

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – CCS - UFRJ
Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica

Rafaela Tannuri Campos Cavalcanti

Deteccção de agentes estimuladores de eritropoiese (ESAs) em urina e sangue de equinos por SAR-PAGE para fins de controle de dopagem

Rio de Janeiro
2019

Rafaela Tannuri Campos Cavalcanti

**Detecção de agentes estimuladores de eritropoiese (ESAs) em urina e sangue
de equinos por SAR-PAGE para fins de controle de dopagem**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biofísica,
IBCCF-CCS, da Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências Biológicas
(Biofísica)

Orientador: Dr. Pedro Antônio Castelo Teixeira

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Ao meu avô Moacyr (saudades eternas)

AGRADECIMENTOS

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza vai mais longe.” – Clarice Lispector

Durante esses dois anos muitas coisas aconteceram, então só tenho a agradecer a todos que dividiram momentos comigo e que deixaram um pouco de si. Agradeço por acreditarem em mim, quando nem eu mesma achava que era capaz. É extremamente difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Pedro Antônio Castelo Teixeira, por todos os ensinamentos antes e durante esse período. Por tirar todas as minhas dúvidas com paciência e entusiasmo, por me orientar brilhantemente durante a execução dos experimentos, por sempre responder as minhas dúvidas (inclusive em horas inusitadas do dia) e por me apoiar desde o dia um.

À Rachel Santos Levy, responsável pela Triagem X, onde foi desenvolvido o trabalho. Agradeço pelo apoio na condução de cada etapa do trabalho, pelo profissionalismo exemplar, pelas dúvidas tiradas e “aulas” dadas, sempre com explicações excelentes, e também pelas risadas compartilhadas. Você mora no meu coração.

Ao Prof. Dr. Francisco Radler de Aquino Neto, pela maestria com a qual conduz o LADETEC, pela disponibilidade para reuniões importantes do projeto e pelas suas excelentes contribuições intelectuais que moldaram grande parte do trabalho.

Ao Prof. Dr. Henrique Marcelo Gualberto Pereira, por acreditar no projeto e acreditar que o tema do trabalho pudesse ser desenvolvido no LBCD. Pelo suporte às decisões inerentes à pesquisa e pelas contribuições essenciais que foram dadas ao logo desta jornada.

À Dra. Marta Tozzi, responsável pelo centro veterinário do Jockey Club Brasileiro do Rio de Janeiro, pelo apoio e parceria ao projeto.

À veterinária Lindiane de Souza, do JCB, pelo apoio e compromisso junto aos animais do estudo.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, agradeço por suas contribuições à ciência.

À minha colega de trabalho Sabrina Nascimento, que embarcou comigo no desafio do mestrado. Agradeço pela cumplicidade no laboratório e nas aulas, pela amizade e momentos de descontração, que foram essenciais durante este percurso.

À técnica Ariane Amaral, por ter cedido muitas das amostras que foram utilizadas durante a validação da técnica.

Às minhas amigas de faculdade Paula L., Rebeca, Paula F., Isis e Victória, por me darem suporte e palavras de incentivo. Pelas saídas que, literalmente, aliviaram muitas das minhas tensões e anseios.

Às minhas amigas de infância Carolina, Juliana, Bruna e Rafaela, por me mostrarem que a vida continua doce.

Aos meus amigos da escola Luciana e Franco, pela cumplicidade e por estarem sempre ao meu lado. Nós damos “show”!

Aos meus fieis companheiros cachorros Kiko (eternamente), Melissa e Pietra, pelo amor incondicional, por estarem sempre grudadinhos em mim, alegrando os meus dias, mesmo aqueles mais cinzas.

Aos meus avós Thereza, Moacyr (eternamente), Antônio (vovô “Caldinhas”), por me ensinarem que a vida é bela e precisa ser vivida e por serem minha fonte de inspiração.

Aos meus pais Janet e Mauro, que me incentivam desde sempre, pelo amor incondicional, por ficarem sempre ao meu lado e por investirem em mim, em todos os aspectos. Vocês são o meu tudo.

Ao meu irmão Gustavo, por ser meu companheirinho desde sempre.

Ao meu noivo Pedro Henrique, pelo amor, paciência, companheirismo, compreensão e por estar sempre ao meu lado, literalmente em todos os momentos. Você é a minha luz.

RESUMO

CAVALCANTI, Rafaela Tannuri Campos. *Detecção de agentes estimuladores de eritropoiese (ESAs) em urina e sangue de equinos por SAR-PAGE para fins de controle de dopagem*. 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.

Os agentes estimuladores da eritropoiese (ESAs) têm sido usados em cavalos para fins de dopagem pois aumenta o desempenho destes animais em esportes de resistência. Atualmente, os métodos de ELISA e espectrometria de massa são usados para detectar o abuso de ESAs em equinos. No entanto, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de sarcosyl (SAR-PAGE) também pode ser utilizada, já que a sua aplicação no controle de dopagem humana é bem estabelecida e mais sensível. Neste trabalho, o método SAR-PAGE foi usado para detectar os ESAs em sangue e urina de cavalo. A técnica de purificação de sangue humano usando kits MAIIA funcionou bem para amostras de cavalos. O principal desafio foi a imunopurificação da urina de cavalo, que se mostrou difícil devido ao entupimento de filtros, mas o aquecimento e o resfriamento da urina de cavalo, seguido de filtração em filtros de 30 kDa eliminaram esse problema. Os limites de detecção (LODs) para rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc foram de 1,3, 1,6, 6,6 e 13,3 pg / mL em urina fortificada, e 40, 100, 80 e 400 pg / mL em sangue fortificado, respectivamente. Esses valores obtidos são menores que os LODs relatados na literatura usando os protocolos de LC-MS. Além disso, a presença de ESAs foi detectada até 9 dias após a administração de microdosagem de Hemax (rHuEPO), NESP e CERA em sangue e urina de cavalo. A técnica de SAR-PAGE pode ser implementada nas análises de rotina de laboratórios de controle de dopagem em cavalos para triagem e confirmação de abuso de ESAs, principalmente devido à sua alta sensibilidade para ambas as matrizes em comparação com métodos de espectrometria de massa publicados.

Palavras-chave: eritropoietina, cavalo, SAR-PAGE, western blotting, dopagem.

ABSTRACT

CAVALCANTI, Rafaela Tannuri Campos. *Detecção de agentes estimuladores de eritropoiese (ESAs) em urina e sangue de equinos por SAR-PAGE para fins de controle de dopagem*. 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.

Erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) have been used in horses for doping purposes to increase the performance of these animals in endurance sports. Currently, ELISA and mass spectrometry methods are used to detect ESA abuse in equines. However, the sarcosyl polyacrylamide gel-electrophoresis (SAR-PAGE) technique could also be used, since its application in human doping control is well established and has proven to be more sensitive. In this work, the SAR-PAGE method was used to detect ESAs in horse blood and urine. The purification technique for human blood using MAIIA kits worked well for horse samples. The major challenge was horse urine immunopurification, which proved difficult due to filter clogging, but heating and cooling of the horse urine followed by filtration in 30-kDa molecular weight cut-off filters solved this problem. The limits of detection (LODs) of 1.3, 1.6, 6.6 and 13.3 pg/mL for rHuEPO, NESP, CERA and EPO-Fc, respectively, obtained in spiked urine and 40, 100, 80 and 400 pg/mL for rHuEPO, NESP, CERA and EPO-Fc, respectively, acquired in spiked blood are lower than the LODs reported in the literature using LC-MS methods. In addition, the presence of ESAs was detected up to 9 days after the administration of microdoses of Hemax (rHuEPO), NESP and CERA in horse blood and urine. SAR-PAGE may be implemented in the routine analysis of horse doping control laboratories for screening and confirmation of ESA abuse, mainly due to its high sensitivity for both matrices compared to published mass spectrometric methods.

Keywords: erythropoietin, horse, SAR-PAGE, western blotting, doping

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Lance Armstrong, durante sua 6ª corrida disputada no *Tour De France*, na França, em 2004. Foto via The New York Times..... **Página 4**
- Figura 2.** Estrutura da molécula de eritropoietina **Página 7**
- Figura 3.** Mecanismo de atuação das HIFs em situações de hipóxia e normóxia.
.....**Página 9**
- Figura 4.** Feedback negativo responsável pela regulação da eritropoiese e produção de EPO em resposta à hipóxia.....**Página 10**
- Figura 5.** Estrutura primária da rHuEPO..... **Página 12**
- Figura 6.** Comparação entre a molécula de rHuEPO (A) e a de NESP (B).
..... **Página 13**
- Figura 7.** Comparação de epoetina alfa e CERA.....**Página 15**
- Figura 8.** Estrutura da EPO-Fc**Página 17**
- Figura 9.** Imagem SDS-PAGE mostrando a característica de banda larga de algumas preparações Epoetin- α and $-\beta$ comercialmente disponíveis (NeoRecormon®, Erypo®, anéis Beijing 4, Shanpoetin™)..... **Página 19**
- Figura 10.** Imagem SAR-PAGE mostrando as massas moleculares aparentes mais altas de CERA, EPO-Fc, NESP e Epoetina- α em comparação com a uEPO / bEPO endógena..... **Página 19**
- Figura 11.** Revelação de membrana mostrando uma banda mista de EPO endógena e rHuEPO (seta vermelha)..... **Página 20**
- Figura 12.** Sequência de aminoácidos da EPO humana em comparação com a NESP..... **Página 24**

Figura 13. Sequência de aminoácidos e nucleotídeos da eEPO.....	Página 25
Figura 14. Comparação de diferentes protocolos de imunopurificação em SAR-PAGE de urina de equinos.....	Página 37
Figura 15. Imunopurificação e SAR-PAGE de sangue de equinos fortificados.....	Página 38
Figura 16. Especificidade em sangue.....	Página 40
Figura 17. Especificidade em urina.....	Página 41
Figura 18: Especificidade e Arraste em branco de sangue + CERA, NESP e rHuEPO.....	Página 42
Figura 19: Especificidade e Arraste em branco de urina + rHuEPO, NESP e CERA.....	Página 43
Figura 20: Limite de detecção de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc fortificados em sangue de equinos.....	Página 46
Figura 21: Limite de detecção de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc fortificados em urina de equinos.....	Página 47
Figura 22: Estudo de excreção em urina-rHuEPO/Hemax (cavalo 1), NESP e CERA (cavalo 2).....	Página 51
Figura 23: Estudo de excreção em sangue de equinos-rHuEPO/Hemax (Cavalo 1), NESP e CERA (Cavalo 2).....	Página 52

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Testes para ESAs na urina e no sangue (soro / plasma) por técnicas eletroforéticas..... **Página 18**

Tabela 2: Limites de detecção (LODs) para ESAs em matrizes equinas por autor..... **Página 54**

Quadro 1: LOD em sangue. Resultados obtidos para determinação do limite de detecção do método analítico em sangue..... **Página 47**

Quadro 2: LOD em urina. Resultados obtidos para determinação do limite de detecção do método analítico em urina..... **Página 48**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMA – Agência Mundial Antidopagem

bEPO – Eritropoietina sanguínea

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*

COI – Comitê Olímpico Internacional

DNA – Ácido desoxirribonucleico

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 – Fatores de indução à hipóxia

HRP – *Horseradish* peroxidase

IAAF – Federação Internacional de Atletismo

IEF - Isoeletrofocalização

IgG – Imunoglobulina G

ISL – *International Standards for Laboratories*

JCB – Jockey Club Brasileiro

MS – Espectrometria de Massas

LADETEC – Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico

LBCD – Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem

LC-MS – Cromatografia Líquida com Espectrômetro de Massas, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

LFM – *Low fat milk* (leite desnatado)

LOD – Limite de Detecção

NESP – *Novel erythropoiesis stimulating protein*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – *Phosphate buffer saline* (tampão fosfato)

PEG – Polietilenoglicol

PHD – Prolil hidroxilases

pO₂ – Pressão parcial de oxigênio

PVDF – Polividileno

pVHL – Proteína supressora de tumor

reEPO – Eritropoietina equina recombinante

rEPOs – Eritropoietinas recombinantes

rHuEPO – Eritropoietina recombinante humana

TD2014EPO – Documento técnico da WADA para análises de EPO

THP – Glicoproteína Tamm-Horsfall

uEPO – Eritropoietina urinária

UCI – União Ciclística Internacional

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UPD – *Urine Precipitate Dissolution buffer*

WADA – *World Antidoping Agency* (AMA, em português)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Dopagem	1
1.1.1 Definição e História da dopagem	1
1.1.2 Atletas e sua relação com a dopagem – Casos famosos	3
1.2 Eritropoetina humana endógena	5
1.2.1 Síntese e mecanismo de ação	8
1.2.2 EPO e seus análogos	10
1.2.2.1 rHuEPO	11
1.2.2.2 NESP	13
1.2.2.3 CERA	14
1.2.2.4 EPO-Fc	14
1.2.2.5 Detecção dos análogos – SAR-PAGE.....	16
1.3 Dopagem de cavalos	20
1.3.1 rHuEPO em Cavalos de Corrida	22
1.3.2 EPO equina	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 Geral	26
2.2 Específicos	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 Estudo em animais	27
3.2 Amostras fortificadas	27
3.3 Preparação das amostras	28
3.3.1 Urina	28
3.3.2 Sangue	29
3.4 Análise SAR-PAGE e <i>western blotting</i>	29
3.5 ELISA	31
3.6 Validação do método	31
3.6.1 Parâmetros de validação	31

3.6.1.1 Especificidade	31
3.6.1.2 Limite de detecção (LOD)	32
3.6.1.3 Arraste	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Otimização da imunopurificação	34
4.2 Validação do Método	39
4.2.1 Especificidade e Arraste	39
4.2.2 Limite de detecção (LOD)	44
4.3 Estudo de excreção	48
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	55
6. REFERÊNCIAS	57
7. ANEXO (ARTIGO)	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dopagem

1.1.1 Definição e História da dopagem

Por definição, é considerado dopagem o uso de substâncias ou métodos capazes de aumentar artificialmente o desempenho esportivo e que estejam listados pela AMA/COI (Agência Mundial Anti-dopagem/Comitê Olímpico Internacional), sejam eles potencialmente prejudiciais à saúde do atleta ou a de seus adversários, ou contrário ao espírito do jogo (RUBIO, K., NUNES, A. 2010). Dopagem – do inglês “doping” - é popularmente conhecida como a utilização de substâncias ou métodos proibidos capazes de promover alterações físicas e/ou psíquicas que melhoram artificialmente o desempenho esportivo do atleta (ABCD, 2018). A utilização destes métodos ou substâncias, além do aumento na performance, pode causar sérios riscos à saúde. Esteroides são as drogas que muitas vezes vêm à mente quando falamos de dopagem, mas esta prática também inclui o uso de outros medicamentos proibidos para atletas, como estimulantes, hormônios, diuréticos e narcóticos; e também o uso de métodos proibidos, como transfusões de sangue, dopagem genética, ou manipulação química.

De acordo com relatórios antigos, vários métodos eram utilizados para melhorar a performance atlética de humanos já no final do terceiro século a.C, tais como, ingestão de testículos para aumentar a virilidade, cogumelos alucinógenos e extratos da planta Ephedra para melhorar a performance, entre outros. Tais práticas foram estritamente proibidas pelas regras dos Jogos Olímpicos (MÜLLER, 2010).

Embora as tentativas de melhorar o desempenho atlético sejam provavelmente mais antigas, a palavra "doping" só foi mencionada pela primeira vez em 1889 em um dicionário de inglês. Este dicionário descreveu originalmente como sendo um remédio misto contendo ópio, que seria usado para "dopar" cavalos. Chamado de "dope", era um preparado de resíduos de uvas, que os guerreiros zulus usavam como "estimulantes" em lutas e procedimentos

religiosos e que também supostamente eram chamados de "doop" em africâner ou holandês. Mais tarde, o significado de "dope" foi estendido em um sentido mais amplo para outras bebidas com propriedades estimulantes. A expressão foi introduzida no Turfe por volta de 1900 para denominar as drogas ilegais aplicadas em cavalos de corrida (MÜLLER, 2010).

Numerosos casos de dopagem foram relatados entre o final do século XIX e a segunda metade do século XX, quando foram iniciados os testes oficiais em atletas humanos. Em paralelo, as primeiras definições e regulamentos contra a dopagem no esporte apareceram. A Federação Internacional de Atletismo (IAAF) foi a primeira a proibir o uso de substâncias estimulantes no esporte, mas estas regras permaneceram ineficientes até possíveis testes estarem disponíveis. Os primeiros testes de controle de dopagem funcionaram como um protótipo do que viria a ser a análise anos mais tarde, e ocorreram durante os Jogos de Inverno, em Grenoble, e nos Jogos de Verão, no México, em 1968, quando foram aplicadas as primeiras desqualificações pelo abuso de substâncias proibidas pelo Comitê Olímpico Internacional (COI). O primeiro atleta flagrado foi o sueco Hans-Gunnar Liljenwall, do pentatlo moderno, pelo uso de álcool.

Por mais que as primeiras tentativas de detectar práticas de dopagem datem de cerca de um século atrás, as possibilidades analíticas em relação à sensibilidade e à certeza dos resultados permaneceram bastante restritas até a década de 70. As primeiras técnicas para análise de controle de dopagem incluindo cromatografia ocorreram durante os Jogos Olímpicos de 1972 em Munique. Seguindo rapidamente o desenvolvimento técnico de novos princípios analíticos, a espectrometria de massa (MS) e sua combinação com a cromatografia gasosa tornaram-se a instrumentação padrão para a detecção e quantificação da maioria dos agentes de dopagem. Após as Olimpíadas de Seoul, em 1988, o número de agentes dopantes começou a crescer continuamente juntamente com o desenvolvimento de drogas sintéticas, o que permanece até os dias atuais. (HEMMERSBACH, 2008).

Em 1999, então, com o objetivo de articular a luta contra a dopagem, foi criada a Agência Mundial *Antidoping* (AMA/WADA), uma organização independente proposta pelo Comitê Olímpico Internacional (COI). A AMA possui

uma rede de 30 laboratórios ao redor do globo acreditados para análise de dopagem em urina e sangue de atletas. Na América do Sul, somente o Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD), localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), possui a acreditação para realização das amostras.

Publicada anualmente pela AMA (WADA, 2019), A Lista de Substâncias Proibidas permite que os atletas e suas equipes saibam quais são as substâncias vetadas durante as competições e também fora delas. Essa lista é frequentemente atualizada, de forma que os competidores consigam estar sempre informados do que podem ou não consumir. Algumas dessas substâncias, como os estimulantes e canabinoides, são vetados apenas em competição, enquanto que hormônios, anabolizantes e diuréticos são proibidos tanto em competição quanto fora de competição. No Brasil, atletas que são flagrados fazendo o uso de tais substâncias são penalizados de acordo com as regras do Código Brasileiro de Justiça Desportiva, elucidando que as infrações por dopagem são reguladas pela lei, pelas normas internacionais pertinentes e, de forma complementar, pela legislação internacional referente à respectiva modalidade esportiva (PANISA, A., DORIGON, A., 2017). Por sua vez, o Código Mundial Antidopagem aplica aos atletas flagrados no exame de doping sanções disciplinares que podem ir desde uma advertência até a suspensão vitalícia da atividade desportiva praticada por ele.

1.1.2 Atletas e sua relação com a dopagem – Casos famosos

Apesar dos apelos iniciais pelo banimento do uso de agentes dopantes, casos letais contribuíram para a crescente conscientização pública deste problema. As mortes do ciclista dinamarquês Knut Enemark Jensen, nos Jogos Olímpicos de Verão de 1960, em Roma, e do ciclista britânico Tommy Simpson em 1967, no Mont Ventoux, durante o Tour de France, ambos por uso de anfetaminas, iniciaram os debates acerca do consumo de tais agentes. A morte de Jensen levou o COI a formar uma comissão médica. Casos fatais em outros esportes naquela época também estavam relacionados ao abuso de estimulantes, como o do levantador de pesos Billi Bello em 1963, pelo uso indiscriminado de heroína, e de Dick Howard, um saltador, em 1960. A despeito

de casos fatais confirmados, deve-se enfatizar que a correlação entre morte súbita no esporte e a dopagem, naquela época, ainda era muito provavelmente uma suspeita, e não um diagnóstico justificado de acordo com os padrões forenses. Ainda que o atleta fosse flagrado fazendo o uso de substâncias proibidas, em um caso real de morte posterior não se podia realmente provar que a dopagem fora a causa da morte. Por outro lado, uma causa natural de morte não excluía necessariamente qualquer uso anterior de agentes dopantes. Nos dias atuais, no entanto, são raros os casos de morte em períodos ativos de esporte de alta performance (BUX, R. *et al*, 2008)

Um dos casos mais famosos conhecidos atualmente é o de Lance Armstrong (figura 1). Armstrong é um ex-ciclista profissional americano, que ficou mundialmente famoso por ter vencido o *Tour de France* sete vezes consecutivas entre 1999 e 2005. Apesar da fama por ter atingido tantos pódios em primeiro lugar, em 2012, já aposentado, perdeu todos os títulos obtidos depois de 1998, inclusive os títulos do *Tour de France*, e foi banido do ciclismo competitivo pela União Ciclística Internacional (UCI), em razão do abuso de substâncias proibidas (USADA, 2018). No caso em questão, o atleta mundialmente conhecido e aclamado, fazia uso do hormônio eritropoietina, de forma a melhorar seu desempenho e resistência durante as competições.



Figura 1. Lance Armstrong, durante sua 6ª corrida disputada no *Tour De France*, na França, em 2004. Foto via The New York Times.

1.2 Eritropoetina humana endógena

Desde 2004, e conforme determinado pelo Código Mundial de Antidopagem, a AMA vem publicando a Lista Anual de Substâncias e Métodos Proibidos (WADA, 2019). A Lista identifica as substâncias e métodos proibidos dentro e fora de competição. As substâncias e métodos na Lista são classificados por diferentes categorias (por exemplo, esteróides, estimulantes, dopagem genética). O papel da AMA, por meio de seu Grupo de Especialistas em Lista e Comitê de Saúde, Medicina e Pesquisa, é facilitar o período de consulta antes de preparar e publicar a Lista até 1º de outubro do ano anterior para permitir sua introdução no início do ano seguinte.

Uma das substâncias na lista de substâncias proibidas para atletas é a eritropoietina, que está associada, geralmente, ao abuso por atletas praticantes de esportes de resistência, esportes que exigem grandes aportes de oxigênio tecidual. Ela está classificada na seção S2 da Lista, que se refere a hormônios, fatores de crescimento e substâncias relacionadas.

A eritropoietina (EPO) é um hormônio de natureza glicoproteica secretado pelos rins e é o principal regulador da eritropoiese em seres humanos e outros animais (ADAMSON, J. 1996; JELKMANN, W., METZEN, E. 1996). Suas formas recombinantes têm sido utilizadas indiscriminadamente por atletas, pois aumentam a concentração de glóbulos vermelhos, gerando maior aporte de oxigênio ao tecido muscular. Com esses “benefícios”, dependendo da modalidade esportiva, os atletas conseguem aumentar artificialmente o seu desempenho, levando a consagrações no esporte através da diminuição do seu tempo de prova, subir a pódios e, em alguns casos, quebrar recordes. Em comparação com as formas clássicas de dopagem sanguínea, isto é, transfusões homólogas ou autólogas, que requerem infraestrutura e ajuda profissional, o aumento da massa de glóbulos vermelhos pode ser mais facilmente alcançado usando injeções de eritropoietina recombinante humana (rHuEPO) por via subcutânea ou intravenosa. Rumores sobre o abuso da rHuEPO nos esportes surgiram simultaneamente à comercialização da rHuEPO em 1987, antes dos Jogos Olímpicos de Inverno de Calgary. Naqueles tempos, médicos e especialistas em sangue alegaram que a droga poderia estar

implicada na morte de 18 profissionais europeus nos últimos anos. Entre as disciplinas esportivas estavam esportes de resistência como esqui *cross-country*, ciclismo, atletismo e triátlon. Em 1990, a administração de rHuEPO foi banida pelo COI e foi incluída na Lista de Proibições da AMA desde a sua criação, com o objetivo de preservar a saúde dos atletas e a ética no esporte (WADA, 2019; BARROSO, O. 2008)

A EPO humana foi purificada, pela primeira vez, em 1977. Alguns anos depois, nos anos 80, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, a indústria farmacêutica iniciou a produção do hormônio sintético, rHuEPO. O medicamento, no entanto, era utilizado para fins de tratamento na clínica médica em pacientes portadores de doenças renais ou anemia (RIVIER, L. 1999). Neste segmento, a utilização do medicamento visa melhorar a qualidade de vida dos pacientes necessitados de transfusões sanguíneas, que passam, agora, a tomar injeções do hormônio por via subcutânea ou intravenosa. Hoje, vários laboratórios da indústria farmacêutica produzem o hormônio sintético, e embora a atividade fisiológica do medicamento, quando comparado com o hormônio produzido pelo organismo, seja idêntica, a estrutura química não é a mesma.

A EPO é um glicopeptídeo que consiste de 193 aminoácidos, sendo 27 destes representantes da sequência expressa apenas para a secreção do hormônio (figura 2A). Ao entrar na corrente sanguínea, além da perda dos 27 aminoácidos responsáveis pela secreção do hormônio, há, ainda, a perda do aminoácido arginina na porção carboxi-terminal. Esta passa a ser, então, a sequência definitiva, com os 165 aminoácidos alinhados em uma única cadeia polipeptídica, que contém duas pontes dissulfeto intramoleculares e quatro cadeias polissacarídicas independentes, ligadas a resíduos de aminoácidos específicos (EGRIE, JC.; BROWNE, JK. 2001). As duas pontes dissulfeto são formadas entre Cys-7 com Cys-161 e Cys-29 com Cys-33 (figura 2B) (NG, T. *et al*, 2003). As quatro cadeias polissacarídicas são as porções glicosiladas, sendo três N-glicosilações (Asn-24, Asn-38 e Asn 83) e uma O-glicosilação, ligada à porção protéica da eritropoietina na Ser-126. Estas porções glicosiladas constituem cerca de 40% da massa molecular da EPO, que é de aproximadamente 30,4 kDa, estando relacionadas à função hormonal. Estima-

se que a meia-vida da EPO, após lançamento na circulação sanguínea, seja da ordem de seis a oito horas.

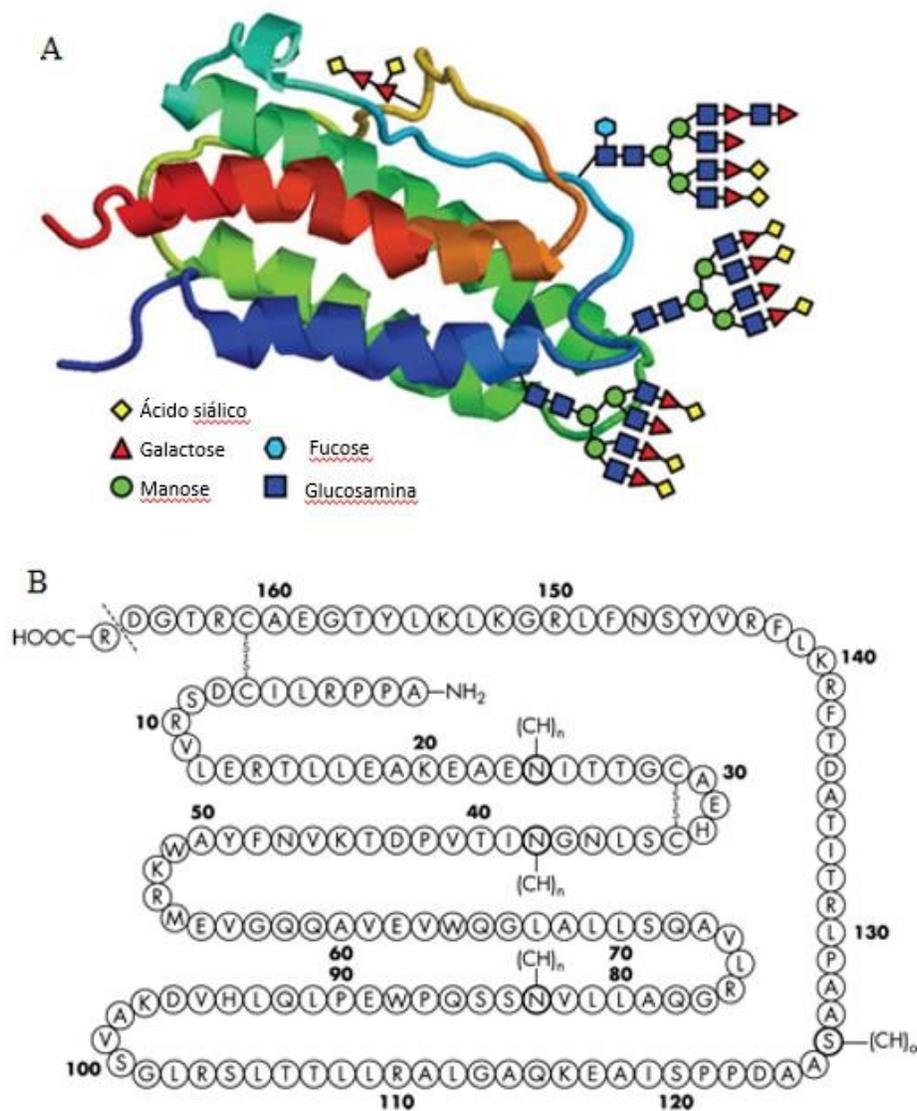


Figura 2. Estrutura da molécula de eritropoietina humana. A. Estrutura geral e tridimensional da EPO humana, indicando a cadeia composta de açúcares como o ácido siálico. As glicosilações estão representadas pela legenda de cores. B. Esqueleto da estrutura primária. Glicosilação N-terminal nos resíduos de asparagina 24, 38, 83; Glicosilação O-terminal no resíduo de serina 126. O resíduo de arginina 166 na porção carboxi-terminal da molécula é removido logo que a EPO é enviada à circulação. (Adaptado de Ng T, *et al.* 2003)

1.2.1 Síntese e mecanismo de ação

A síntese de EPO é mediada pelo fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1), responsável pela ativação de pelo menos 20 genes, incluindo o da EPO (REICHEL, C.; GMEINER, G. 2010).

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. HIF-1 α e HIF-2 α mostram uma maior semelhança entre si em comparação com o HIF-3 α . HIF-1 β , o parceiro de heterodimerização das isoformas HIF- α , é permanentemente presente no núcleo, independentemente do suprimento de O₂ (BRUEGGE, K., JELKMANN, W., METZEN, E., 2007).

A estabilização e ativação do HIF-1 é principalmente regulada por modificações pós-traducionais que dependem da pressão parcial de O₂ (pO₂). Enquanto o nível nuclear da subunidade β é independente da pO₂, a estabilização do HIF-1 α está diretamente ligada à diminuição do fornecimento de O₂, enquanto que a reoxigenação leva a uma rápida degradação do HIF-1 α . 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 prolinas 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 O₂ 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 3). 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 alvos induzidos por hipóxia, como o gene da EPO (BRUEGGE, K., JELKMANN, W., METZEN, E., 2007).

A eritropoiese, que normalmente ocorre em níveis basais para substituir glóbulos vermelhos senescentes, é altamente induzida pela perda de hemácias, diminuição de oxigênio no ambiente e outros estímulos que diminuem a entrega

de oxigênio aos tecidos. Em estados graves de hipóxia, a produção de EPO é aumentada até 1.000 vezes, através da atuação das HIFs. O hormônio é secretado pelas células renais, circula no sangue e se liga a receptores expressos especificamente nas células progenitoras eritróides da medula óssea, promovendo a viabilidade, proliferação e diferenciação dos precursores eritróides, resultando no aumento da massa de células da linhagem eritrocítica (EBERT, B., BUNN, H., 1999).

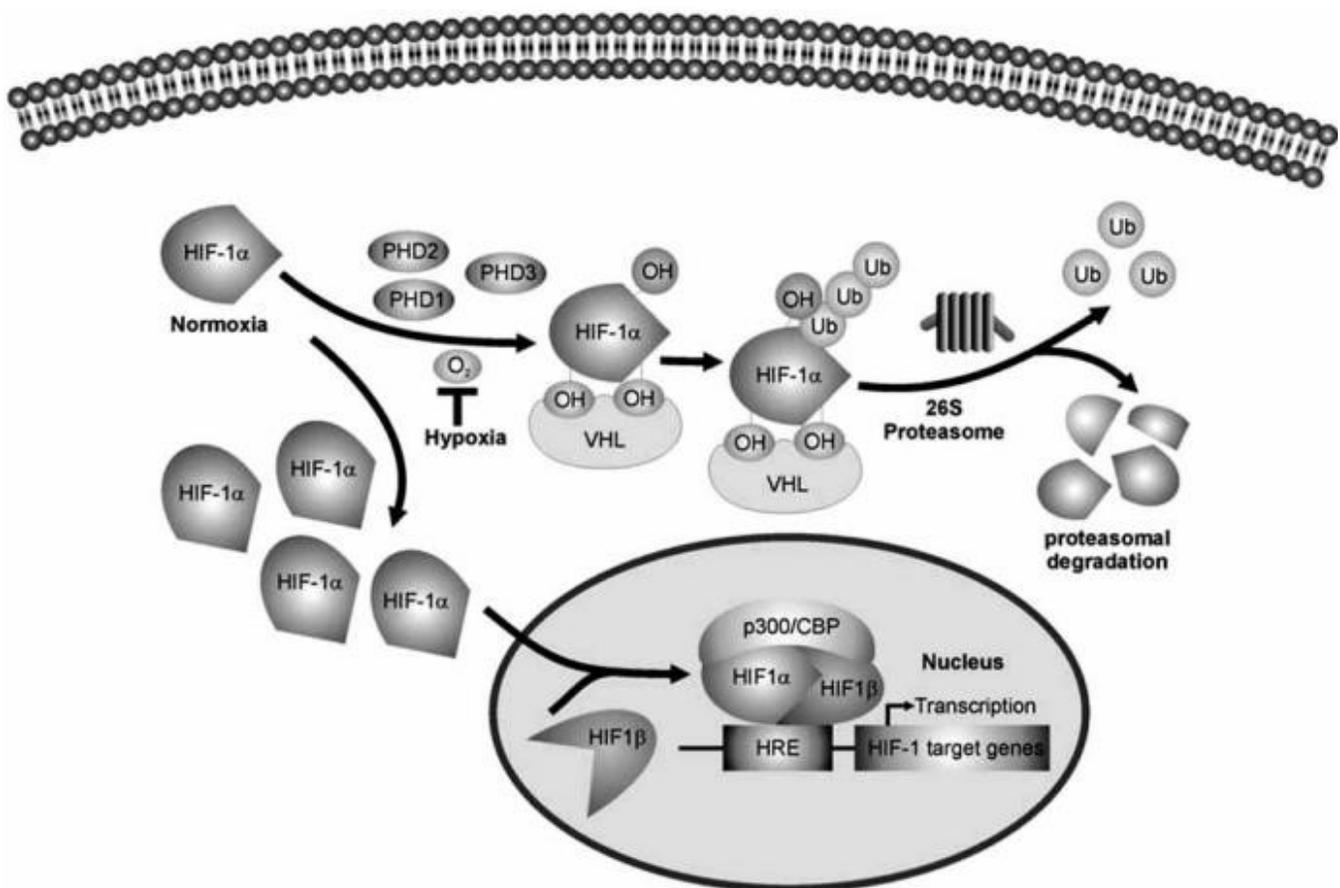


Figura 3. Mecanismo de atuação das HIFs em situações de hipóxia e normóxia. HIF-1 α atua pela diminuição do suprimento de oxigênio, ou seja, em estado de hipóxia ela permanece estável e estimula a produção da EPO. Já em situações de normóxia, quando há suprimento de oxigênio, a HIF-1 α é degradada, sendo hidroxilada pelas proteínas proil hidroxilases (PHDs) e reconhecida pela proteína supressora de tumor pVH, sendo então enviada ao proteossoma para degradação final. (Extraído de Bruegge K, et al., 2007).

A capacidade de transporte de oxigênio do sangue é, então, aumentada, elevando a tensão de oxigênio nos tecidos e completando, assim, o ciclo de produção e efeito. Sendo assim, a oxigenação tecidual regula a produção de EPO em resposta à hipóxia, em um sistema de feedback negativo (figura 4). Logo, em baixa de oxigênio, a produção de EPO e eritropoiese aumentam.

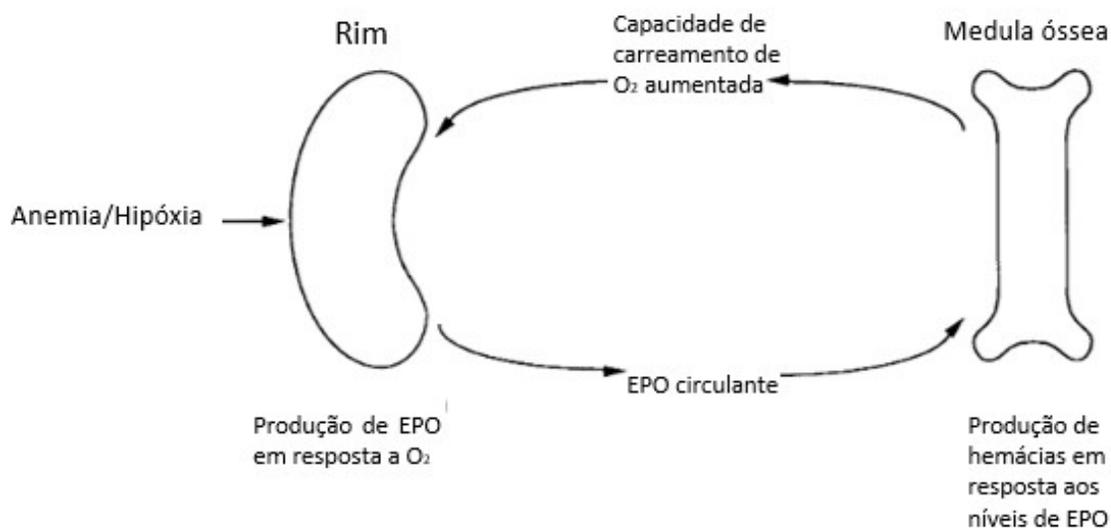


Figura 4. Representação da atuação e produção da EPO e regulação da em resposta à hipóxia. (Adaptado de Ebert, 1999).

1.2.2 EPO e seus análogos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a denominação comum internacional deve ser utilizada para substâncias biológicas e biotecnológicas (OMS, 2016). O nome dos fatores sanguíneos do tipo eritropoietina devem ser compostos de um sufixo (-poetina). Para eritropoietinas com a mesma sequência de aminoácidos da eritropoietina humana, o nome *epoetina* deve ser usado. Se a sequência de aminoácidos for diferente, deve-se utilizar um prefixo aleatório (por exemplo, *darbepoetina*). Uma letra grega adicional indica que existem diferenças na glicosilação padrão (por exemplo, *darbepoetina* alfa, *epoetina* alfa, *epoetina* beta, *epoetina* ômega, etc). Devido a

estas diferenças estruturais, a meia-vida sérica das eritropoietinas é diferente (REICHEL, C., GMEINER, G., 2010).

Atualmente existem vários tipos de rHuEPO, como a alfa, a beta, delta, a ômega, entre outras. Apesar de estas formas atuarem no mesmo receptor de EPO, existem algumas variações de glicosilação que levam a diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre elas. As epoetinas alfa e beta são sintetizadas a partir de células CHO (linhagem celular de ovário de hamster, do inglês *Chinese Hamster Ovary cell*), enquanto que a ômega é produzida a partir de células BHK (linhagem celular proveniente de rins de hamster, do inglês *Baby Hamster Kidney*). Apesar de as células CHO e BHK glicosilarem proteínas de modo bastante similar ao que ocorre na célula humana, algumas regiões de carboidratos não são sintetizadas por estas células devido à ausência de enzimas açúcar-transferases específicas. Enquanto a síntese da cadeia peptídica é geneticamente regulada, as cadeias polissacarídicas são processadas e ligadas por uma série de reações enzimáticas (BENTO, R., DAMASCENO, L., NETO, F., 2003).

Estudos em EPO humana demonstraram que há uma relação direta entre o teor de carboidratos contendo ácido siálico e sua meia-vida sérica e atividade biológica *in vivo* (EGRIE, J., BROWNE, J., 2001). Essas observações levaram à hipótese de que aumentar o teor de carboidratos, além do encontrado naturalmente, levaria a uma molécula com atividade biológica aumentada. Os análogos da EPO humana foram desenvolvidos para testar esta hipótese.

1.2.2.1 rHuEPO

A forma recombinante da EPO, a EPO humana recombinante (rHuEPO), ficou disponível comercialmente a partir de 1987, quando então passou a ser usada com sucesso na clínica médica, melhorando a qualidade de vida de pacientes que necessitavam de sucessivas transfusões de sangue, ou com quadros de anemia por insuficiência renal crônica (EKBLUM, B., 2002). Nesta época, a dificuldade de detecção, para controle de dopagem, deveu-se ao fato de a rHuEPO ser uma macromolécula complexa, presente em concentrações baixas nos fluidos biológicos, com estrutura bastante semelhante à da sua forma

endógena, o que impossibilitava sua identificação inequívoca (BENTO, R., DAMASCENO, L., NETO, F., 2003).

A epoetina alfa foi a primeira eritropoetina recombinante. Tem sido comercialmente produzida desde 1987 e está disponível mundialmente. Ela é produzida a partir de células CHO, que é transfectada com o gene da EPO humana (REICHEL, C., GMEINER, G., 2010). Possui a mesma sequência de aminoácidos (figura 2) e a mesma atividade biológica da EPO endógena, com peso molecular de aproximadamente 30,4 KDa (figura 5).

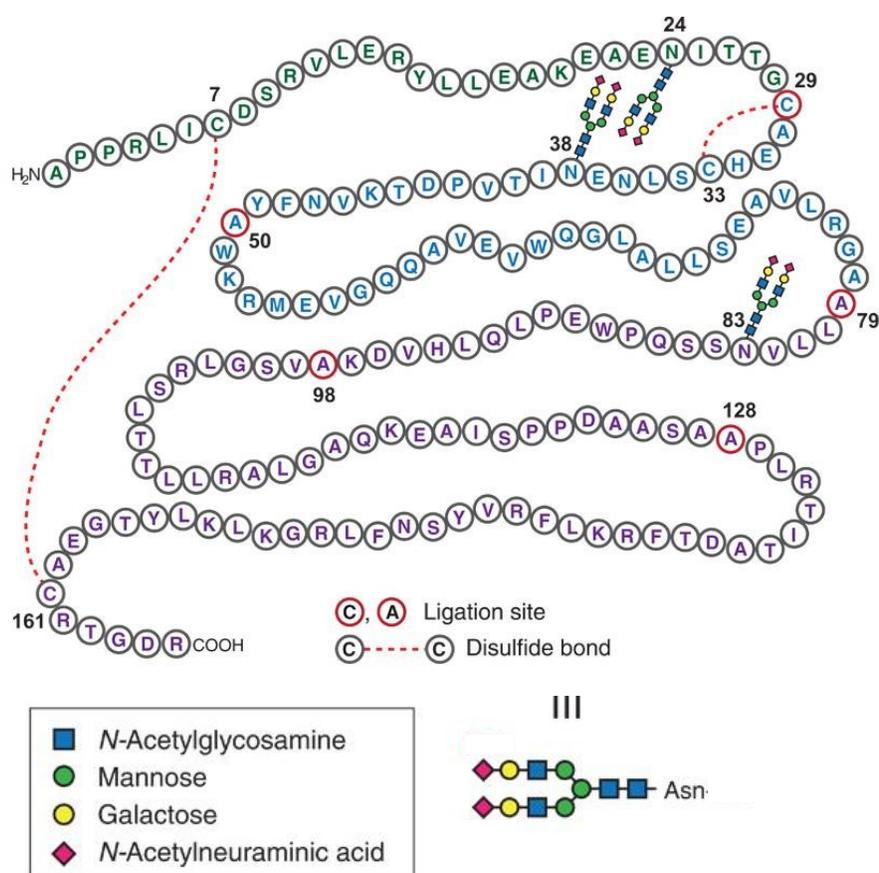


Figura 5. Estrutura primária da rHuEPO. Estrutura primária da EPO recombinante mostrando a sequência de aminoácidos, locais de glicosilação, locais de ligação (círculo vermelho) e ligações dissulfeto (linha pontilhada vermelha). A glutamina na posição 78 foi substituída por alanina. (MURAKAMI, M, *et al*, 2016)

1.2.2.2 NESP

Com o intuito de prolongar a meia vida da molécula de EPO no organismo, em 2001 foi introduzida no mercado uma rHuEPO hiperglicosilada, conhecida como *Novel erythropoiesis stimulating protein* (NESP; darbepoetin-alfa). Nesta EPO recombinante, é utilizado um processo chamado “mutagênese local”, onde o esqueleto polipeptídico da molécula é modificado, levando à criação de cinco sítios de N-glicosilação, em comparação com três da EPO endógena (figura 6) (NG, T., *et al.*, 2003). Como a N-glicosilação confere a atividade biológica à EPO, um aumento no número de locais de glicosilação pode aumentar a sua atividade. Sendo assim, a NESP é uma molécula que estimula a eritropoiese pelos mesmos mecanismos da EPO nativa e da rHuEPO. Ela também contém resíduos extras de ácido siálico, o que permite maior estabilidade e aumenta o seu tempo de meia-vida (MACDOUGALL, I., 2001).

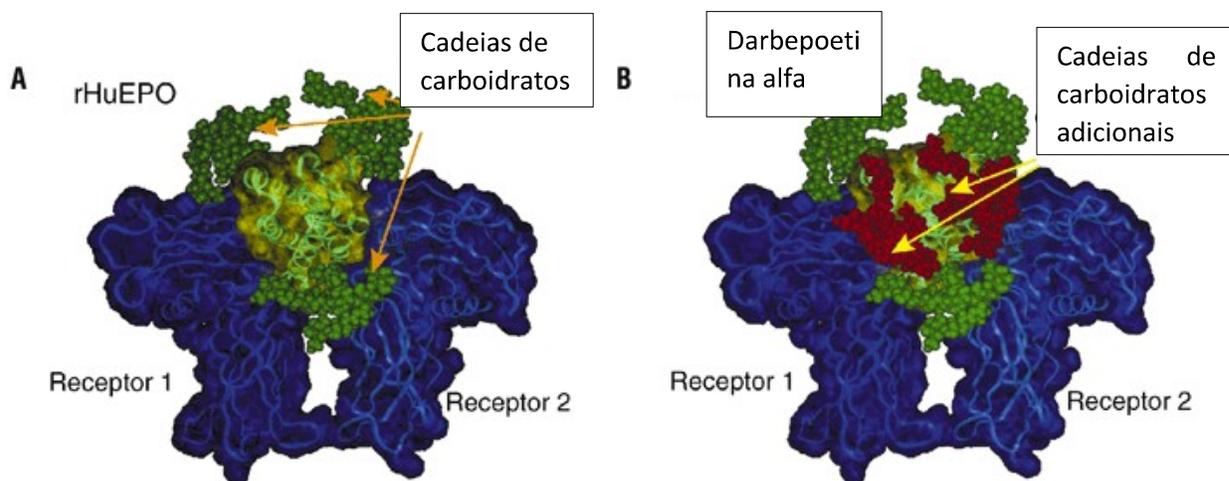


Figura 6. Comparação entre a molécula de rHuEPO (A) e a de NESP (B). (Adaptado de ELLIOT, S., Phama, E., MACDOUGALL, I., 2008).

Quando comparada com a rHuEPO, a NESP possui uma carga negativa mais alta e maior tempo de meia vida, além de peso molecular de aproximadamente 37 kDa. No tratamento clínico, o cronograma de dosagem e aplicação em pacientes pode ser feito com menor frequência, sem alterar a eficácia e com a mesma segurança da rHuEPO, podendo também ser utilizada no tratamento da anemia proveniente de doença renal crônica.

1.2.2.3 CERA

Com o objetivo de aumentar ainda mais a meia-vida da eritropoietina recombinante, sua estrutura foi quimicamente modificada para gerar o Ativador Contínuo do Receptor de Eritropoietina (CERA), vendido como MIRCERA. A CERA faz parte da terceira geração de medicamentos à base de EPO e contém um grupamento de metoxi polietilenoglicol (PEG), tornando-se então uma forma PEG-lada de epoetina beta, uma metoxi polietilenoglicol-Epoetina beta (figura 7) (REICHEL, C., GMEINER, G., 2010). Esta forma da glicoproteína é primeiramente expressa em células CHO e depois é então ligada, através de um grupo amino, em uma molécula de metoxi polietilenoglicol (PEG, com 30 kDa). Esta PEG-lação ocorre na porção N-terminal (Ala1), elevando a massa molecular da CERA a 60 kDa. Devido à sua afinidade alterada ao receptor de EPO, a meia-vida sérica da CERA torna-se ainda maior (cerca de 130h), podendo ser usada na clínica médica para tratamentos de anemia a cada 3 ou 4 semanas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (MACDOUGALL, I., KAI-UWE, M., 2006). Por conta de sua estrutura alterada, maior massa molecular e meia-vida sérica prolongada, ela é dificilmente excretada na urina, e, portanto, deve ser preferencialmente testada em sangue, para fins de controle de dopagem (REICHEL, C., ABZIEHER, F., GEISENDORFER, T., 2009). Por conta de sua diferença molecular, a CERA pode ser facilmente diferenciada de outras epoetinas através de análises de Isoeletrofocalização e SDS-PAGE/SAR-PAGE.

1.2.2.4 EPO-Fc

Como visto, o prolongamento da meia-vida no soro pode ser obtido pela fusão da molécula com outras proteínas por uma transformação química (como é o exemplo da CERA, onde há o acoplamento com PEG) ou através de uma mudança genética (como a NESP). Todas essas modificações retardam a eliminação da EPO da corrente sanguínea, devido à filtração glomerular menos eficiente (REICHEL, C., THEVIS, M., 2012).

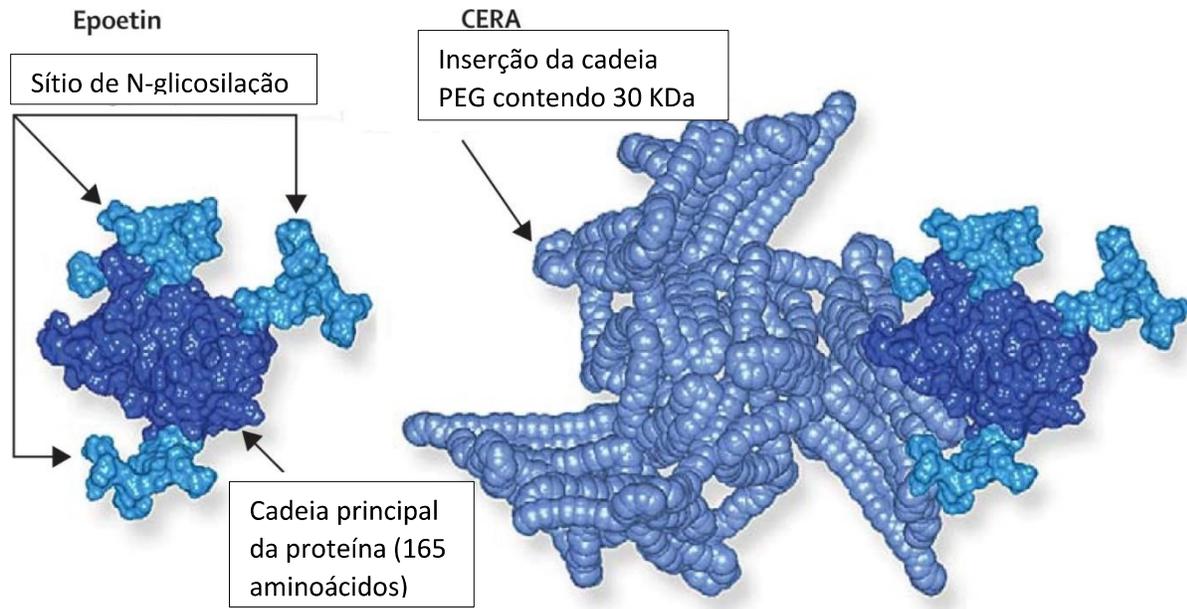


Figura 7. Comparação de epoetina alfa e CERA. Estrutura da epoetina com as 3 cadeias de carboidrato acopladas nos sítios N-terminais (ligação O-terminal omitida), em comparação com a estrutura tridimensional da CERA, onde há o acoplamento da porção PEG, elevando seu peso molecular. (Extraído de Macdougall, 2006).

A indústria farmacêutica propôs o desenvolvimento de um fármaco capaz de ser inalado e absorvido pelos pulmões, e que tivesse as mesmas características de hematopoiese da EPO humana. Estudos na área foram feitos a fim de acoplar a molécula de EPO a uma proteína que pudesse ser absorvida por via inalatória, sendo, assim, um meio menos invasivo. O receptor neonatal da região Fc (FcRn) é expresso em humanos na placenta, com função de transportar IgG da mãe para o feto, e também em vários tecidos epiteliais absorptivos, incluindo pulmão, rins e intestino. A expressão de FcRn no epitélio absorptivo, como é o caso dos pulmões, sugere que o FcRn pode ser explorado para a absorção de proteínas terapêuticas, como a EPO-Fc, através da conjugação de proteínas a um ligante de FcRn, tal como o fragmento Fc da IgG. Isso permitiria seu transporte através do epitélio (BITONTI, A., *et al.* 2004).

A EPO-Fc produzida em células CHO é uma cadeia polipeptídica dimérica, glicosilada, constituída de duas moléculas de EPO ligadas à porção Fc da imunoglobulina humana IgG (figura 8) (MESONZHNIK, N., *et al.* 2018). A IgG da imunoglobulina humana é composta por quatro polipeptídeos ligados covalentemente por ligações dissulfeto (duas cópias idênticas da cadeia leve e

da cadeia pesada), onde sua proteólise pela papaína gera dois fragmentos Fab e um fragmento Fc. A estrutura do fragmento Fc é quase a mesma entre todos os subtipos de imunoglobulina humana e está entre uma das proteínas mais abundantes no organismo, compondo de 70 a 75% do total de imunoglobulinas no soro. A meia-vida da IgG em circulação é a mais longa entre os cinco tipos de imunoglobulina, podendo chegar a 21 dias. Estas proteínas de fusão têm uma meia-vida *in vivo* significativamente mais longa, mantendo as suas propriedades biológicas e terapêuticas (WANG, H., *et al.* 2006). A atividade aumentada deve-se à ligação mais eficiente do dímero de EPO ao seu receptor; e a meia-vida prolongada *in vivo* deve-se ao tamanho maior da proteína dimérica. Desse modo, o tempo de meia vida da molécula no organismo torna-se aumentado.

1.2.2.5 Detecção dos análogos – SAR-PAGE

Durante vários anos foram pesquisadas maneiras de contornar o problema da dopagem por rHuEPO devido à impossibilidade de sua detecção e diferenciação, por se tratar de uma substância estruturalmente complexa de elevada massa molecular, presente em baixas concentrações nos fluidos biológicos e bastante semelhante à sua forma endógena (BENTO, R., DAMASCENO, L., NETO, F., 2003).

A detecção dos agentes estimuladores da eritropoiese, nos laboratórios que analisam amostras provenientes de possíveis casos de dopagem, ocorre por meio da técnica de SAR-PAGE. De acordo com o Documento Técnico para ESAs da AMA, a técnica de SAR-PAGE deve ser utilizada para amostras de triagem e de confirmação, para todos os analitos envolvidos, como pode ser observado na Tabela 1 (WADA EPO Working Group, 2014). A detecção por essa técnica passa por alguns passos antes de se obter o resultado. Primeiro, há a imunopurificação da amostra de urina ou plasma/soro, seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida com detergente sarcosil (SAR-PAGE). O gel, após a corrida, passa por uma imunotransferência, onde as proteínas serão transferidas a uma membrana de polividileno (PVDF), que passa por incubações com agente bloqueador e anticorpos. Ao final do processo, a membrana é revelada por uma reação de quimioluminescência.

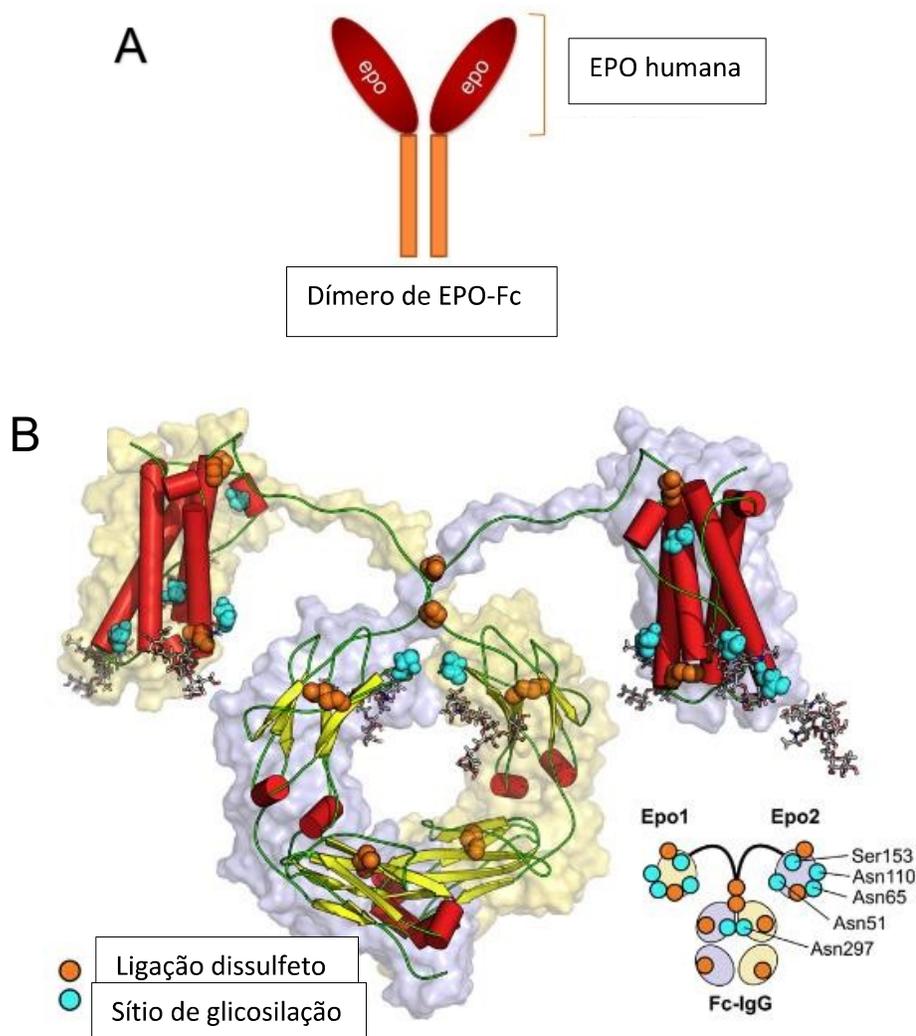


Figura 8. Estrutura da EPO-Fc. A. Esquema simplificado da estrutura da molécula de EPO-Fc, onde duas moléculas de EPO são ligadas ao fragmento Fc da imunoglobulina IgG. B. Modelo tridimensional da quimera dimérica EPO-Fc. O dímero possui duas cadeias de aminoácidos unidas por duas pontes dissulfeto, as cadeias A e B são mostradas na superfície roxo e marrom, respectivamente. A estrutura secundária da proteína quimérica está representada nos desenhos, onde as folha-beta pregueadas estão em amarelo, as alfa-hélices em vermelho, e os loops em verde. Os resíduos que formam as pontes dissulfeto e os sítios de glicosilação são mostrados em forma de esferas laranja e azul, respectivamente. No desenho menor ao lado direito, são mostrados três sítios de N-glicosilação de cada domínio EPO e do resíduo de Fc. (Adaptado de Salgado, R., 2005).

Tabela 1. Testes para ESAs na urina e no sangue de humanos (soro / plasma) por técnicas eletroforéticas (adaptado do TDEPO2014).

Initial Testing Procedure		Confirmation Procedure
Método	Resultado Presumível	Método
IEF and/or SAR-PAGE	rEPO	SDS-PAGE or SAR-PAGE
	NESP	IEF or SDS-PAGE or SAR-PAGE
	CERA	IEF or SAR-PAGE
SAR-PAGE	EPO-Fc	SDS-PAGE or SAR-PAGE
SDS-PAGE or SAR-PAGE	Peginesatide	SDS-PAGE or SAR-PAGE

As ESAs serão detectadas de acordo com a sua característica na membrana revelada. A recombinante rHuEPO, por exemplo, possui um *smear* logo acima da banda principal no gel. NESP, CERA e EPO-Fc apresentam bandas com peso molecular elevado e, portanto, se apresentam acima da rHuEPO em um gel revelado. As Figuras 9 e 10 ilustram revelações da membrana com EPO endógena, recombinante e análogos.

As rEPOs e seus análogos podem ser diferenciados da EPO endógena urinária (uEPO) e sanguínea (bEPO) com base na forma de sua banda característica e massa molecular diferente. O comportamento de migração (banda) de cada rEPO ou análogo, ou seja, posição e forma (largura, focalizada ou mais difusa) pode ser usado para confirmar a identidade da substância. Bandas adicionais, correspondentes às cadeias leves pesadas dos anticorpos utilizados para imunopurificação, podem estar presentes mas não interferem na interpretação dos resultados.

A detecção de bandas mistas, ou seja, contendo tanto a EPO endógena quanto uma recombinante, também é possível de ser realizada. Nestes casos, o formato da banda se assemelha ao da rEPO acrescido da banda endógena uEPO/bEPO. Uma área difusa ou fraca da banda acima da faixa endógena correspondente também é indicativa da presença de epoetina- α e β (Figura 11).

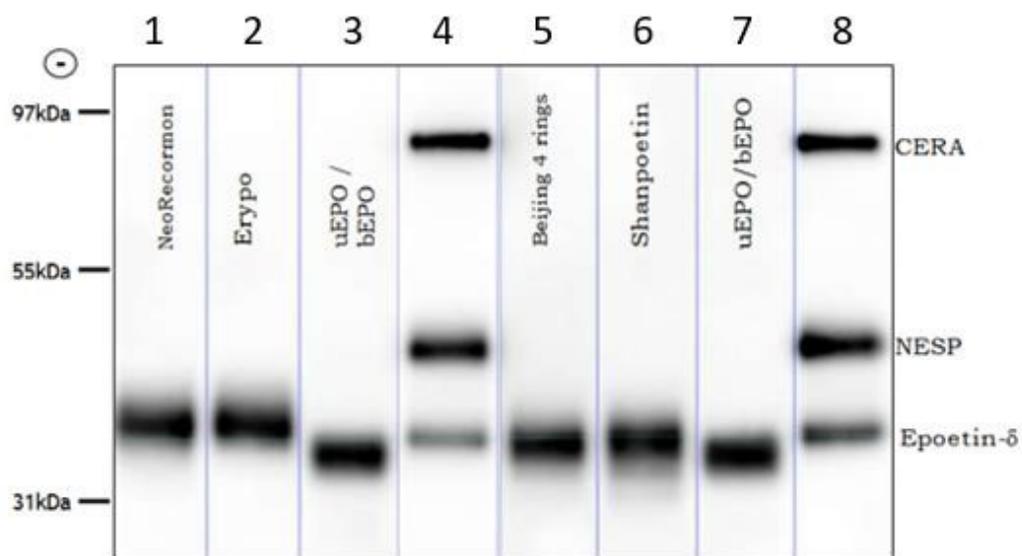


Figura 9. Imagem SDS-PAGE seguido de *western blotting* mostrando a característica de banda larga de algumas preparações Epoetin- α e - β comercialmente disponíveis (NeoRecormon®, Erypo®, anéis Beijing 4, Shanpoetin™). As posições relativas de EPO endógena, EPO, Epoetina, NESP e CERA são também mostradas. (Retirado do TDEPO2014).

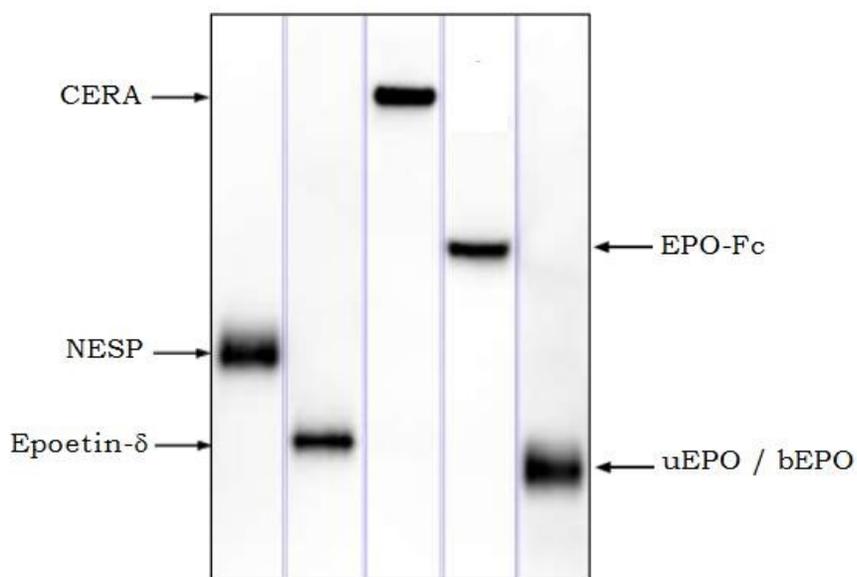


Figura 10. Imagem SAR-PAGE mostrando as massas moleculares aparentes mais altas de CERA (~60 KDa), EPO-Fc (~44 KDa), NESP (~37 KDa) e Epoetina- α (~34 KDa) em comparação com a uEPO / bEPO (~30 KDa) endógena. (Retirado do TDEPO2014).

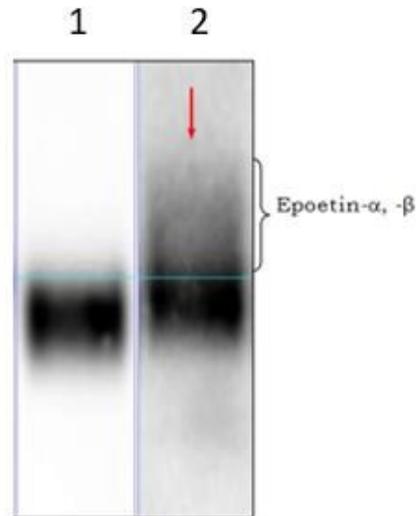


Figura 11. Revelação de membrana mostrando uma banda mista de EPO endógena e rHuEPO (seta vermelha, coluna 2). A área difusa da banda acima da banda endógena correspondente também é indicativa da presença de epoetina- α e β . A coluna 1 representa a EPO endógena (Retirado do TDEPO2014).

1.3 Dopagem de cavalos

A FEI (Federação Equestre Internacional) é a entidade mundial que rege os desportos equestres. A principal missão da FEI é promover o esporte equestre em todo o mundo, promovendo, regulando e administrando a competição internacional humanitária e esportiva em disciplinas equestres tradicionais (HIGGINS, A., 2006).

A FEI possui um Código de Conduta especificamente formulado para proteger o bem-estar do cavalo, bem como regras rígidas sobre o controle antidopagem e de medicações aplicadas nos animais. O controle do uso de drogas em equinos que participam de competições é necessário pois significa mais do que assegurar a justiça (proporcionando uma "igualdade de condições") ou tranquilizar os patrocinadores ou a opinião pública, embora todos esses fatores sejam significativos. Este controle perpassa por valores, uma vez que os atletas humanos decidem por si mesmos se desejam usar drogas; os cavalos, não. Como resultado, há uma dimensão moral e ética ao medicar animais. A FEI afirma que a atenção veterinária não deve ser negada a nenhum cavalo que requeira, e faz uma clara distinção entre medicação, ou seja, tratamento

veterinário justificadamente fornecido para salvaguardar a saúde e bem-estar do animal, e dopagem, ou seja, a intenção deliberada de afetar o desempenho de um cavalo ou para mascarar um problema de saúde subjacente. Lamentavelmente, uma minoria de competidores acaba utilizando de subterfúgios para manter um cavalo em uma competição, mesmo quando uma opinião veterinária objetiva e capacitada recomenda que o animal seja retirado dos treinos, tratado e descansado.

As pressões no hipismo de alto nível (onde a FEI exerce jurisdição), o crescente número de eventos no calendário e os níveis recordes de premiação em dinheiro, juntamente com um pequeno número de veterinários complacentes que podem favorecer as exigências dos competidores sobre as necessidades clínicas do cavalo, pode prejudicar severamente a vida de um animal. O teste de Substâncias Proibidas é, portanto, uma parte importante das operações da FEI. Em 2005, a FEI testou 2563 cavalos em 416 eventos em todo o mundo (HIGGINS, A., 2006).

A primeira aplicação de análises químicas, juntamente com uma série de resultados inesperados em corridas de cavalo ocorreu na Áustria no início do século XX. Uma série de relatos apontam que o Jockey Club Australiano – seguido de eventos suspeitos durante corridas de cavalo – convidou o químico russo Bukowski para ir à Viena, conseguindo detectar alcaloides na saliva de cavalos. Enquanto Bukowski manteve seu método em segredo, o professor Siegmund Frenkel elaborou seu próprio método na Universidade de Viena. No início do século XX, cerca de 220 análises foram realizadas, levando a diversas sanções sendo impostas aos treinadores após descobertas positivas em amostras de saliva equinas (MÜLLER, R., 2010).

Embora o suor, as fezes e a urina fossem também considerados, a saliva era o meio mais apropriado para testes forenses (MUNCH, J., 1934). Em 1912, testes de saliva foram introduzidos em todos os principais países de corrida, principalmente procurando por alcalóides, como teobromina, cafeína, cocaína, morfina e estricnina. Com a desqualificação automática dos cavalos testando positivo, a incidência de doping diminuiu brevemente. No entanto, quando as apostas em cavalos de corrida se tornaram recorrentes e foram legalizadas nos

EUA em 1933, a dopagem em cavalos explodiu, onde os estimulantes eram amplamente utilizados (HIGGINS, A., 2006). Estima-se que, naquela época, 50% dos equinos norte-americanos tinham um estimulante ou anestésico local administrado a eles antes de uma corrida, de modo que havia uma incidência muito maior de lesões durante as corridas causadas por insensibilidade à dor e falta de coordenação apropriada de movimentos musculares devidos à administração de doses maciças de cocaína, heroína, estricnina e cafeína.⁵⁶ As autoridades federais acabaram tomando medidas e testes de saliva e, posteriormente de urina, se tornaram rotineiros. Nas décadas seguintes, os Clubes Turfe de todas as principais nações de competição modificaram suas regras e impuseram verificações e controles rigorosos, bem como testes de rotina obrigatórios para a detecção de drogas.

1.3.1 rHuEPO em cavalos de corrida

O uso indevido da rHuEPO para melhorar o desempenho dos cavalos de corrida também é considerado doping, e está associado, além do maior aporte de oxigênio muscular, à mortalidade pelo aumento da viscosidade do sangue, coagulação e ataque cardíaco (PIERCY, R., SWARDSON, C., HINCHCLIFF, K., 1998; KEARNS, C., LENHART, J., McKEEVER, K., 2000). Além da ética envolvida no processo de dopagem de cavalos por seus treinadores, os animais podem enfrentar graves problemas de saúde relacionadas à administração do hormônio recombinante humano. Esses riscos potenciais para os cavalos levou os pesquisadores a identificar semelhanças entre a EPO humana e equina para o desenvolvimento de medidas que possam garantir a segurança dos animais.

Pelo fato de a EPO humana e a EPO equina (eEPO) possuírem elevado grau de similaridade (YU, N., *et al.* 2010) (figura 12), existe um risco de os cavalos produzirem anticorpos contra a rHuEPO, o que poderia ocasionar uma reação cruzada com a EPO equina, bloqueando a sua ação e levando o animal a quadros de anemia ou até mesmo morte (KEARNS, C., LENHART, J., McKEEVER, K., 2000). O abuso de rHuEPO e seus análogos promove um aumento no hematócrito sistêmico do cavalo e na absorção máxima de oxigênio, e esta é uma grande preocupação para os reguladores na indústria de corridas de cavalos porque, como muitas outras substâncias banidas, o uso de tais

agentes durante a competição viola a regra da concorrência leal e o bem-estar dos animais (McKEEVER, K., *et al.* 2016).

1.3.2 EPO equina

A sequência de aminoácidos da EPO já foi obtida para humanos, macacos, suínos, cães, gatos, coelhos e ratos. Um elevado grau de conservação na sequência de aminoácidos da EPO é evidente entre as espécies, e embora apenas a sequência parcial de DNA genômico da eEPO (EPO equina) tenha sido descrita, estima-se que aproximadamente 80% da sequência seja conservada entre a HuEPO e a eEPO (SATO, F., *et al.* 2004). SATO e colaboradores, em 2004, determinaram a sequência de aminoácidos representantes da eEPO (figura 13) utilizando técnicas de RT-PCR.

Rumores sobre o abuso de rHuEPO em corridas de cavalos, para melhorar o desempenho e resistência do animal, têm circulado desde o desenvolvimento da droga. Em 2006, essa substância foi detectada em amostras de plasma equino coletadas após corridas oficiais nos Estados Unidos (GUAN, F., *et al.* 2007). Desde então, muitos laboratórios de testes de drogas em equinos começaram a analisar amostras de corrida para agentes estimulantes a eritropoiese (ESAs), no entanto, seu uso em cavalos só foi formalmente proibido pela Federação Equestre Internacional (FEI) em 2010. Os casos mais recentes são de 2016, onde amostras de equinos retiradas em uma competição em Doha, no Qatar, testaram positivo para rHuEPO. Seus treinadores, Mohd Butti Ghemran Al Qubaisi e Abdulla Mubarak Rashed Al Khaili, foram suspensos das competições por dois anos (FEI, 2016).

	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	
DPO	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 N	
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	
DPO	E T 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	
DPO	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 V N E T	
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	
DPO	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	
DPO	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		
DPO	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. Sequência de aminoácidos da HuEPO em comparação com a NESP/DPO (possuem a mesma sequência, com exceção de 5 aminoácidos diferentes, em verde) e com a eEPO. A eEPO difere da hEPO em alguns aminoácidos, destacados de vermelho. (Extraído de Yu, 2010).

Vários métodos têm sido utilizados para diferenciar a EPO endógena de cavalo da versão humana recombinante, como a focalização isoelétrica (IEF) e espectrometria de massa (LC-MS) (LASNE, F., *et al.* 2005; YU, N., *et al.* 2010; BAILLY-CHOURIBERRY, L., *et al.* 2012). Atualmente, a maioria dos laboratórios avalia rHuEPO em amostras de cavalo usando um teste de ELISA específico para a HuEPO, seguido de confirmação por LC / MS / MS (CHANG, Y., *et al.* 2011). O último método baseia-se na diferença de 20% na estrutura de aminoácidos entre a EPO equina e humana. Entretanto, se a EPO recombinante equina (reEPO) aparecer no mercado como um novo medicamento, esses métodos ficarão seriamente comprometidos e não poderão ser usados para sua detecção, principalmente de seus análogos. Sendo assim, os métodos que permitem a diferenciação dos padrões de glicosilação e / ou diferenças de peso molecular, como por exemplo, a focalização isoelétrica (IEF) e SDS / SAR-

PAGE, tornar-se-ão essenciais. Além disso, o alto limite de detecção (LOD) desse hormônio na urina continua sendo um problema para o controle de dopagem em laboratórios que trabalham com matrizes equinas. Assim, o método SAR-PAGE poderia ser elegível como uma alternativa a essas metodologias, uma vez que sua aplicação no controle de dopagem humana já está bem estabelecida em laboratórios credenciados pela AMA (WADA, 2014; REIHLEN, P., *et al.* 2015).

```

TATCGAGGCGTGGAG 15

ATGGGGGTGCGCGAATGTCCTGCCCTGCTGCTTCTGCTGTCCCTGCTACTGCCTCCTCTG 75
1 M G V R E C P A L L L L S L L L P P L
GGCCTCCCAGCCCTGGGCGCCCCTCCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGG 135
21 G L P A L G A P P R L I C D S R V L E R
TACATCCTGGAGGCCAGGGAGGCCGAAAATGTCACGATGGGCTGTGCCGAAGGCTGCAGC 195
41 Y I L E A R E A E N V T M G C A E G C S
TTTGGTGAGAATGTCACCGTTCAGACACCAAGGTTAACTTCTACTCCTGGAAGAGGATG 255
61 F G E N V T V P D T K V N F Y S W K R M
GAGGTGGAGCAGCAGGCTGTGGAAGTCTGGCAGGGCTTGGCCCTGCTCTCAGAAGCCATT 315
81 E V E Q Q A V E V W Q G L A L L S E A I
CTGCAGGGCCAGGCCCTGTTGGCCAACCTCCAGCCATCTGAGACCCTGCGGCTGCAT 375
101 L Q G Q A L L A N S S Q P S E T L R L H
GTGGACAAAGCCGTCAGCAGCCTGCGCAGCCTCACCTCCCTGCTTCGGGCGCTGGGAGCC 435
121 V D K A V S S L R S L T S L L R A L G A
CAGAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCAGCCTCTGCTGCTCCACTCCGAACATTCGCT 495
141 Q K E A I S P P D A A S A A P L R T F A
GTTGATACTTTGTGCAAACTCTTCCGAATCTACTCCAATTTCTGCGGGGAAAGCTGAAG 555
161 V D T L C K L F R I Y S N F L R G K L K
CTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGAGAGGGGACAGGTGAACCAGGTGCTTGCACCCTGGGC 615
181 L Y T G E A C R R G D R *

```

Figura 13. Sequência de aminoácidos e nucleotídeos da eEPO. Na imagem, o códon ATG, indicando o ponto de início da tradução da cadeia de RNAm, e que irá codificar o primeiro aminoácido da cadeia da EPO. (Extraído de SATO, 2004).

2. Objetivos

O presente trabalho foi desenvolvido a partir de um interesse do Jockey Club Brasileiro do Rio de Janeiro nas análises de antidopagem realizadas nas dependências do LADETEC. Visando atender ao público do Turfe o presente método de detecção de ESAs por SAR-PAGE foi elaborado.

2.1 Geral

Desenvolver uma técnica para detecção do abuso de ESAs em matrizes equinas (sangue e urina) utilizando o método SAR-PAGE.

2.2 Específicos

- Validar a técnica de imunopurificação de sangue realizada em amostras humanas para aplicação em amostras equinas e posterior aplicação em SAR-PAGE;
 - Desenvolver e validar a técnica de imunopurificação de urina equina para aplicação em SAR-PAGE;
 - Condução de um estudo de excreção para detectar ESAs em cavalos após administração única de microdoses, a fim de avaliar a sensibilidade do método em amostras reais.

3. Metodologia

A presente dissertação foi desenvolvida no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD), visando atender os requisitos do título de Mestre no Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, com a implementação e aprimoramento de técnicas que possam ser utilizadas na rotina de laboratórios.

3.1 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 pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFRJ, sob o protocolo de pesquisa n.073 / 18.

As quantidades de ESAs administradas por via subcutânea foram até 6 vezes menores do que as doses terapêuticas recomendadas para o tratamento da anemia em humanos e, portanto, podem ser consideradas micro doses. Dois cavalos machos puros, pesando aproximadamente 450 kg cada, foram usados neste experimento. O primeiro equino recebeu 21 µg do medicamento Hemax Eritron/rHuEPO (Aché, São Paulo, Brasil), que corresponde à eritropoietina recombinante humana de primeira geração, a epoetina alfa, enquanto que o segundo equino recebeu 50 µg do medicamento Mircera/CERA (methoxy polyethylene glycol/continuous erythropoietin receptor activator, uma epoetina beta, da Roch, Mannheim, Alemanha) mais 100 µg do medicamento Araesp/NESP (darbepoetina alfa, da Amgem, 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 o dia 4 por indisponibilidade de amostra. Todas as amostras foram armazenadas a -20 °C até a análise.

3.2 Amostras fortificadas

O estudo *in vitro* foi realizado com sangue e urina de cavalo, gentilmente doado pelo JCB. As amostras de urina e sangue foram fortificadas com rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc (epoetina alfa, da ProSpec, Ness-Ziona, Israel). Diferentes concentrações dos analitos foram usadas para atingir os limites de

detecção. O padrão da EPO recombinante humana, BRP, utilizada como controle positivo, é da European Directorate for the Quality of Medicines (Strasbourg, França).

3.3 Preparação das amostras

3.3.1 Urina

A preparação da amostra de urina foi conduzida como descrito por Reihlen *et al.*, com algumas modificações para melhorar a preparação da urina, como adição de calor e tratamento com tampão de ajuste, detalhadas abaixo.

Alíquotas de 15 mL de amostras de urina de cavalo foram transferidas para tubos de centrifuga de 50 mL (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). Após a adição de 1,8 mL de tampão de ajuste (Tris-HCl 3,75 M pH 7,4 + solução de inibidor de protease (Complete®, da Roche, Indianapolis, IN, USA), as amostras foram misturadas, aquecidas a aproximadamente 95 °C por 9 minutos em banho-maria, e imediatamente resfriadas (10 °C a 15 °C) em banho de água e gelo durante 10 minutos e depois centrifugadas durante 30 min a 4.000 g. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ultrafiltração Amicon Ultra-15 (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) e centrifugado por mais 30 min a 4.000 g. O material filtrado foi descartado. Os retentados foram lavados duas vezes com 15 mL de tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + solução de inibidor de protease) e centrifugados durante 30 min a 4.000 g. Os retentados foram diretamente imunopurificados.

A imunopurificação foi realizada conforme descrito por Reihlen *et al.* com modificações. Cada retentado foi aplicado a um poço da placa de ELISA (kit ELISA – StemCell Technologies, Vancouver Canadá) pré-revestido com anticorpo anti-EPO. Os poços foram selados com fita adesiva e incubados durante a noite a 4 °C. Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com 400 µL de PBS (Sigma Aldrich St Louis, MO, EUA). A EPO foi eluída dos poços pela adição de 15 µL do tampão de amostra SAR (Tris-HCl 424 mM, Trizma® base 564 mM, SAR 8%, EDTA 2 mM (Sigma Aldrich St Louis, MO, EUA), glicerol 40% [p / v], ditiotreitól 10 mM (GE Healthcare Life Sciences, Darmstadt, Alemanha)) e incubados durante 5 min, a 95 °C, sob agitação (700

rpm) usando um Thermomixer® (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Uma vez que os eluatos foram resfriados até a temperatura ambiente, as amostras foram imediatamente aplicadas ao gel e submetidos à corrida eletroforética.

3.3.2 Sangue

O procedimento para o sangue é adequado tanto para amostras de plasma, quanto para as de soro. As amostras de sangue de cavalo foram imunopurificadas utilizando todos os tampões e reagentes do kit de purificação de EPO (MAIA Diagnostics, cat. Nº 1390, Uppsala, Suécia) de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações. Resumidamente, 0,25 mL de amostra de sangue foram diluídos (1:10) com tampão de diluição de amostra (preparado de acordo com o fabricante), centrifugadas em filtros de 0,22 µm (filtros HPF da Millipore, Bedford, MA, EUA), onde os filtrados foram aplicados a uma coluna anti-EPO a um coeficiente de fluxo de aproximadamente 0,8-1,0 mL/min. Após a lavagem com tampão de lavagem do kit, a EPO que havia sido ligada na coluna foi eluída com 50 µL de tampão de dessorção e o eluato foi neutralizado com 5 µL de tampão de ajuste A. A amostra imunopurificada foi transferida para um filtro de microcentrífuga Microcon de 30 kDa e concentrada para um volume final de 8 µL. Após aquecimento a 95 °C durante 5 min, a amostra concentrada foi suplementada com 7 µL de tampão de amostra SAR e depois diretamente aplicada ao gel para eletroforese.

3.4 Análise SAR-PAGE e *western blotting*

A análise por SAR-PAGE foi realizada por *single blotting*, conforme descrito por Reihlen *et al.* Cubas com géis Midi XCell Sure Lock com 20 poços a 10% de Bis-Tris NuPAGE® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram montadas como descrito pelo fabricante. O reservatório anódico (externo) foi preenchido com tampão de corrida SAR (MOPS 50 mM (Sigma Aldrich St Louis, MO, EUA), Trizma® base 50 mM, SAR 0,1%, EDTA 1 mM) até à marcação da cuba. A câmara catódica (interna) foi preenchida com tampão de corrida SAR e antioxidante (Invitrogen) até os poços estarem completamente cobertos. As amostras purificadas por imunoafinidade e os padrões de EPO (misturas de

ESAs) foram aplicados nos poços do gel. O volume de aplicação por poço não excedeu 15 μ L. A eletroforese foi realizada por 3 horas a 125 V constantes / 4 °C.

Antes do fim da eletroforese, a membrana foi rinsada em metanol para ativação e depois colocada em tampão de transferência (glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, SAR 0,00375%, etanol 20% (Merck, Alemanha). As proteínas foram transferidas para uma membrana Immobilon-P (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) utilizando a placa de transferência semi-seca TE77 PWR (Amersham, Freiburg, Alemanha) e papel de *blotting* extra grosso (BioRad, Hercules, CA, EUA). O *blotting* foi conduzido a 1,54 mA/cm² por 45 min. A membrana, após a transferência, foi bloqueada com 5% de leite com baixo teor de gordura (LFM) (Itambé, Uberlândia, MG, Brasil) em PBS durante 1 h, com agitação suave à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com PBS e incubada em tampão redutor DTT 10 mM (GE Healthcare, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em PBS durante 15 min a 37 °C. Todas as etapas subsequentes de incubação com anticorpos primário (anticorpo monoclonal em camundongo, clone AE7A5; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) e secundário (anticorpo de cabra anti-camundongo conjugado a HRP, cat. n°. 31432; Thermo Scientific; Waltham, MA, USA), bem como as lavagens, foram realizadas em um processador de blot automatizado (BlotCycler, Precision Biosystems, Mansfield, MA, EUA) a 4 °C. Para tal, 25 mL de solução de anticorpo primário (1:1000 em PBS 1% em LFM) e solução de anticorpo secundário (1:100.000 em PBS 1% em LFM) foram usados para encher o processador. O BlotCycler foi programado para 3 h de incubação com o anticorpo primário e 13,5 h para o anticorpo secundário. Ambas as incubações de anticorpos foram seguidas por nove lavagens de 5 min cada com PBS. Após o término do programa BlotCycler, a membrana foi incubada com o substrato quimioluminescente Super Signal TM West Femto (Thermo Scientifica Rockford, IL, EUA), e as imagens foram adquiridas em uma câmera CCD (LAS-4000, Fujifilm, Tóquio, Japão). O software GASepo v 2.3 (ARC, Seibersdorf, Áustria) foi utilizado para a análise das imagens.

3.5 ELISA

A quantificação de ESAs nas amostras de urina e sangue dos cavalos foi realizada usando-se um kit ELISA da StemCell Technologies, de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Validação do método

3.6.1 Parâmetros de validação

Todos os parâmetros foram avaliados tendo em vista as determinações da AMA, atendendo aos preceitos do *International Standards for Laboratories* em vigor (WADA, ISL, 2015). Pelo fato de o ISL normatizar o controle de dopagem em humanos, o laboratório reserva-se o direito de avaliar os resultados de maneira independente. O procedimento da validação foi baseado em uma análise qualitativa, onde os parâmetros avaliados foram: especificidade, limite de detecção e arraste. Os volumes de urina e sangue (plasma/soro) utilizados ao longo da validação foram de, respectivamente, 15 mL e de 0,25 mL. As concentrações dos mixes são: Mix 1: DYNEPO/NES/CERA (78 pg/59 pg/157 pg); MIX 2: BRP/NESP/EPO-Fc (71 pg/59 pg/400 pg).

3.6.1.1 Especificidade

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

a) Branco de Urina e Sangue equinos

Com o intuito de averiguar a especificidade para detecção de eritropoietina humana em urina e sangue equinos, foram analisados brancos de sangue e urina de quatro indivíduos (cavalos) diferentes.

b) Sangue fortificado com rHuEPO, NESP e CERA.

Procedimento de determinação utilizado

Três grupos de amostras de brancos de sangue de diferentes indivíduos foram fortificados com CERA, NESP e rHuEPO com o intuito de averiguar a especificidade para detecção desses analitos. O primeiro grupo com amostras

fortificadas com 150 pg de CERA, o segundo grupo com amostras fortificadas com 150 pg de NESP e o terceiro grupo com amostras fortificadas com 100 pg de rHuEPO.

c) Urina fortificada com rHuEPO, NESP e CERA

Procedimento de determinação utilizado

Com o intuito de averiguar a especificidade para detecção de eritropoietina recombinante (rHuEPO) e NESP em urina, um grupo de 2 brancos de urina de equinos diferentes foram fortificados cada um com 100 pg de rHuEPO, e 2 brancos de urina de equinos diferentes foram fortificados cada um com 200 pg de NESP. Com o intuito de averiguar a especificidade para detecção de CERA em urina, um segundo grupo de 2 brancos de urina de equinos foram fortificados, cada um, com 200 pg de CERA.

3.6.1.1 Limite de detecção (LOD)

O parâmetro indica a quantidade mínima do analito que pode ser detectada pelo método.

a) Limite de detecção – rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc em sangue

Procedimento de determinação utilizado

Um *pool* de plasma/soro foi fortificado com diferentes concentrações das soluções de eritropoietina recombinante rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc. A menor concentração que possibilitou a detecção da substância, baseado nos critérios de identificação descritos no documento técnico da WADA em vigor, foi considerada o limite de detecção do método. As concentrações utilizadas foram: rHuEPO 40, 25, 10 e 5 pg; NESP 50, 25, 10 e 5 pg; CERA 60, 40, 20 e 10 pg; EPO-Fc 400, 300, 200, 100 pg.

b) Limite de detecção – rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc em urina**Procedimento de determinação utilizado**

Um *pool* de urina foi fortificado com diferentes concentrações das soluções de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc. A menor concentração que possibilitar a detecção da substância, baseado nos critérios de identificação descritos no documento técnico da WADA em vigor, será considerada o limite de detecção do método. As substâncias avaliadas e suas faixas de concentrações foram: rHuEPO 50, 40, 30 e 20 pg; NESP 90, 40, 25 e 10 pg; CERA 200, 150, 100 e 50 pg; EPO-Fc 400, 300, 200 e 100 pg.

3.6.1.2 Arraste

O arraste fica caracterizado quando se verifica a presença do analito em colunas vazias adjacentes as do analito testado.

Procedimento de determinação utilizado

Três amostras de plasma e três de urina fortificadas com rHuEPO, NESP e CERA foram aplicadas de maneira intercalada a colunas vizinhas e vazias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros analisados no estudo de validação foram baseados e atendem aos critérios descritos no WADA Technical Document – TD2014EPO Version 1.0 (WADA, 2014).

Devido à versatilidade, facilidade de manuseio, bom custo benefício e eficácia, os métodos eletroforéticos em gel fornecem um importante conjunto de ferramentas para a análise de proteínas. SDS-PAGE é tipicamente usado como um método para separar proteínas de acordo com sua massa molecular. Todos os ESAs podem ser estudados por este método, incluindo a CERA, que apresenta uma banda bastante ampla e “manchada”/difusa (com *smear*), correspondendo a uma massa molecular aparente de 66-97 kDa. CERA é uma proteína “PEGlada” (que contém polietilenoglicol) que, quando detectada por imunotransfência, apresenta afinidade relativamente diminuída ao anticorpo de detecção, em comparação com as ESAs não-PEGladas. As fortes propriedades de solubilização do SDS são a razão para a menor sensibilidade de detecção. O SDS liga-se tanto à região PEG quanto à região proteica da CERA e a cadeia de PEG solubilizada com SDS é a principal razão para o aparecimento da banda manchada no SDS-PAGE. Substituindo o SDS por SAR, um detergente que não se liga à região PEGlada, ligando-se somente à região proteica, o formato em largura da banda da CERA é significativamente reduzido. O SAR-PAGE, então, melhora especificamente o desempenho eletroforético da EPO PEGlada, e deixa inalteradas as características de desempenho de outras epoetinas. O SAR-PAGE, seguido de *western blotting*, é a técnica utilizada nos laboratórios de controle de dopagem para avaliar o abuso por ESAs. Além disso, para os Jogos Olímpicos de 2016 realizados no Rio, todas as análises da ESA foram realizadas usando-se o método de SAR-PAGE pela primeira vez na história deste grande evento (PEREIRA, H., *et al.* 2017).

4.1 Otimização da imunopurificação

Nas imagens avaliadas nos resultados (figuras 14 e 15), as bandas de cada analito de EPO foram detectadas de acordo com os critérios de identificação, utilizando a preparação de referência correspondente do material

padrão (mistura de ESAs, que são utilizadas como controles positivos; algumas misturas contêm Dynepo, uma rHuEPO/epoetina delta) sem interferentes e/ou bandas não específicas. Como não há critérios disponíveis para animais, as conclusões são baseadas na orientação humana adotada pela WADA. Os critérios de aceitação da WADA definem os requisitos que uma imagem deve cumprir para permitir a aplicação dos critérios de identificação, a fim de determinar a presença de ESAs. Pontos, manchas, áreas de fundo excessivo ou ausência de sinal em uma coluna que interfiram significativamente na aplicação dos critérios de identificação invalidam a coluna.

Antes de iniciar efetivamente a validação desta técnica para detecção de ESAs em equinos, foi preciso superar o desafio das deficiências durante a purificação da urina, uma vez que a urina de cavalo é notavelmente mais viscosa e complexa do que a urina humana. Uma possível causa do aumento da viscosidade é a presença de proteoglicanos que causam entupimento do filtro e, assim, reduzem a eficiência da centrifugação durante a preparação da amostra (SIMPSON, N., WYNNE, P. 2000). Além disso, precipitados comumente aparecem em amostras de urina, especialmente em amostras congeladas e descongeladas, e esses precipitados podem se ligar a grandes quantidades de substâncias encontradas na urina, como proteínas. Para superar esta dificuldade e melhorar a qualidade da imunopurificação da urina de cavalo, foi realizada uma comparação de vários ensaios utilizando urina de cavalo misturada com rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc (figura 14). Primeiro, o desempenho foi avaliado usando o protocolo de extração de urina humana sugerido por Reihlen *et al.* 2015, usando o protocolo regular de ultrafiltração para amostras humanas sem qualquer pré-tratamento. Este protocolo envolve a ultrafiltração das amostras de urina sem passar pelas etapas de tratamento prévio com tampão Tris-HCl, e nem pelo processo de aquecimento e resfriamento. Este primeiro ensaio não teve sucesso porque a CERA não pôde ser detectado e os filtros Amicon Ultra 15 de 30 kDa usados no primeiro estágio de ultrafiltração foram facilmente entupidos com precipitados, impossibilitando a continuação da extração (figura 14, coluna 2). Em uma segunda tentativa, o uso de tampão Tris-HCl 3,75 M, seguido de aquecimento e resfriamento e, em seguida, ultrafiltração, foi realizado. Este método liberou a CERA, como acontece com os outros ESAs, disponibilizando as amostras para posterior filtragem. A decisão de usar este

protocolo com Tris-HCl (figura 14, coluna 3), aquecimento e resfriamento foi baseada na glicoproteína Tamm-Horsfall (THP), uma proteína comumente encontrada na urina que facilmente se agrega em macromoléculas. O aquecimento das amostras em um banho de água quente altera a estrutura macromolecular do THP, evitando o entupimento e facilitando o fluxo através de poros estreitos nas colunas ou filtros (MAIIA, 2016). O desempenho de um tampão comercial do kit MAIIA (UPD - Urine Precipitate Dissolution buffer) como substituto do Tris-HCl também foi avaliado e funcionou bem para dissolver os precipitados, evitando o efeito de entupimento (figura 14, coluna 4). O tampão de escolha foi Tris-HCl 3,75 M, porque é fácil de preparar em laboratório, mais barato e apresentou desempenho igual ao do tampão comercial UPD.

Para avaliar a técnica de sangue, as amostras de sangue de cavalo foram fortificadas com rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc e foram então imunopurificadas utilizando o Kit MAIIA e analisadas por SAR-PAGE (figura 15). Ao contrário do método da urina, não houve mudança no protocolo do sangue, uma vez que as amostras foram facilmente imunopurificadas usando este método. Portanto, o kit de imunopurificação da EPO do diagnóstico MAIIA, usado para a técnica de purificação em doping humano, funcionou bem para a análise do sangue do cavalo.

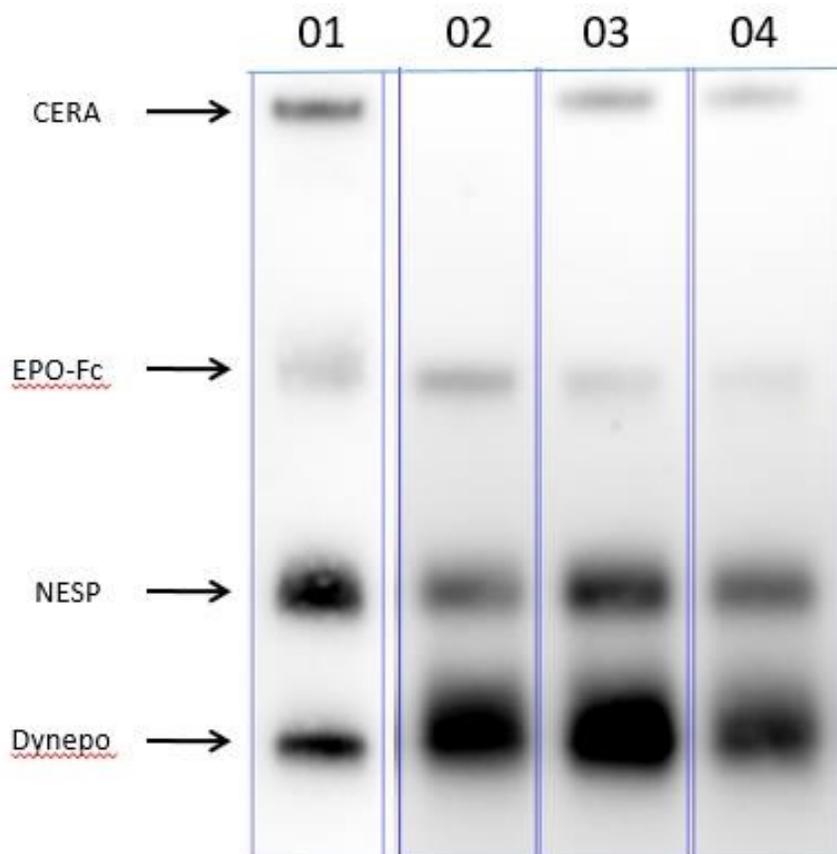


Figura 14: Comparação de diferentes protocolos de imunopurificação em SAR-PAGE de urina de equinos. Urinas de equinos fortificadas com 100 pg de rHuEPO, 100 pg de NESP, 200 pg de CERA e 400 de EPO-Fc imunopurificadas por diferentes protocolos. Lane 1: Mistura de ESAs. Lane 2: Purificação com tampão Tris-HCl sem a etapa de aquecimento. Lane 3: Purificação com tampão Tris-HCl, aquecimento e resfriamento. Lane 4: Purificação com tampão UPD, aquecimento e resfriamento. O analito CERA não foi observado na lane 2, onde não houve o aquecimento da amostra, indicando que há a perda quando esta etapa é suprimida do processo. As lanes 3 e 4 avaliam o protocolo utilizando a etapa de aquecimento, porém, utilizando dois tampões de ajuste de pH diferentes. Na lane 3 foi utilizado o Tris-HCl, e na lane 4 o tampão do kit Maia, UPD. Ambos funcionaram.

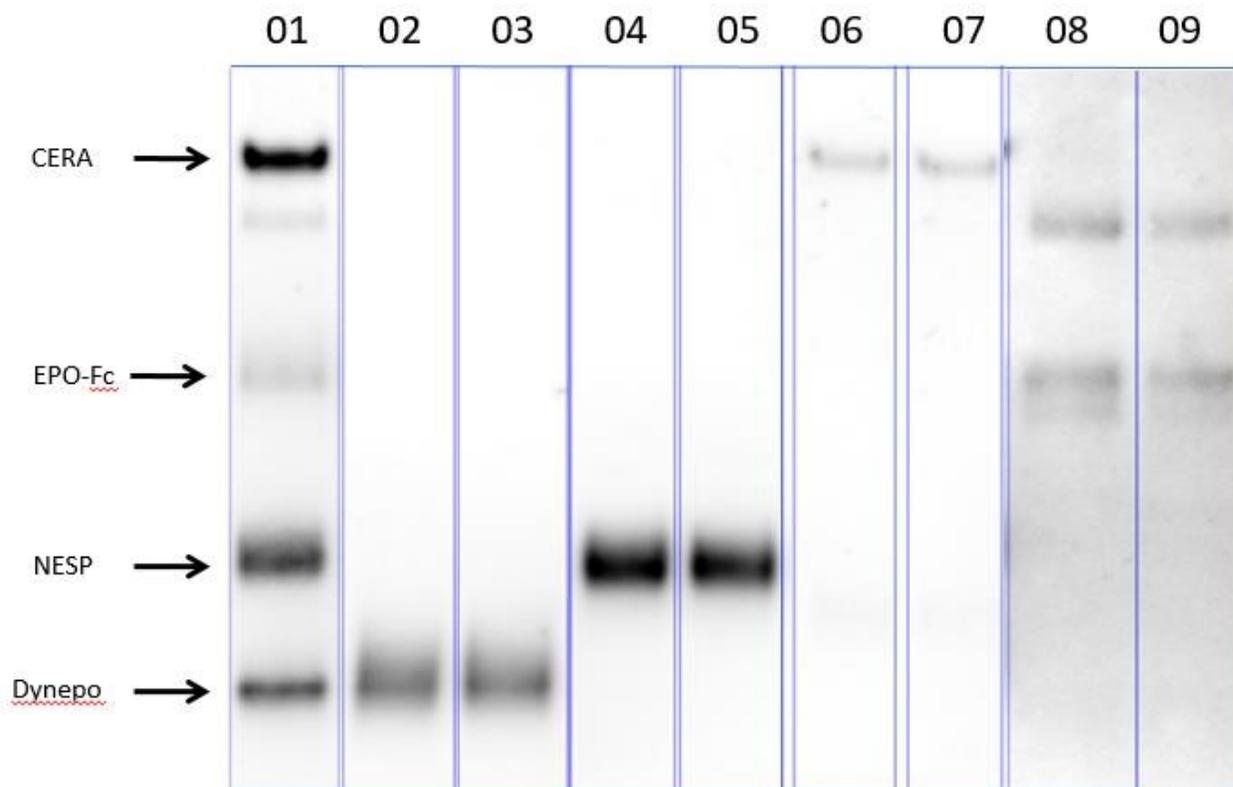


Figura 15: Imunopurificação e SAR-PAGE de sangue de equinos fortificados. Coluna 1: Mistura de ESAs. Colunas 2, 3: 100 pg de rHuEPO. Colunas 4, 5: 150 pg de NESP. Colunas 6-7: 150 pg de CERA. Colunas 8-9: 800 pg de EPO-Fc. A imunopurificação que é feita para amostras de sangue de humanos funcionou para as amostras de sangue de equinos. Quando amostras equinas foram avaliadas por esta técnica, todos os analitos puderam ser identificados, mostrando que a técnica é adequada para a análise de amostras de sangue de equinos.

4.2 Validação do Método

4.2.1 Especificidade e Arraste

Com o intuito de averiguar a especificidade para detecção de eritropoietina humana em urina e sangue equinos, foram analisados brancos de sangue e urina de quatro indivíduos diferentes. Nas figuras, está especificado como “BRP” um tipo de rHuEPO padrão; os controles (*mixes*) de ESAs utilizadas como controles positivos na validação também continham Dynepo, uma rHuEPO/epoetina delta.

Após análise dos resultados, não foi possível observar sinal nas colunas onde foram aplicados sangue e urina equinos considerados como brancos (figura 16 colunas 2, 3, 5 e 6 e figura 17 colunas 2, 3, 4 e 5), o que assegura a especificidade da técnica.

Em seguida, o mesmo teste foi realizado com amostras de cavalos fortificadas. Desta vez, a uma mistura de sangue ou urina equina foi adicionado rHuEPO, NESP ou CERA. Após análise da imagem, só foi possível observar, em cada coluna, o sinal correspondente ao analito utilizado na fortificação (figuras 18 e 19, colunas 3-4, 6-7 e 9-10). Sendo assim, podemos assegurar a especificidade deste método.

Além do parâmetro “especificidade”, esses experimentos também puderam ser utilizados para a avaliação do parâmetro “arraste”, que consiste na presença do analito em colunas vazias próximas as do analito testado. Sendo assim, é possível observar que as colunas 3-4, 6-7 e 9-10 das figuras 18 e 19 não apresentaram bandas dos analitos rHuEPO, NESP ou CERA, o que comprova que não houve arraste.

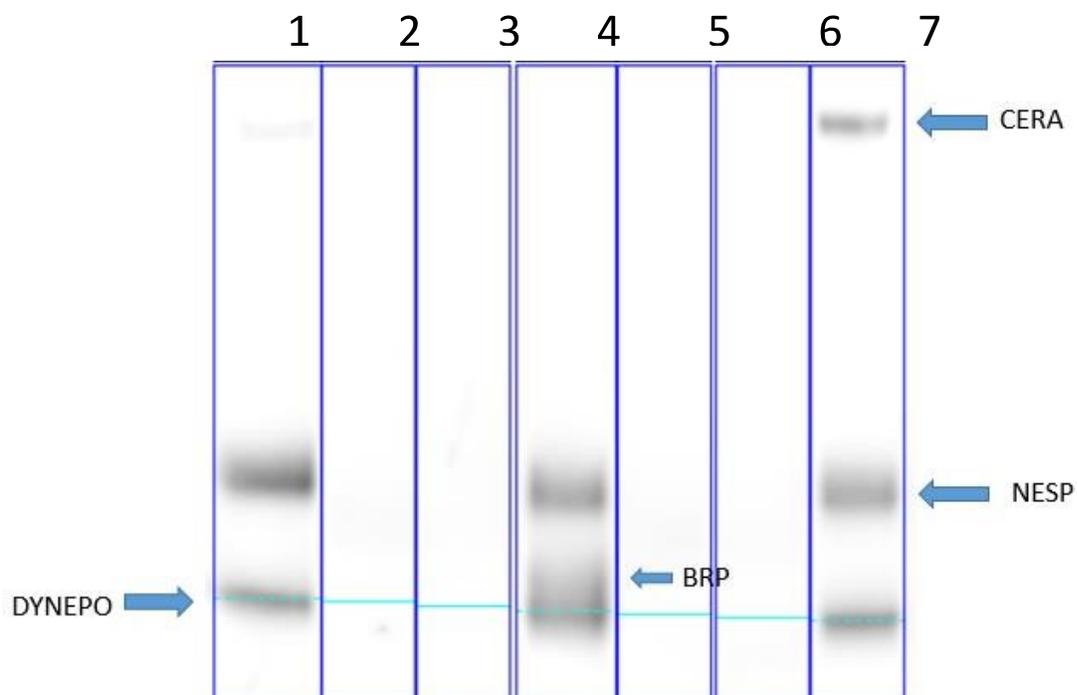


Figura 16: Especificidade em sangue de cavalo. Colunas 1, 4, e 7: Solução mix de agentes estimuladores de eritropoiese. Colunas 2, 3, 5 e 6: Branco de sangue equino. Coluna 4: Solução contendo mix de ESAs. As lanes em branco indicam que a EPO endógena do cavalo não pôde ser observada. Isto indica que o anticorpo utilizado no *western blotting* não reconhece a EPO endógena equina, pois trata-se de um anticorpo para humanos. Ainda, não foi possível observar interferentes nestas lanes, o que indica a especificidade da técnica. Logo, a lane em branco indica que o animal não foi dopado com rHuEPO.

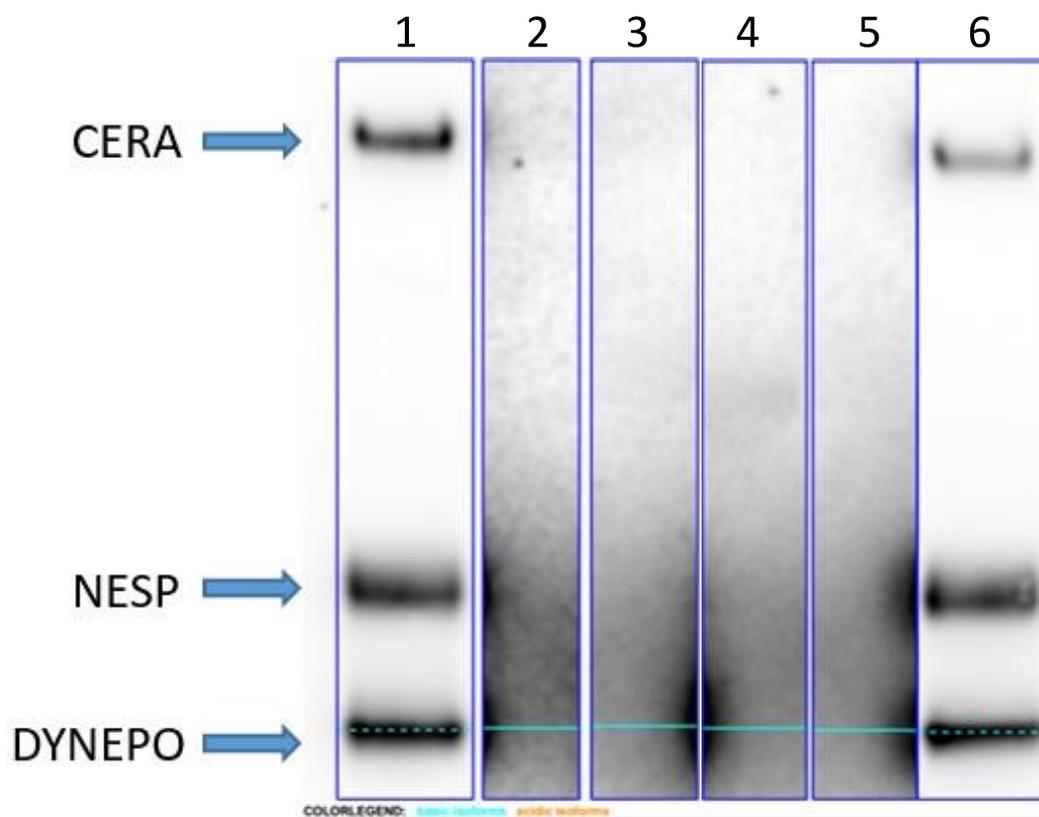


Figura 17. Especificidade em urina de cavalo. Colunas 1 e 7: Solução mix de agentes estimuladores de eritropoiese. Colunas 2–6: Branco de urina equina. Solução contendo mix de ESAs. As lanes em branco indicam que a EPO endógena do cavalo não pôde ser observada. Isto indica que o anticorpo utilizado no *western blotting* não reconhece a EPO endógena equina, pois trata-se de um anticorpo para humanos. Ainda, não foi possível observar interferentes nestas lanes, o que indica a especificidade da técnica. Logo, a lane em branco indica que o animal não foi dopado com rHuEPO.

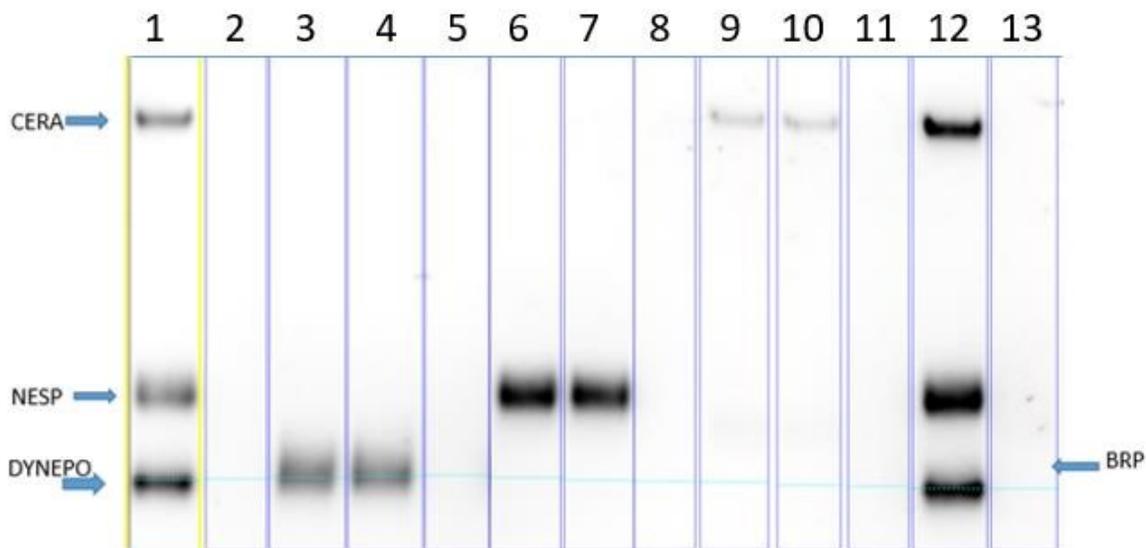


Figura 18: Especificidade e Arraste em branco de sangue + rHuEPO, NESP e CERA.

Colunas 1 e 13: Solução mix de agentes estimuladores de eritropoiese. Colunas 3-4: Sangue fortificado com rHuEPO (100 pg). Colunas 6-7: Sangue fortificado com NESP (150 pg). Colunas 9-10: Sangue fortificado com CERA (150 pg). As amostras de sangue de cavalo foram fortificadas com os analitos rHuEPO, NESP e CERA e foram aplicados em duplicata. A lane/coluna vizinha em cada duplicata não possui amostra e também não há a presença de outro interferente, o que indica que não houve arraste de uma coluna para a coluna vizinha (vazia).

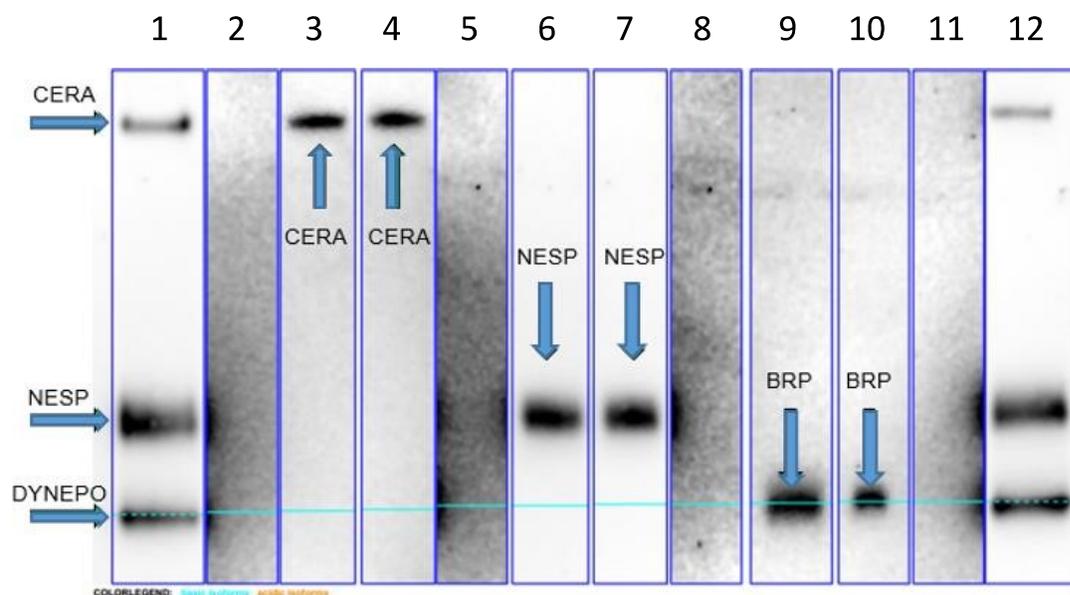


Figura 19: Especificidade e Arraste em branco de urina + rHuEPO, NESP e CERA. Colunas 1 e 12: Solução mix de agentes estimuladores de eritropoiese. Colunas 3-4: Urinas fortificadas com CERA 200 pg. Colunas 6-7: Urinas fortificadas com NESP 200 pg. Colunas 9-10: Urinas fortificadas com rHuEPO 100 pg. As amostras de urina de cavalo foram fortificadas com os analitos rHuEPO, NESP e CERA e foram aplicados em duplicata. A lane/coluna vizinha em cada duplicata não possui amostra e também não há a presença de outro interferente, o que indica que não houve arraste de uma coluna para a coluna vizinha (vazia).

4.2.2 Limite de detecção (LOD)

O SAR-PAGE é um método qualitativo, e a intensidade das bandas avaliadas permite o estabelecimento da quantidade mínima que pode ser detectada (LOD). Assim, a quantidade de analito detectado, em conformidade com os critérios de aceitação e identificação, é diretamente proporcional à intensidade do sinal das bandas.

A fim de estabelecer a quantidade mínima de analito que pode ser detectada pelo método, misturas de sangue equino foram fortificadas com ESAs, em quantidades que variaram de 40 a 5, 50 a 5, 60 a 10 e 400 a 100 pg de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc, respectivamente. Da mesma forma, misturas de urina foram fortificadas em quantidades que variaram de 50 a 20, 90 a 10, 200 a 50 e 400 a 100 pg de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc, respectivamente. Na Figura 20 (colunas 4, 7, 12 e 17) é possível observar os LODs obtidos para cada ESA analisada, onde 10, 25, 20 e 100 pg são as quantidades mínimas detectadas de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc, respectivamente, em sangue equino. Já a Figura 21 (colunas 5, 8, 12 e 16) mostra que 20, 25, 100 e 200 pg são os LODs encontrados para rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc, respectivamente, em urina equina. As Tabelas 2 e 3 resumem os resultados obtidos para determinação do limite de detecção do método analítico em sangue e urina, respectivamente, e apresenta esse mesmo resultado em concentrações, que são de 40, 100, 80 e 400 pg/mL em sangue e 1,3, 1,6, 6,6 e 13,3 pg/mL em urina, para rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc, respectivamente.

Os resultados mostram melhor sensibilidade, principalmente na urina, quando comparados aos limites de detecção descritos anteriormente na literatura, que variam de 50 pg/mL a 1000 pg/mL para rHuEPO, NESP e CERA no plasma e de 25 pg/mL a 150 pg/mL na urina (YU, N., *et al.* 2010; BAILLY-CHOURIBERRY, L., *et al.* 2012; GUAN, F., *et al.* 2007; CHANG, Y. *et al.* 2011; LÖNNBERG, M., *et al.* 2012; GUAN, F., *et al.* 2008; SCARTH, J., *et al.* 2011; GUAN, F., ROBINSON, M., 2018; GUAN, F., *et al.* 2010). Embora a urina de cavalo seja viscosa e difícil de extrair, a coleta é menos invasiva quando comparada às amostras de sangue e também uma segunda fonte de matriz quando o sangue não está disponível. Devido a essa dificuldade na

imunopurificação, apenas alguns grupos estudaram a detecção de ESAs na urina de cavalo (BAILLY-CHOURIBERRY, L., *et al.* 2012; SCARTH, J., *et al.* 2011). No entanto, os LODs obtidos com SAR-PAGE são, em alguns casos, mais de 30 vezes menores quando comparados com trabalhos publicados anteriormente.

A análise da EPO-Fc em amostras de equinos é uma conquista inédita, feita pela primeira vez neste trabalho, uma vez que a detecção dessa substância no sangue é geralmente considerada desafiadora. Com o objetivo de obter maior sensibilidade para EPO-Fc no sangue utilizando o Kit de Purificação de EPO da MAIIA Diagnostics, várias tentativas foram feitas. No entanto, é bem conhecido entre os especialistas que este Kit de Purificação (versão revisada em março de 2016) não funciona bem para a EPO-Fc. Recentemente, uma pesquisadora da área, Michelle Masquelier, compartilhou os resultados de uma recuperação baixa (de cerca de 10%) da EPO-Fc utilizando essa metodologia (MASQUELIER, M. 2018). Em alinhamento com esta observação, o presente estudo com a EPO-Fc demonstrou um maior limite de detecção em comparação com os outros ESAs, mas ainda menor do que os obtidos com os protocolos regulares de LC-MS mencionados. Para melhorar a recuperação deste analito no sangue, uma nova versão revisada do kit MAIIA será lançada para resolver este problema.

Algumas bandas podem ter aparecido abaixo do LOD, mas não foram consideradas limite de detecção por não terem sido resultados reproduzíveis.

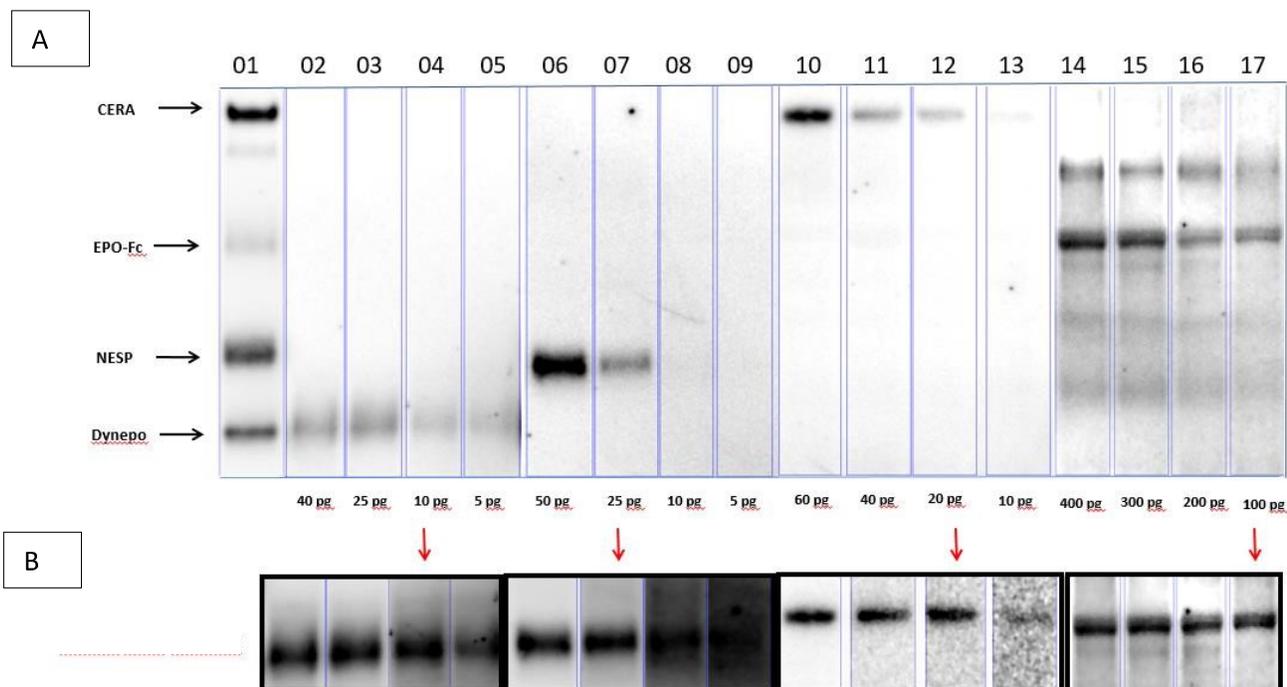


Figura 20: Limite de detecção de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc fortificados em sangue de equinos. A. Coluna 1: Mistura de ESAs. Colunas 2 -5: rHuEPO (40 – 5 pg). Colunas 6 – 9: NESP (50 – 5 pg). Colunas 10 – 13: CERA (60 – 10 pg). Colunas 14- 17: EPO-Fc (400 – 100 pg). **B.** O LOD de cada analito está indicado pelas setas na caixa destacada abaixo, indicando as bandas com contraste.

Quadro 1: LOD em sangue. Resultados obtidos para determinação do limite de detecção do método analítico em sangue.

Analito	Massa absoluta no gel (pg)	Concentração por amostra (pg/mL)
rHuEPO	10	40
NESP	25	100
CERA	20	80
EPO-Fc	100	400

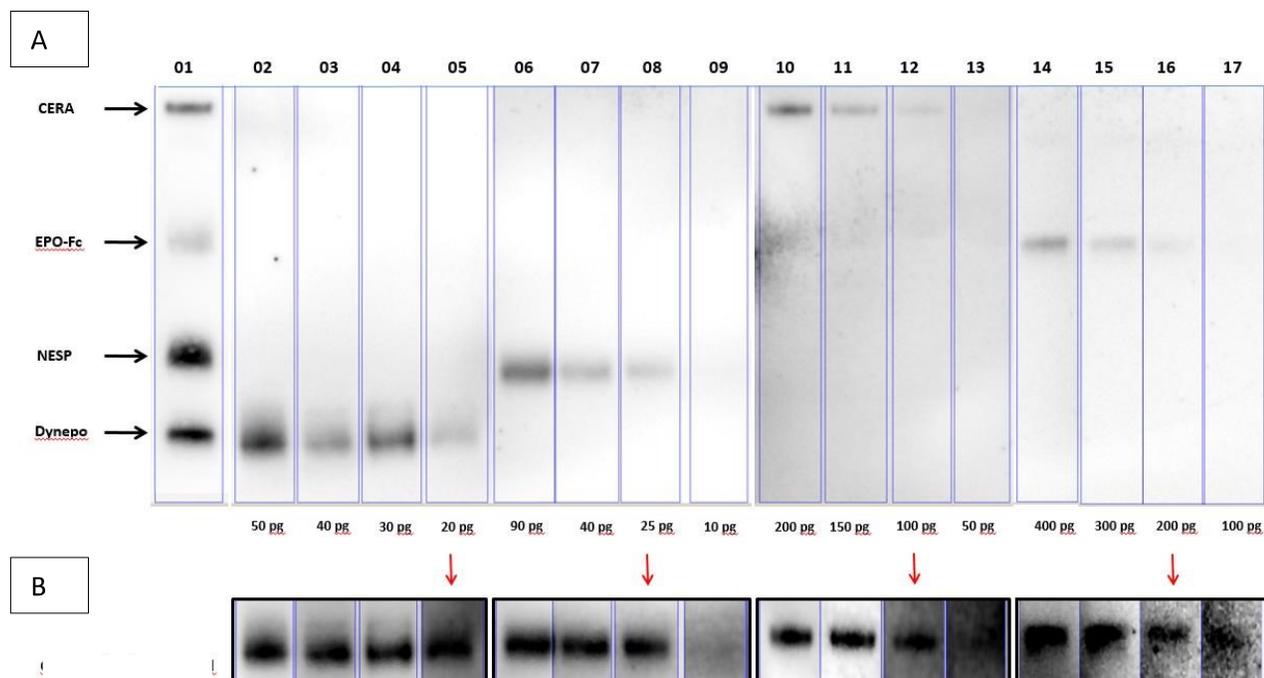


Figura 21: Limite de detecção de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc fortificados em urina de equinos. A. Coluna 1: Mistura de ESAs. Colunas 2-5: rHuEPO (50 – 20 pg). Colunas 6 – 9: NESP (90 – 10 pg). Colunas 10 -13: CERA (200 – 50 pg). Colunas 14- 17: EPO-Fc (400 – 100 pg). **B.** O LOD de cada analito está indicado pelas setas na caixa destacada abaixo, indicando as bandas com contraste.

Quadro 2: LOD em urina. Resultados obtidos para determinação do limite de detecção do método analítico em urina.

Analito	Massa absoluta no gel (pg)	Concentração por amostra (pg/mL)
rHuEPO	20	1,3
NESP	25	1,7
CERA	100	6,6
EPO-Fc	200	13

4.3 Estudo de excreção

Com o objetivo de avaliar a técnica e a validação, um estudo de excreção foi conduzido com a participação de dois cavalos. Os cavalos envolvidos no estudo foram acompanhados por 9 dias após a administração subcutânea de Hemax Eritron (rHuEPO), Aranesp (NESP) e Mircera (CERA), onde foram realizadas coletas de sangue e urina todos os dias, exceto no dia 4 por indisponibilidade de amostra.

A urina do equino que recebeu Hemax Eritron apresentou resultado positivo desde as 6 primeiras horas após a injeção única de 21 µg de rHuEPO ou 0,045 µg/kg e até o dia 3 (figura 22, Cavalos 1). Devido à sua natureza glicoproteica, a eritropoietina recombinante apresenta uma forma de banda ampla característica, com uma área difusa (lembrando um esfregaço) acima dela. Uma mudança contínua na área difusa entre as 6 h até 3 dias após a injeção foi observada, e no dia 5, não foi mais observada. A dose administrada é considerada uma micro dose, uma vez que foi 6 vezes inferior (a injeção foi de aproximadamente 6,6 UI / kg ou 0,045 µg/kg) à dose terapêutica recomendada para pacientes humanos anêmicos (que é de aproximadamente 40 UI / kg ou 0,28 µg/kg).

A urina do segundo equino testou positivo para NESP em todos os dias analisados (figura 22, Cavalos 2). Como uma EPO recombinante de segunda geração, a NESP tem uma meia-vida maior e pôde ser facilmente detectado de a partir das primeiras 6 h até dia 9 após uma única injeção de 100 µg ou 0,22 µg/kg, 2 vezes abaixo da dose terapêutica. Esta urina também testou positivo para CERA, uma EPO recombinante de terceira geração, após uma única injeção de 50 µg ou 0,11 µg/kg (Figura 24). A CERA tem o maior tempo de meia-vida e pôde ser detectada do dia 1 ao dia 3. Neste caso, a dose administrada foi 5 vezes abaixo da dose terapêutica recomendada.

De acordo com trabalhos anteriores, o uso de colunas MAIIA e LC-FAIMS-MS / MS indicou que a administração de 40 UI / kg (aproximadamente, 0,28 µg / kg ou 126 µg no total) de rHuEPO por 6 dias consecutivos apresentou resultado positivo para a substância até 3 dias na urina após a interrupção da administração (BAILLY-CHOURIBERRY, L., *et al.* 2012; LÖNNBERG, M., *et al.* 2012). Esses relatos também compararam uma injeção de 0,39 µg / kg de NESP, que apresentou resultado positivo por até 8 dias após a última injeção quando

se utilizou o método de MAIA, e até 5 dias quando se utilizou LC-FAIMS-MS / MS. No entanto, o presente estudo de SAR-PAGE mostra que a administração única de micro dose de 6,6 UI / kg (aproximadamente, 0,05 µg / kg) de rHuEPO pode ser positiva até 3 dias na urina. Além disso, uma única injeção de 100 µg / cavalo (0,22 µg / kg) de NESP apresentou resultado positivo até 9 dias na urina após a injeção.

Outro trabalho recente, apresentado na Conferência Internacional de Analistas de Corrida e Veterinários (ICRAV) de 2018, mostrou que o grupo também analisou amostras de plasma de cavalo usando SAR-PAGE de animais fortificados com CERA (RHEILEN, P., *et al.* 2018). Nesse estudo, os autores administraram 4,24 µg / kg de Mircera por via subcutânea, que tiveram resultados positivos no plasma por mais de 40 dias em alguns casos. Já no presente trabalho, apesar de uma menor injeção de 50 µg de Mircera no equino (injeção de 0,11 µg / kg), a presença de CERA ainda pôde ser detectada no plasma e na urina, com resultados positivos desde o dia 1 até o dia 3.

Devido à longa meia-vida e ao maior tamanho de CERA (aproximadamente 60 kDa), a detecção dessa molécula na urina humana é mais desafiadora do que no sangue (REICHEL, C., THEVIS, M., 2015). Apesar dessa dificuldade, a CERA foi encontrada em três urinas de atletas durante os Jogos Olímpicos Rio 2016 (PEREIRA, H., *et al.* 2017). É razoável inferir que esse comportamento seria reprodutível em cavalos, já que não há muita diferença entre o sistema urinário dos mamíferos, mas como a dose injetada foi muito baixa, seria difícil a detecção na urina. No entanto, neste trabalho, esse analito foi encontrado do dia 1 ao dia 3, confirmando a observação anterior em humanos (PEREIRA, H., *et al.* 2017). No entanto, os cavalos utilizados neste estudo apresentaram parâmetros normais para creatinina quando foram realizadas análises bioquímicas (dados não mostrados), o que significa que o sistema urinário e os rins do cavalo estavam funcionando adequadamente. Portanto, a maior sensibilidade do SAR-PAGE permitiu a observação de pequenas quantidades de CERA na urina. Em comparação com o estudo anterior em SAR-PAGE, fica claro que o presente estudo conseguiu detectar o analito CERA por apenas 3 dias, porque a quantidade injetada foi 39 vezes menor do que o experimento acima mencionado, de RHEILEN, P., *et al.* 2018.

O decaimento gradual na quantidade de cada substância foi observado e permitiu o estabelecimento da quantidade mínima por coluna que permite a detecção. Portanto, como os animais receberam microdoses administradas em uma única injeção, os resultados apresentados confirmam a alta sensibilidade das amostras de urina neste método em comparação com outros estudos realizados nessa matriz. Os dados obtidos foram reprodutíveis, adicionando confiança aos resultados analíticos.

A identificação de rHuEPO e NESP em plasma e soro de cavalo foi previamente descrita (GUAN, F., *et al.* 2007; BAILLY-CHOURIBERRY, L., *et al.* 2012; LÖNNBERG, M., *et al.* 2012; GUAN, F., *et al.* 2008; GUAN, F., *et al.* 2010). Em trabalhos anteriores, ao injetar 0,37 µg / kg e 100 µg de NESP no equino, foi possível detectar este analito até o dia 8 e 12, respectivamente (GUAN, F., *et al.* 2008; GUAN, F., *et al.* 2010). Ao usar 0,5 mL de plasma, foi possível detectar 40 UI / kg (aproximadamente, 0,28 µg / kg) de rHuEPO e 0,39 µg / kg de NESP, que testaram positivo por até 2 e 7 dias, respectivamente, ao usar MAIIA e LC-FAIMS-MS / MS (LÖNNBERG, M., *et al.* 2012). No presente trabalho, a quantidade de soro utilizada foi de 0,250 mL, e a rHuEPO pôde ser detectada no sangue até o dia 3, com uma sensibilidade de 6,6 UI / kg (0,05 µg / kg), como mostra a Figura 23 (Cavalo 1). A forma ampla da banda característica e o *smear* não foram mais observados no dia 5.

Os resultados apresentados na Figura 23 confirmam a maior sensibilidade em comparação com os trabalhos citados anteriormente. Tal como na urina, o sangue do segundo equino testou positivo para NESP em todos os dias analisados (figura 23, Cavalo 2). Além disso, a janela de detecção para CERA foi entre o dia 1 ao dia 3 após a administração da droga. Chang *et al.* administraram 100 µg de CERA por equino por via subcutânea e observaram, pelo método ELISA, que a maior concentração de EPO estava no dia 2 e depois diminuía gradualmente até o dia 6. Guan *et al.* 2010, administraram 100 µg de CERA por cavalo por via intramuscular e o analito foi detectado até ao dia 8 após administração, por LC-MS. No entanto, na presente tese, foi mostrado que usando apenas 50 µg, o método SAR-PAGE seguido de *western blotting* foi capaz de identificar o analito em questão por até 3 dias após injeção única.

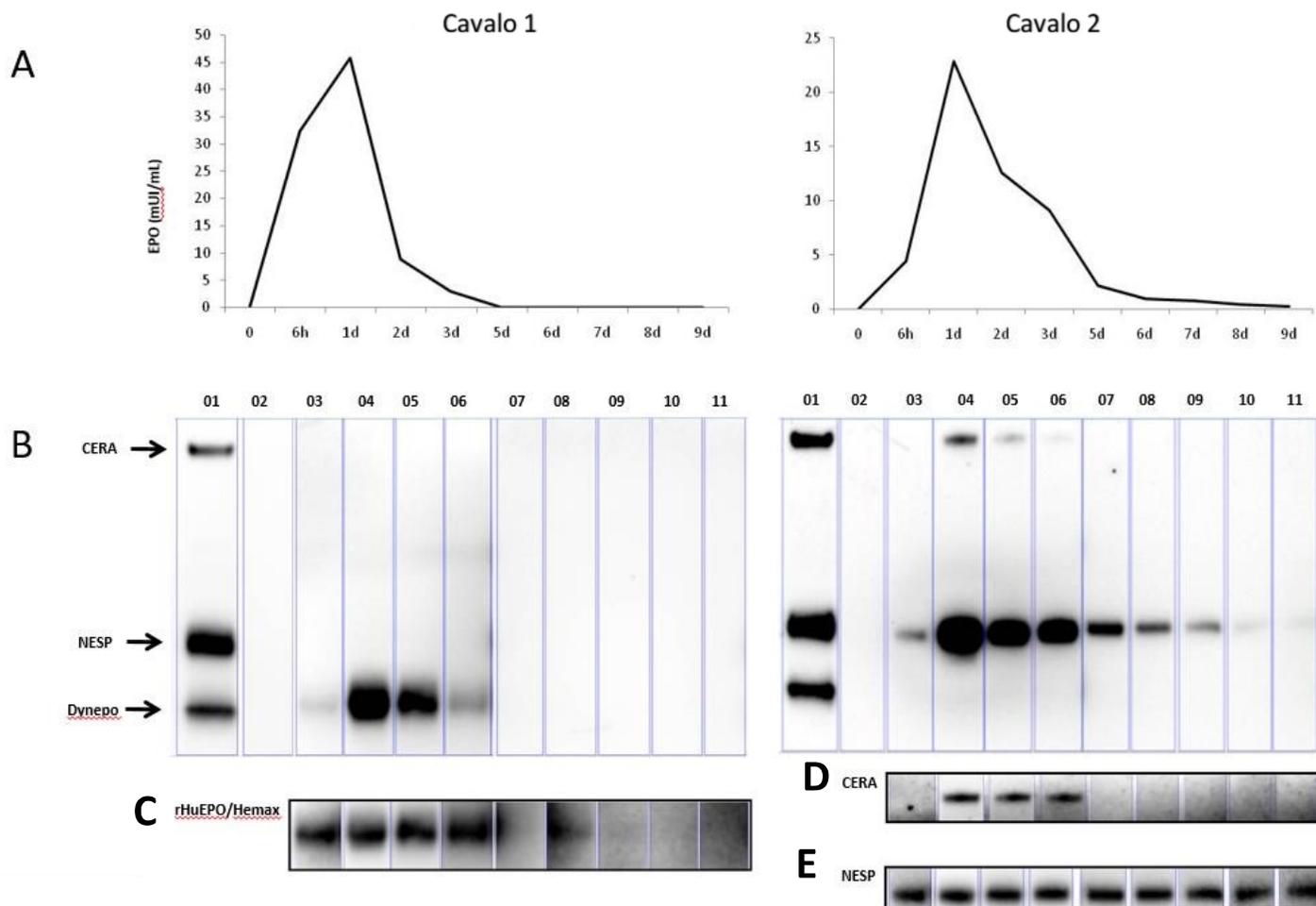


Figura 22: Estudo de excreção em urina-rHuEPO/Hemax (cavalo 1), NESP e CERA (cavalo 2). Quantificação da eliminação por **(A)** ELISA e **(B)** SAR-PAGE analisados nos dias on 0, + 6 h, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9 após a injeção (respectivamente, Colunas 2 – 11). Coluna 1: Mistura de ESAs. O pico de concentração indicado na figura A para o cavalo 1 e para o cavalo 2, corresponde ao pico de intensidade de banda visto na figura B. Conforme as bandas nas imagens B ficam menos fortes, o pico da figura A também decai, mostrando que a janela de detecção dos analitos diminui com o passar dos dias. No cavalo 1, o pico ficou na coluna 4, indicando as primeiras 24h após a injeção. Já para o cavalo 2, o pico de NESP e CERA também foi observado neste momento. As figuras C, D e E mostram as bandas de rHuEPO, NESP e CERA com maior contraste, respectivamente.

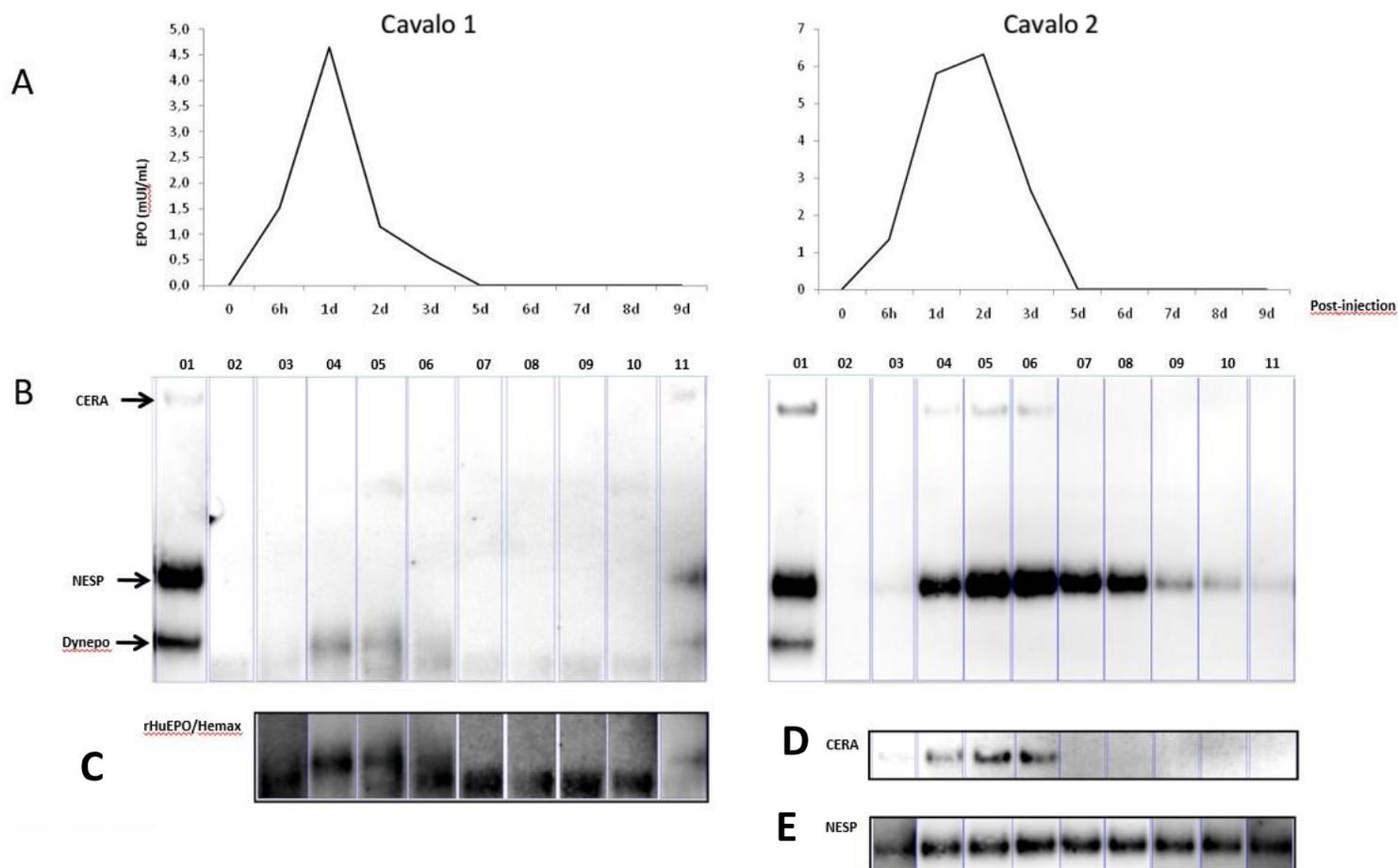


Figura 23: Estudo de excreção em sangue de equinos-rHuEPO/Hemax (Cavalo 1), NESP e CERA (Cavalo 2). Quantificação da eliminação por **(A)** ELISA e **(B)** SAR-PAGE analisados nos dias on 0, + 6 h, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9 após a injeção (respectivamente, Colunas 2 – 11). Coluna 1: Mistura de ESAs. O decaimento da concentração dos analitos na matriz sangue é observado com a diminuição do gráfico da Figura A. Assim também ocorre com a B, onde a intensidade das bandas diminui com o passar dos dias. As figuras C, D e E mostram as bandas de rHuEPO, NESP e CERA com maior contraste, respectivamente.

A cinética de eliminação para cada substância também pôde ser avaliada em ambas as matrizes usando o método de quantificação por ELISA. Estes resultados confirmam a maior sensibilidade da detecção de SAR-PAGE em comparação com o método ELISA, já que aonde a presença de NESP e CERA não pôde ser detectada, o método SAR-PAGE proposto ainda poderia detectar essas substâncias. Os gráficos correspondentes à dosagem de ESAs estão acima das imagens do SAR-PAGE (figuras 22 A e 23 A).

Conforme relatado por Desharnais, P., 2017 e , Martin, L., 2018, a técnica da IEF pode ser mais sensível para alguns tipos de biossimilares que surgiram no mercado após o fim da patente original para EPO recombinante, indicando que a técnica de SAR-PAGE poderia dar falsos negativos a alguns biossimilares em amostras humanas. Isso não seria uma preocupação com amostras de cavalos porque, embora a EPO equina e humana tenham 80% de similaridade, ^[13] o anticorpo usado para reconhecer a EPO humana tem alta especificidade e não reconhece a EPO equina. Portanto, a banda da EPO endógena do equino não é visível no gel, como mostrado nos sangues e urinas brancas usados como controles negativos na validação do método e no estudo de excreção (figura 16 colunas 2, 3, 5 e 6 e figura 17 colunas 2, 3, 4 e 5); e Figuras 22 e 23, colunas 2). Assim, qualquer banda que apareça no gel é exógena, gerando melhor sensibilidade, especialmente em relação à rHuEPO.

Como visto neste trabalho de mestrado, quando comparado a outros, a técnica SAR-PAGE mostra melhor sensibilidade e menores limites de detecção quando se utiliza matriz de urina e, para detecção de rHuEPO e CERA no sangue. A Tabela 4 resume os LODs estabelecidos de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc em amostras fortificadas realizadas neste trabalho e as compara com os dados publicados anteriormente por LC-MS / MS. Há poucos dados publicados disponíveis para a urina, o que pode ser devido às dificuldades enfrentadas durante a etapa de extração, os quais foram superadas neste trabalho.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

SAR-PAGE seguido do método de *single-blotting* é um método amplamente utilizado por laboratórios credenciados pela WADA para a detecção do uso indevido de EPO por atletas humanos. Neste trabalho de mestrado, um método eletroforético seletivo, sensível e robusto foi apresentado para monitorar o abuso de rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc em equinos. Este método, quando aplicado a equinos, mostra a vantagem de ter uma interpretação mais fácil dos resultados devido à ausência de um sinal endógeno da EPO, uma vez que o anticorpo anti-EPO para humanos não reconhece EPO equina endógena. Além disso, essa técnica apresenta grande sensibilidade em comparação com estudos anteriores, permitindo limites mais baixos de detecção em amostras de urina, produzindo sensibilidade superior e LODs inferiores aos relatados anteriormente. (BAILLY-CHOURIBERRY, L., *et al.* 2012; SCARTH, J., *et al.* 2011).

As menores concentrações detectadas no gel de cada ESA foram 1,3, 1,6, 3,3 e 13,3 pg / mL para as urinas fortificadas com rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc, respectivamente. Isso indica uma sensibilidade maior em pelo menos 15 vezes para rHuEPO, NESP e CERA do que relatos anteriores. ^[11,23] Para sangue fortificado, os LODs foram 40, 100, 80 e 400 pg / mL para rHuEPO, NESP, CERA e EPO-Fc, respectivamente, sendo 1,25 e 3,12 vezes menores do que os descritos anteriormente na literatura para rHuEPO e CERA (SCARTH, J., *et al.* 2011; GUAN, F., *et al.* 2010). Além disso, esta é a primeira avaliação de LODs para EPO-Fc por SAR-PAGE em amostras de equinos.

A combinação de um tampão, calor e resfriamento como pré-tratamento para amostras de urina resolveu a questão da extração. Logo, tornou-se uma ferramenta útil para extrair urina de cavalo sem perder os analitos ou lidar com o entupimento dos filtros. Esta nova abordagem permitirá a realização de novos estudos sobre a urina de cavalo.

O método também foi aplicado com sucesso a amostras de urina e sangue coletados de equinos, aos quais foram administrados ESAs por via subcutânea através de microdoses únicas dessas drogas. Os estudos de excreção realizados também mostraram que a administração de microdoses de ESAs pode ser detectada por vários dias em 15 mL de urina e em quantidades menores

de sangue (0,25 mL), em comparação com dados anteriores de literatura. Corroborando a boa sensibilidade do método apresentado neste trabalho, todos os equinos testaram positivo para as três substâncias administradas.

O processo de detecção de ESAs em amostras reais de cavalo apresentado nesta dissertação deu apenas os seus primeiros passos, com a demonstração de todas as suas etapas desde a identificação do problema de extração da matriz urina até a verificação do limite de detecção em amostras fortificadas, além do sucesso em amostragem em cavalos reais. Todo o processo realizado até o presente momento foi feito com o objetivo de identificar rHuEPO humana em cavalos. Como desdobramentos do trabalho, serão realizados estudos para detecção de eritropoietina recombinante equina (reEPO) também em urina e sangue de equinos, e, para isso, serão utilizados, além de padrões de reEPO, dois tipos de anticorpo monoclonal anti-EPO de cavalo, para as etapas de imunopurificação e western blotting. Este projeto prevê também a detecção de rHuEPO e reEPO concomitantemente em uma única análise.

A implementação do método na rotina laboratorial visa inibir o uso de substâncias proibidas, devido à alta sensibilidade do método. Portanto, o presente estudo cumpriu os critérios de qualidade e provou que o método SAR-PAGE é apropriado para fins de controle de doping em cavalos de corrida.

O presente trabalho deu origem a um artigo, que foi publicado na revista de maior relevância na área de dopagem mundial (anexo 7), a *Drug, Testing and Analysis*.

6. REFERÊNCIAS

ABCD – Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem. Dopagem. Disponível em <www.abcd.gov.br/>. Acessado em 14/11/2018.

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

Addis-Smith, L. "The Changing Pattern of 'Doping' in Horse Racing and Its Control." *New Zealand Veterinary Journal* 9, no. 6 (1961): 121–128

Bailly-Chouriberry, L., Cormant, F., Garcia, P., Lönnberg, M., Szwandt, S., Bondesson, U., Popot, M., & Bonnaire, Y. (2012). A new analytical method based on anti-EPO monolith column and LC-FAIMS-MS/MS for the detection of rHuEPOs in horse plasma and urine samples. *Analyst* 137, 2445–2453.

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

Bento, R., Damasceno, L., Neto, F. Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão. *Rev Bras Med Esporte*, 2003 - Vol. 9, Nº 3 – Mai/Jun.

Bitonti, AJ., *et al.* Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 29;101(26):9763-8. Epub 2004 Jun 21.

Bruegge, K., Jelkmann, W., Metzen, E. Hydroxylation of Hypoxia-Inducible Transcription Factors and Chemical Compounds Targeting the HIF-Hydroxylases. *Current Medicinal Chemistry*, 2007, 14:1853-1862.

Bux, R., Zedler, B., Schmidt, P., Parzeller, M. (2008). Sudden unexpected death associated with sports. Frequency in autopsies between 1972 and 2007. *Rechtsmedizin* 18(3):155–160

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

Desharnais, P., Naud, J., Ayotte, C. Immunomagnetic beads-based isolation of erythropoietins from urine and blood for sports anti-doping control. *Drug Test Anal* 2017;9 (11-12):1744-1752.

Ebert, B., Bunn, H. (1999) Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 74:1864–1877

Egrie, J., Browne, J. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *British Journal of Cancer* volume 84, pages3–10 (2001)

Ekblom, B. Erythropoietin. Performance-enhancing substances in sport and exercise. USA: *Human Kinetics*, 2002:101-7.

ELLIOT, S., Phama, E., MACDOUGALL, I. Erythropoietins: A common mechanism of action. *Experimental Hematology*, 2008; 36:1573–1584

Fédération Equestre Internationale. Fei announces two banned substance positives, 2016. Disponível em <https://inside.fei.org/news/fei-announces-two-banned-substance-positives>. Acessado em 14/11/2018.

Guan, F., Robinson, M. EPO T9 as a Specific Peptide for LC-MS Confirmation of rhEPO in Equine Plasma. Oral presentation at: 22nd *International Conference of Racing Analysts and Veterinarians; March, 2018; Dubai, United Arab Emirates*.

Guan, F., Uboh, C., Soma, L., Maylin, G., Jianq, Z., Chen, J. Confirmatory analysis of continuous erythropoietin receptor activator and erythropoietin analogues in equine plasma by LC-MS for doping control. *Anal Chem* 2010;82(21):9074-9081

Guan, F., Uboh, C., Soma, L., *et al*. Differentiation and identification of recombinant human erythropoietin and darbepoetin alfa in equine plasma by LC-MS/MS for doping control. *Anal Chem* 2008;80:3811-3817.

Guan, F., Uboh, C., Soma, L., *et al*. LC-MS/MS Method for Confirmation of Recombinant Human Erythropoietin and Darbepoetin in Equine Plasma. *Anal Chem* 2007: 79, 4627-4635.

Hemmersbach, P. (2008) History of mass spectrometry at the Olympic Games. *J Mass Spectrom* 43:839–853

Higgins, A. From ancient Greece to modern Athens: 3000 years of doping in competition horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Volume 29. October 2006. Pages 4-8.

Jelkmann, W., Metzen, E. Erythropoietin in the control of red cell production. *Ann Anat*, 1996, 178(5),391-403.

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

Lasne, F., *et al.* Detection of recombinant epoetin and darbepoetin alpha after subcutaneous administration in the horse. *J Anal Toxicol*, 2005, 29 (8):835-837.

Lönnerberg, M., Bondesson, U., Cormant, F., *et al.* Detection of recombinant human EPO administered to horses using MAIIA lateral flow isoform test. *Anal Bioanal Chem* 2012;403:1619-1628.

Lönnerberg, M., Bondesson, U., Cormant, F., Garcia, P., Bonnaire, Y., Carlsson, J., Bailly-Chouriberry, L. Detection of recombinant human EPO administered to horses using MAIIA lateral flow isoform test. *Anal Bioanal Chem* 2012:403, 1619-1628.

Macdougall, I., Eckardt, M. Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential new treatments for anaemia. *Lancet*, 2006. Sep 9;368(9539):947-53.

Macdougall, I. An overview of the efficacy and safety of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(suppl 3):14–21

MAIIA Diagnostics. (2016). EPO Purification Kit-Directions for Use. Disponível em <http://maiiadiagnostics.com/gammal/files/Directions%20for%20Use%20-%20EPO%20Purification%20Kit%20%28new%21%29.pdf>

Martin, L., Audran, M., Marchand, A. Development of an Isoelectric focusing method (IEF) for the screening of all rEPOs and ActRII-Fc proteins. Oral presentation at: Manfred Donike Workshop, The 36th Cologne Workshop on Dope Analysis; April, 2018; Cologne, Germany.

Masquelier, M. ESAs screening optimization. Oral presentation at: Manfred Donike Workshop, The 36th Cologne Workshop on Dope Analysis; April, 2018; Cologne, Germany.

McKeever, K., McNally, B., Hinchcliff, K., Lehnhard, R., & Poole, D.. *Respir Physiol Neurobiol* 2016:225, 38-34.

Mesonzhnik, N., Postnikov, V., Svetlana, P., Svetlana, A., Grigory, K. Characterization and detection of EPO-Fc fusion proteins using LC-MS. *Journal of Proteome Research* 2018:17. 689–697.

Mocini, D., Leone, T., Tubaro, M., Santini, M., Penco, M. Structure, production and function of erythropoietin: implications for therapeutical use in cardiovascular disease. *Curr Med Chem.* 2007;14(21):2278-87.

Müller, R. History of Doping and Doping Control. *Doping in Sports*. Capítulo 1., 2010.

Munch J. Saliva tests. I. Morphine. Scientific Section, A. Ph. A., Washington meeting, 1934.

Murakami, M., *et al.* Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity. *Science Advances/Biochemistry.* 2016.

Ng, T., Marx, G., Littlewood, T., *et al.* Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgraduate Medical Journal* 2003;79:367-376.

OMS. World Health Organization. International Nonproprietary Names. Disponível em < <https://www.who.int/medicines/services/inn/en/> >

Panisa, A., Dorigon, A. A lei antidoping e os direitos fundamentais do atleta. *Revista Âmbito Jurídico* nº 157, 2017 – Ano XX.

Pereira, H., Sardela, V., Padilha, M., *et al.* Doping control analysis at the Rio 2016 Olympic and Paralympic Games. *Drug Test Anal* 2017;9(11-12):1658-1672.

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

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

Reichel, C., Thevis, M. Gel electrophoretic methods for the analysis of biosimilar pharmaceuticals using the example of recombinant erythropoietin. *Bioanalysis* 2013;5(5):587-602.

Reichel, C., Gmeiner, G. Erythropoietin and analogs. Em Handbook of Experimental Pharmacology 195: *Doping in Sports*. New York: Springer, 2010. Cap 12, pág 251-294.

Reichel, C., Abzieher, F., Geisendorfer, T. SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA- and EPO-doping in blood. *Drug Test Anal* 2009 (11-12):494-504.

Reihlen, P., Blobel, M., Machnik, M., *et al.* Screening and confirmation of various ESAs in equine blood by SARCOSYL-PAGE. Poster presented at: 22nd *International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*; March 2018; Dubai, United Arab Emirates

Reihlen, P., Blobel, M., Kempkes, R., Reichel, C., VölkerSchänzer, E., Majer, B., Schänzer, W. Optimizing SAR-PAGE. *Drug Test. Anal* 2015:7, 1014–1016.

Rivier, L., Saugy. Peptide Hormones Abuse in Sport: State of the Art in the Detection of Growth Hormone and Erythropoietin. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 1999. 18(2), 145–176.

Rubio, K.; Nunes, A. Comportamento de risco entre atletas: os recursos ergogênicos e o doping no Século XXI. *Revista Brasileira de Psicologia do Esporte*, São Paulo, v.3, nº 4, 2010.

Salgado, R., *et al.* Post-translational modification of a chimeric EPO-Fc hormone is more important than its molecular size in defining its *in vivo* hematopoietic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Volume 1850, Issue 9, September 2015, Páginas 1685-1693.

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* 2004, 65(1):15-9.

Scarth, J., Seibert, C., Brown, P., *et al.* UPLC-MS/MS Method for the identification of recombinant human erythropoietin analogues in horse plasma and urine. *Chromatographia* 2011;74:593-608.

Simpson, N., Wynne, P. 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, Inc; 2000: 39-96.

U.S. Anti-Doping Agency (USADA). Lance Armstrong Receives Lifetime Ban And Disqualification Of Competitive Results For Doping Violations Stemming From His Involvement In The United States Postal Service Pro-Cycling Team Doping Conspiracy. *U.S. Anti-Doping Agency (USADA)*. Acessado em 29/12/2018.

WADA EPO Working Group. (2014). WADA-TD2014EPO World Anti-Doping Agency, 1–15. Retirado de <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA-TD2014EPO-v1-Harmonization-of-Analysis-and-Reporting-of-ESAs-by-Electrophoretic-Techniques-EN.pdf>.

WADA, 2019. Prohibited List Documents. Disponível em < <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents> >

WADA. International Standard for laboratories. 2015. Retirado de < <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isl> > acessado em 05/01/2019.

Wang, H., Yong, D., Zhang, R., Xu, J., Liu, L. Recombinant human EPO-FC fusion proteins with prolonged half-life and enhanced erythropoietic activity in vivo, 2006. Depositante: Novagen Holding Corporation. United States Patent. Patent No.: US 8431,132 B2

World Anti-Doping Agency. (2018). Prohibited List. Retrieved from https://www.wada--ama.org/sites/default/files/prohibited_list_2018_en.pdf.

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*, 2010, 396:2513–2521.

7. ANEXO