tibetanos (que vivem a cerca de 3800 m de altitude) têm baixas concentrações de hemoglobina e não desenvolvem doença crônica das montanhas, sugerindo que ocorre o evento de seleção natural e adaptação genética na evolução da tolerância dos humanos à hipóxia. Nos animais que vivem em La Paz, a 4000 m de altitude, foi observado uma maior concentração de hemoglobina e, portanto, maior capacidade de absorção de O_2 do que os habitantes que vivem em terras baixas (JELKMANN, 2016).

Na aclimatação em alta altitude, os níveis de EPO no plasma aumentam entre 1 e 2 dias após a subida. Posteriormente, a eritropoiese continua a ser elevada, embora a concentração de EPO seja pouco aumentada na residência de altitude contínua (JELKMANN, 2016).

1.3.2. Estrutura e Fisiologia da EPO

A EPO humana é uma glicoproteína ácida constituída inicialmente como um pró hormônio de 193 aminoácidos, entretanto 27 aminoácidos são clivados antes da excreção, sequência essa que não possui atividade biológica (Figura 3). Ao entrar na circulação sanguínea, há também a perda do aminoácido arginina na

posição carboxi-terminal (RECNY et al., 1987), deixando o hormônio com uma sequência final de 165 aminoácidos que formam duas pontes de dissulfeto (Cys⁷ – Cys¹⁶¹, Cys²⁹ – Cys³³) e quatro glicosilações sendo três N- ligadas aos aminoácidos Asn²⁴, Asn³⁸, Asn⁸³ e uma O ligada à Ser¹²⁶. Esta proteína possui aproximadamente 30,4 kDa (JELKMANN, 2016) e 40% do seu peso molecular total corresponde a porção carboidrato da molécula (PASCUAL, 2004). As EPOs endógena e recombinante possuem várias isoformas de glicosilação. Os N-glicanos e os resíduos de ácido siálico são essenciais para a expressão da atividade biológica *in vivo* da EPO. Os resíduos de ácido siálico deste hormônio atuam como sinalizadores biológicos, a fim de impedir sua remoção prematuramente da circulação pelo fígado, antes que alcance seu alvo fisiológico (SPIVAK & HOGANS, 1989). Ao entrar na circulação sanguínea, estima-se que a meia vida da EPO seja em torno de seis a oito horas (ADMSOM, 1996). No entanto, a eritropoiese é um processo lento, levando entre 3 e 4 dias para que a reticulocitose se torne aparente (SUZUKI *et al.*, 2002).



A eritropoietina atua em células alvo específicas na medula óssea através dos receptores da superfície celular. O principal alvo da ação da eritropoietina são as células formadoras de colônias eritróides (CFC-Es) (ADMSOM, 1996). Essas células possuem a particularidade de só responderem a este hormônio mesmo em baixas concentrações, pois possuem receptores específicos, pertencentes à família de receptores para fatores de crescimento hematopoéticos. A ligação da EPO ao seu receptor provoca uma dimerização na porção extracelular do mesmo, desencadeando uma sinalização através de proteínas quinases. O estímulo hormonal continua até que os níveis de oxigenação tecidual volte a valores normais (JELKMANN, 2008; 2010). As CFC-Es ativadas irão, então gerar eritrócitos maduros após as divisões celulares e diferenciação (Figura 4). É importante ressaltar que as CFC-Es, neste estágio, não apresentam hemoglobina dependendo exclusivamente da EPO que é essencial para impedir que estas células sofram apoptose, além de estimular sua proliferação e diferenciação (JELKMANN, 2010).

A produção de EPO é mediada pelos fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIFs), embora não seja seu alvo exclusivo, já que os HIFs podem ativar mais de 1.000 genes além da EPO. Os HIFs são complexos proteicos heterodiméricos consistindo de uma subunidade α e uma subunidade β . Três diferentes isoformas de HIF α foram descritas (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), que diferem em peso, função e distribuição tecidual. O HIF-2 foi identificado como o principal fator de transcrição que induz a expressão da EPO. A ativação do HIF é modulada e estabilizada por diversos mecanismos intracelulares que dependem da pO_2 e a sua inativação ocorre através da hidroxilação enzimática das suas subunidades. Em normóxia, ou seja, em situações onde o suprimento de oxigênio está nos níveis normais, o HIF-1 α é hidroxilado imediatamente após a tradução pelas prolin hidroxilases (PHDs) e reconhecido pela proteína supressora de tumor pVHL. Após uma polubiquitinação, a subunidade HIF- α é degradada no proteossoma 26S. Em hipóxia, ou seja, onde os níveis de O_2 estão abaixo da normalidade, o HIF-1 α é estabilizado devido à inatividade das hidroxilases e translocado para o núcleo, onde ele dimeriza com seu parceiro de transcrição heterodimérico HIF-1 β (Figura 5). O complexo ativo se liga a elementos responsivos à hipóxia, co-ativadores de transcrição de DNA e induz

a expressão de uma série de genes alvo induzidos por hipóxia, como o gene da EPO (BUNN & POYTON, 1996)

Existem alguns compostos que são capazes de estabilizar as HIFs como o cobalto, que se liga ao HIF- α , impedindo assim a interação com a proteína de degradação de HIF- α e estimulando assim a expressão de EPO. (JELKMANN, 2011; 2016). Em 2014, JELKMANN, relatou que a produção de EPO pela ativação do HIF também pode ser estimulada através da inalação de xenônio. De fato, em 2014, a Agência Mundial Antidopagem aprovou a opção de modificar a seção S.2. da Lista Proibida, onde o xenônio e o argônio foram identificados especificamente como ativadores de HIF. No entanto, não há evidências de estudos em humanos indicando que o xenônio de fato estimula a eritropoiese.

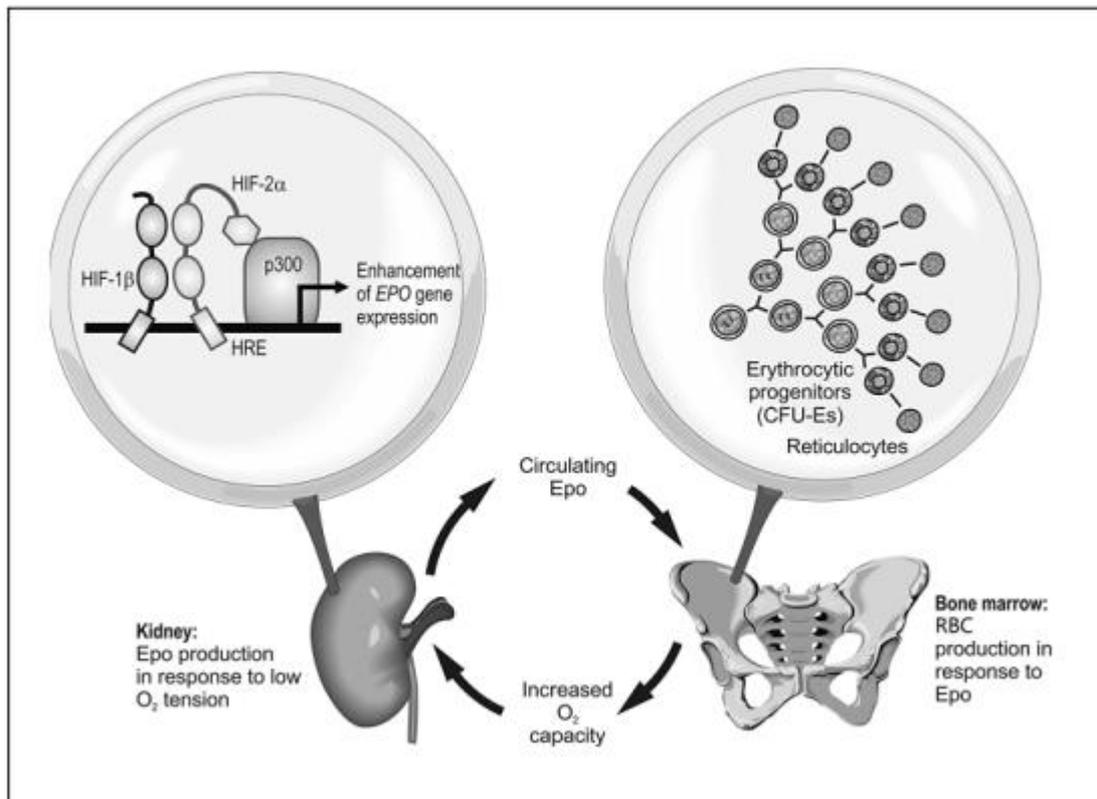


Figura 4: Demonstração do processo de eritropoiese. O potenciador da EPO é ativado pelo complexo de fator de transcrição indutível por hipóxia HIF, com a participação de co-fatores, como p300, ativando a expressão da EPO. Na medula óssea, a Epo promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação de progenitores eritrocitários, particularmente as unidades formadoras de colônias-eritróides (CFUEs). Fonte: JELKMANN, 2013.

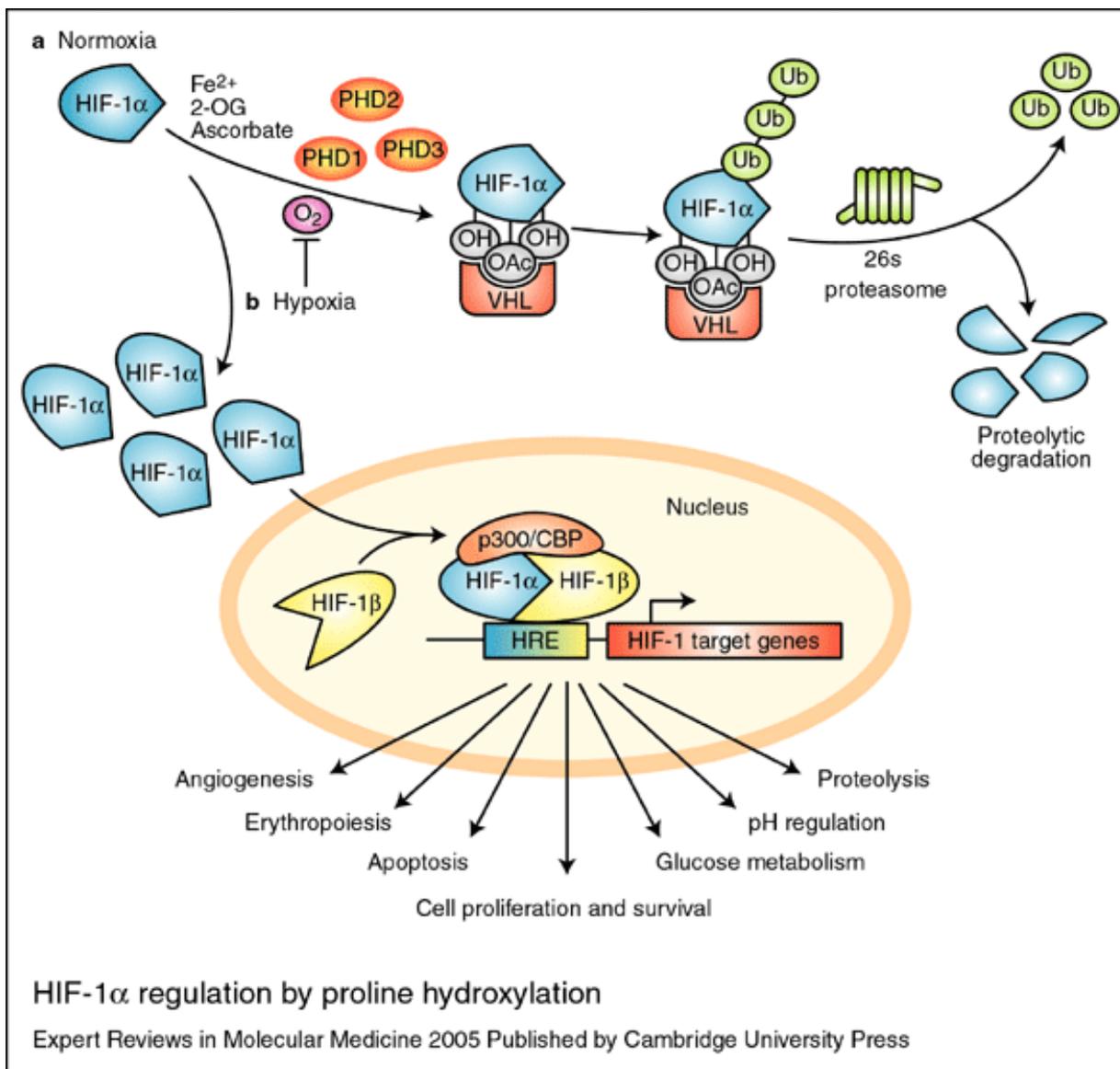


Figura 5: Mecanismo de atuação das HIFs em situações de hipóxia e normóxia. Extraído de: Expert Reviews in Molecular Medicine: <http://www.expertreviews.org/> Acessado em 09/01/2019.

1.4. Agentes Estimuladores de Eritropoiese (ESAs)

1.4.1. Eritropoietina recombinante (rHuEPO)

A eritropoietina humana e a recombinante são bem parecidas, pois as porções proteicas das duas são idênticas, possuindo os mesmos 165 aminoácidos. Embora ambas possuam quatro cadeias oligossacarídeas, sendo três delas do tipo N (Asn²⁴, Asn³⁸ e Asn⁸³) e uma do tipo O (Ser¹²⁶), elas são diferentes pois, as modificações pós-traducionais de uma proteína dependem do equipamento enzimático das células que realizam a síntese e também dos procedimentos de cultivo. Enquanto a EPO endógena é produzida por células de rim humano em um organismo vivo, o hormônio recombinante é obtido a partir de célula do ovário de hamster chinês (CHO) cultivada em biorreator. Isso resulta em diferentes modificações pós-traducionais, como a glicosilação, o que permite a diferenciação desses dois tipos de hormônios (SKIBELI *et al.*, 2001; REICHEL *et al.*, 2012; SCHAUER, 2000).

Os N-glicanos exercem um papel importante na secreção, estabilidade, solubilidade, afinidade de ligação ao receptor e na excreção *in vivo* da EPO (TAKEUCHI, KOBATA, 1991; WEIKERT *et al.*, 1999; ELLIOTT *et al.*, 2003). Em particular, as isoformas da EPO se diferem pelo teor de ácido siálico (JELKMANN, 2008).

As rHuEPOs de primeira geração foram projetadas em clones de linhagens celulares de ovário de hamster chinês (CHO) (LIN *et al.*, 1985). A epoetina alfa foi a primeira eritropoietina recombinante. Ela é produzida desde 1989 e comercializado sob diferentes nomes; Epogen, Procrit, Eprex, Erypo e Espo. No ano seguinte em 1990 surgiu no mercado a epoetina beta, comercializada como Recormon, também produzida em células CHO, porém possui mais isoformas básicas que a alfa (JELKMANN, 2008). A letra grega é uma indicativa de que existe diferenças nos padrões de glicosilações na meia vida sérica das epoetinas. São alguns exemplos, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina gama, epoetina delta (DEICHER & HÖRL, 2004).

Mudando a linhagem celular de produção, temos no mercado a epoetina ômega, que foi comercializada pela primeira vez pela Elanex Pharmaceuticals sob o nome de Epomax, tendo sido posteriormente adquirida pela Baxter. Ela é

sintetizada em células renais de hamster bebê (BHK) e a quantidade de isoformas básicas é ainda maior do que a da Epoetina beta (PASCUAL *et al.*, 2004).

1.4.2. NESP (*Novel Erythropoiesis Stimulating Protein*)

Com o intuito de obter uma epoetina com meia-vida mais longa para que pacientes necessitassem de menos injeções na semana durante o tratamento, a indústria farmacêutica desenvolveu um novo agente estimulador de eritropoiese a Aranesp[®], também chamada de NESP ou Darbepoetina Alfa (EGRIE & BROWNE, 2001), um análogo hiperglicosilado da epoetina que estimula a eritropoiese pelo mesmo mecanismo que o hormônio endógeno (MACDOUGALL, 1999). Embora também seja obtida a partir de células CHO, a NESP difere em 5 aminoácidos da rHUEPO (Ala³⁰ por Asn, His³² por Thr, Pro⁸⁷ por Val, Trp⁸⁸ por Asn e Pro⁹⁰ por Thr). (Figura 6) (EGRIE & BROWNE, 2001; ELLIOTT *et al.*, 2003).

Devido a essas mutações, esse análogo apresenta adicionalmente mais duas N-glicosilações, quando comparadas a rHuEpo, totalizando, assim seis cadeias de açúcares (cinco delas estão ligadas a átomos de nitrogênio enquanto que uma está ligada a um átomo de oxigênio) (Figura 7). Esta hiperglicosilação leva a um aumento na massa molecular de até 15 KDa, levando a sua massa para entorno de 44-45 kDa. Esses N-glicanos adicionais possuem resíduos de ácido siálico terminais que levam a meia-vida sérica da NESP a aumentar em cerca de três a quatro vezes em comparação com as outras epoetinas recombinantes, podendo ser injetada apenas uma vez por semana para se obter a mesma resposta biológica. Eles também fazem com que a NESP apresente um perfil mais ácido do que as outras epoetinas (PASCUAL *et al.*, 2004; MACDOUGALL, 2001; ELLIOTT *et al.*, 2004).

Posição do AA ^a	rHuEPO	NESP
30	Alanina	Asparagina
32	Histidina	Treonina
87	Prolina	Valina
88	Triptofano	Asparagina
90	Prolina	Treonina

^a Aminoácido

Figura 6: Posições e diferenças dos resíduos de aminoácidos das estruturas peptídicas da rHuEPO e da NESP. Fonte: BENTO, 2008.

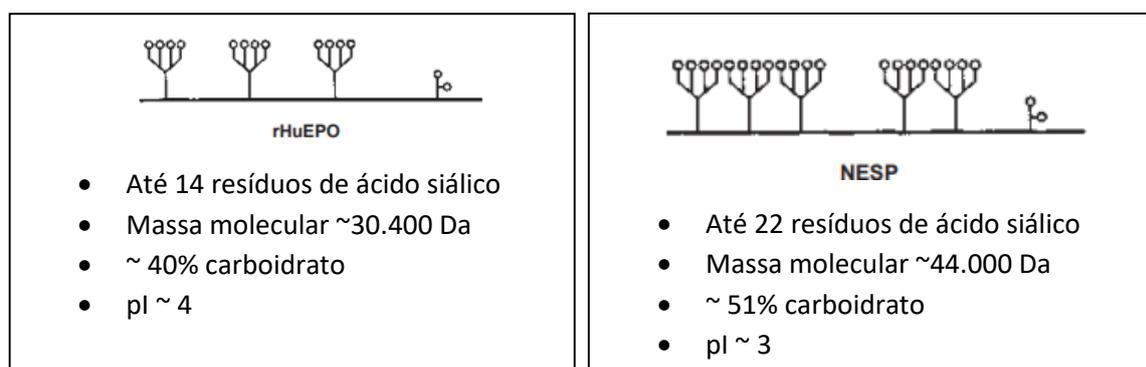


Figura 7: Diagrama esquematizado de comparação entre as estruturas oligossacarídicas da Epoetina alfa (eritropoietina humana recombinante alfa) e da Aranesp® (darbepoetina alfa, NESP). A sequência proteica está representada por linhas e círculos (N-glicanos por estruturas maiores e mais ramificadas e O-glicanos, mais curtos). pI, ponto isoelétrico. Adaptado de EGRIE, BROWNE, 2001.

1.4.3. ATIVADOR CONTÍNUO DO RECEPTOR DE ERITROPOIETINA (CERA)

Na terceira geração de eritropoietinas recombinantes, encontra-se o Ativador Contínuo do Receptor de Eritropoietina, Mircera[®] também chamado de CERA, desenvolvido pela Roche[®]. Esse novo agente estimulador de eritropoiese foi criado a fim de prolongar ainda mais a meia-vida da eritropoietina recombinante. A glicoproteína é primeiro expressa em células CHO (epoetina beta) e então ligada através de um grupo amino a uma molécula de metóxi polietilenoglicol (PEG). O polímero pode estar ligado à alanina N-terminal (Ala¹) ou a uma das lisinas (Lys⁴⁵ ou Lys⁵²) (DELGADO *et al.*, 1992), resultando em uma molécula de peso molecular de aproximadamente 60 kDa. Essa pegilação na molécula faz com que ela não seja internalizada na célula após se ligar ao receptor de eritropoietina, estimulando mais células progenitoras a se desenvolverem em eritrócitos, diferentemente das outras epoetinas que são internalizadas pelas células progenitoras de eritróide e degradadas após a ligação com o receptor (MACDOUGALL, 2003). Este fato contribui para que a meia-vida da CERA no soro seja em torno de 130 horas (MACDOUGALL, 2006). Devido a essa grande alteração estrutural, a CERA é excretada em pequenas quantidades na urina diferentemente das outras ESAs. O que tornou a sua detecção um desafio adicional para o controle de dopagem (REICHEL, ABZIEHER, & GEISENDORFER, 2009).

1.4.4. PROTEÍNA DE FUSÃO RECOMBINANTE DA EPO (EPO-FC)

Com o intuito de se prolongar sua meia-vida sérica, a EPO vem sendo modificada estruturalmente ao longo dos anos, tanto com a expressão de N-glicanos adicionais (NESP) como com modificações químicas, por exemplo, com polietilenoglicol (MIRCERA). Dando continuidade a estas modificações, foi que surgiu a Proteína de fusão recombinante da EPO, EPO –Fc (REICHEL & THEVIS, 2012). A EPO-Fc é constituída pela EPO fusionada, na porção c-terminal, à porção Fc da imunoglobulina G1 (Figura 8). A porção EPO desta molécula contém a mesma sequência de aminoácidos da EPO humana, porém, com diferenças em sua composição glicídica oriundas de modificações pós-transcricionais relacionadas pelo maquinário enzimático da célula hospedeira utilizada, a linhagem CHO. Todas essas modificações diminuem a afinidade da

EPO ao seu receptor (EPO-R) e retardam a depuração da EPO no sangue, aumentando a sua meia vida (JELCKMAN, 2008).

A EPO-Fc é um homodímero, formado por duas subunidades idênticas, com peso molecular de aproximadamente 112 kDa. Porém, em análises de SDS/SAR-PAGE a EPO-Fc pode apresentar duas bandas, a mais baixa e mais forte, representando o monômero e a mais alta e mais fraca, representando o dímero (REICHEL & THEVIS, 2012).

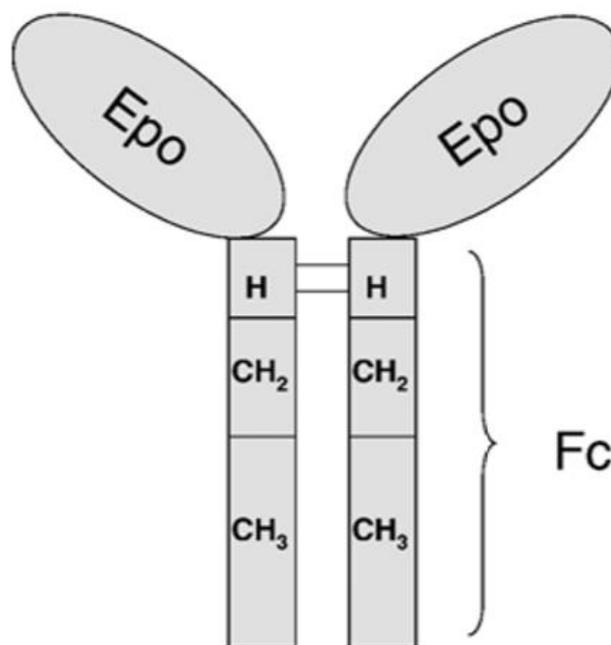


Figura 8: Composição do dímero da EPO-Fc. Esta molécula compreende a fusão da Eritropoietina humana recombinante alfa (Epoetina alfa) com a porção Fc da IgG1. (BITONTI & DUMONT, 2006).

1.5 Biossimilares

Em meado dos anos 2000, alguns medicamentos de eritropoietina tiveram suas patentes expiradas, com isso as indústrias farmacêuticas lançaram no mercado os biossimilares de rHuEPO. Porém, a substituição como ocorre em casos de medicamentos genéricos, deve ser realizada com cuidado no caso de produtos biofarmacêuticos, pois estes não são idênticos aos de referência, devido às diferenças nos processos de fabricação, tais como, o plamídeo, a célula hospedeira e o meio de cultura utilizados, e até mesmo os passos de purificação. (JELKMANN, 2010)

Em contraste com os medicamentos genéricos, que são quimicamente sintetizados, as proteínas recombinantes são produzidas por organismos vivos (SCHELLEKENS, 2002). Esse problema é especialmente verdadeiro para glicoproteínas como a EPO, porque estas são heterogêneas devido à presença de várias isoformas das cadeias de glicanos (JELKMANN, 2007b).

Proteínas recombinantes são produzidas por células transfectadas com um gene ou cDNA (a sequência codificadora do gene) ligado a um vetor de expressão. O DNA recombinante é integrado no genoma das células hospedeiras que de forma estável expressa ao longo do tempo. Células de mamíferos geneticamente modificadas são necessárias para produção de glicoproteínas que possuem O e/ou N-glicanos. A integridade dos açúcares terminais dos N-glicanos é de grande importância para a farmacocinética das glicoproteínas (KRÄMER, 2008).

Muito se discute sobre a aprovação do desenvolvimento e comercialização de biossimilares. As indústrias farmacêutica e de biotecnologia diferem em testes que são necessários para avaliar a segurança e a eficácia desses medicamentos, já que qualquer mudança sutil na fabricação, purificação, envasamento, venda e armazenamento, têm o potencial de impactar a estrutura molecular do produto, alterando seu potencial imunogênico (SCHELLEKENS, 2004 a). A legislação utilizada para o registro de biossimilares no Brasil é a Resolução RDC nº 55, de 16 de dezembro de 2010. Para fazer o registro, devem ser apresentados, dentre outros requisitos, estudos comparativos entre o biossimilar e o produto biológico comparador contendo informações suficientes

para prever se as diferenças detectadas nos atributos de qualidade entre os produtos resultam em impactos adversos na segurança e eficácia do biossimilar (ANVISA, 2010)

Após a expiração das patentes para epoetina alfa e beta, os primeiros biossimilares de EPO apareceram no mercado europeu em 2007 (por exemplo, epoetina alfa Hexal[®], Binocrit[®], Abseamed[®], Silapo[®] e Retacrit[®]). Porém, antes de 2007, alguns biossimilares já eram comercializados em alguns países como Argentina, China, Índia e Coréia. Em 2010, a primeira darbepoetina alfa biossimilar (CRES[®]) apareceu no mercado indiano (HINDERER, *et al.*, 2012).

Os estudos analíticos relataram que os produtos biossimilares diferem amplamente na composição, nem sempre atendem às especificações autodeclaradas, exibem variação de lote para lote e variam na concentração de isoformas. Embora vários estudos clínicos tenham demonstrado correção da anemia com epoetinas biossimilares por meio de um estudos, foi observado uma grande variação na atividade biológica de 71 a 226% em relação ao de marca (SCHELLEKENS, 2004 b).

Acredita-se que um grande número de medicamentos biossimilares de rHuEPO esteja disponível mundialmente (Figura 9) e que alguns estejam sendo utilizados indevidamente por atletas inescrupulosos. Sabe-se que esses medicamentos apresentam pequenas diferenças entre si, principalmente na glicosilação, e que tais diferenças podem gerar dúvidas durante a análise de um resultado de teste controle de dopagem (THEVIS, 2010).

Com base nos dados descritos anteriormente, o estudo de novos biossimilares de rHuEPO e a pesquisa de métodos mais sensíveis e precisos para detecção do abuso de EPO despertam o interesse da comunidade científica desportiva e daqueles que presam pelo esporte limpo.

Product	Manufacturer	Cell Line	Erythropoietin Subtype			
			α	β	δ	ω
Epogen	Amgen	CHO	x			
Epopen	Esteve	CHO	x			
Epoxitin	Janssen-Cilag	CHO	x			
Eprex	Janssen	CHO	x			
Erypo	Janssen-Cilag	CHO	x			
Espo	Kirin	CHO	x			
Globuren	Cilag	CHO	x			
Procrit	Amgen	CHO	x			
Epoch	Chugai	CHO		x		
Epogin	Chugai	CHO		x		
Eritrogen	Roche	CHO		x		
Erantin	Boehringer Mannheim	CHO		x		
Erythrostim	Microgen	CHO		x		
Marogen	Chugai	CHO		x		
Neorecormon	Roche	CHO		x		
Recormon	Boehringer Mannheim	CHO		x		
Dynepo	Aventis Pharma	human			x	
Epomax	Elanex	BHK				x
Hemax	Elanex	BHK				x
Repotin	Bodene	BHK				—
Aranesp ^b	Amgen	CHO	x			
Mircera ^c	Roche			x		
SEP (synthetic erythropoiesis protein) ^d	Gryphon Therapeutics					

Figura 9: Exemplos de alguns medicamentos de eritropoietina disponíveis no mercado. Linhagem celulares: CHO- ovário de hamster chinês. BHK- células renais de hamster bebê. Fonte: THEVIS, 2010.

1.6 Técnicas de análise

1.6.1 Isoeletrofocalização (IEF-PAGE)

No ano 2000, o laboratório de controle de dopagem de Paris (*Laboratoire National de Dépistage du Dopage*) desenvolveu o primeiro método de detecção de rHuEPO em urina humana por focalização isoelétrica (IEF). Esse é um método eletroforético que é capaz de separar proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) , onde o valor de pH no qual a carga líquida da proteína é zero. (LASNE & CEARRIZ, 2000). Um gradiente de pH é estabelecido ao deixar uma mistura de ácidos e bases orgânicas de baixo peso molecular, denominados de anfólitos, sob ação de um campo elétrico ao longo do gel de poliacrilamida. Quando a proteína é aplicada no gel ela migra até encontrar a região onde o pH corresponde ao seu pI (WESTERMEIER, 2005).

As diferenças nas cadeias glicosídicas são essenciais para distinguir a EPO de origem endógena e a recombinante. Apesar de possuírem exatamente a mesma sequência de aminoácidos, as duas proteínas exibem várias isoformas que diferem em carga elétrica, sendo possível a sua separação, já que a recombinante é mais básica do que a endógena purificada, devido a modificações pós-traducionais, como a glicosilação. Usando essa técnica de separação de proteínas, a EPO humana endógena apresenta uma mistura de 14-15 isoformas, enquanto que a EPO recombinante contém um número mais baixo de isoformas entre 6 e 9 que se concentram na faixa de pH mais básica (JELKMANN, 2016; LASNE, *et al.*, 2002) (Figura 10). Com exceção da darbepoetina (Ananesp[®], NESP[®]), que por conter dois N-glicanos adicionais e mais ácidos siálicos concentrando-se na região de pH ácido do gel (EGRIE & BROWNE, 2001). A IEF-PAGE seguido de uma dupla imunotransferência foi utilizado por todos os laboratórios de controle de dopagem acreditados pela AMA do mundo durante mais de 10 anos e ainda é aceita como técnica analítica para procedimento de teste inicial (WADA, 2014).

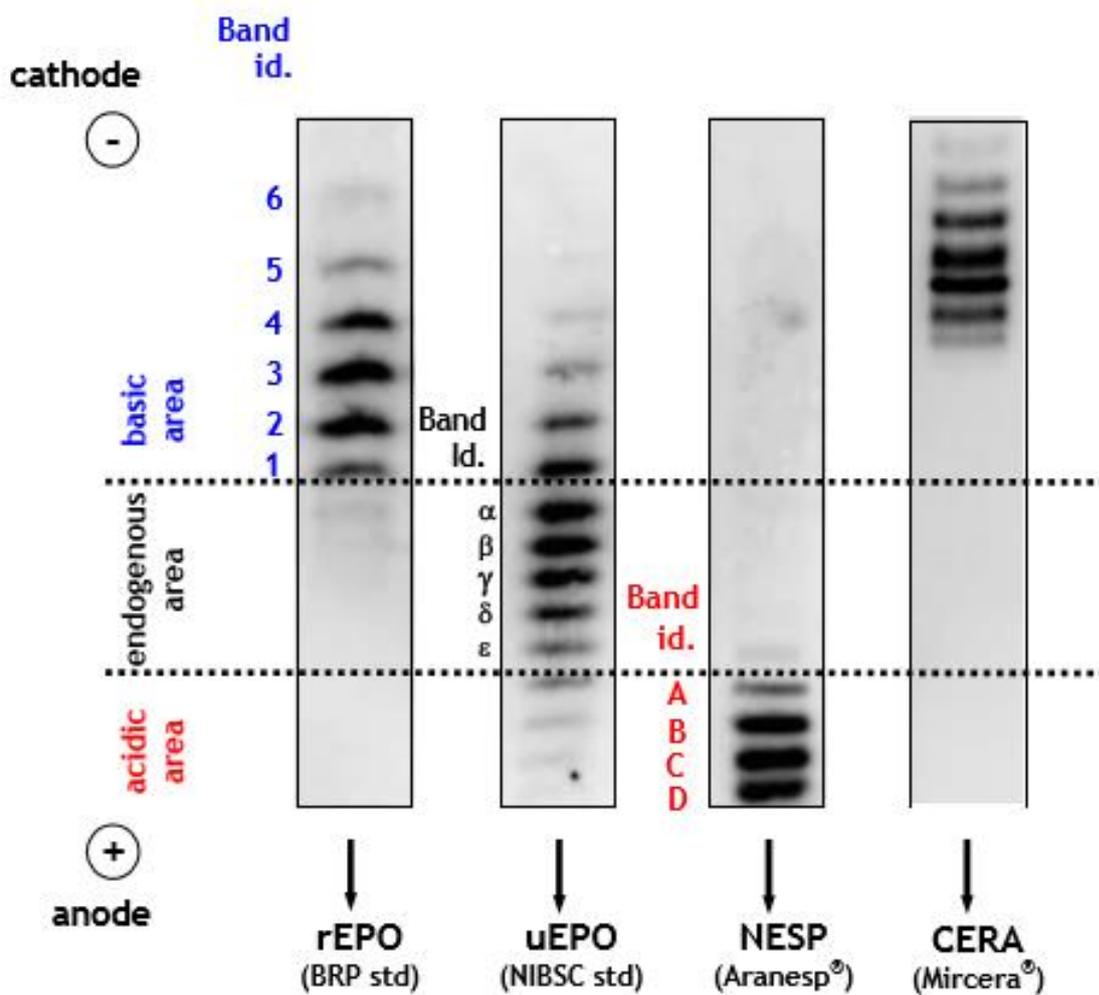


Figura 10: Imagem dos lanes de identificação correspondente à análise dos padrões de referência rEPO e/ou rHuEPO, uEPO e/ou HuEPO, NESP e CERA. As áreas básicas e ácidas são definidas pela posição das bandas apresentadas pelo padrão. A área endógena é a região existente entre as duas áreas. Imagem obtida através do TD2014EPO.

1.6.2 SARCOSYL – PAGE (SAR-PAGE)

Em 2009, Reichel e colaboradores, do laboratório de controle de dopagem de Seibersdorf, na Áustria, desenvolveram um novo método de detecção de rHuEPO e análogos em urina e sangue humanos, o SAR-PAGE. Diferentemente da IEF-PAGE, que separa proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico, SAR-PAGE é um método eletroforético, que permite separar as proteínas de acordo com o seu peso molecular. Esse método é bastante semelhante ao SDS-PAGE diferindo apenas no detergente aniônico utilizado. A substituição do SDS pelo SAR (N-lauroilsarcosinato de sódio ou Sarcosyl) foi necessária para melhorar a corrida eletroforética de um análogo de rHuEPO, a EPO recombinante PEGilada (CERA). Devido ao SDS ter um alto poder de solubilização, ele liga-se tanto na cadeia PEG quanto na parte protéica da proteína, prejudicando a detecção deste análogo (ZHENG, MA & SU, 2007). O Sarcosyl também é um detergente aniônico, porém ele não se liga ao grupo PEG, deixando-o em seu estado nativo sem carga (REICHEL, ABZIEHER & GEISENDORFER, 2009).

No SAR-PAGE, o anticorpo monoclonal anti-EPO liga-se a CERA de maneira semelhante as rHuEPOs, aumentando a sensibilidade da técnica, possibilitando bandas definidas para a CERA sem alterar a detecção das outras ESAs (REICHEL, ABZIEHER, GEISENDORFER, 2009). Apenas em 2014, a AMA recomendou fortemente a utilização dessa técnica, seguida de imunotransferência, pelos seus laboratórios de controle de dopagem acreditados (Figura 11) (WADA, 2014).

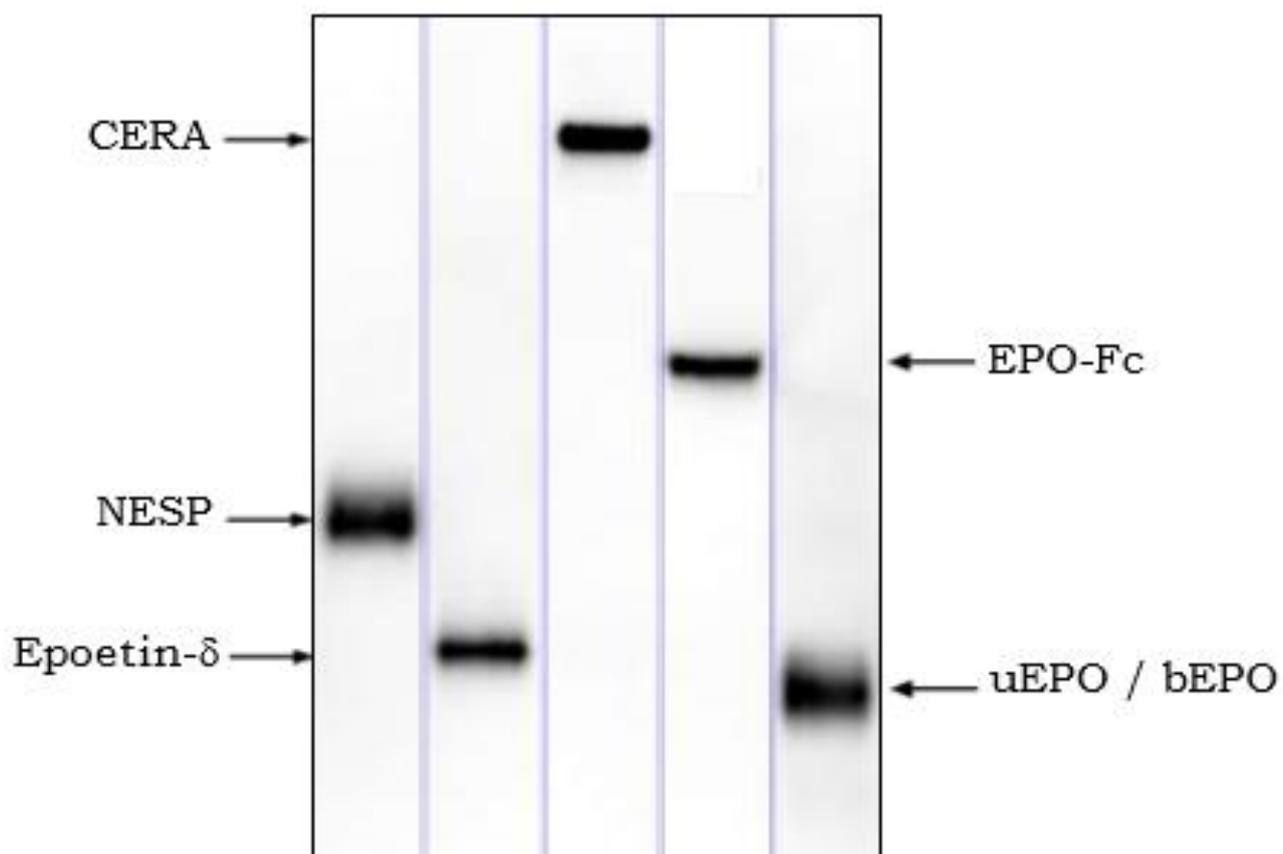


Figura 11: Imagem SAR-PAGE mostrando o padrão de bandejamento correspondente à análise dos padrões de referência Epoetin- δ , NESP, CERA, EPO-Fc em comparação com endógeno uEPO / bEPO. Imagem obtida através do TD2014EPO.

1.7 Dopagem Equina

O uso indevido da eritropoietina recombinante para melhorar o desempenho de cavalos de corrida também é considerado doping. Essa prática é utilizada com o mesmo objetivo do que em atletas humanos: na melhora do desempenho e aumento da resistência aeróbica do atleta equino. Porém o uso desses agentes violam a regra da competição justa.

O abuso dessa droga é de grande preocupação uma vez que os efeitos são nocivos à saúde do cavalo, pois podem aumentar a viscosidade do sangue formando coágulos, causando derrames ou ataque cardíaco (KEARNS; LENHART & MCKEEVER, 2000). Além disso, essas proteínas de origem humana são estranhas ao organismo do cavalo, levando eles a produzirem anticorpos anti-rHuEPO que podem gerar uma reação cruzada com a EPO endógena equina, podendo causar inibição do processo de eritropoiese, anemia grave e morte de alguns cavalos (PIERCY, *et al.* 1998).

O uso dessas substâncias em corridas de cavalos para melhorar a capacidade aeróbica de equinos foi relatada pela primeira vez em meados dos anos 1990 (CHOURIBERRY *et al.*, 2010). Em 2003, anticorpos contra EPO humana foram encontrados em análises realizada em cavalos de corrida nos Estados Unidos, o que foi interpretado como um indicador da dopagem com EPO. Após corridas oficiais que aconteceram na América do Norte em 2006, a rHUEPO foi detectada em plasma equino coletado após a competição (GUAN, *et al.*, 2007). Entretanto, seu uso em cavalos só foi oficialmente proibido pela Federação Equestre International (FEI) em 2010, não exigindo a quantificação para confirmar a presença da droga. (GUAN, *et al.*, 2007).

Considerando todos esses riscos para saúde dos cavalos, pesquisadores identificaram semelhanças entre a EPO humana e equina no intuito de garantir a segurança desses animais (KEARNS; LENHART & MCKEEVER, 2000). A análise da sequência nucleotídica da EPO entre diferentes espécies: humanos, macacos, gatos, cachorros e ratos mostra uma alto grau de homologia entre elas. Sabe-se que as sequências aminoácido das EPOs humana e equina possuem similaridade de aproximadamente 80% (Figura 12) (SATO *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2010).

	1	10	20	30
hEPO	A P P R L I C D S R	V L E R Y L L E A K	E A E N I T T G C A	
eEPO	P P R L I C D S R	V L E R Y I L E A R	E A E N V T M G C A	
	40	50	60	
hEPO	E H C S L N E N I T	V P D T K V N F Y A	W K R M E V G Q Q A	
eEPO	E G C S F G E N V T	V P D T K V N F Y S	W K R M E V E Q Q A	
	70	80	90	
hEPO	V E V W Q G L A L L	S E A V L R G Q A L	L V N S S Q P W E P	
eEPO	V E V W Q G L A L L	S E A I L Q G Q A L	L A N S S Q P S E T	
	100	110	120	
hEPO	L Q L H V D K A V S	G L R S L T T L L R	A L G A Q K E A I S	
eEPO	L R L H V D K A V S	S L R S L T S L L R	A L G A Q K E A I S	
	130	140	150	
hEPO	P P D A A S A A P L	R T I T A D T F R K	L F R V Y S N F L R	
eEPO	P P D A A S A A P L	R T F A V D T L C K	L F R I Y S N F L R	
	160			
hEPO	G K L K L Y T G E A	C R T G D		
eEPO	G K L K L Y T G E A	C R R G D R		

Figura 12: Diferenças entre a sequência de aminoácidos da EPO humana (hEPO) e equina (eEPO), representado em vermelho. Adaptado de Yu, *et al.*, 2010.

1.7.1 Detecção da Eritropoietina recombinante humana (rHuEPO) em Equinos

Diversos métodos foram desenvolvidos para detectar a presença de rHuEPO em amostras equinas, como a focalização isoelétrica seguida de dupla transferência, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), SAR-PAGE seguido de imunotransferência e ELISA (LASNE, *et al.*, 2005; GUAN, *et al.*, 2007; CHOURIBERRY *et al.*, 2010; Yu, *et al.*, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2019), sendo que todos eles possuem vantagens e desvantagens. Enquanto os métodos eletroforéticos apresentam alta sensibilidade, demoram até três dias para serem finalizados. Já os métodos baseados em espectrometria de massas, apesar de serem realizados em um tempo menor, não apresentam limites de detecção (LODs) tão baixos quanto os anteriores. Além disso, por se pautarem nas diferenças das sequências de aminoácido das EPOs humana e equina, os métodos de LC-MS não seriam capazes de detectar uma eventual EPO recombinante equina que surgisse no mercado. Sendo assim, uma excelente opção é o desenvolvimento e otimização da técnica de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de rHuEPO em urina e sangue equinos.

ELISA ou ensaio de imunoabsorção enzimática é um teste imunoenzimático baseado em placas que utilizam anticorpos específicos ligados a enzimas para detectar e quantificar substâncias como peptídeos, proteínas e hormônios. Existem vários tipos de testes de ELISA: ELISA direto, onde o anticorpo primário é marcado com a enzima, ELISA indireto, onde o anticorpo marcado com a enzima é o secundário e o ELISA sanduíche, nesse o analito alvo é ligado entre dois anticorpos (Figura 13). Neste último, o anticorpo de captura que está adsorvido ao poço da placa reconhece o antígeno que está na amostra, posteriormente o anticorpo primário se liga também ao antígeno da amostra e por último o anticorpo secundário conjugado a enzima reconhece o primário. Esta enzima reage com o substrato fazendo com que o cromógeno mude de cor. A presença de cor nos poços indica a presença do antígeno e a ausência de cor indica a ausência do antígeno em questão. O formato de ensaio ELISA mais potente é o ensaio em sanduíche porque apresenta maior sensibilidade e robustez que os demais. (RICHARD *et al.*, 2000).

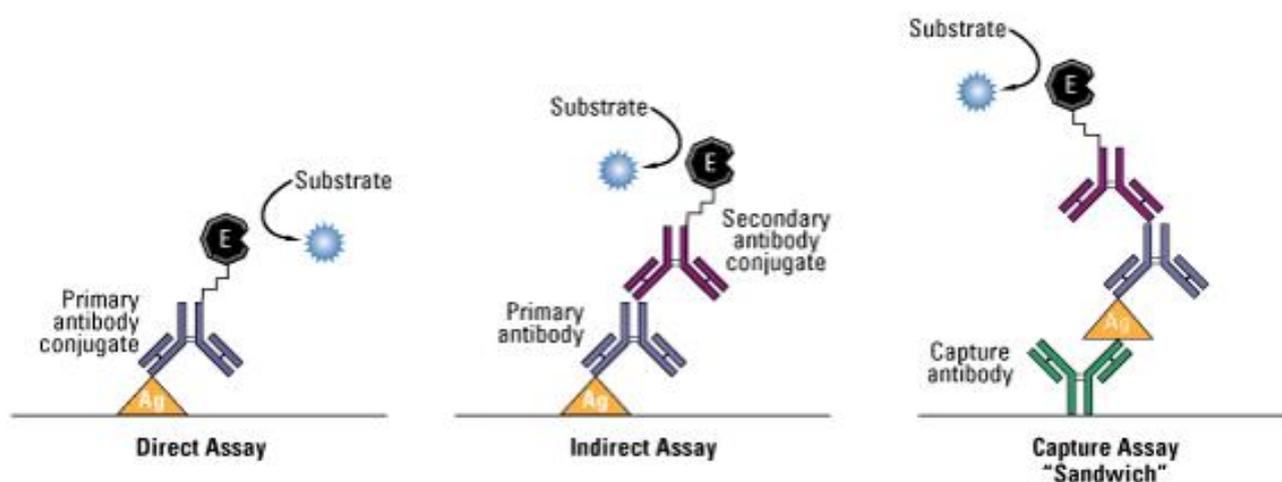


Figura 13: Tipos de ELISA que podem ser utilizados. Ensaios direto, indireto e sanduíche. Fonte: extraído de THERMO FISHER, 2019. <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>.

1.8 Validação de Métodos de Análise

De acordo com a Resolução de Diretoria colegiada (RDC) n^o 166/2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação analítica é a comprovação, através do fornecimento de ensaios experimentais, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos. É através dela que laboratórios dispõem de meios e critérios objetivos para demonstrar que os métodos de ensaio que executam produzem resultados confiáveis e adequados à finalidade que se destina (ANVISA, 2017).

Segundo RIBANI (2004), os parâmetros analíticos utilizados no estudo de validação devem ser representativos a intenção de uso do método, devendo haver uma avaliação sobre qual o tipo de estudo de validação será desenvolvido. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário. Independentemente do tipo de experimento ou método usado, os resultados obtidos devem obedecer uma série de parâmetros para que o método seja considerado válido. Entre tais parâmetros temos:

➤ **Seletividade / Especificidade**

Este parâmetro deve demonstrar a capacidade do método analítico de identificar ou quantificar a substância de interesse, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz.

➤ **Linearidade**

Linearidade é a capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma determinada faixa de concentração.

➤ **Precisão Intermediária**

A precisão representa a capacidade de avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios. A precisão inter-ensaio é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório.

➤ **Limite de Detecção**

Indica a quantidade mínima do analito que pode ser detectado pelo método, mas não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação do limite de detecção pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva analítica.

➤ **Arraste**

O arraste fica caracterizado quando se verifica a presença do analito em amostras brancas.

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

- 1 - Investigar o perfil eletroforético de diferentes biossimilares de rHuEPO em urina humana disponíveis no mercado, utilizando diferentes técnicas de separação de proteínas em gel.

- 2 - Desenvolver e validar a detecção de ESAs em amostras equinas utilizando a técnica de ELISA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Etapa 1:

- Avaliar o padrão eletroforético de 9 biossimilares de rHuEPO de diferentes países utilizando a técnica de SAR-PAGE;

- Comparar o perfil eletroforético de um mesmo biossimilar produzido em dois lotes diferentes pela técnica de SAR-PAGE;

- Avaliar o padrão eletroforético de 9 biossimilares de rHuEPO de diferentes países utilizando a técnica de IEF.

Etapa 2:

- Implementar a análise de ESAs em amostras de origem equina utilizando a técnica de ELISA;

- Validar a técnica de ELISA para análise de ESAs em amostras de origem equina;

- Analisar amostras do estudo de excreção de ESAs realizadas em equinos a fim de avaliar a técnica desenvolvida e validada.

3. METODOLOGIA

3.1 Local dos experimentos

Os procedimentos analíticos descritos na presente dissertação foram realizados no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD). O LBCD é um laboratório associado ao Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ)

3.2 Metodologia aplicada para análise de biossimilares (Etapa 1)

3.2.1 Materiais de Referência

Os padrões de eritropoietina utilizados como referência foram: Eritropoietina humana recombinante (rHuEPO, BRP) (EDQM-Direção Europeia para Qualidade dos Medicamentos e cuidados da saúde, Estrasburgo, França), eritropoietina humana urinária (uEPO) (NIBISC- Instituto Nacional de Padrões Biológicos e Controle, Reino Unido), darbepoetina (NESP) (Amgen, Milano, Itália), beta epoetina metoxi polietileno glicol (Mircera /CERA) (Roche, Mannheim, Alemanha), eritropoietina humana recombinante alfa Fc quimera (EPO-Fc) (ProSpec, Ness-Ziona, Israel), epoetina delta (Dynepo) (Shire, Hampshire, Reino Unido).

Os medicamentos biossimilares escolhidos foram: Alfaepoetina® (Blausiegel, São Paulo, Brasil) Hemax Eritron® (Aché, São Paulo, Brasil), Eritromax® (alfaepoetina, Blau Farmacêutica, São Paulo, Brasil), Recormon® e Neorecormon® (betaepoetina, Roche, Mannheim, Alemanha), Zyrop® e Shanpoetin® (Índia), Beijing four rings® (China) e Repoetin® (África do Sul).

3.2.2 Obtenção e preparo das amostras de urina humana

Quatro indivíduos saudáveis doaram voluntariamente suas urinas brancas para a análise dos medicamentos biossimilares de rHuEPO. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as regras do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 12753519.7.0000.5257 e Parecer: 3.445.063

Quinze mL da mistura da urina dos 4 indivíduos foram fortificados com diferentes medicamentos biossimilares de rHuEPO, em variadas concentrações a fim de avaliar o perfil eletroforético de cada biossimilar.

3.2.3 Imunopurificação da amostra de urina para eletroforese em SAR-PAGE

A metodologia foi conduzida como descrito por REIHLEN *et al.*, 2015. Brevemente, em 15 ml de urina, foram adicionados 1,5 mL de tampão Tris-HCl 3,75 M pH 7,4, (Tizma Base[®] (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA), Ácido Clorídrico (Merck, Darmstad, Alemanha)) para que o pH da urina fique na faixa entre 6,5-8,5, e 300 µL de Complete[®] (Inibidor de protease Complete Roche, Mannheim, Alemanha). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 xg por 12 min. Logo após, as amostras foram transferidas para filtros de 30 kDa de 15 mL (Amicon Ultra 15 - Merck Millipore, Irlanda) e centrifugadas a 4000 xg por 20 min. Após essa etapa, foram adicionados 15 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e 300 µL de complete[®] e a centrifugação foi repetida nas mesmas condições anteriores. Essa etapa de lavagem foi realizada mais uma vez. Em seguida, os retentados foram transferido para placa de ELISA, contendo anticorpo anti-Epo adsorvido em cada poço (Kit Stemcell[®] anti-epo, StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) e incubado durante a noite em geladeira a 4 °C. Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com 400 µL de PBS (Sigma Aldrich St Louis, MO, EUA). Logo após, a EPO foi eluída pela adição de 15 µL do tampão de amostra SAR em cada poço (Tris-HCl 424 mM, Trizma[®] base 564 mM, SAR 8%, EDTA 2 mM, vermelho de fenol 0,175mM (Sigma Aldrich St Louis, MO, EUA), glicerol 40% [p / v], 1,4-ditiotreitól (DTT) 10 mM (GE Healthcare Life Sciences, Darmstadt, Alemanha)). A placa foi incubada utilizando ThermomixerC[®] (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) durante 5 min, a 95°C sob

agitação (700 rpm). Em seguida, as amostras foram aplicadas ao gel e submetidos à corrida eletroforética.

3.2.4 Eletroforese em SAR-PAGE, Imunotransferência e Detecção por Quimiluminescência

Após a purificação, 15 uL das amostras foram submetidos à migração eletroforética em gel de poliacrilamida Bis-Tris 10% NuPAGE® utilizando a cuba Midi XCell Sure Lock (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Ao montar a cuba foi adicionado o tampão de corrida SAR na parte anódica (MOPS 50 mM, Trizma® base 50 mM, SAR 0,1%, EDTA 1 mM). A parte interna da cuba, região catódica, foi preenchida com tampão de corrida SAR e antioxidante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) até os poços estarem completamente cobertos. Os tampões de amostra e corrida contêm o detergente aniônico N-Laurilsarcosinato de sódio (SAR), que torna as proteínas carregadas negativamente e migram conforme seu peso molecular em direção ao pólo positivo (anodo). A corrida foi realizada com voltagem constante (125 V) por 3 horas à 4°C.

Antes do término da eletroforese a membrana Immobilon® (membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), Merck Millipore, Irlanda), foi previamente ativada submergindo-a em metanol (Tédia, EUA) por 30 segundos e depois em água milli-Q por 1 minuto, e, em seguida, no tampão de transferência (glicina 39 mM (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA), Tris-HCl 48 mM, SAR 0,00375%, etanol 20% (Merck, Alemanha)). Os papéis de blotting extra-thick® (BioRad, Hercules, CA, EUA) também foram submersos em tampão de transferência. Para o blotting foi utilizado a placa de transferência semi-seca TE77 PWR (Amersham, Freiburg, Alemanha) e o sanduiche montado da seguinte forma: 1 folha de papel extra-thick, membrana Immobilon, gel e outra folha de papel extra-thick. A transferência foi realizada a 142 mA (constante) por 45 minutos. Após a transferência, os papéis de blotting foram descartados e a membrana lavada com PBS por 1 min manualmente. A membrana foi bloqueada com uma solução de leite 5% (leite com baixo teor de gordura (Itambé, Uberlândia, MG, Brasil) em PBS), sob agitação, durante 1 hora em temperatura ambiente. Depois, a membrana foi lavada com PBS por duas vezes de 2 minutos cada, sob agitação, e incubada com solução de DTT 10 mM à 37 °C por 15 minutos. Novamente, lavou-se a membrana com PBS por duas vezes de 2 minutos cada sob agitação.

Posteriormente, a membrana foi colocada no equipamento automatizado BlotCycler® (Precision Biosystems, Mansfield, MA, EUA) que realizou todas as etapas seguintes de incubação com anticorpos e lavagens com PBS. O equipamento foi preenchido com 3 litros de PBS, 25 mL da solução de anticorpo primário anti-EPO (anticorpo monoclonal em camundongo, clone AE7A5; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) diluído 1:1000 em leite 1% e 25 mL da solução de anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anticorpo policlonal de cabra anti-camundongo conjugado a peroxidase, Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) diluído 1: 100.000 em leite 1%. O protocolo do equipamento consiste 3 horas de incubação com o anticorpo primário anti-EPO, 13,5 horas de anticorpo secundário e nove etapas de lavagem de 5 minutos cada após a cada incubação com anticorpo. Como essa etapa é longa, o equipamento é mantido em geladeira a 4°C. Ao término das incubações, a membrana foi revelada com substrato quimioluminescente Super Signal™ West Femto (luminol / peróxido de hidrogênio (Thermo Scientific Rockford, IL, EUA)) na proporção de 1:1, seguido de aquisição das imagens em diferentes tempos de exposição usando uma câmera CCD LAS, 4000 (Fujifilm, Tóquio, Japão). As imagens foram analisadas utilizando o programa GASepo v 2.3 (ARC, Seibersdorf, Áustria).

3.2.5 Imunopurificação da amostra de urina para eletroforese em IEF-PAGE

As amostras de urina foram imunopurificadas utilizando todos os tampões e reagentes do kit de purificação de EPO (MAIIA Diagnostics, cat. N° 1390, Uppsala, Suécia) de acordo com as instruções do fabricante manual do Kit MAIIA®. Brevemente, 20 mL de urina foram incubados em banho maria a 96 °C por 5 minutos e, em seguida em banho de gelo por 10 minutos. Depois foram adicionados 20 mL de tampão de diluição (tampão do kit) e as amostras foram filtradas em filtro de 0,22 µm (Steriflip® - Millipore, China). O filtrado foi então, aplicado a uma coluna anti-EPO a um fluxo de aproximadamente 0,8-1,0 mL/min. Após a eluição da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de lavagem do kit. Em seguida, a coluna foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada a 2000 xg por 1 min para retirar o excesso de tampão. Logo após, a coluna foi transferida para um novo tubo eppendorf contendo 5 µL de tampão de ajuste, e adicionado 50 µL de tampão de desorção diretamente sobre a coluna (ambos

do kit) para que a EPO que estava ligada na coluna fosse eluída. Centrifugou-se novamente o tubo com a coluna a 2000 xg por 1min, para recolher o eluato.

3.2.6 Eletroforese em IEF-PAGE, Dupla Imunotransferência e Detecção por Quimiluminescência

A metodologia foi baseada em LASNE *et al*, 2000. Após a imunopurificação, 20 µL de cada amostra foram submetidos à migração eletroforética em gel de acrilamida/bisacrilamida (Serva Eletroforese GmbH, Mannheim, Alemanha) que contém gradiente de pH. O equipamento de eletroforese utilizado foi o sistema Multiphor II (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Condições do pré-enfoque: 250 V por 30 minutos. Condições da corrida: 25 W constante durante 3 horas.

Após a IEF, as proteínas foram transferidas para membrana Immobilon[®], previamente ativada em metanol por 2 minutos e depois em água milli-Q por 2 minutos duas vezes, e em seguida no tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM). Os papéis de blotting e a membrana Durapore[®] (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) também foram submersos em tampão de transferência. Para a primeira transferência (básica) foi utilizado uma placa de transferência semi-seca e o sanduiche montado da seguinte forma: 4 folhas de papeis de blotting, membrana Immobilon, membrana Durapore, gel e as outras 4 folhas de papeis de blotting. As seguintes condições foram aplicadas: 188mA (constante) por 30 minutos. Após a transferência, os papéis de blotting e a membrana Durapore foram descartados e a membrana Immobilon lavada com PBS por 1 min manualmente. Em seguida, a membrana foi incubada com solução de DTT 5 mM à 37°C por 1 hora. A membrana foi, então, lavada com PBS por duas vezes de 1 min cada, sob agitação, e incubada com solução de bloqueio (leite 5% com baixo teor de gordura em PBS), sob agitação, durante 1 hora em temperatura ambiente. Depois, lavou-se a membrana novamente com PBS por três vezes de 2 minutos cada, sob agitação. Logo em seguida, a membrana foi incubada com a solução de anticorpo primário anti-Epo (anticorpo monoclonal em camundongo, clone AE7A5; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) diluído 1:1000 em leite 1%, por toda noite a 4 °C. Após a incubação, lavou-

se a membrana com leite 0,5% por 3 vezes, de 10 min cada e com PBS 2 vezes, por 2 min.

Quando a membrana estava na última lavagem de 10 min, a segunda membrana Immobilon® foi ativada da mesma forma que a primeira (com metanol e água milli-Q), porém foi submersa em ácido acético 0,7% em água (Tédia, EUA). As folhas de Novablot® (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) e a Durapore® também foram imersas em ácido acético 0,7% em água. O sanduiche foi montado da seguinte forma: 9 folhas de papel Novablot, primeira membrana Immobilon, membrana Durapore, segunda membrana Immobilon e as outras 9 folhas de papel Novablot. As seguintes condições foram aplicadas: 150 mA (constante) por 10 min. Após a transferência, descartou-se os papéis e a membrana Durapore. A primeira membrana foi guardada em PBS na geladeira (até o final do procedimento) e a segunda membrana foi lavada com PBS por 1 min. A membrana foi bloqueada com uma solução de leite 5%, sob agitação, durante 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS por três vezes de 2 min cada e incubada com solução de anticorpo secundário (anticorpo policlonal secundário de cabra conjugado à biotina anti-IgG de camundongo (H + L), Thermo Scientific, Rockford, EUA) diluído 1:1333 em leite 1% a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação. Repetiu-se a lavagem da membrana com leite 0,5% por 3 vezes de 10 min cada e com PBS 2 vezes de 2 min. A membrana foi, então, incubada a temperatura ambiente com estreptavidina conjugada à peroxidase (Biospa, Milão, Itália), diluída 1:2666 em leite 1% durante 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Logo após, a membrana foi lavada vigorosamente com PBS por três vezes de 1 minuto e três vezes de 10 min e revelada com substrato quimioluminescente Super Signal™ West Femto na proporção de 1:1, seguido de aquisição das imagens em diferentes tempos de exposição usando uma câmera CCD LAS, 4000. Uma vez obtida a imagem correspondente à leitura da quimioluminescência, os dados foram analisados utilizando o programa GASEPO v 2.3, seguindo os critérios de avaliação do documento técnico vigente (WADA Technical Document – TD2014EPO).

3.3 Metodologia aplicada para análise de rHUEPO em Equinos (Etapa 2)

3.3.1 Materiais de Referência

Os padrões de eritropoietina utilizados como referência foram: Eritropoietina humana recombinante (rHuEPO, BRP) (EDQM-Direção Europeia para Qualidade dos Medicamentos e cuidados da saúde, Estrasburgo, França), eritropoietina humana urinária (uEPO) (NIBISC- Instituto Nacional de Padrões Biológicos e Controle, Reino Unido), darbepoetina (NESP) (Amgen, Milano, Itália), beta epoetina metoxi polietileno glicol (Mircera /CERA) (Roche, Mannheim, Alemanha),

3.3.2 Estudo em animais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as regras de bem-estar animal do centro de administração e amostragem do Jockey Club Brasileiro (JCB). O estudo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo de pesquisa de número 142 / 18.

As ESAs foram administradas por via subcutânea em dois cavalos machos, pesando aproximadamente 450 kg cada. O primeiro animal recebeu 21 µg (3000 UI) do medicamento Hemax Eritron/rHuEPO (Aché, São Paulo, Brasil), que corresponde à eritropoietina recombinante humana de primeira geração, a epoetina alfa. Já o segundo cavalo recebeu 50 µg do medicamento CERA (Roche, Mannheim, Alemanha) mais 100 µg do medicamento NESP (Amgen, Mião, Itália). Amostras de sangue e urina foram coletadas na hora 0 (branco), 6 h após a injeção do fármaco e, em seguida, uma vez ao dia até o dia 9, excluindo-se o dia 4 por problemas de logística. Todas as amostras foram armazenadas a -20 °C até a análise.

3.3.3 Amostras fortificadas

O estudo *in vitro* foi realizado com sangue e urina de cavalos, doados pelo JCB. As amostras de urina e sangue foram fortificadas com rHuEPO, NESP e CERA em diferentes concentrações.

A Metodologia foi adaptada do manual do kit ELISA, utilizando todos os tampões e reagentes do kit (Kit Stemcell[®] anti-epo, StemCell Technologies, Vancouver, Canadá).

3.3.4 ELISA das amostras de sangue equino

O volume de sangue (podendo ser plasma ou soro) utilizado no ensaio foi de 50 µL por poço. As amostras foram analisadas em duplicata. Transferiu-se 25 µL de tampão A (contido no kit de ELISA) para cada poço da placa utilizado. Em seguida, adicionou-se 50 µL da amostra nos poços, revestidos com anticorpo monoclonal anti-EPO. A placa foi selada com fita adesiva e incubada em Thermomixer C[®] (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 37 °C por 1 hora a 600 rpm. Após a incubação, descartou-se o líquido e lavou-se cada poço com 400 µL de PBS por cinco vezes. Foram, então, adicionados 50 µL de anticorpo anti-EPO biotilado e a placa foi novamente incubada em Thermomixer C[®], porém, a 25 °C por 1 hora, a 500 rpm. Para retirar todos outros componentes não ligados da matriz, a placa foi lavada com 200 µL do tampão de lavagem (tampão fosfato salino contendo detergente), por 5 vezes. Logo após, foram adicionados 100 µL da enzima estreptavidina- conjugada a HRP seguido de incubação por 15 minutos a 25 °C a 500 rpm. Ao término da incubação, lavou-se novamente os poços da placa com 200 µL do tampão de lavagem por cinco vezes. Para a revelação, adicionou-se 100 µL do substrato TMB (Tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio), incubou-se por 15 minutos, a temperatura ambiente na ausência de luz. Para finalizar a reação, foi adicionado 100 µL da solução de parada (ácido sulfúrico 0,5N) em cada poço e a densidade ótica a 450 nm, foi medida em analisador Multiskan FC (Thermo Fisher).

3.3.5 Análise das amostras de urina equina

Em 15 mL de amostra de urina foram adicionados 1,5 mL de tampão Tris-HCl 3,75 M pH 7,4. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C em banho maria por 9 minutos e resfriadas imediatamente por 10 minutos em banho de gelo. Esse processo foi necessário devido à alta viscosidade das

urinas equinas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 xg, por 30 minutos, transferidas para filtros Amicon 30 kDa de 15 mL e centrifugadas novamente sob as mesmas condições. Descartou-se o filtrado e adicionou-se 15 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, seguido de nova centrifugação. Este procedimento de lavagem foi feito mais uma vez, porém centrifugando-se a 4000 xg por 40 min. O retentado foi transferido para a placa de ELISA, esta foi selada e incubada por toda noite em geladeira. No dia seguinte, a placa foi lavada com 400 μ L de PBS por poço. Esse passo foi repetido por mais quatro vezes. A partir deste ponto o procedimento de ELISA foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido para as amostras de sangue equino.

4. RESULTADOS e DISCUSSÕES

4.1. Análise de biossimilares de rHuEPO (Etapa 1)

A fim de testar a detectabilidade de biossimilares de rHuEPO, que vêm surgindo no mercado mundial após a quebra da patente da eritropoietina recombinante, foram selecionados 9 medicamentos para serem analisados pelas 2 técnicas acreditadas pela WADA (IEF e SAR-PAGE) para detecção de EPO exógena em urina humana.

O perfil eletroforético desses biossimilares foi avaliado, primeiramente, pela técnica de SAR-PAGE. Os medicamentos utilizados foram: Shanpoetin, Zyrop, Beijing Four Rings, Repoetin, Eritromax, Hemax, Alfaepoetina, Neorecormon e Recormon. Neste ensaio (Figura 14), foram aplicados 100 pg de cada medicamento diretamente no gel, ou seja, as drogas não foram adicionadas a urinas humanas e, portanto, não foi realizada a etapa de imunopurificação. Após análise da imagem, é possível observar que os biossimilares Zyrop, Eritromax, Alfaepoetina, Neorecormon e Recormon (Figura 14, linhas 3, 6, 8, 9 e 10) apresentam perfil claramente positivo, banda difusa a cima da banda da endógena, semelhante ao controle positivo (Figura 14, linha 13). Porém, os medicamentos Shanpoetin, Beijing Four Rings, Repoetin e Hemax (Figura 14, linhas 2, 4, 5 e 7) mostraram perfil idêntico ou bem semelhante ao do controle negativo (Figura 14, linha 11).

Com o intuito de mimetizar o uso de EPO por atletas, analisamos o padrão das mesmas drogas adicionadas a urinas humanas. Nesse experimento, (Figura 15) foram adicionados 150 pg de cada biossimilar a 15 mL de urina humana. Em seguida, todas as amostras foram imunopurificadas, como descrito anteriormente, para aplicação no gel e eletroforese por SAR-PAGE. Após análise do resultado, foi observado que apenas 3 biossimilares Eritromax, Alfaepoetina e Recormon (Figura 15, linhas 6, 8 e 10) apresentaram bandas difusas posicionadas acima da linha traçada, sendo claramente positivos. Enquanto que os biossimilres Shanpoetin, Zyrop, Beijing Four Rings, e Neorecormon (Figura 15, linhas 2, 3, 4 e 9) demonstraram algum grau de

dificuldade na detecção da positividade, mas o perfil difuso/ arraste acima da banda indica tratarem-se de EPO recombinante. Já o Repoetin e o Hemax (Figura 15, linhas 5 e 7) apresentaram um desafio para detecção, uma vez que suas bandas se apresentaram abaixo da linha traçada sem o perfil de banda difusa, sendo facilmente confundidas com a EPO endógena.

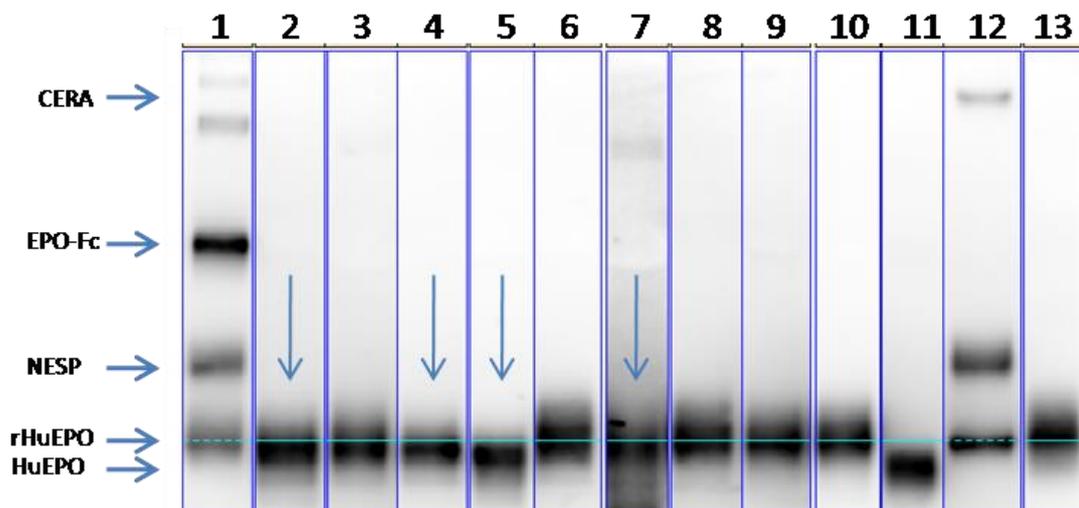


Figura 14: Padrão eletroforético de biossimilares de rHuEPO aplicados diretamente no gel de SAR-PAGE. Linha 1: BRP/NESP/EPO-Fc, 71/59/400 pg, respectivamente. Linhas 2-10: Shanpoetin, Zyrop, Beijing Four Rings, Repoetin, Eritromax, Hemax, Alfaepoetina, Neorecormon e Recormon. Linha 11: HuEPO, EPO endógena, controle negativo. Linha 12: Dynepo/NESP/CERA, 78/59/157 pg, respectivamente. Linha 13: HuEPO + rHuEPO a 100 pg, controle positivo. A seta indica os medicamentos de difícil detecção.

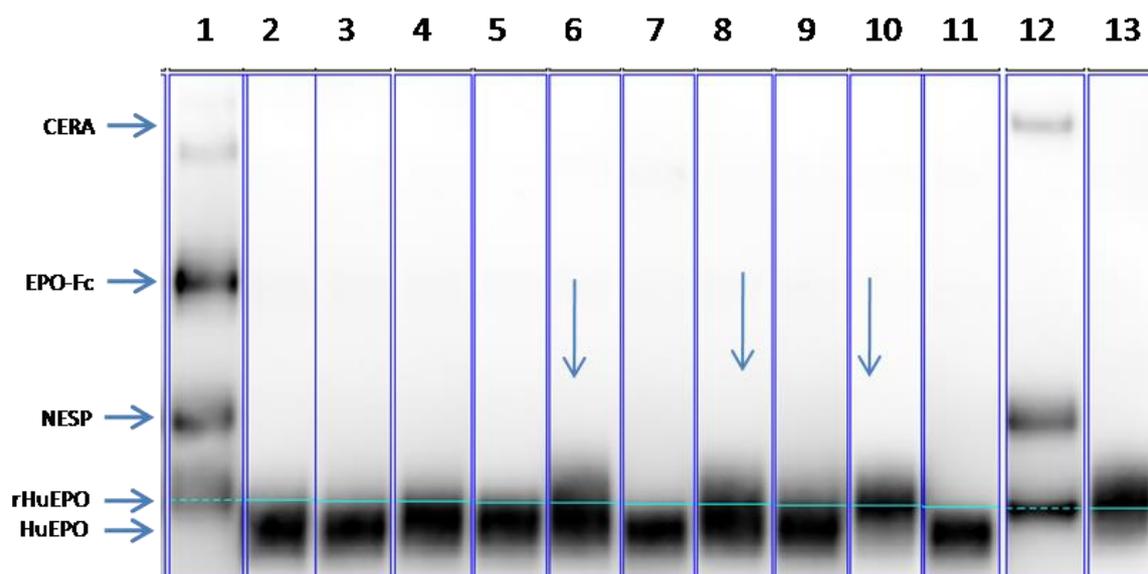


Figura 15: Padrão eletroforético de biossimilares de rHuEPO adicionados á urina humana, por SAR-PAGE. Linha 1: BRP/NESP/EPO-Fc, 71/59/400 pg, respectivamente. Linha 2-10: Shanpoetin, Zyrop, Beijing Four Rings, Repoetin, Eritromax, Hemax, Alfaepoetina, Neorecormon e Recormon. Linha 11: HuEPO, EPO endógena, controle negativo. Linha 12: Dynepo/NESP/CERA, 78/59/157 pg, respectivamente. Linha 13: HuEPO + rHuEPO a 100 pg, controle positivo. A seta indica os medicamentos claramente positivos.

É importante observar que medicamentos como Zyrop e Neorecormon (Figuras 14 e 15, linhas 3 e 9) perderam a positividade quando adicionados a urinas humanas, dada a interferência da EPO endógena, gerando falsos negativos. Outro fato importante é que Repoetin® (Figura 14 e 15, linha 5), um biossimilar de EPO, produzido em células de rim de hamster bebê (BHK) originado na Africa do Sul, possui uma massa molecular aparente um pouco menor do que a massa de EPO endógena. Logo, a sua banda apresenta um *smear* (sombreado) para baixo, gerando um falso negativo na análise por SAR-PAGE.

O mesmo estudo comparativo realizado com os diferentes medicamentos, usando a técnica de SAR-PAGE, foi também realizado por IEF-PAGE, a fim de comparar as técnicas utilizadas na detecção de biossimilares de rHuEPO. Assim sendo, 200 pg de Recormon, Neorecormon, Hemax, Zyrop, Eritromax, Alfaepoetina, Repoetin, Beijing four ring e Shanpoetin foram aplicados diretamente no gel para separação isoeletrica, ou seja, não sendo imunopurificados. Observamos, que apesar dos medicamentos testados apresentarem perfis distintos de separação, todos mostraram claro perfil de

positividade, comparados com os controles positivo e negativo (Figura 16, linhas 1 e 11).

Para simular o uso de EPO por atletas, nesse experimento (Figura 17) foram adicionados 400 pg de cada biossimilar a 20 mL de urina humana. Em seguida, todas as amostras foram imunopurificadas, como descrito anteriormente, antes da aplicação no gel e eletroforese por IEF-PAGE. Após análise do resultado, foi possível observar que, apesar de cada medicamento apresentar padrão eletroforético distinto, todos permaneceram positivos mesmo quando adicionados à matriz e sofrido o processo de imunopurificação.

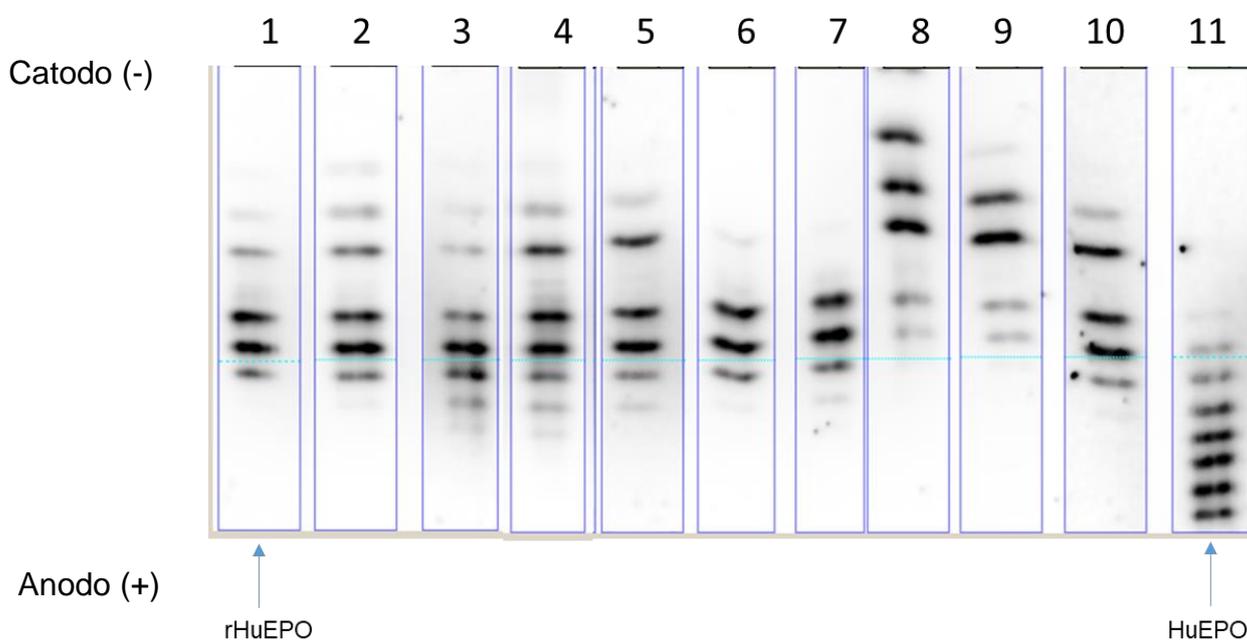


Figura 16: Padrão eletroforético dos biossimilares de rHuEPO aplicados diretamente no gel de IEF-PAGE. pH do gel 2-6. Linha 1: rHuEpo. Linhas 2 - 10: Recormon, Neorecormon, Hemax, Zyrop, Eritromax, Alfaepoetina, Repoetin, Beijing four ring e Shanpoetin. Linha 11: uEPO 4 µg.

Catodo (-)

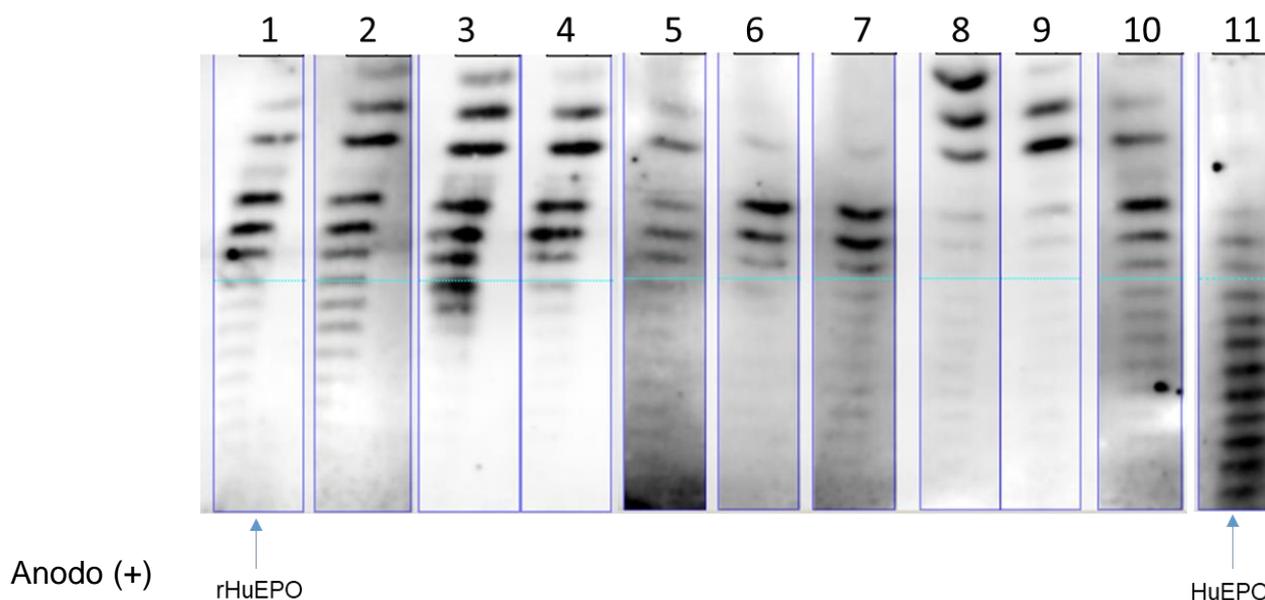


Figura 17: Padrão eletroforético de biossimilares de rHuEPO adicionados á urina humana, por IEF-PAGE. pH do gel 2-6.. Linha 1: BRP 400 pg. Linhas 2-10: Recormon, Neorecormon, Hemax, Zyrop, Eritromax, Alfaepoetina, Repoetin, Beijing Four Rings, Shanpoetin. Linhas 11: HuEPO 4 μ g.

Algumas dessas preparações possuem uma maior quantidade de isoformas (por exemplo: Recormon e Neorecormon), outras, uma quantidade maior de isoformas básicas (Hemax e Beijing Four Rings). No entanto, todas estas epoetinas são produzidas em células CHO. O Repoetin apesar de apresentar isoformas básicas, é produzido em células BHK. As diferenças nas condições de cultura celular como temperatura, pH, composição da cultura e o processo de purificação, geram diferentes produtos finais (YUEN, *et al*; 2005). YANG e BUTLER, em 2000, investigaram o efeito de íons de amônio na glicosilação das células CHO. Eles foram capazes de mostrar que o íon NH_4^+ leva a uma diminuição de ácidos siálicos terminais e, conseqüentemente, um deslocamento da EPO na IEF para valores maiores de pI. Já AHN e colaboradores, em 2008, demonstraram que o cultivo em temperaturas abaixo de 32°C reduzem as proporções de isoformas ácidas e estruturas antenárias de N-glicanos, sugerindo que a redução afeta negativamente a qualidade da EPO.

O número e o perfil eletroforético das isoformas têm sido frequentemente utilizadas para distinguir EPOs recombinantes das endógenas. Na IEF, a HuEPO separa-se numa mistura de 14-15 isoformas. Já, as rHuEPO contêm um

número menor de isoformas, entre 6 – 9, que, em geral, são mais básicas e encontram-se na região do gel de pH em entre 3,5 e 6 (LASNE *et al.*, 2002). Com exceção da NESP que contém mais ácidos siálicos e por isso, concentra-se na região ácida de pH do gel (EGRIE & BROWNE, 2001).

DESHARNAIS e colaboradores mostraram, em 2017, que a IEF pode ser mais sensível que o SAR-PAGE em amostras contendo múltiplos biossimilares de rHuEPO, devido a alguns biossimilares apresentarem baixo peso molecular. Outra desvantagem do SAR-PAGE é que, por apresentar bandas mistas contendo rHuEPO e HuEpo, a identificação da EPO exógena torna-se um desafio maior, pois a banda endógena se mistura com a banda da recombinante. Assim a banda endógena pode mascarar e/ou dificultar a detecção da área difusa da rHuEPO, fazendo com que biossimilares apresentem perfil falso negativo.

Os biossimilares de EPO diferem dos medicamentos de referência em número e na distribuição das isoformas, como descrito em 2004 por SCHELLEKENS, eles podem variar apresentando perfis mais básicos ou ácidos de isoformas. Além disso, a variação de lote para lote foi também observado por ele para alguns produtos. Isso porque drogas proteicas são produzidas por células vivas. Elas geralmente são moléculas grandes e complexas que apresentam heterogeneidade, resultado de processos naturais nas células hospedeiras que modificam as proteínas durante a sua produção.

Em 2010, quando JELKMAN realizou um estudo sobre os biossimilares de eritropoietina, ele observou que estas glicoproteínas apresentam isoformas diferentes, devido ao processo de produção, diferindo da formulação original.

A análise de biossimilares através da técnica de IEF mostrou-se mais discriminante que o SAR-PAGE, pois a separação se dá através de diversas isoformas e não em banda única difusa. Entretanto, a IEF pode levar a um resultado falso positivo em casos de urina “ativa”, onde ocorre um deslocamento do perfil de isoformas da EPO endógena para a área básica ou “recombinante” (cátodo) do gel. De um modo geral, isso pode ocorrer devido à atividade enzimática, de remoção ou degradação de grupos carregados negativamente na EPO, levando a esse perfil de bandas básicas. Tal perfil também ocorre em

casos de urina de “esforço”, onde o atleta (principalmente em esportes de alto rendimento), pode apresentar proteinúria induzida pelo exercício, aumentando a excreção de glicofomas básicas da EPO na urina, gerando um resultado falso positivo. SÉVERINE e colaboradores (2009), assim como VOSS *et al* (2010), observaram que a proteinúria pós-exercício pode ocorrer após exercícios extenuantes, sendo afetada pela intensidade do exercício e não pela sua duração, e que o retorno ao estado basal das concentrações de EPO e proteína são iniciadas 3 horas após o término de exercícios. Sabendo disso, a WADA, através de seu documento técnico para EPO (TD2014EPO), não permite que os laboratórios de controle de dopagem realizem ensaios de confirmação de um resultado pela técnica de IEF, apenas por SAR-PAGE, exatamente para evitar que casos raros, como urina “ativa” ou de “esforço”, sejam reportados como adversos (positivos), punindo injustamente atletas inocentes.

Devido à sua versatilidade e efetividade, os métodos eletroforéticos em gel fornecem um conjunto importante de ferramentas para a análise de proteínas terapêuticas. Com o número crescente de produtos farmacêuticos biossimilares no mercado, são necessárias técnicas que permitam a detectabilidade destes produtos para que nenhum atleta passe impune ao fazer uso dessas substâncias. IEF ou SAR-PAGE podem ser usados a critério do laboratório para procedimentos iniciais de análise. No entanto, por ter géis pré-fabricados comerciais, um menor tempo de análise e imunoblotting único, a técnica mais utilizada pelos laboratórios de controle de dopagem para este fim é o SAR-PAGE.

A fim de testar a variação entre lotes de um mesmo medicamento, adicionamos Hemax em triplicata, produzido em dois lotes distintos, á urinas humanas. Após imunopurificação, e corrida eletroforética em gel de SAR-PAGE, observamos clara diferença entre os lotes estudados. A droga Hemax produzida no lote 160999 (Figura 18, linhas 2, 3 e 4) não apresentou critérios de positividade, enquanto o mesmo medicamento produzido no lote 6090731 (Figura 18, linhas 5, 6 e 7) mostra claro perfil de positividade.

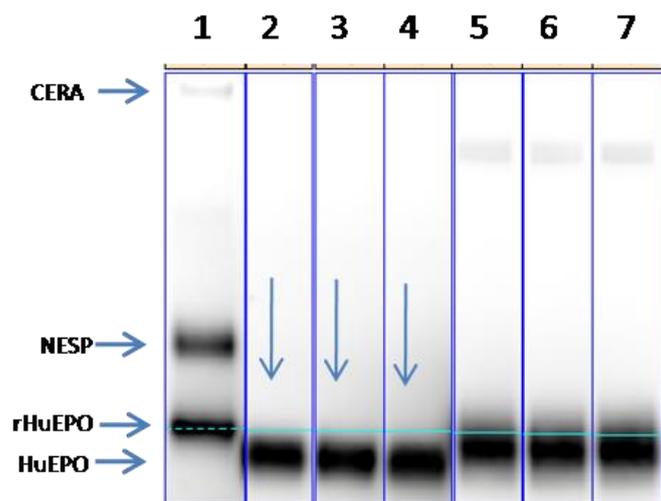


Figura 18: Padrão eletroforético do biosimilar Hemax produzido em diferentes lotes e adicionado a urina humana, por SAR-PAGE. Linha 1: Dynepo/NESP/CERA, 78/59/157 pg, respectivamente. Linhas 2 - 4: Hemax (lote:1609996) 150 pg. Linhas 5 - 7: Hemax (lote: 6090731) 150 pg, ambos em triplicta. A seta indica os medicamentos de difícil detecção (lote:1609996).

Como já citado por SCHELLEKENS (2004 b) e GOLDSMITH *et al.*, (2018), existe variabilidade entre lotes de medicamentos biossimilares, principalmente por se tratar de medicamentos biológicos, que são proteínas geneticamente modificadas. Os lotes nunca são idênticos entre si. Em 2008 JELKMAN também relatou que os produtos biossimilares de glicoproteínas exibem heterogeneidade com relação à estrutura dos glicanos, em contraste com os medicamentos genéricos, que são quimicamente sintetizados.

As autoridades reguladoras, exigem dados de comparabilidade para o produto, a fim de garantir que quaisquer alterações para que não tenha efeito adverso na qualidade, eficácia clínica e segurança clínica. Em 2016, Halim e colaboradores avaliaram a qualidade e consistência entre lotes dos produtos originais e biossimilares de EPO. Eles encontram variações no conteúdo da epoetina, como diferença no perfil das isoformas. Porém, eles citam que essas diferenças não implicam necessariamente na qualidade do produto. Tais variações nos atributos de qualidade são inevitáveis porque a fabricação de epoetina requer o uso de células vivas.

Em um outro estudo realizado por GIANONCELLI *et al.*; (2015) para avaliar a rhEPO alfa e dois de seus biossimilares, demonstrou que embora a sequência

do peptídeo seja a mesma entre as três drogas há, diferenças no peso molecular observados. A variação no peso molecular foi devida à presença de diferentes cadeias de açúcar na N-glicosilação.

No entanto essas diferenças no perfil das isoformas e no peso molecular dificultam a detecção desses biossimilares no controle de dopagem, gerando resultados falso negativos. Como mencionado anteriormente, a WADA dita regras para evitar que uma amostra seja reportada como positiva indevidamente, porém, apesar disso, ainda assim é possível liberar uma amostra como falso negativo, como observado neste estudo, deixando impune atletas inescrupulosos que abusam de substâncias proibidas e levam vantagem sob atletas honestos. Sendo assim, faz-se necessário mais estudos e pesquisas na busca por técnicas mais efetivas, que sejam capazes de discriminar a EPO exógena da endógena de forma mais eficiente e consumindo menos tempo. Nesse sentido, vários grupos de pesquisa, principalmente de laboratórios de controle de dopagem acreditados pela WADA, já avançaram em estudos utilizando-se a técnica de espectrometria de massas para detectar EPO recombinante em amostras humanas (REICHEL, 2013; BING *et al*, 2013). Porém, dadas as semelhanças das sequências de aminoácidos da HuEPO e da rHuEPO, não é possível discriminá-las pela porção protéica e, por outro lado, devido a imensa variedade de tipos de glicosilação existente entre os biossimilares de EPO recombinante, torna-se extremamente difícil detectar um padrão de glicosilação que seja comum a todos os tipos de ESAs. Além disso, a área de metabolômica também parece ser promissora para o desenvolvimento de técnicas de detecção de rHuEPO em amostras humanas, já que se mostrou eficiente na detecção de uma outra proteína recombinante, o GH recombinante equino, em amostras equinas (BOYARD-KIEKEN F *et al*, 2011). Contudo, faz-se importante a constante pesquisa e desenvolvimento de técnicas de detecção de novos biossimilares, que surgem rotineiramente no mercado, prezando sempre por um esporte limpo e uma competição justa.

4.2. Detecção de ESAs em equinos por ELISA (Etapa 2)

O abuso de substâncias ilícitas no esporte não se restringe as modalidades humanas; técnicos e treinadores mal intencionados estão presentes em várias áreas, inclusive nos esportes equinos. Em 2017, o LBCD foi procurado pelo Jockey Club Brasileiro para realizar análises de controle de dopagem em equinos. Porém, devido a regras da WADA, que impedem a análise de amostras não humanas por laboratórios acreditados, essa colaboração acabou sendo realizada com o LABRES (Laboratório de Análise de Resíduos), que, assim como o LBCD, também é associado ao LADETEC, e há décadas é responsável por analisar resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal e em animais produtores de alimentos. Essa nova área no controle de dopagem acabou por nos estimular a estudar e pesquisar novas técnicas mais eficientes de detecção de eritropoietina recombinante humana. Dois dos laboratórios mais importantes do mundo na área de controle de dopagem equino na França e em Hong Kong, já desenvolveram métodos para detectar rHEPO em equinos, porém estes ensaios são baseados em espectrometria de massas e possuem algumas desvantagens, como altos limites de detecção (LODs) (YU *et al.*, 2010). Recentemente, foi desenvolvido em nosso laboratório um método de detecção de rHuEPO em amostras equinas usando-se a técnica de SAR-PAGE (CAVALCANTI *et al.*, 2019), a mesma que é amplamente utilizada pelos laboratórios de controle de dopagem humano acreditados pela WADA, que alcança baixíssimos LODs, mas que custa um longo tempo de análise. Sendo assim, um dos objetivos dessa dissertação foi desenvolver e validar um novo método de detecção de rHuEPO em urina e sangue equinos, que seja simples, mais rápido que a técnica de SAR-PAGE e com LODs tão ou mais baixos que os métodos que utilizam espectrometria de massas. Um kit ELISA comercial, usado para dosagem de EPO humana, foi utilizado como base para o desenvolvimento desse novo método.

4.2.1 Otimizações/ Adaptações:

Para conseguir detectar ESAs em matrizes equinas foram realizadas adaptações ao ensaio de ELISA, desenvolvido para detectar EPO humana em soro/plasma. Para a matriz sangue, foi necessário a incubação prévia de 1 hora a 37 °C, sob agitação, da amostra com o anticorpo monoclonal anti-EPO que vem revestidos nos poços da placa. Após a incubação os poços foram lavados com solução de PBS para retirar qualquer vestígio de proteínas que não estivesse ligada e que pudesse interferir na análise.

Para a matriz urina, foi necessária uma filtração prévia, o que foi um desafio adicional já que a urina do cavalo contém muitos precipitados e é mais viscosa e complexa do que a urina humana. De acordo com SIMPSON e WYNNE, (2000) a presença de proteoglicanos é uma das causas dessa alta viscosidade. Devido a esses fatores ocorria o entupimento nos filtros durante a centrifugação. Para superar este problema de centrifugação, diluímos a urina em solução tampão Tris-HCl 3,75 M, e a submetemos à aquecimento e resfriamento, como descrito na metodologia e, posteriormente, a ultrafiltração. A utilização desse procedimento foi baseada na glicoproteína Tamm-Horsfall (THP), uma proteína comumente encontrada na urina de cavalos que se agrega a macromoléculas levando a formação de precipitados. O aquecimento das amostras em um banho de água quente altera a estrutura macromolecular do THP, evitando o entupimento e facilitando a centrifugação das amostras de urina (MAIIA DIAGNOSTICS). Para uma melhor sensibilidade, após a ultrafiltração a urina foi incubada durante toda noite com o anticorpo monoclonal anti-EPO que vem revestido nos poços da placa. Assim como para a matriz sangue, após a incubação, os poços foram lavados com solução de PBS para retirar qualquer vestígio de proteínas que não estivessem ligadas e que pudessem interferir na análise. Em seguida, foi seguido o protocolo do kit Stemcell®.

4.2.2 Especificidade

O parâmetro indica a capacidade de identificar as ESAs sem a interferência de outros componentes com estruturas semelhantes.

a) Brancos de Urina e Sangue equinos

Com o intuito de averiguar a especificidade desta técnica para detecção de rHuEPO em amostras equinas, foram analisados sangue e urina de vinte cavalos diferentes (brancos de sangue e urina). Não foi possível detectar a presença da EPO equina em nenhuma das amostras testadas pela técnica de ELISA (Tabelas 2 e 3), com isso, não foram observados interferentes na análise, o que assegura a especificidade do kit.

A tabela 2 contém a absorbância de 20 sangues de diferentes cavalos, onde foi descontado a absorbância do sangue branco. Nenhuma das absorbâncias obtidas nas amostras foi maior do que a absorbância obtida no controle positivo (NESP) fortificado no LOD, demonstrando que o kit não foi capaz de detectar a EPO equina endógena. Já na tabela 3 as absorbâncias são referentes a matriz urina, não apresentando também nenhuma absorbância acima do controle positivo (rHuEPO) fortificado no LOD, aplicado nesse ensaio. Sendo assim, podemos assegurar a especificidade deste método.

Tabela 2: Resultado obtido para determinação da especificidade do método analítico em sangue.

AMOSTRAS DE SANGUE	ABS ¹	ABS - BRANCO
cavalo 1	0,108	-0,010
cavalo 2	0,103	-0,015
cavalo 3	0,104	-0,014
cavalo 4	0,125	0,007
cavalo 5	0,088	-0,030
cavalo 6	0,124	0,006
cavalo 7	0,110	-0,008
cavalo 8	0,105	-0,013
cavalo 9	0,151	0,033
cavalo 10	0,102	-0,016
cavalo 11	0,097	-0,021
cavalo 12	0,097	-0,021
cavalo 13	0,096	-0,022
cavalo 14	0,124	0,006
cavalo 15	0,135	0,017
cavalo 16	0,163	0,045
cavalo 17	0,112	-0,006
cavalo 18	0,102	-0,016
cavalo 19	0,083	-0,035
cavalo 20	0,142	0,024

CTRL + NESP	ABS¹	ABS¹	ABS média	ABS - BRANCO
100 mU/mL	0,541	0,554	0,548	0,430

¹ABS, absorvância a 450 nm

Tabela 3: Resultado obtido para determinação da especificidade do método analítico em urina.

AMOSTRAS DE URINA	ABS¹	ABS - BRANCO
cavalo 1	0,052	-0,001
cavalo 2	0,062	0,009
cavalo 3	0,063	0,010
cavalo 4	0,067	0,014
cavalo 5	0,058	0,005
cavalo 6	0,062	0,009
cavalo 7	0,061	0,008
cavalo 8	0,059	0,006
cavalo 9	0,061	0,008
cavalo 10	0,064	0,011
cavalo 11	0,058	0,005
cavalo 12	0,058	0,005
cavalo 13	0,061	0,008
cavalo 14	0,059	0,006
cavalo 15	0,063	0,010
cavalo 16	0,070	0,017
cavalo 17	0,048	-0,005
cavalo 18	0,055	0,002
cavalo 19	0,056	0,003
cavalo 20	0,070	0,017

CTRL + rHuEPO	ABS¹	ABS¹	ABS média	ABS - BRANCO
6,25 mU/mL	0,096	0,098	0,097	0,044

¹ABS, absorvância a 450 nm

b) Urina fortificada com BRP e Sangue fortificado com rHuEPO, NESP e CERA.

Misturas de brancos de urina e de sangue foram fortificadas em diferentes concentrações com rHuEPO, NESP e CERA, para a construção de curvas de calibração de cada ESA, a fim de averiguar a especificidade desta técnica na detecção desses analitos. Após análise dos dados, observou-se que este método é sensível à variação da concentração de eritropoietina humana e análogos, o que assegura a especificidade do kit. Esses resultados estão demonstrados nas Figuras 19, 20, 21 e 22 e nas Tabelas 4, 5, 6 e 7.

Tabela 4: Determinação da especificidade em sangue + rEPO.

AMOSTRAS SANGUE + rHuEPO (mU/mL)	ABS	ABS	ABS média	ABS média - BRANCO	CONCENTRAÇÃO (mU/mL)
0	0,245	0,220	0,233	-0,001	-0,7
1,56	0,263	0,251	0,257	0,024	1,2
3,12	0,290	0,281	0,286	0,053	3,5
6,25	0,326	0,319	0,323	0,090	6,5
12,50	0,408	0,401	0,405	0,172	13,0
25	0,574	0,561	0,568	0,335	26,1
50	0,836	0,848	0,842	0,609	48,0
100	1,700	1,287	1,494	1,261	100,1

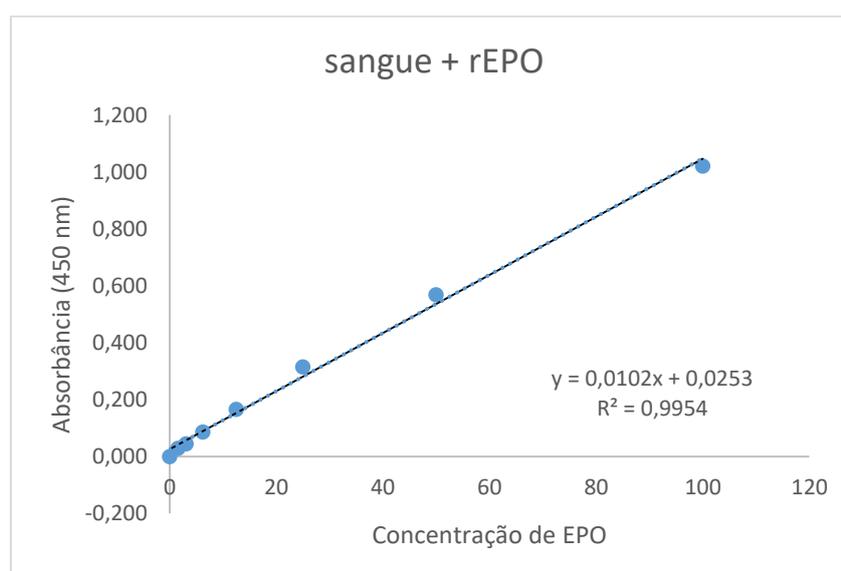


Figura 19: Gráfico da curva de calibração de sangue + rEPO.

Tabela 5: Determinação da especificidade em sangue + NESP.

AMOSTRAS Sangue + NESP (mU/mL)	ABS	ABS	ABS média	ABS média - BRANCO	CONCENTRAÇÃO (mU/mL)
0	0,084	0,082	0,083	0,000	-17,00
25	0,086	0,081	0,084	0,000	-14,50
50	0,091	0,083	0,087	0,004	3,00
100	0,099	0,103	0,101	0,018	73,00
200	0,115	0,115	0,115	0,032	143,00
400	0,145	0,132	0,139	0,056	260,50
800	0,220	0,211	0,216	0,133	645,50
1600	0,344	0,364	0,354	0,271	1338,00

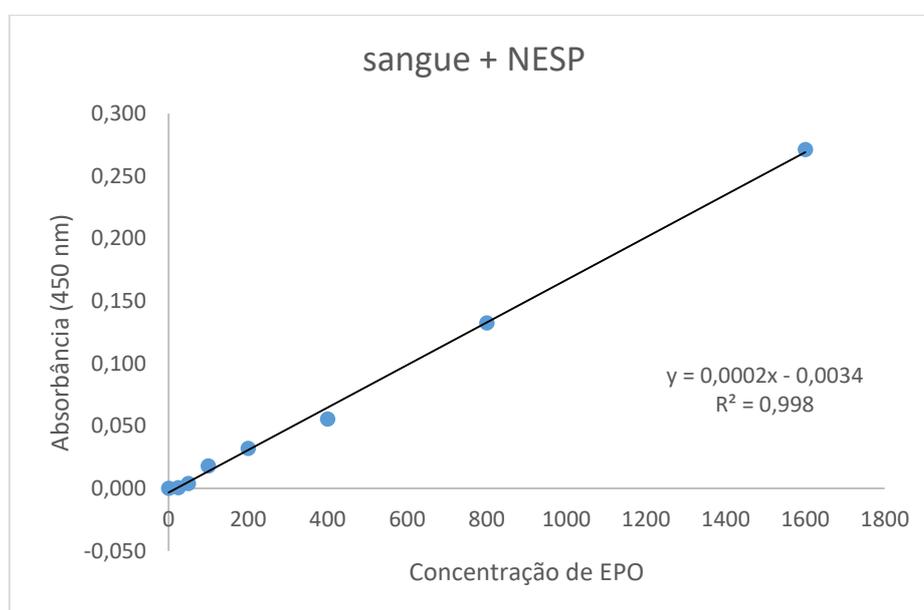


Figura 20: Gráfico da curva de calibração de sangue + NESP.

Tabela 6: Determinação da especificidade em sangue + CERA.

AMOSTRAS Sangue + CERA (mU/mL)	ABS	ABS	ABS média	ABS média - BRANCO	CONCENTRAÇÃO (mU/mL)
0	0,101	0,094	0,098	-0,001	-2,51
6,25	0,124	0,125	0,125	0,027	2,78
12,5	0,156	0,160	0,158	0,060	9,35
25	0,223	0,211	0,217	0,119	20,92
50	0,293	0,356	0,325	0,227	42,00
100	0,493	0,638	0,566	0,468	89,25
200	0,990	1,273	1,132	1,034	200,24
400	2,232	2,039	2,136	2,038	397,10

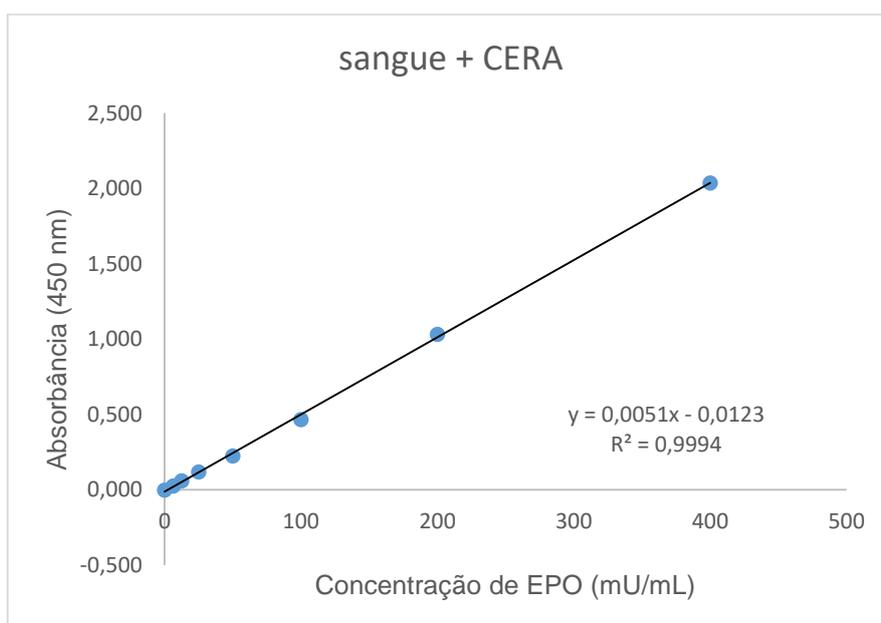


Figura 21: Gráfico da curva de calibração de sangue + CERA.

Tabela 7: Determinação da especificidade em urina + rEPO.

AMOSTRAS URINA + rHuEPO (mU/mL)	ABS	ABS	ABS	ABS média	ABS média - BRANCO	CONCENTRAÇÃO (mU/mL)
0	0,060	0,063	0,064	0,062	0,000	-0,384
1,56	0,068	0,066	0,062	0,065	0,003	0,268
3,12	0,077	0,081	0,066	0,075	0,013	2,297
6,25	0,093	0,087	0,091	0,090	0,028	5,703
12,5	0,116	0,119	0,137	0,124	0,062	13,022
25	0,167	0,175	0,217	0,186	0,124	26,572
50	0,259	0,345	0,312	0,305	0,243	52,442
100	0,545	0,452	0,550	0,516	0,454	98,167

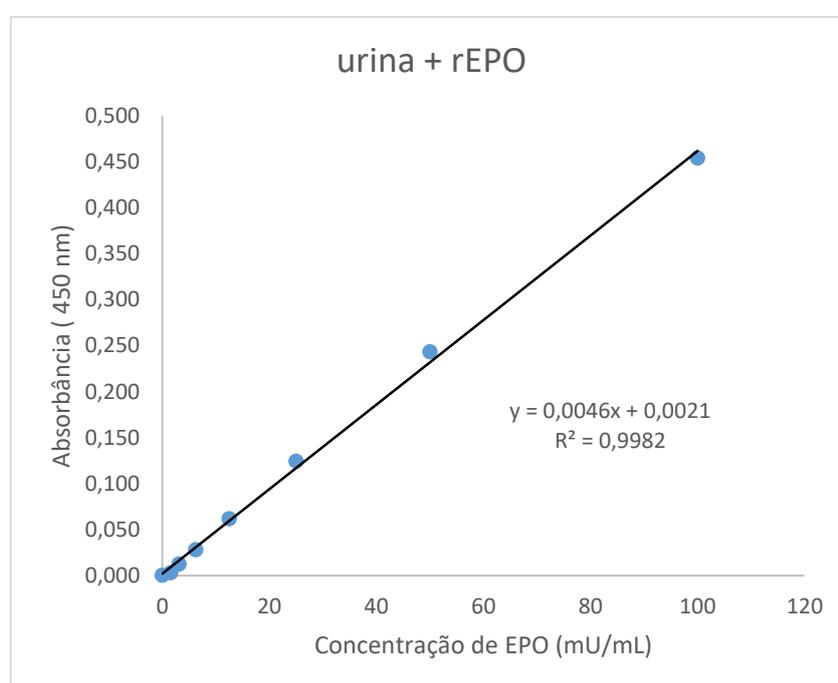


Figura 22: Gráfico da curva de calibração de urina + rEPO.

De acordo com o ISL (WADA, 2015), um método é considerado específico quando esse é capaz de detectar/quantificar o analito, na presença de outras substâncias estruturalmente correlacionadas. Para imunoenaios, a especificidade do método recai diretamente sobre a especificidade dos anticorpos utilizados. O fornecedor do kit avaliou e documentou a inexistência de reatividade cruzada para o soro de animais das seguintes espécies: vaca, bode, cavalo, rato, ovelha e coelho (Manual Kit STEMCELL®). Os testes realizados com a troca da matriz de análise (sangue por urina) não influenciaram na

especificidade dos anticorpos utilizados, mantendo a especificidade do kit para eritropoietina humana.

4.2.3 Limite de Detecção (LOD)

A fim de determinar a menor concentração detectada (LOD) pelo método de ELISA, misturas de sangue e urina foram fortificadas com diferentes concentrações, em triplicata, de rHuEPO, NESP e CERA. Em seguida, foram escolhidas as menores concentrações em que era possível a detecção das substâncias e estas foram analisadas 20 vezes individualmente em três dias diferentes. O critério para a escolha do LOD foi a concentração em que todas as 20 replicatas apresentassem resultado de concentração obtida acima de 0,5 mU/mL e se mantivesse reprodutível nos três dias de análise. As concentrações testadas foram, para sangue:

- rHuEPO (3,12; 6,25; 12,5 mU/mL);
- NESP (50; 100 mU/mL);
- CERA (25; 50 mU/mL)

E para urina:

- rHuEPO (3,12; 6,25; 12,5 mU/mL);

As concentrações obtidas que alcançaram resultados 100% acima de 0,5 mU/mL foram 6,25, 100 e 50 mU/mL, que equivale a 0,04, 0,5, 0,25 ng/mL para rHuEPO, NESP e CERA, respectivamente, em sangue (Tabelas 8, 9 e 10), e 6,25 mU/mL , ou 0,04 ng/mL para rHuEPO em urina (Tabela 11). A Tabela 12 resume os LODs encontrados em sangue e urina, respectivamente.

Tabela 8: Concentrações obtidas para rHuEPO em vinte replicatas em três dias diferentes.

rHuEPO	DIA 1	DIA 2	DIA 3
Concentrações em mU/mL			
6,25	5,62	5,26	5,29
6,25	2,42	4,38	7,21
6,25	2,90	6,05	3,56
6,25	3,94	5,56	6,06
6,25	5,62	6,74	6,35
6,25	4,34	6,83	6,92
6,25	5,30	7,23	8,46
6,25	2,74	5,66	15,96
6,25	6,26	4,68	5,96
6,25	4,42	5,17	5,00
6,25	3,62	5,36	7,31
6,25	3,38	6,05	16,15
6,25	1,70	6,25	12,12
6,25	3,54	6,83	9,04
6,25	1,70	6,83	9,52
6,25	1,22	8,50	13,56
6,25	6,82	8,89	8,56
6,25	3,94	9,58	8,85
6,25	2,98	11,54	6,25
6,25	4,50	10,95	14,42
Média	3,85	6,92	8,83
DP ¹	1,55	2,00	3,71
CV ²	40,16	28,97	42,06

¹DP, desvio padrão. ²CV, coeficiente de variação%.

Tabela 9: concentrações obtidas para NESP em vinte replicatas em três dias diferentes.

NESP	DIA 1	DIA 2	DIA 3
Concentrações em mU/mL			
100	94,00	102,32	143,43
100	106,22	135,12	154,74
100	92,89	136,32	163,87
100	61,78	105,52	136,91
100	130,67	153,92	146,91
100	111,78	128,32	188,65
100	132,89	134,32	148,65
100	121,78	158,72	155,61
100	124,00	118,32	136,91
100	158,44	142,72	174,74
100	90,67	117,92	174,30
100	94,00	130,32	138,65
100	118,44	224,32	184,74
100	140,67	240,72	348,22
100	192,89	199,52	200,83
100	129,56	177,92	192,57
100	109,56	179,92	371,70
100	101,78	153,92	343,43
100	114,00	139,52	213,87
100	76,22	148,72	253,87
Média	115,11	151,42	198,63
DP ¹	29,13	39,92	73,44
CV ²	25,31	24,38	36,97

¹DP, desvio padrão. ²CV, coeficiente de variação%

Tabela 10: concentrações obtidas para CERA em vinte replicatas em três dias diferentes.

CERA	DIA 1	DIA 2	DIA 3
Concentrações em mU/mL			
50	60,33	86,33	17,57
50	57,39	80,50	19,16
50	63,08	79,11	18,68
50	35,82	64,67	16,46
50	56,02	72,17	20,43
50	59,55	78,83	23,44
50	65,43	73,83	31,86
50	69,55	75,50	23,29
50	62,10	80,50	22,81
50	59,94	68,56	21,54
50	66,02	68,83	27,41
50	56,61	56,89	24,71
50	60,33	82,44	50,90
50	60,14	106,33	55,03
50	62,49	81,06	59,16
50	61,31	101,06	53,13
50	65,24	87,72	59,00
50	35,43	61,89	58,84
50	46,41	71,89	52,81
50	42,29	125,78	29,16
Média	57,27	80,19	34,27
DP ¹	9,67	16,02	16,55
CV ²	16,89	19,98	48,29

¹DP, desvio padrão. ²CV, coeficiente de variação%.

Tabela 11: concentrações obtidas para rHuEPO (urina) em vinte replicatas em três dias diferentes.

BRP	DIA 1	DIA 2	DIA 3
Concentrações em mU/mL			
6,25	7,61	6,07	2,80
6,25	8,32	6,07	6,20
6,25	9,04	4,54	7,09
6,25	6,54	4,98	4,59
6,25	13,68	5,63	4,23
6,25	7,96	6,50	6,02
6,25	7,61	6,28	5,48
6,25	7,96	7,15	3,52
6,25	8,68	4,54	5,66
6,25	7,25	7,37	4,95
6,25	7,96	6,50	4,95
6,25	6,54	4,98	3,88
6,25	8,32	1,50	3,88
6,25	6,89	6,28	4,05
6,25	9,04	7,80	2,98
6,25	11,54	6,28	5,13
6,25	5,11	4,76	5,13
6,25	4,04	7,37	3,34
6,25	16,54	4,76	2,98
6,25	7,61	6,07	2,98
Média	8,41	5,77	4,49
DP ¹	2,78	1,41	1,23
CV ²	33,15	24,44	27,28

¹DP, desvio padrão. ²CV, coeficiente de variação%

Tabela 12: LOD dos analitos rEPO/NESP/CERA em sangue e rEPO em urina nas concentrações em mU/mL e ng/mL.

	sangue	urina
Analito	mU/mL (ng/mL)	mU/mL (ng/mL)
rEPO	6,25 (0,04)	6,25 (0,04)
NESP	100 (0,5)	-
CERA	50 (0,25)	-

Os resultados mostram maior sensibilidade, para rHuEPO, quando comparados a outras ESAs na matriz sangue, isso se deve a interação dessas ESAs com o anticorpo primário anti-EPO biotilado (ou seja, livre) do kit. Acredita-se que a interação com o anticorpo primário biotilado seja menor que a interação com o anticorpo primário imobilizado na placa. Essa hipótese se deve aos bons resultados obtidos na imunopurificação de urinas humana utilizando-se apenas o anticorpo imobilizado na placa. Além disso, não houve diferença de sensibilidade entre urina e sangue, sendo a urina uma opção menos invasiva.

Em 2011, CHANG *et al.* conseguiram detectar CERA em plasma equino em uma concentração de 0,02 ng/mL, utilizando também 50 µL de amostra. No entanto, este valor foi baseado em um estudo de excreção, onde o animal recebeu uma dose subcutânea de 100 µg de CERA, além de ter realizado um pré-tratamento nas amostras com polietilenoglicol 6000 e utilizado kit Elisa diferente do utilizado nesse trabalho. Como o trabalho publicado era somente com CERA, não se sabe como seria o comportamento das outras epoetinas ao adicionar o PEG-6000 na amostra. Já em LC-MS o mesmo grupo obteve o LOD para CERA de 1,0 ng /mL em 2 mL de plasma de cavalo. YU *et al.*, 2010 detectaram rHuEPO, NESP e CERA à 0,1, 0,2 e 1,0 ng /mL, respectivamente, em plasma equino, utilizando a técnica de espectrometria de massa em tandem com cromatografia líquida (LC/ MS / MS). Os LODs de rHuEPO e CERA alcançados nesta dissertação são menores que os obtidos por LC-MS descritos na literatura, desmonstrando uma das vantagens da técnica de ELISA sobre a espectrometria de massas. Utilizando a técnica de SAR-PAGE, CAVALCANTI *et al.*, 2019, obteve um LOD de 0,04, 0,1, 0,08 ng/mL para rHuEPO, NESP e CERA utilizando 250 µL de sangue equino. Apesar dos LODs de NESP e CERA serem menores do que os obtidos por ELISA, o SAR-PAGE possui a desvantagem de analisar poucas amostras, além de ser um método demorado, levando três dias para se obter o resultado.

4.2.4 Arraste

A fim de avaliar o parâmetro “Arraste”, que consiste na presença do analito em poços vazios próximos as do analito testado, amostras brancas foram intercaladas com amostras fortificadas com rHuEPO, NESP ou CERA nas concentrações de 100, 400 e 200 mU/mL respectivamente. Após a análise dos resultados não foi possível detectar a presença de nenhuma ESA testada nos poços que continham amostras brancas, o que assegura a ausência de arraste neste método.

4.2.5 Precisão Intermediária

A precisão representa a capacidade de avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios, sendo assim a análise da precisão intermediária foi realizada em dois dias diferentes. Foram utilizadas misturas de sangue e de urina fortificadas com os analitos rHuEPO, NESP e CERA na concentração de 50, 400 e 200 mU/mL respectivamente. Depois obteve-se a concentração média, desvio padrão e o coeficiente de variação das absorbâncias de cada analito.

Nas tabelas 13,14 e 15 encontram-se os dados brutos obtidos na análise do parâmetro precisão intermediária em sangue.

Na tabela 16 encontra-se os dados brutos obtidos na análise do parâmetro precisão intermediária em urina.

Tabela 13: Valores de absorvância obtidos para precisão intermediária da CERA, a 200 mU/mL, em sangue.

Replicata	ABS ¹
1	1,069
2	1,172
3	1,168
4	1,201
5	1,359
6	1,209
7	1,057
8	1,214
9	1,090
10	1,023
11	1,110
12	1,112
13	1,089
Média	1,144
DP²	0,089
CV%³	7,814

¹ABS, absorvância a 450 nm.

²DP, desvio padrão.

³CV, coeficiente de variação%.

Tabela 14: Valores de absorvância obtidos para a precisão intermediária da NESP, a 400 mU/mL, em sangue.

Replicatas	ABS ¹
1	0,829
2	0,872
3	0,793
4	0,757
5	0,865
6	0,724
7	0,965
8	0,851
9	0,911
10	0,853
11	0,870
12	0,898
Média	0,849
DP²	0,070
CV%³	8,210

¹ABS, absorvância a 450 nm.

²DP, desvio padrão.

³CV, coeficiente de variação%.

Tabela 15: Valores de absorvância para a precisão intermediária da BRP.

Replicatas	ABS ¹
1	1,164
2	1,507
3	1,298
4	1,436
5	1,569
6	1,430
7	1,484
8	1,409
9	1,405
10	1,357
11	1,163
12	1,276
13	1,263
14	1,181
15	1,216
16	1,287
Média	1,340
DP ²	0,128
CV% ³	9,539

¹ABS, absorvância a 450 nm.

²DP, desvio padrão.

³CV, coeficiente de variação%.

Tabela 16: Valores de absorvância para a precisão intermediária da BRP.

Replicatas	ABS
1	0,429
2	0,367
3	0,361
4	0,402
5	0,376
6	0,385
7	0,370
8	0,340
9	0,364
10	0,343
Média	0,374
Desvpad	0,027
CV%	7,127

¹ABS, absorvância a 450 nm.

²DP, desvio padrão.

³CV, coeficiente de variação%.

A precisão intermediária pode ser entendida como a estimativa inicial para a variabilidade dos resultados em um laboratório. Esse teste é satisfatório quando apresenta um coeficiente de variação inferior a 10%, comprovando a aplicabilidade do método (ALBANO & RAYA-RODRIGUES, 2015).

4.2.6 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma determinada faixa de concentração. A análise da linearidade foi feita através da construção de uma curva de calibração em 8 níveis de concentrações, em triplicata para cada analito (0;1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100mU/mL). Os níveis de concentrações escolhidos para cada substância variaram de acordo com o nível de detectabilidade dos mesmos e foram confeccionados a partir do padrão de referência.

O gráfico gerado utilizou como eixo X (abscissas) as medidas de absorbância médias geradas pela análise de cada nível de concentração. Já no eixo Y (ordenadas) foram utilizados os valores de concentração (mU/mL) em que uma amostra negativa foi fortificada com o material de referência apropriado.

As tabelas 17, 18, 19 e 20 e os gráficos 23, 24, 25 e 26 mostram os resultados de linearidade, assim como a equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2).

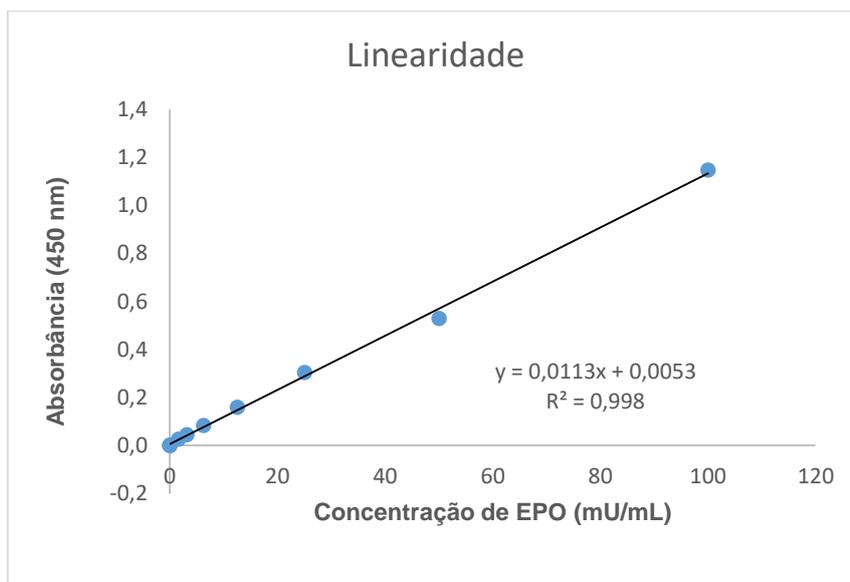


Figura 23: Gráfico curva padrão para análise da linearidade para rHuEPO em sangue.

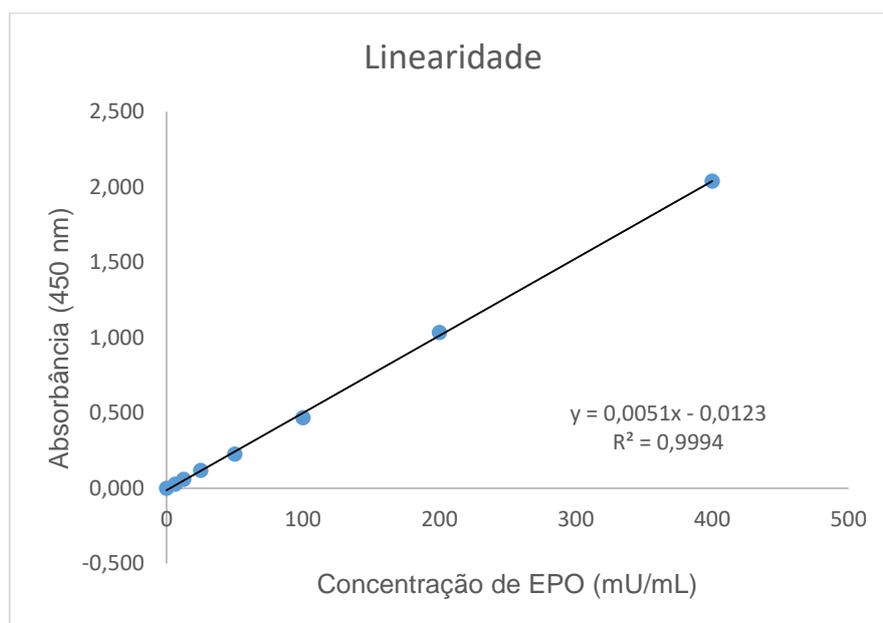


Figura 24: Gráfico curva padrão para análise da linearidade para CERA em sangue.

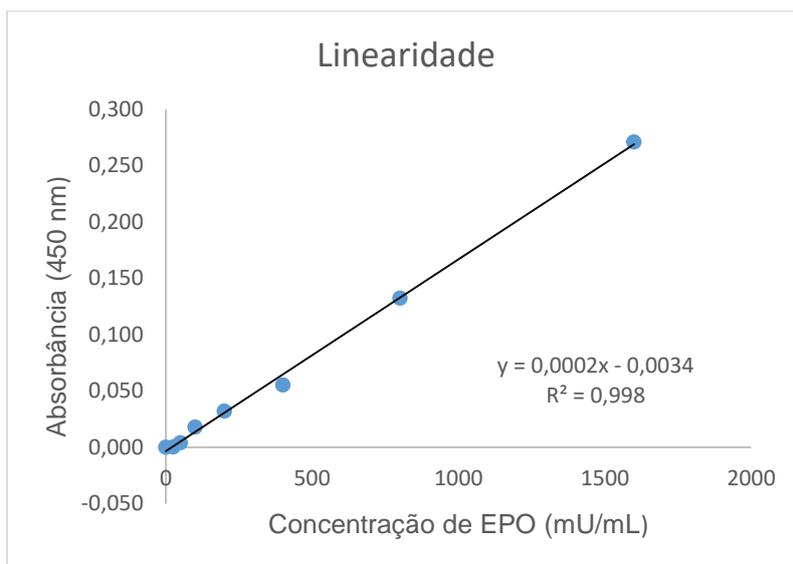


Figura 25: Gráfico curva padrão para análise da linearidade para NESP em sangue.

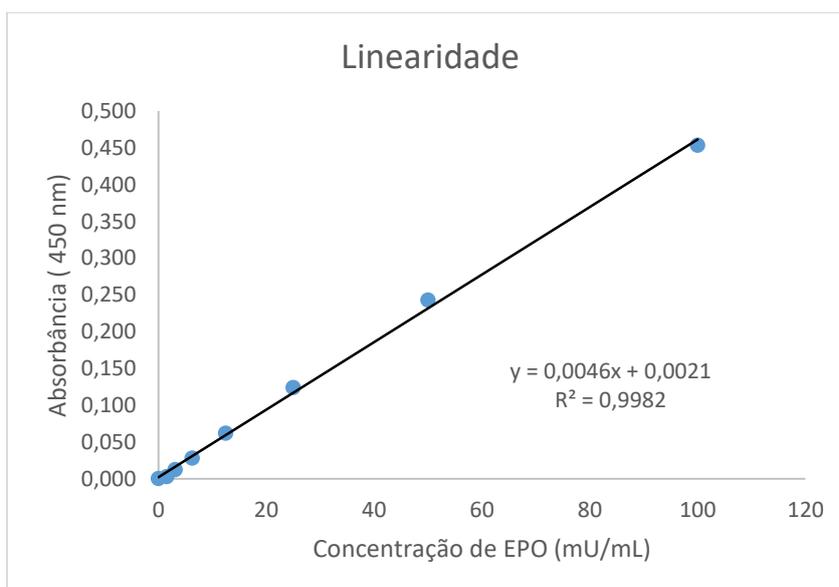


Figura 26: Gráfico curva padrão para análise da linearidade para rHuEPO em urina.

A linearidade do método foi adequada para todos os analitos avaliados (rHuEPO, NESP e CERA), independentemente da matriz utilizada, uma vez que o coeficiente de determinação (r^2) foi maior do que 0,99 (ALBANO & RAYA-RODRIGUES, 2015).

4.2.7 Estudo de Excreção

Com o objetivo de avaliar a técnica de ELISA na análise de doping de ESAs em equinos, um estudo de excreção foi conduzido envolvendo dois cavalos, o primeiro recebeu a administração subcutânea de Hemax Eritron (rHuEPO) e o segundo Aranesp (NESP) e Mircera (CERA). Durante 9 dias após a injeção, com exceção do dia 4, foram coletadas amostras de sangue e urina desses animais.

4.2.7.1 Estudo de excreção de rHuEPO/ Hemax Eritron em sangue

A análise por ELISA para fim do controle de dopagem em equinos é uma análise qualitativa, onde basta comparar a absorbância média da amostra em duplicata com a absorbância do controle fortificado no LOD. Após essa comparação, a urina do equino que recebeu Hemax Eritron apresentou resultado positivo no primeiro dia após a aplicação de uma dose única de 21 µg de rHuEPO (Tabela 21), diferindo da análise por SAR-PAGE, como visto por CAVALCANTI *et al.*, 2019, onde a rHuEPO foi detectada até o dia 3. Apesar do SAR-PAGE mostrar-se mais sensível do que o ELISA, devemos levar em consideração a quantidade de amostras que podem ser analisadas, o tempo gasto durante a análise, além do alto custo da técnica. Além do ELISA realizar um número muito maior de análises de uma só vez, a técnica pode ser realizada em um único dia e é bem menos custosa do que a técnica por gel. Ou seja, o método de ELISA mostrou ser rápido e de baixo custo em comparação com outras estratégias e pode ser utilizada para os procedimentos iniciais de análise. Além disso, é bom ressaltar que o estudo realizado utilizou micro-doses, tendo o animal recebido uma dose subcutânea de 3.000 UI (aproximadamente 6,6 UI / kg) sendo 6 vezes abaixo da dose terapêutica recomendada para pacientes humanos anêmicos (aproximadamente 40 UI / kg).

Tabela 17: Estudo de excreção em sangue rHuEPO / Hemax por ELISA.

AMOSTRAS	ABS¹	ABS¹	ABS média
Branco	0,129	0,143	0,136
6h	0,146	0,167	0,157
1 dia	0,357	0,428	0,393
2 dia	0,288	0,281	0,285
3 dia	0,280	0,250	0,265
5 dia	0,223	0,185	0,204
6 dia	0,173	0,182	0,178
7 dia	0,126	0,132	0,129
8 dia	0,197	0,147	0,172
9 dia	0,115	0,122	0,119

CTRL Positivo	ABS¹	ABS¹	ABS média
6,25 mU/mL	0,398	0,336	0,367

¹ABS, absorvância a 450 nm.

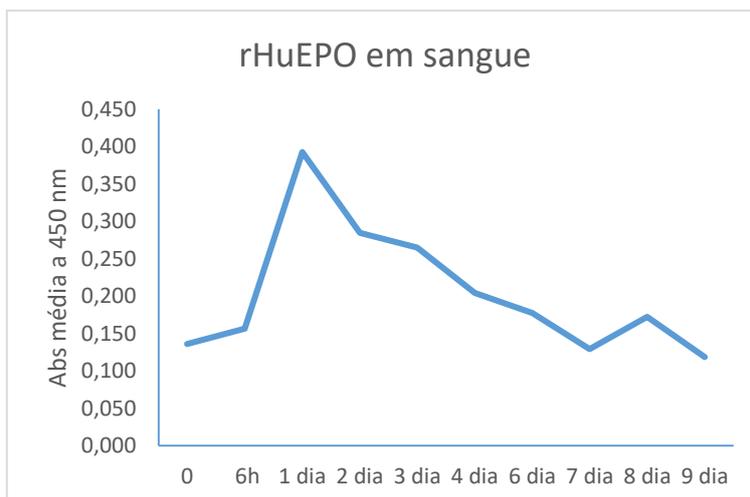


Figura 277: Representação gráfica do estudo de excreção de rHuEPO em sangue equino.

4.2.7.2 Estudo de excreção de NESP e CERA em sangue

Ao analisar o sangue do segundo cavalo que recebeu NESP e CERA (Tabela 22), observamos resultado positivo (ou seja, apresentou ABS acima da ABS do controle positivo) em todos os dias da coleta de 6h ao 9º dia. Esse resultado corrobora os dados de CAVALCANTI *et al.*, 2019, que conseguiu detectar os mesmos analitos no mesmo período utilizando a técnica SAR-PAGE. A NESP e a CERA são epoetinas de segunda e terceira geração respectivamente, logo apresentam uma meia-vida de longa duração, fazendo com que sejam detectadas por mais tempo, mesmo recebendo microdoses, uma única injeção de 100 µg de NESP e 50 µg de CERA, todas abaixo da dose terapêutica recomendada.

O ensaio de ELISA não é capaz de discriminar qual tipo de ESA foi administrado no cavalo, por isso deve ser adotado como um protocolo para procedimentos iniciais. Caso a amostra apresente densidade óptica maior ou igual a do controle positivo, esta deve ser reanalisada utilizando-se outra técnica.

Tabela 18: Estudo de excreção de NESP e CERA por ELISA em sangue.

AMOSTRAS*	ABS¹	ABS¹	ABS média
Branco	0,106	0,101	0,104
6h	0,253	0,269	0,261
1 dia	1,439	1,828	1,634
2 dia	1,917	2,203	2,060
3 dia	1,462	1,753	1,608
5 dia	0,501	0,571	0,536
6 dia	0,336	0,375	0,356
7 dia	0,245	0,272	0,259
8 dia	0,235	0,270	0,253
9 dia	0,202	0,240	0,221

CTRL Positivo	ABS¹	ABS¹	ABS média
6,25 mU/mL	0,225	0,163	0,194

¹ABS, absorvância a 450 nm.

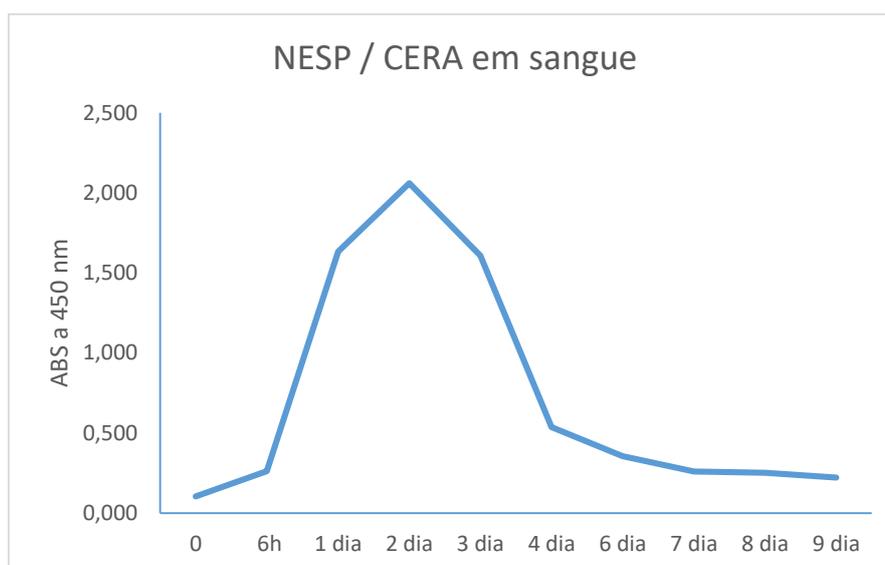


Figura 28: Representação gráfica do estudo de excreção de NESP e CERA em sangue equino.

4.2.7.3 Estudo de excreção de rHuEPO/ Hemax Eritron em urina.

Na urina (Tabela 23), foi possível detectar a rHuEPO a partir de 6h ao dia 2, mesmo sendo uma matriz complexa devido a sua alta viscosidade e não ser um fluido biológico relatado para o ensaio pelo fornecedor do kit. Esses dados corroboram em parte os resultados obtidos por CAVALCANTI *et al.*, 2019, já que o ELISA não foi capaz de detectar a presença de rHuEPO no terceiro dia após a administração do medicamento.

Outros dois kits comerciais de marcas diferentes (R&D system e IBL) foram avaliados por ROBERTS e colaboradores em 2002, que conseguiram detectar rHuEPO até 72 horas após a administração em plasma e até 48 horas em urina, porém a dose administrada foi de 20.000 IU (aproximadamente 44,5 UI / kg), sendo 7 vezes superior à administrada nesse estudo. O kit ELISA utilizado neste estudo para o desenvolvimento e validação do método de detecção de ESAs em amostras de origem equinas é o mesmo kit utilizado na imunopurificação de urinas humanas para controle de dopagem nos laboratórios acreditados pela WADA. Sendo assim, os materiais utilizados na nova rotina de análise de amostras equinas já são amplamente utilizados em laboratórios de controle de dopagem em humanos. Além disso, esses kits são subutilizados na análise de rotina humana, pois utiliza-se somente a placa de ELISA, sendo os reagentes

são descartados. Já na análise de equinos o kit é plenamente utilizado, evitando desperdícios e custos adicionais.

Tabela 19: Estudo de excreção de rHuEPO / Hemax por ELISA em urina.

AMOSTRAS	ABS¹	ABS¹	ABS média
Branco	0,128	0,059	0,094
6h	2,998	1,682	2,340
1 dia	2,399	1,993	2,196
2 dia	0,716	0,599	0,658
3 dia	0,326	0,301	0,314
5 dia	0,105	0,118	0,112
6 dia	0,095	0,142	0,119
7 dia	0,13	0,085	0,108
8 dia	0,084	0,074	0,079
9 dia	0,068	0,073	0,071

CTRL Positivo	ABS¹	ABS¹	ABS média
6,25 mU/mL	0,419	0,335	0,377

¹ABS, absorvância a 450 nm.

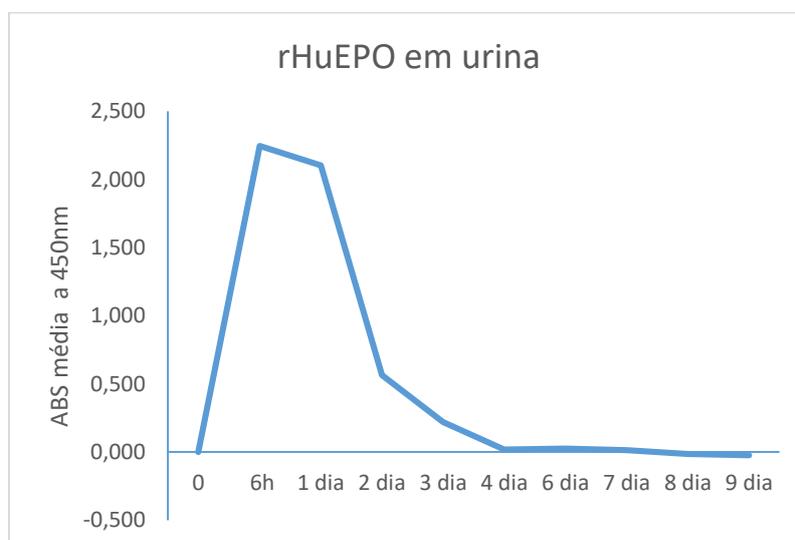


Figura 29: Representação gráfica do estudo de excreção de rHuEPO em urina equina.

5. CONCLUSÕES:

Etapa 1:

Com o aumento do número de medicamentos biossimilares de EPO no mercado, foi possível observar neste trabalho de mestrado que a técnica de SAR-PAGE, pode apresentar falhas na detecção de biossimilares. Pois dos 9 biossimilares de rHuEPO testados, 6 apresentaram difícil detecção por esta técnica, sugerindo que esta metodologia pode gerar resultados falso negativos. Já na técnica de IEF-PAGE apesar dos medicamentos testados apresentarem perfis distintos de separação, foi possível detectar todos os 9 biossimilares testado, porém, sabe-se que este método não pode ser utilizado como confirmação, pois pode gerar resultados falso positivos, quando analisadas amostras de urina “ativa” ou de “esforço”.

Ao analisarmos o medicamento Hemax de diferentes lotes através da técnica de SAR-PAGE, observamos diferenças no perfil eletroforético deste biossimilar, onde um lote apresentou resultado falso negativo, constatando que existem diferenças entre lotes do mesmo medicamento. Podemos concluir que alguns biossimilares podem não estar sendo detectados, passando como falso negativos. Contudo, faz-se importante a constante pesquisa e desenvolvimento de novas técnicas de detecção, como espectrometria de massas e metabolômica, de novos biossimilares, que surgem rotineiramente no mercado, prezando sempre por um esporte limpo e uma competição justa.

Etapa 2:

A técnica de ELISA desenvolvida para a detecção de ESAs de origem humana nas matrizes sangue e urina de equino mostrou-se eficaz, rápida e de baixo custo quando comparado aos métodos atuais utilizados. Apesar do fabricante do kit não relatar a matriz urina como uma possibilidade para análise, o kit demonstrou ser eficaz com base nos dados apresentados, viabilizando uma forma de análise menos invasiva para o animal. A validação desta técnica foi satisfatória, pois todos os parâmetros avaliados foram atendidos. Os LODs obtidos durante a validação em amostras equinas foram de 6,25, 100 e 50

mU/mL para rHuEPO (independente da matriz), NESP e CERA, respectivamente.

O método também provou ser adequado para detecção das ESAs em amostras equinas durante o estudo de excreção de microdoses dessas drogas. Esse estudo mostrou que a técnica desenvolvida neste trabalho pode ser empregada para análise de triagem em amostras de cavalo de corrida, usando ambas as matrizes, sangue e urina, para fins de controle de dopagem no esporte.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

Adamson, J W. Epoetin alfa: into the new millennium. **Semin Oncol.** p. 76-79,1998.

Adamson, J. W. Regulation of red blood cell production. **Am. J. Med.** v. 101, n. 2, p. 4S-6S, 1996.

Ahn, WS; Jeon, JJ; Jeong, YR; Lee, SJ; Yoon, SK. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. **Biotechnol. Bioeng.** v. 101, n. 6, p. 1234–1244, 2008.

ALBANO, F. RAYA-RODRIGUEZ, M, T. Validação e Garantia da Qualidade de Ensaio Laboratoriais. 2ª edição. **Rede Metrológica RS.** Porto Alegre, 2015.

Aquino Neto, FR. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. **Rev Bras Med Esporte;** v.7, n. 4, p.138-148, 2001.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 55, de 16 de Dezembro de 2010. Disponível em:< <http://portal.anvisa.gov.br>> Acessado em: 12/03/2019.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 166, de 24 de Junho de 2017. Disponível em:< <http://portal.anvisa.gov.br>> Acessado em: 15/03/2019

Barroso, O.; Mazzoni, I.; Rabin, O. Hormone abuse in sports: the antidoping perspective. **Asian J. Androl,** v.10, n.3, p.391–402, 2008.

Beall CM.; Brittenham GM.; Strohl KP.; Blangero J.; Blangero SW.; Goldstein MC Decker MJ.; Vargas E.; Villena M.; Soria R, Alarcon AM.; Gonzales C. Hemoglobin concentration of high-altitude Tibetans and Bolivian Aymara. **American Journal of Physical Anthropology.** v.106, p. 385-400, 1998.

Bento. Rafael Maia de Almeida. **Estabilidade da eritropoietina humana recombinante e de seu análogo darbepoetina alfa em urina humana mediante contaminação microbiológica, e substâncias psicotrópicas no**

controle de dopagem. Tese de Doutorado em Química Orgânica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

Bing Gong, Irina Burnina, Terrance A. Stadheim and Huijuan Li. Glycosylation characterization of recombinant human erythropoietin produced in glycoengineered *Pichia pastoris* by mass spectrometry. **J.Mass Spectrom.** v.48, p.1308–1317, 2013.

Bitonti A, J; Dumont J, A. Pulmonary administration of therapeutic proteins using an immunoglobulin transport pathway. *Adv Drug Deliv Rev.* p. 1106-18, 2006.

Boyard-Kieken F, Dervilly-Pinel G, Garcia P, Paris AC, Popot MA, le Bizec B, Bonnaire Y. Comparison of different liquid chromatography stationary phases in LC-HRMS metabolomics for the detection of recombinant growth hormone doping control. **Journal of Separation Science.** v. 34, p.3493-501, 2011.

Bunn HF, Poyton RO: Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. **Physiol Rev.** v. 76, p. 839, 1996.

Cavalcanti, Rafaela Tannuri Campos; Teixeira, Pedro Antônio Castelo; Levy Rachel Santos; Gualberto, Henrique Marcelo Pereira; Aquino Neto, Francisco Radler. Detection of ESAs in equine urine and blood by SAR-PAGE. **Drug Test Anal.** p. 1-10, 2019.

Chang Y, Maylin G.M, Matsumoto G, Neades S.M, Catlin D.H. Screen and confirmation of PEG-epoetin β in equine plasma. **Drug Test. Anal.** v.3, p.68-73, 2011.

Chouriberry Ludovic Bailly; Florian Noguier; Laurent Manchon; David Piquemal; Patrice Garcia; Marie-Agnès Popot; Yves Bonnaire. Blood cells RNA biomarkers as a first long-term detection strategy for EPO abuse in horseracing. **Drug Test. Analysis.** v. 2, p. 339-345, 2010.

Deicher R.; HÖRL WH. Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents: a guide to selection for anaemia of chronic kidney disease. **Drugs.** v. 64, n. 5, p. 499–509, 2004.

Delgado, C.; Francis, G.E.; Fisher, D. The uses and properties of PEG-linked proteins. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v.9, p. 249–304, 1992.

Desharnais P.; Naud JF.; Ayotte C. Immunomagnetic beads-based isolation of erythropoietins from urine and blood for sports anti-doping control. **Drug Test Anal.** v. 9, p. 1744-1752, 2017.

Egrie JC.; Browne JK. Development and characterization of novel Erythropoiesis stimulating protein (NESP). **Br. J. Câncer**. v. 84, p. 3–10, 2001.

Elliott SG *et al.* Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. **Exp Hematol.** v. 32, n. 12, p. 1146–1155, 2004.

Elliott,S.; Lorenzini,T.; Asher,S.; Aoki,K.;Brankow,D.;Buck,L.;Busse, L.; Chang, D.; Fuller,J.; Grant,J.; Hernday,N.; Hokum,M.; Hu,S.; Knudten,A.; Levin,N.; Komorowski, R.; Martin, F.; Navarro, R.; Osslund, T.; Rogers, G.; Rogers, N.; Trail,G.;Egrie,J. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. **Nature Biotechnology**. v. 21, p. 414–421, 2003.

Erslev AJ; Caro J, Besarab A. Why the kidney? **Nephron**. V. 41, p. 213-216, 1985.

Expert Reviews in Molecular Medicine:<http://www.expertreviews.org/>. vol. 7; Issue 6; 15 April 2005. Acessado 13/03/2019.

Faura J, Ramos J, Reynafarje C, English E, Finne P, Finch CA. Effect of altitude on erythropoiesis. **Blood**. v. 33, p. 668–76, 1969.

Gianoncelli Alessandra, Sara A. Bonini, Michela Bertuzzi, Michela Guarienti, Sara Vezzoli, Rajesh Kumar, Andrea Delbarba, Andrea Mastinu, Sandra Sigala, Pierfranco Spano, Luca Pani, Sergio Pecorelli, Maurizio Memo. An Integrated Approach for a Structural and Functional Evaluation of Biosimilars: Implications for Erythropoietin. **Bio Drugs**. v. 29, p. 285–300, 2015.

Goldsmith David, Frank Dellanna, Martin Schiestl, Andriy Krendyukov, Christian Combe. Epoetin Biosimilars in the Treatment of Renal Anemia: What Have We Learned from a Decade of European Experience?. **Clin Drug Investig.** v.38, p. 481-490, 2018.

Guan, F.; Uboh, C.; Soma, L.; Birks, E.; Chen, J.; Mitchell, J.; Mbuy, G. LC-MS/MS Method for Confirmation of Recombinant Human Erythropoietin and Darbepoetin in Equine Plasma. **Anal Chem.** v.79, p.4627-4635, 2007.

Halim Liem Andhyk; BiVera, Brinks; Stefan, Romeijn; Rob, Haselberg ; Chris, Burns; Meenu, Wadhwa,. Quality and Batch-to-Batch Consistency of Original and Huub Schellekensosimilar Epoetin Products. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 105, p. 542-550, 2016.

Hinderer W.; Kayser O,Warzecha H. Biosimilar drugs. In: **Pharmaceutical Biotechnology.** (Eds). Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany, p. 285–335, 2012.

Jacobson LO.; Goldwasser E.; Fried W.; Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. **Nature.** v.179, p. 633-634, 1957.

Jelkmann W. Recombinant EPO production—Points the nephrologist should know. **Nephrol Dial Transplant.** v. 22p. 2749–2753, 2007.

Jelkmann W. Xenon misuse in sports – increase of hypoxia-inducible factors and erythropoietin, or nothing but ‘hot air’? **Dtsch Z Sportmed.** v.65, p.267–271, 2014.

Jelkmann, W. Biosimilar epoetins and other “follow-on” biologics: Update on the European experiences. **American Journal of Hematology.** p 771-780, 2010.

Jelkmann, Wolfgang. Developments in the therapeutic use of erythropoiesis stimulating agentes. **British Journal of Haematology.** p. 287–297, 2008.

Jelkmann, W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. **European Journal of Haematology.** v.78, p. 183-205, 2007a.

Jelkmann, W. Erythropoietin. **Front Horm Res.** v. 47, p.115–127, 2016.

Jelkmann, W. Physiology and Pharmacology of Erythropoietin. **Transfusion Medice and Hemotherapy.** p. 302–309, 2013

Jelkmann, W. Regulation of erythropoietin production. **The Journal of Physiology.** p. 1251–1258, 2011.

Krämer I. Pharmacy and pharmacology of biosimilars. **J Endocrinol Invest.** v. 31, p. 479–488, 2008.

Kearns, C.; Lenhart, J.; McKeever K. Cross-reactivity between human erythropoietin antibody and horse erythropoietin. **Electrophoresis**. v. 21, p.1454-1457, 2000.

Lamon, Séverine; Martin, Laurent; Robinson, Neil; Saugy, Marcial; Ceaurriz, Jacques de; Lasne Françoise. Efeitos do Exercício nos Padrões Isoelétricos da Eritropoietina. **Revista Clínica de Medicina Esportiva**. v. 19, p. 311-315, 2009.

LAPPIN, T. The Cellular Biology of Erythropoietin Receptors. **The Oncologist**. v.8, p.15-18, 2003.

Lasne, F.; Ceaurriz, J, de. Recombinant erythropoietin in urine. **Nature**. v. 405, p. 635-637, 2000.

Lasne, F.; Martin, L.; Crepin, N.; Ceaurriz, J, de. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. **Analytical Biochemistry**. v.311, p.119–126, 2002.

Lasne,F.; Popot,M.; Varlet-Marie.;E.; Martin.;L.; Martin.;J., Bonnaire.; Y.; Audran, M.; de Ceaurriz, J. Detection of recombinant epoetin and darbepoetin alpha after subcutaneous administration in the horse. **J Anal Toxicol**. v. 29, n. 8, p. 835-837, 2005.

Lin, F.K.; Suggs, S.; Lin, C.H.; Browne, J.K.; Smalling, R.; Egrie, J.C.; Chen, K.K.; Fox, G.M.; Martin, F.; Stabinsky, Z.; Badrawi, S.M.; Lai, P.H.; Goldwasser, E. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.82, p. 7580–7584, 1985.

Ludovic Bailly-Chouriberry.; Florian Noguier.; Laurent Manchon.; David Piquemal.; Patrice Garcia.; Marie-Agnes Popot.; Yves Bonnaire. Blood cells RNA biomarkers as a first long-term detection strategy for EPO abuse in horseracing. **Drug Testing and Analysis**. 2010.

Macdougall IC, Bailon P, Tara N, Pahlke W, Pílula J, Brandt M: CERA (Ativador do Receptor de Eritropoiese Contínua) para o tratamento da anemia renal: Um agente inovador com características únicas de ligação ao receptor e meia-vida sérica prolongadaContinuous Erythropoiesis Receptor Activator) for the treatment of renal anemia: Na innovative agent with unique receptor binding

characteristics and prolonged serum half-life. **J Am Soc Nephrol.** v. 14, p.14-769A, 2003.

Macdougall, I.C. et al. Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. **J. Am. Soc. Nephrol.** v.10, n.11, p.2392-2395, 1999.

Macdougall, I.C.; Richard Robson.; Sylvie Opatrna.; Xavier Liogier.; Anne Pannier.; Paul Jordan.; Frank C. Dougherty.; Bruno Reigner. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous and Subcutaneous Continuous Erythropoietin Receptor Activator (C.E.R.A.) in Patients with Chronic Kidney Disease. **Clin J Am Soc Nephrol.** v. 1, p. 1211–1215, 2006.

Macdougall, IC. An overview of the efficacy and safety of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). **Nephrol Dial Transplant.** v.16, n.3, p.14–21, 2001.

MAIIA Diagnostics. Kit de purificação do EPO - Instruções de uso para 2016. Disponível <[http://maiiadiagnostics.com/gammal/files/Directions%20for%20Use%20-%20EPO%20Purification%20Kit%20\(new!\).pdf](http://maiiadiagnostics.com/gammal/files/Directions%20for%20Use%20-%20EPO%20Purification%20Kit%20(new!).pdf)> Acessado em 10 de dezembro de 2018.

Marti HH.; Wenger RH.; Rivas LA.; Straumann U.; Digicaylioglu M.; Henn V.; Yonekawa Y.; Bauer C.; Gassmann M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. **Eur J Neurosci.** v. 8, p. 666-676, 1996.

Müller, R, K. Doping in Sports, **Handbook of Experimental Pharmacology.** v. 195, p. 1-5, 2010.

Pascual JA *et al.* Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control. **Ther Drug Monit** v. 26, n. 2, p. 175–179, 2004.

Pereira, H.; Padilha, M.; Aquino Neto, FR. Química e o Controle de Dopagem no Esporte. **Coleção Química no Cotidiano.** v. 3, p. 15-23, 2010.

Philippe, Desharnais; Jean-Francois, Naud; Christiane, Ayotte. Immunomagnetic beads-based isolation of erythropoietins from urine and blood for sports anti-doping control. **Drug Test. Analysis.** v.9, p. 1744–1752, 2017.

Piercy, R. J.; Swardson, C. J.; Hinchcliff, K. W. *J. Erythroid hypoplasia and anemia following administration of recombinant human erythropoietin to two horses. Am Vet. Med. Assoc.* v. 212, p. 244-247, 1998.

Recny, A. M.; Scoble, A.H.; Kim,Y. Structural Characterization of Natural Human Urinary and Recombinant DNA-derived Erythropoietin Identification of Des-Arginine 166 Erythropoietin. **The journal of biological chemistry.** v. 262, n. 35, p. 17156-17163, 1987.

Reichel C.; Abzieher F.; Geisendorfer T. Sarcosyl-PAGE: a new method for the detection of mircera– and EPO-doping in blood. **Drug Testing and Analysis.** v. 1, p. 494–504, 2009.

Reichel C.; Thevis M. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: Screening and *confirmation* protocols for sports drug testing. **Drug Testing and Analysis.** v. 4, p. 818-829, 2012.

Reichel, C. SARCOSYL-PAGE: A New Electrophoretic Method for the Separation and Immunological Detection of PEGylated. **Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.** v.869, cap.7, Springer, 2012.

Reichel, C.; Abzieher, F.; Thomas, G. SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA and EPO-doping in blood. **DrugTesting and Analysis.** v. 1, p. 494-504, 2009.

Reichel, C.; Thevis, M. Gel electrophoretic methods for the analysis of biosimilar pharmaceuticals using the example of recombinant erythropoietin. **Bioanalysis.** v.5, p.587–602, 2013.

Reichel Christian. Differences in sialic acid O-acetylation between human urinary and recombinant erythropoietins: a possible mass spectrometric marker for doping control. *Drug Test. Analysis.*v.5, p.877-899, 2013.

Reihlen. Philipp.; Blobel, M.; Kempkes, R.; Reichel, C.; Schänzer, V, E.; Majer, B.; Schänzer, W. Optimizing SAR-PAGE. **DrugTesting and Analysis.** v. 7, p. 1014-1016, 2015.

Ribani Marcelo.; Carla Beatriz Grespan Bottoli, Carol H. Collins e Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, Lúcio Flávio Costa Melo. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS

CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. *Quim. Nova.* v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

Roberts J,; P, Brown; S,Cade; J, Faustino-Kemp; F, Lasne. Evaluation of commercial ELISA kits to detect the administration of recombinant human erythropoietin to horses. Apresentação oral na 14ª Conferência Internacional de Analistas e Veterinários de Corrida. **R &W publicações**. Editores: D.W.Hill e W.T. Hill. Orlando, Florida, USA. p.234-241, 2002.

RICHARD A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Janis Kuby. **Kuby Immunology**. Publisher: W H Freeman & Co (Sd); 4th edition, p. 162, 2000.

Rose, E, H, de. O uso de anabólicos esteróides e suas repercussões na saúde. In: QUINTAS, Geraldo Gonçalves Soares (Org.). Valores humanos, corpo e prevenção: a procura de novos paradigmas para a educação física. Brasília: **Ministério da Educação**, Secretaria de Educação Física, p. 81-89,1989.

Sato, F.; Yamashita, S.; Kugo, T.; Hasegawa, T.; Mitsui, I.; Kijima-Suda, I. Nucleotide sequence of equine erythropoietin and characterization of region-specific antibodies. **Am J Vet Res.** v. 65, n. 1, p.15-19, 2004.

Schauer, R. Achievements and challenges of sialic acid research. **Glycoconj J.** v.17, n.7-9, p.485-499, 2000.

Schellekens, H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. **Nat Rev Drug Discov.** v. 1, p. 457–462, 2002.

Schellekens, H. Biosimilar epoetins: how similar are they? **Eur. J. Hosp. Pharm.** v. 10, n. 3, p.43–47, 2004b.

Schellekens, H. Biosimilar therapeutic agents: issues with bioequivalence and immunogenicity. **European Journal of Clinical investigation.** v. 34, p. 797-799, 2004a.

Séverine Lamon,; Martin, Laurent; Robinson, Neil; Saugy, Marcial; Ceaurriz, Jacques de; Lasne Françoise. Efeitos do Exercício nos Padrões Isoelétricos da Eritropoietina. **Revista Clínica de Medicina Esportiva.** v. 19, p. 311-315, 2009.

Simpson NJK, Wynne PM. The sample matrix and its influence on method development. In: Simpson NJK, ed. **Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications**. 1st ed. New York, NY: Marcel Dekker, p. 39-96, Inc; 2000.

Skibeli V.; Nissen-Lie G.; Torjesen P.; Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. **Blood**. v.98, (13), p. 3626–3634, 2001.

Spivak, L, J.; Hogans, B, B. The In Vivo Metabolism of Recombinant Human Erythropoietin in the Rat. **Blood**. v. 73, n. 1, p. 90-99, 1989.

Stemcell Manual Kit ELISA. Disponível em:

https://cdn.stemcell.com/media/files/manual/MA28379-Human_Erythropoietin_ELISA_Kit.pdf. Acessado em 10/02/2019.

Suzuki, N.; Ohneda, O.; Takahashi, S; Higuchi, M.; Mukai, HY.; Nakahata, T.; Imagawa, S.; Yamamoto M. Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. **Blood**. v.100, p. 2279–2288, 2002.

Takeuchi, M.; Kobata, A. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. **Glycobiology**. v. 1, p. 337–346, 1991.

THERMO FISHER. Disponível <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>. Acessado em 27/03/2019.

Thevis Mario. Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays IN SPORTS DRUG TESTING WILEY-INTERSCIENCE SERIES IN MASS SPECTROMETRY MASS SPECTROMETRY. ed **Wiley** p. 299, Inc; 2010.

Thevis, Mario, The 36th Manfred Donike workshop on doping analysis. **Drug Test Anal**. v. 10, p. 1633-1634, 2018.

Voss, S., A. Lüdke, S. Romberg, E. Schänzer, U. Flenker, M. de Marees, S. Achtzehn, J. Mester, W. Schänzer. Effects of High Intensity Exercise on

Isoelectric Profiles and SDS-PAGE Mobility of Erythropoietin. **Int J Sports Med.** v. 31, p. 367 – 371, 2010.

WADA Technical Document – TD2014EPO v1.0 – Harmonization of analysis and reporting of erythropoiesis stimulating agents (ESAs) by electrophoretic techniques.

Weikert, S.; Papac, D.; Briggs, J.; Cowfer, D.; Tom, S.; Gawlitzek, M., Lofgren, J.; Mehta, S.; Chisholm, V.; Modi, N.; Eppler, S.; Carroll, K.; Chamow, S.; Peers, D.; Berman, P.; Krummen, L. Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. **Nature Biotechnology.** v. 17, p. 1116–1121, 1999.

Westermeier, R. Isoelectric focusing In: **Electrophoresis in Practice** (4th Edition). Wiley-VCH, Weinheim, Germany. p.51–65, 2005.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY. Prohibited-List-Documents, 2019 Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents>. Acesso em 20/02/2019 às 11:16hs.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY. WADA, The World Anti-Doping Code, 2015. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/resources/the-code/world-anti-doping-code>. Acesso em 19/02/2018 às 14:58hs.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY WADA, International Standard for laboratories, 2015. Disponível: <https://www.wadama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isl>. Acessado em 05/01/2019.

Y, Chang; G, M, Maylin; G, Matsumoto; S, M, Neades; D, H, Catlin. Screen and confirmation of PEG-epoetin β in equine plasma. **Drug Test. Analysis.** v. 3, p. 68–73, 2011.

Yang, M; Butler, M. Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. **Biotechnol. Bioeng.** v. 68, n. 4, p. 370–380, 2000.

Yu, N.; Ho, E.; Wan T.; Wong, A. Doping control analysis of recombinant human erythropoietin, darbepoetinalfa and methoxy polyethylene glycol-epoetin beta in equine plasma by nano-liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.** v. 396, p.2513–2521, 2010.

Yuen, CT; Storrington, PL; Tiplady, RJ et al. Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. **Adv. Exp. Med. Biol.** v.564, p. 141–142, 2005.

Zheng C.; Ma G.; Su Z. Native PAGE eliminates the problem of PEG-SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation. **Electrophoresis.** v. 28, 2007.