

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE  
LISBOA**

**DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM  
MÉTODO DE PESQUISA DE ERAs EM AMOSTRAS DE  
DRIED BLOOD SPOTS (DBS)**

Sara da Costa Antunes dos Santos

Orientadores:

Professor Doutor Paulo Paixão (Laboratório de Análises de Dopagem)

Professor Doutor Miguel Brito (ESTeSL)

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2022

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE**  
**LISBOA**

**DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM**  
**MÉTODO DE PESQUISA DE ERAs EM AMOSTRAS DE**  
**DRIED BLOOD SPOTS (DBS)**

Sara da Costa Antunes dos Santos

Orientadores:

Professor Doutor Paulo Paixão (Laboratório de Análises de Dopagem)

Professor Doutor Miguel Brito (ESTeSL)

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2022

Mestrado em  
Tecnologias  
Moleculares  
em Saúde

DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM  
MÉTODO DE PESQUISA DE ERAS EM AMOSTRAS DE  
DRIED BLOOD SPOTS (DBS)

Sara da Costa  
Antunes dos  
Santos

**2022**

## Agradecimentos

Tenho sorte, mesmo muita sorte pois no meu percurso sempre fui acompanhada por pessoas que me ajudaram a crescer e a conquistar as minhas montanhas e a elas quero agradecer pela forma como me influenciaram.

Ao Professor Doutor Miguel Brito pela orientação e boa disposição com que encara tudo e por ser um marco na minha vida académica. Ao Professor Doutor Paulo Paixão por ter aceitado o convite e pela orientação ponderada e assertiva.

À Chefia Dona Maria Pias por juntos me darem um propósito maior e ajudarem a manter um sonho bem real na vida dos nossos jovens escoteiros. A todos os jovens dos Escoteiros de Queluz e em particular a todos os caminheiros do 23 pelo carinho, respeito e alegria. E em particular à Joana Félix por navegar comigo neste barco e me ter demonstrado que tenho muito para aprender e crescer.

Ao David, Li, Diogo e Sofia por me terem ensinado tudo aquilo que me orgulho de perpetuar e serem um verdadeiro exemplo na minha vida. Ao Artur por me demonstrar um tipo de amor que desconhecia e deixar-me mostrar que o meu trabalho é alguma “coisa de jeito”.

Aos meus amigos Leo, Joana, Daniela, Patrícia, Valter e Pedro pelas noites divertidas que me ajudaram a descontraír e manter a mente sã. A “elas” por me terem tornado melhor pessoa e me pelo acompanhamento na minha vida académica.

Ao João por ser um líder que me ajuda a acreditar, ao Engenheiro Daniel pela invenção única que me permitiu otimizar o trabalho, à Bea pela partilha constante, ao Telmo por ser o principal impulsionador da definição deste caminho, à Tiffany pela cooperação e companheirismo estilo BIO, sem a qual nunca teria sido possível fazer este trabalho e à Liliana por ser um exemplo diário de dedicação, empenho e interajuda. A vocês todos obrigada por me fazerem acreditar que a amizade está onde nós conseguimos alcançar.

À minha sobrinha e amiga Catarina por me permitir demonstrar que nunca é tarde demais e há sempre um tempo certo. Ao meu irmão Daniel por ser mais do que irmão em toda a minha vida. Não tenho palavras para agradecer à minha mãe, que sozinha, sempre me definiu, protegeu e me tornou mais forte. Muito obrigada mãe.

Pelo papel que tens na minha vida como meu melhor amigo, a ti André, por me motivares a subir todas as montanhas que meto no nosso caminho e juntos crescermos.

## Resumo

As especificações para a análise de eritropoietina (EPO) e Agonistas do Recetor da Eritropoietina (ERAs) nos laboratórios de antidopagem encontram-se descritas atualmente apenas para urina e soro/plasma. A utilização de *dried blood spots* (DBS) para análise de substâncias dopantes tem sido uma realidade cada vez mais comum estando esta metodologia a conquistar um lugar de relevo na luta contra a dopagem. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo compreender se o sangue capilar em DBS é um complemento viável para a deteção de EPO e ERAs no âmbito do controlo de dopagem. O estudo envolveu 30 voluntários, aos quais foram colhidos dois spots de 60 µL de sangue capilar no dedo, amostras de sangue venoso (tubo EDTA) e ainda, a quatro voluntários, amostras de urina e sangue (tubos EDTA e seco). Todas as amostras, de DBS, foram imunopurificadas (Kit de Purificação em Gel - MAIIA) e implementados os métodos eletroforéticos *sodium N-lauroysarcosinate polyacrilamide gel eletrophoresis* (SAR-PAGE) e *Western Blot*. De modo a identificar qual a quantidade mínima do analito que pode ser detetada pelo método recorrendo a amostras DBS determinaram-se valores de limites de deteção (LODs) para as principais ERAs: BRP, NESP, EPO-Fc e CERA que se concluíram mais elevados do que os definidos para soro e urina. O estudo de estabilidade realizado com amostras de DBS, soro e urina conservadas a diferentes temperaturas (ambiente, 4°C e -20 °C), apresentaram resultados promissores para os DBS, ao serem a única matriz que permite a conservação de todas as ERAs ao fim de três meses a qualquer temperatura analisada. Estes resultados apoiam a utilidade dos DBS como matriz biológica complementar para a deteção de EPO e ERAs no controlo de dopagem.

**Palavras-Chave:** *Dried Blood Spots* (DBS), Agonistas do recetor da eritropoietina (ERAS) e eritropoietina (EPO).

## Abstract

Currently specifications for the analysis of Erythropoietin (EPO) and Erythropoietin Receptor Agonists (ERAs) in anti-doping laboratories are only described for urine and serum/plasma. The use of dried blood spots (DBS) for the analysis of doping substances has been increasing and this methodology gaining a prominent place in the fight against doping. For that reason, the present study aims to understand whether capillary blood in DBS is a viable complement for the detection of EPO and ERAs in relation to doping control. The study involved 30 volunteers, of whom two 60  $\mu$ L spots of capillary blood on the finger and venous blood samples (EDTA tube) were collected. Urine and blood samples (EDTA and dry tubes) were also collected from 4 of the 30 volunteers. All DBS samples were immunopurified (Gel Purification Kit - MAIIA) and the electrophoretic methods of sodium N-lauroylsarcosinate polyacrylamide gel electrophoresis (SAR-PAGE) and Western Blot were implemented. To determine the lowest concentration of the analyte that can be detected in DBS samples, limits of detection values (LODs) were quantified for the main ERAs: BRP, NESP, EPO-Fc and CERA, resulting in limits of higher value than those defined for serum and urine. The stability study carried out with samples of DBS, serum and urine, stored at different temperatures (ambient, 4°C and -20°C), showed promising results for DBS, as they are the only matrix that allows the conservation of all ERAs after three months at all the studied temperatures. These results support the utility of DBS as a complementary biological matrix for the detection of EPO and ERAs in doping control.

**Key Words:** *Dried Blood Spots (DBS), EPO-Receptor Agonists (ERAs) and erythropoietin (EPO)*



# Índice Geral

<b>1. Introdução</b>	<b>18</b>
1.1. World Anti-Doping Agency (WADA)	18
1.2. A origem da eritropoietina	19
1.3. Crescimento, proliferação e diferenciação na eritropoiese	21
1.4. Agonistas do Recetor da Eritropoietina (ERAs)	22
1.5. <i>Testing figures report</i>	24
1.6. Colheita, transporte e armazenamento de amostras de urina e sangue	26
1.7. <i>Dried Blood Spots</i> (DBS)	29
1.7.1. Colheita das amostras, transporte e armazenamento	30
1.7.2. Vantagens e limitações	31
1.7.3. Diferentes tipos de suportes e dispositivos	35
1.8. Método <i>Gold-Standard</i>	38
<b>2. Objetivos do estudo</b>	<b>42</b>
<b>3. Materiais e métodos</b>	<b>44</b>
3.1. Amostras biológicas	44
3.2. Hemograma	45
3.3. Questionário	45
3.4. Materiais de referência	45
3.5. Parâmetros de análise	46
3.5.1. Seletividade	47
3.5.2. Limite de deteção (LOD)	47
3.5.3. Robustez/ Comparação de diferentes marcas de DBS	47
3.5.4. Estudo de estabilidade e capacidade de identificação	48
3.6. Procedimento experimental	49
3.6.1. Imunopurificação das amostras de urina – ELISA, StemCell	49
3.6.2. Imunopurificação das amostras de soro – Kit 1390, MAIIA	49

3.6.3.	Imunopurificação das amostras de DBS – Kit 1430, MAIIA.....	50
3.6.4.	Eletroforese por SAR-PAGE .....	50
3.6.5.	Blot ou transferência básica e bloqueio com leite .....	51
3.6.6.	Incubação automatizada do anticorpo primário e estreptavidina conjugada com HRP; .....	51
3.6.7.	Deteção quimioluminiscente.....	52
3.6.8.	Tratamento dos resultados .....	52
<b>4.</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>54</b>
4.1.	Amostras biológicas.....	54
4.2.	Hemograma.....	55
4.3.	Questionário .....	55
4.4.	Parâmetros de análise .....	56
4.4.1.	Seletividade .....	57
4.4.2.	Limite de deteção (LOD).....	60
4.4.3.	Robustez/ Comparação de diferentes marcas de DBS .....	62
4.4.4.	Estudo de estabilidade e capacidade de identificação .....	66
<b>5.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>80</b>
<b>7.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>87</b>
	Anexo I .....	87
	Anexo II .....	87
<b>8.</b>	<b>Apêndices .....</b>	<b>88</b>
	Apêndice 1.....	88
	Apêndice 2.....	89
	Apêndice 3.....	89
	Apêndice 4.....	90
	Apêndice 5.....	95
	Apêndice 6.....	95
	Apêndice 7.....	97

Apêndice 8.....	99
Apêndice 9.....	101
Apêndice 10.....	102

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1-</b> Horas máximas desde a colheita da amostra de sangue até chegada ao laboratório de acordo com a substância pesquisada (27) .....	27
<b>Tabela 1.2-</b> MRPL das ERAs, analisadas por métodos eletroforéticos por matriz de análise. Adaptado de (48).....	35
<b>Tabela 3.1-</b> Concentrações testadas, em amostras de DBS, para o parâmetro Limite de Detecção (LOD).....	47
<b>Tabela 3.2-</b> Condições do programa no <i>BlotCycler</i> .....	52
<b>Tabela 4.1-</b> Valores de LOD em sangue capilar (DBS) definidos para as ERAs: CERA, EPO-Fc, NESP e rEPO (BRP), resultados obtidos pela leitura da <b>Figura 4.6</b> .....	62
<b>Tabela 7.1-</b> Técnicas eletroforéticas para análise de ERAs na urina e no sangue (soro e/ou plasma) (48).....	87
<b>Tabela 8.1-</b> Classes de substâncias e métodos proibidos(3) .....	88
<b>Tabela 8.2-</b> Resumo de valores descritos no Testing Figures Report, de 2013 a 2020, para as amostras de ERAs em urina e sangue .....	89
<b>Tabela 8.3-</b> Correlação entre a temperatura média no transporte da amostra de sangue com o período de tempo entre a colheita e recepção (27) .....	89
<b>Tabela 8.4-</b> Bibliografia desenvolvida no âmbito das análises de dopagem com recurso a Dried Blood Spots (DBS) .....	90
<b>Tabela 8.5-</b> Medição do pH e densidade das 4 amostras de urina de diferentes voluntários no imediato .....	95
<b>Tabela 8.6-</b> Resultados de hematócrito, resultante do hemograma completo analisado no tubo de EDTA e diâmetro (mm) dos blood spot após secagem.....	95
<b>Tabela 8.7-</b> Hemograma realizado ao tubo de sangue venoso com EDTA no equipamento XN-1000 (Sysmex) .....	96
<b>Tabela 8.8-</b> Dados resultantes do boxplot dos valores da escala de dor do sangue venoso e capilar. Valores representados: mínimo, 1º quartil, mediana, média, 3º quartil e máximo. ....	98
<b>Tabela 8.9-</b> Valores do volume absoluto das bandas endógenas dos 30 voluntários (DBS1-30) representados na <b>Figura 4.3</b> , <b>Figura 4.2</b> e <b>Figura 4.4</b> .....	99
<b>Tabela 8.10-</b> Valores do volume absoluto das bandas das 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA) nas 5 concentrações testadas para o parâmetro do limite de detecção (LOD) representado na <b>Figura 4.5</b> .....	100

<b>Tabela 8.11-</b> Valores do volume absoluto das bandas da endógena (bEPO) e das 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA) nos 6 diferentes suportes testados para o parâmetro de comparação de DBS representado na <b>Figura 4.7</b> .....	100
<b>Tabela 8.12-</b> Valores do volume absoluto das bandas da endógena (bEPO) e das 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA) nos 6 diferentes suportes testados para o parâmetro de comparação de DBS representado na <b>Figura 4.8</b> .....	101
<b>Tabela 8.13-</b> Medição do pH e densidade das 4 amostras de urina de diferentes voluntários ao fim de 3 meses armazenadas a diferentes temperaturas .....	101

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1-</b> Efeitos pleiotrópicos da eritropoietina. Adaptado de (10) .....	21
<b>Figura 1.2-</b> Produção de EPO- Mecanismo feedback em loop. Adaptado de (12).....	22
<b>Figura 1.3-</b> Comparação de amostras analisadas de ERAs no sangue e urina entre 2012-2020 (18) .....	26
<b>Figura 1.4-</b> SAR-PAGE: 1. Dynepo, 2. uEPO (NIBSC), 3. Urina com perda de peso molecular, 4. Amostra negativa fortificada com rEPO (29) .....	28
<b>Figura 1.5-</b> A- Frascos de colheita, transporte e armazenamento de amostras de urina com sistema de segurança. BEREG-kit, Berlinger B- Frascos de colheita, transporte e armazenamento de amostras de sangue com sistema de segurança. BEREG-kit Small, Berlinger .....	32
<b>Figura 1.6-</b> Diversos tipos de cartões utilizados nas DBS; A- Whatman® 903 Protein Saver Card; B- Whatman® FTA® Elute; C- Microsampling HemaXis DB10 kits; D-F- Whatman® FTA DMPK-A, B e C. ....	37
<b>Figura 1.7-</b> Dispositivos de microamostragem. A-VAMS (Neoteryx), B- TAP® (Seventh Sense Biosystems), C- TAPII (Seventh Sense Biosystems) e D- Tasso-M20 (Tasso) 37	
<b>Figura 1.8-</b> Perfis isoeletricos da uEPO e ERAs. rEPO: 3 bandas na área básica, as duas mais intensas pertencem à área básica. uEPO: bandas na área endógena. NESP: 3 bandas aceitáveis na área ácida. CERA e EPO-Fc: 4 bandas consecutivas na área básica correspondente. Adaptado de (48) .....	39
<b>Figura 1.9-</b> A- Perfil das ERAs por SAR-PAGE (NESP, Dynepo, CERA, EPO-Fc e hEPO. B- Perfil das bandas de Dynepo, hEPO e hEPO/rEPO pela técnica de SAR-PAGE. Adaptado de (48). ....	40
<b>Figura 4.1-</b> Resultado SAR-PAGE, para definição do volume de trabalho (20,40 e 60 µL). ERA MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA. NIBSC (0,2 mUI) .....	57
<b>Figura 4.2-</b> Resultado SAR-PAGE seletividade. Amostras DBS 5-12. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA .....	58
<b>Figura 4.3-</b> Resultado SAR-PAGE seletividade. Amostras DBS 1-4. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	58
<b>Figura 4.4-</b> Resultado SAR-PAGE seletividade. Amostras DBS 13-30. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA .....	59

<b>Figura 4.5-</b> Resultado SAR-PAGE para o Limite de detecção (LOD). Cinco concentrações, C1-C5 de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA .....	60
<b>Figura 4.6-</b> Resultado SAR-PAGE para o Limite de detecção (LOD). Seis concentrações, C2-C7 de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA .....	61
<b>Figura 4.7-</b> Resultados de SAR-PAGE para a comparação de diferentes suportes de DBS. Do lado esquerdo apresentam-se os resultados de amostras apenas com bEPO e do lado direito amostras fortificadas com 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	64
<b>Figura 4.8-</b> Resultados de SAR-PAGE para a comparação de diferentes suportes de DBS. Do lado esquerdo apresentam-se os resultados de amostras apenas com bEPO e do lado direito amostras fortificadas com 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	66
<b>Figura 4.9-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em soro e urina imediatamente após colheita e fortificação das amostras. 1-4 soro: Amostras com 500 µL de sangue soro e fortificação de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). 1-4 urina: Amostras com 7,5 mL de urina e fortificação de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (1,5 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	67
<b>Figura 4.10-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em DBS imediatamente após colheita e fortificação das amostras. 1-4 DBS: Amostras de DBS com 60 µL de sangue venoso total e fortificação de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA .....	67
<b>Figura 4.11-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de sangue capilar em DBS conservadas durante 1 mês a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de sangue capilar em DBS. NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	68
<b>Figura 4.12-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de urina conservadas durante 1 mês a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de urina. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste	

para as bandas de CERA, EPO-Fc da temperatura 4 °C e -20 °C e para as bandas de NESP da temperatura -20 °C. NIBSC (1,5 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	69
<b>Figura 4.13-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de soro conservadas durante 1 mês a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. S1-S4: Amostras de soro. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA .....	70
<b>Figura 4.14-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de sangue capilar em DBS conservadas durante 2 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de sangue capilar em DBS. NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	71
<b>Figura 4.15-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de urina conservadas durante 2 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de urina. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste para as bandas de CERA e BRP da temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C, para as bandas de NESP e EPO-Fc da temperatura 4°C e -20 °C. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	72
<b>Figura 4.16-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de soro conservadas durante 2 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. S1-S4: Amostras de soro. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste para as bandas de CERA e EPO-Fc da temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C, para as bandas de BRP da temperatura 4°C e -20 °C. NIBSC (1,5 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	73
<b>Figura 4.17-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de sangue capilar em DBS conservadas durante 3 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de sangue capilar em DBS. NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	74
<b>Figura 4.18-</b> Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de urina conservadas durante 3 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de urina. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste para as bandas de CERA e BRP da temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C, para as bandas de NESP e EPO-Fc da temperatura 4°C e -20 °C. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA.....	75

**Figura 4.19-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de soro conservadas durante 3 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. S1-S4: Amostras de soro. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste para as bandas de CERA e EPO-Fc da temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C, para as bandas de BRP da temperatura 4°C e -20 °C. NIBSC (1,5 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA..... 75

**Figura 7.1-** Estabilidade do NESP, após período de armazenamento a longo prazo (3-5 ½ meses). Adaptado de (44)..... 87

## Abreviaturas

- AAD** – *Anti Doping Danmark* ou Autoridade Antidopagem da Dinamarca
- AAF** – *Adverse Analytical Finding* ou Resultado Analítico Positivo
- ABP** – *Athlete Biological Passport* ou Passaporte biológico do atleta
- ADAMS** – *Anti-Doping Administration and Management System*
- ATF** – *Atypical Finding* ou Resultado atípico
- AUT** – Autorização de utilização terapêutica
- BFU-E** – Unidade formadora de *burst* eritroide
- BRP** – *Biological Reference Preparation*
- bEPO** – Eritropoietina endógena sanguínea
- CCD** – *Charge Coupled Device*
- CE** – Conselho de ética
- CERA** – *Continuous Erythropoietin Receptor Activator*
- CFU-E** – Estágio de formação da unidade eritroide
- cDNA** – Ácido desoxirribonucleico complementar ou *complementary DNA*
- COI** – Comité Olímpico Internacional
- CP** – *Confirmation Procedure* ou Procedimento de confirmação
- DBS** – *Dried Blood Spot*
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- EDTA** – Ácido etilendiamino tetra-acético
- ELISA** – *Enzyme linked immunosorbent assay* ou Ensaio de imunoabsorção enzimática
- EPO** – Eritropoietina
- EPO-Fc** – *Recombinant human erythropoietin-alpha Fc-Chimera*
- EpoR** – Recetor de eritropoietina
- ERAs** – Agonistas do recetor da eritropoietina ou *EPO-Receptor Agonists*
- ESTEsL** – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
- FDA** – *U.S Food & Drug Administration*
- FTA** – *Flinders Technology Associates*
- HBOCs** – *Hemoglobin-Based Oxygen Carriers* ou Transportadores de oxigénio baseados na hemoglobina

**HCT** – Hematócrito

**hEPO** – Eritropoietina endógena humana

**HRP** – *Enzyme Horsedish peroxidase* ou Enzima peroxidase de rábano

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogénio

**IAAF** – *International Association of Athletics Federations* ou Associação Internacional de Federações de Atletismo

**IEF** – *Isoelectric Focusing* ou Focagem Isoelétrica

**INFARMED** – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

**IOC** – *International Olympic Committee* ou Comité Olímpico internacional

**IPDJ** – Instituto Português do Desporto e Juventude

**IRC** – Insuficiência Renal Crónica

**ISL** – *International Standard for Laboratories* ou Norma internacional para laboratórios

**ISTI** – *International Standard for Testing and Investigation*

**ITP** – *Initial Testing Procedure* ou Procedimento de triagem

**I&D** – Investigação e desenvolvimento

**JAK 2** – Janus quinase 2 (JAK 2)

**LAD** – Laboratório de Análises de Dopagem

**LOD** – *Limit of detection* ou Limite de deteção

**mL** – Mililitro

**MRPL** – *Minimum Required Performance Limits*

**NESP** – *Novel Erythropoiesis Stimulating Protein*.

**NFκB** – Fator de transcrição nuclear kappa B

**NIBSC** – *National Institute for Biological Standards and Control*

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PAAF** – *Presumptive Adverse Analytical Finding* ou Amostra suspeita

**PBS** – *Phosphate Buffered Saline* ou Tampão Fosfato Salino

**pg** – Picogramas

**PI3K** – Fosfatidilinositol-3-cinase

**PVDF** – *Polyvinylidene difluoride* ou Fluoreto de Polivinilideno

**Ras/MAP** – *Rat Sarcoma virus/mitogen-activated protein*

**rEPO** – Eritropoietina recombinante

**RGPD** – Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados

**SAR-PAGE** – *sodium N-lauroylsarcosinate “sarcosyl” polyacrilamide gel eletrophoresis*

**SDS-PAGE** – *Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel eletrophoresis*

**STAT5** – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 5

**TA** – *Testing Authority* ou Autoridade de teste

**TD** – *Technical Document* ou Documento técnico

**TN** – *Technical Note*

**uEPO** – Eritropoietina endógena urinária

**USADA** – *U.S Anti Doping Agency* ou Agência Antidopagem Norte Americana

**VAMS** – *Volumetric Absorptive Microsampling*

**WADA** – *World Anti-Doping Agency* ou Agência Mundial de Antidopagem

**µL** – microlitros



# 1. Introdução

## 1.1. World Anti-Doping Agency (WADA)

Há muitos anos que o mundo do desporto é caracterizado pela necessidade de vencer e, com isto, muitos praticantes desportivos e equipas são incentivados a encontrar formas de aumentar a sua *performance* desportiva. Após a morte de um ciclista dinamarquês, nos Jogos Olímpicos de Roma de 1960, devido a um colapso provocado pela ingestão de anfetaminas, houve a necessidade de, em 1961, o *International Olympic Committee* (IOC) e a *International Association of Athletics Federations* (IAAF) associarem-se para construir um mundo desportivo melhor, começando assim a luta contra o doping no desporto (1). Um conjunto de medidas foram tomadas durante as décadas de 70 e 80 que constituem os pilares do atual programa mundial antidopagem. Exemplo das ações implementadas foram: campanhas de informação e educação, introdução de procedimentos padronizados, para controlos de doping, a criação e atualização de uma lista de substâncias e métodos proibidos, a acreditação de laboratórios de controlo de doping, a introdução de testes dentro e fora de competição, regras para autorização de utilização terapêutica (AUT) e ainda a introdução do controlo do doping sanguíneo. Com o objetivo de proteger os praticantes desportivos, promover os valores de um desporto “limpo” e preservar o espírito do desporto a nível internacional a *World Anti-Doping Agency* (WADA), uma agência internacional independente, foi criada em conjunto pelo movimento olímpico e as autoridades públicas em 1999.

O programa mundial antidopagem engloba todos os elementos necessários para assegurar harmonização e melhores práticas em programas anti-doping nacionais e internacionais. De modo a harmonizar as políticas, regras e regulamentos entre organismos desportivos e autoridades públicas em todo o mundo a WADA tem como documento principal o Código Mundial Antidopagem, também designado por *The Code*. Outros documentos como os *International Standards*, Documentos Técnicos (TDs), modelos de boas práticas e *Guidelines* fazem parte da estrutura documental da WADA que asseguram tal harmonização.

No *The Code* a dopagem é definida como a ocorrência de uma ou mais violações das regras antidoping estabelecida em diversos artigos, que consistem desde a descoberta de uma substância proibida ou dos seus metabolitos ou marcadores numa amostra de um praticante desportivo; a utilização ou tentativa de utilização de uma substância ou método proibido por parte do praticante desportivo; evasão e/ou recusa da colheita de

amostra; combinação de três controlos falhados e/ou falhas na apresentação dentro de um período de doze meses; adulteração ou tentativa de adulteração no controlo de doping por parte do praticante desportivo ou por terceiros; posse de uma substância ou método proibido por um praticante desportivo ou pessoa de apoio ao praticante desportivo, excetuando casos nos quais a posse é consistente com a Autorização de Utilização Terapêutica (AUT), entre outras violações (2).

Uma das oito normas internacionais descritas no *The Code* é a *Prohibited List*, um documento revisto anualmente pelo *List Expert Group* e o *Health, Medical and Research Committee* da WADA e onde são identificadas e agrupadas as substâncias e métodos proibidos dentro e fora de competição, e para alguns desportos em particular (**Apêndice 1 - Tabela 8.1**). De forma a serem categorizados como uma substância ou método proibido devem cumprir dois de três critérios: possuir potencial para melhorar a *performance* desportiva, representar um risco potencial para a saúde do praticante desportivo e/ou violar o espírito do desporto, descrito no *The Code*.(3) O *International Standard for Laboratories* (ISL), é uma das normas que tem como principal objetivo assegurar a análise laboratorial de amostras de praticantes desportivos de forma a alcançar resultados válidos e relatórios uniformes por parte de todos os Laboratórios acreditados pela WADA(4).

Nos últimos 50 anos a ciência nesta área tornou-se um campo multidisciplinar que evoluiu tentando antecipar novas estratégias de dopagem tendo existido diversas técnicas e medidas que foram forçadas a evoluir rapidamente para dar resposta ao doping praticado. Exemplos deste facto são a pesquisa e deteção de esteróides exógenos nos finais dos anos 70, a análise de isótopos estáveis na deteção de esteróides endógenos em meados da década de 90 e por volta do início do século XXI as técnicas eletroforéticas para pesquisa de eritropoietina recombinante (rEPO) (5). Na *Prohibited List*, esta hormona está inserida na classe dos S2 Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos, mais propriamente na secção 1) Eritropoietinas e agentes que afetam a eritropoiese.

## 1.2. A origem da eritropoietina

Em 1985 diversos ciclistas norte-americanos admitiram realizar doping sanguíneo durante os Jogos Olímpicos de 1984. A hemoglobina é um dos principais modeladores da energia aeróbia e como tal influencia a *performance* de desportos de endurance, tais como o ciclismo, atletismo, *cross-country*, entre outros. A Eritropoietina humana (EPO) é uma hormona glicoproteica produzida principalmente pelo fígado no feto, e por células

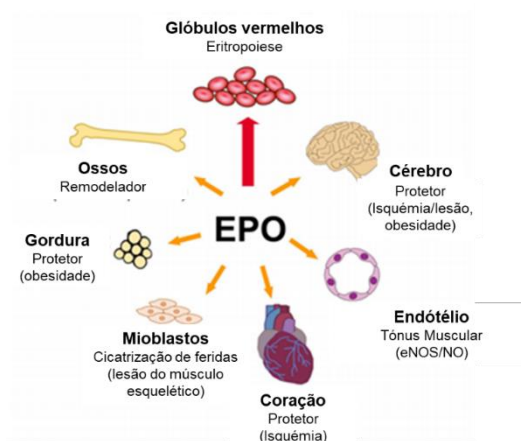
renais no adulto e tem como principal objetivo a regulação da eritropoiese na medula óssea. Em 1987 é isolada para uso terapêutico, de forma a dar resposta à anemia presente em pacientes com Insuficiência Renal Crónica (IRC). Com recurso à tecnologia molecular, através da replicação de ADN humano em laboratório, é criada uma Eritropoietina recombinante (rEPO) com uma forma idêntica à produzida endogenamente (uEPO ou bEPO). Para além do tratamento de pessoas com IRC, esta proteína foi mais tarde integrada na terapêutica de patologias como o mieloma múltiplo e síndromes mielodisplásicas, e em alguns pacientes oncológicos que desenvolvem anemia devido à realização de quimioterapia (6). Face à comprovada melhoria dos doentes com o recurso ao tratamento com rEPO, rapidamente o mundo do desporto compreendeu as vantagens na toma desta substância, levando a que fosse proibida pelo IOC. Em 1998, no Tour de França foram apreendidas diversas caixas desta substância e abertos vários inquéritos levando a que esta volta ficasse apelidada como o *Tour de Farce*.

Wide *et al.* (7) desenvolvem em 1995 um método direto de deteção de mobilidade eletroforética no sangue e na urina, que mostrou apresentar diversas desvantagens, como a curta janela de deteção, dispendiosidade e complexidade. Lasne e De Ceaurriz (8), em 2000, apresentam o método de Focagem Isoelétrica (IEF), que permite a separação de proteínas com massas moleculares iguais ou muito próximas, de acordo com seu comportamento como ácidos e bases fracas, através dos seus distintos pontos isoelétricos. Este avanço permitiu distinguir a uEPO/bEPO da recombinante (rEPO) em amostras de urina.

Em 2001, no laboratório de Lausanne, na Suíça, é detetado o 1º caso positivo (*Adverse Analytical Finding- AAF*) de eritropoietina, pertencente ao ciclista Bo Hamburger, que acabou por ser perdido, a favor do praticante desportivo, no Tribunal Arbitral do Desporto por existirem muitas incoerências nos critérios de positividade da amostra. Mais tarde, Bo Hamburger, admite a toma desta substância. Em 2004, é emitido pela WADA o primeiro Documento Técnico para a Eritropoietina, TD2004EPO, que visa harmonizar, entre os diversos laboratórios acreditados por esta agência, a metodologia de deteção da Eritropoietina (9).

### 1.3. Crescimento, proliferação e diferenciação na eritropoiese

Para além da eritropoiese, a EPO causa respostas em múltiplos tecidos associados à expressão do recetor de eritropoietina (EpoR) em células não eritroides, tais como células neurais, células endoteliais e mioblastos do músculo esquelético (**Figura 1.1**) (10). O seu gene localiza-se no cromossoma 7q22.1. A EPO é constituída por 193 aminoácidos com um terminal NH<sub>2</sub> de 27 aminoácidos e 3 locais de glicosilação ligados a N-terminal(11). A clivagem, pós-tradução, dá origem a um polipeptídeo de 165 aminoácidos. A EPO recombinante (rEPO) originada em células de ovário de hamster, produzem uma glicoproteína com peso molecular de 34 kDa e que é biologicamente ativa, com 165 aminoácidos. Esta substância recebeu aprovação da U.S. *Food and Drug Administration*, em 1989.



**Figura 1.1-** Efeitos pleiotrópicos da eritropoietina. Adaptado de (10)

O EpoR é expresso nas células progenitoras eritroides no estágio de formação da unidade eritroide (CFU-E), respondendo a alterações dos níveis de EPO. E, numa fase anterior, é essencial para a diferenciação das BFU-E (Unidade formadora de burst eritroide) em CFU-E (Unidade formadora de colónias eritroide) (**Figura 1.2**). Os níveis sanguíneos de EPO variam com diversos fatores, tais como: stress isquémico, perda de volume sanguíneo, alteração das concentrações de oxigénio atmosférico (altitude), toma de formas sintéticas de eritropoietina, entre outros. A EPO e o seu recetor são essenciais para a proliferação, diferenciação e sobrevivência dos progenitores eritroides. O gene do EpoR encontra-se localizado no braço curto do cromossoma 19 (19p13.2), mede 7 kb e contém oito exões. O EpoR contém, aproximadamente, 230 aminoácidos no domínio extracelular, um segmento transmembranar, e cerca de 230 aminoácidos no domínio citoplasmático, que não contém atividade enzimática (12). É

membro da superfamília de recetores de citocinas tipo I, que é determinada por pequenas regiões de homologia no domínio extracelular, incluindo quatro cisteínas que formam duas ligações dissulfeto e o motivo WSXWS perto do segmento que atravessa a membrana.

A via de sinalização é ativada com a ligação do ligando EPO ao domínio extracelular do EpoR, que conseqüentemente sofre dimerização. Através da mudança conformacional do recetor, ocorre a transfosforilação e ativação da *Janus quinase 2* (JAK 2), que fosforila vários resíduos de tirosina do domínio citoplasmático de EpoR. Estes resíduos servem como locais de ancoragem para uma variedade de mediadores de sinalização intracelular que contêm domínios de *Src* (SH2), incluindo *STAT5*, *Ras/MAP*, *PI3K* e *NFkB* (13). As moléculas de sinalização ativadas geram então sinais que promovem a eritropoiese. A eritropoiese é a principal via pela qual uma célula estaminal hematopoiética dá origem a glóbulos vermelhos na fase final.

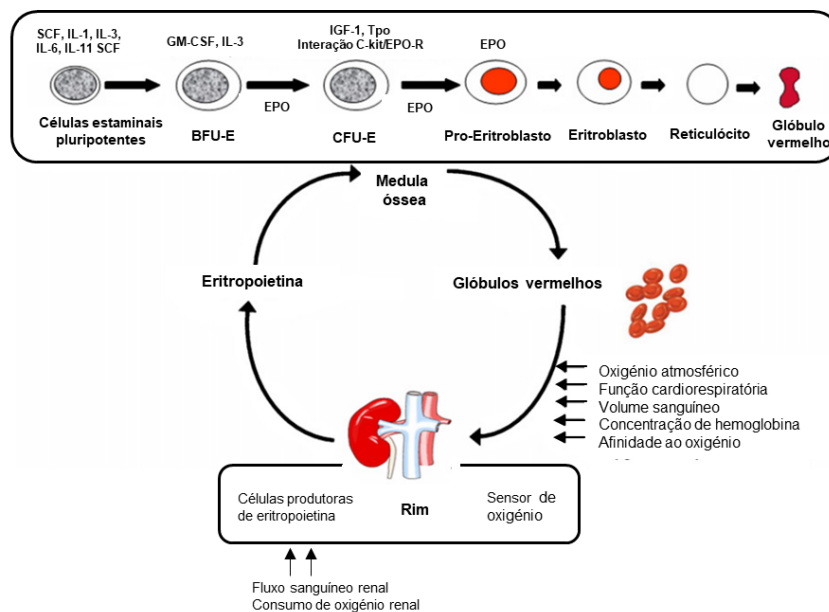


Figura 1.2- Produção de EPO- Mecanismo feedback em *loop*. Adaptado de (12)

## 1.4. Agonistas do Recetor da Eritropoietina (ERAs)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a denominação comum internacional (DCI) é utilizada para substâncias biológicas e biotecnológicas. O nome dos fatores sanguíneos do tipo eritropoietina são compostos por um ramo comum (-poetina). As eritropoietinas com a mesma sequência de aminoácidos que a eritropoietina humana, denominam-se epoetinas. Existem diferentes epoetinas, tais como a alfa e beta, e agonistas do recetor da eritropoietina, sintetizadas artificialmente a partir da estrutura

da uEPO/bEPO, com pequenas diferenças na glicosilação da EPO mas com a mesma cadeia polipeptídica. A letra grega adicional indica que existem diferenças na glicosilação padrão da molécula (por exemplo, darbepoetina alfa, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina gama, epoetina delta, epoetina zeta, epoetina omega, etc) mas a cadeia peptídica é obrigatoriamente a mesma, pois é geneticamente controlada. Estas modificações permitem aos novos produtos de EPO, permanecer mais tempo na corrente sanguínea, o que faz com que tenham um tempo de semivida mais longo, e por conseguinte, uma ação mais sustentada. Estruturalmente, estas moléculas são glicoproteínas, ou seja, são proteínas unidas a cadeias de carboidratos que apresentam na sua estrutura pontes dissulfeto, que são essenciais para a sua atividade (14). Os glúcidos, estão unidos à sequência de aminoácidos em forma de cadeias, denominadas de cadeias oligossacarídase são necessários para a sobrevivência da molécula na corrente sanguínea. Geralmente, uma proteína apresenta uma mistura de glicofomas, de maneira que cada glicoproteína apresenta um modelo de glicosilação característico e reprodutível, o que diferencia estruturalmente as diferentes epoetinas (endógena, rEPO alfa, rEPO beta e darbepoetina alfa). Os ácidos siálicos encontram-se unidos às cadeias de sacarídeos e são responsáveis pela determinação da vida média plasmática da molécula, uma vez que evitam os recetores hepáticos, aumentando atividade biológica *in vivo* da proteína. Os ácidos siálicos são ainda os responsáveis pelo fornecimento de carga elétrica a uma determinada proteína. Esta diferença de carga elétrica, traduz-se numa migração electroforética característica, que é utilizada para distinguir as diferentes epoetinas endógena e ou exógenas.

Os principais fatores que determinam a composição glicídica das eritropoietinas são o tipo de célula que hospedou o cDNA, as condições de cultura e os procedimentos de purificação da proteína levando a que existam diferentes atividades biológicas consequentes das distintas composições glicídicas entre as diferentes eritropoietinas recombinantes. O cDNA é DNA sintetizado a partir de um molde de mRNA e é utilizado para expressar uma proteína onde geralmente esta não é expressa.

A epoetina alfa (rEPO $\alpha$ ) foi a primeira rEPO a ser comercializada em 1989. O seu tempo de semivida é de 8 horas para tomas intravenosas e 24 horas para tomas subcutâneas. A sua atividade biológica atualmente é das mais baixas e como tal é necessário um maior número de tomas. Nomes de mercado: EPOGEN<sup>®</sup>, PROCIT<sup>®</sup>, EPREX<sup>®</sup>, ERYPO<sup>®</sup>, HEXAL<sup>®</sup> e ESPO<sup>®</sup>. Um ano depois, foi também divulgada no mercado outro tipo de eritropoietina recombinante, a do tipo beta (rEPO $\beta$ ). Apesar de ambas, rEPO $\alpha$  e rEPO $\beta$ , serem sintetizadas em células de ovários de hamsters chineses, por serem linhagens

de células distintas, a estrutura da cadeia glicosídica gerada entre elas é diferente e as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas diferentes resultam numa maior atividade biológica da rEPO $\beta$ . Nomes de mercado: RECORMON<sup>®</sup>, CINNAPOETIN<sup>®</sup> e NEO RECORMON<sup>®</sup>. O BRP, *Biological Reference Preparation*, para a mistura equimolar de rEPO $\alpha$  e rEPO $\beta$  é produzido pela NIBSC (15). Outras eritropoietinas recombinantes foram desenvolvidas como a delta (rEPO  $\delta$ ), sintetizadas também a partir de cDNA mas em células renais de hamsters jovens e em células de fibrossarcoma humano. Nomes de mercado: DYNEPO<sup>®</sup>, atualmente já não é comercializada.

A darbepoetina alfa (NESP), é um novo princípio ativo em que foram modificados 5 aminoácidos da sequência primária da uEPO. A NESP é um novo agente eritropoiético, bioquimicamente distinto da rEPO. A especificidade para o recetor fisiológico da eritropoietina é semelhante, mas devido ao seu maior conteúdo em glícidos, tem uma vida média prolongada e maior potência biológica *in vivo* que a rEPO, o que permite uma menor frequência de administração, para manter o efeito biológico desejado. Nomes de mercado: ARANESP<sup>®</sup>(16). A metoxi polietilenoglicol-epoetina beta é um análogo da eritropoetina e possui uma ligação química com o polímero polietilenoglicol (PEG). Este polímero permite aumentar o tempo de semivida no sangue para cerca de 130 horas. Como possui uma baixa excreção na urina, ao contrário das restantes ERAs, o uso de metoxi polietilenoglicol-epoetina beta por praticantes desportivos é detetada preferencialmente em amostras de soro ou plasma. Nomes de mercado: MIRCERA<sup>®</sup>(17).

A EPO-alpha Fc Chimera é uma cadeia polipeptídica dimérica, glicosilada, constituída por duas moléculas de EPO humanas ligadas à porção Fc da IgG humana. A EPO-alpha Fc é uma versão de ação prolongada da EPO uma vez que, para além da presença do PEG, ao estarem fundidas com IgG Fc demonstram uma semi-vida superior *in vivo*. Nomes de mercado: EPO-alpha Fc Human<sup>®</sup>.

## **1.5. Testing figures report**

Todos os anos a WADA reúne e publica um documento com a análise detalhada da totalidade dos resultados realizados na componente de análise de dopagem a nível mundial. Denomina-se *Testing figures report*, é um documento público e o último publicado é relativo ao ano de 2020(18). Da análise deste relatório verifica-se que, desde 2010, o número de amostras colhidas para a pesquisa de ERAs tem vindo a aumentar (**Figura 1.3**) e conseqüentemente têm sido reportados mais resultados positivos, designados no mundo do doping por *Adverse Analytical Findings (AAFs)*,

afetos a esta metodologia. O ano de 2020, por ter sido um ano atípico devido à pandemia do coronavírus SARS-CoV-2, responsável pela doença COVID-19, resultou no cancelamento de diversos eventos desportivos e, conseqüentemente, menos amostras foram colhidas na globalidade.

Comparando os anos de 2018 e 2019 observa-se um ligeiro aumento de AAFs reportados para ERAs, podendo estar relacionado com o aumento da sua testagem: 0.13% positivos em 2018 por comparação com 0.15% em 2019 em amostras de urina e 0.33% em 2018 e 0.37% em 2019 em amostras de sangue. No total, no ano de 2018, foram analisadas 263.519 amostras de urina, soro, plasma e sangue total, por todo o mundo, havendo um aumento de 5.5% em 2019 (**Apêndice 2 - Tabela 8.2**) (18–25).

Tal como referido, na Lista, as ERAs encontram-se na classe S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos. A Classe S2 registou, no ano de 2019, 138 ocorrências de amostras positivas de um total de 4180 AAFs reportados na totalidade das classes. Os S2 representam assim 3% dos AAFs reportados em 2019. Atualmente, as ERAs representam 66% dos resultados positivos na classe S2, quando em 2012 representavam apenas 31.5%, demonstrando nos últimos anos a existência de um aumento significativo dos positivos para estas substâncias. Este crescimento é justificado pelo lançamento em 2014 de um documento técnico, o *WADA Technical Document for Sport Specific Analysis* (TDSSA) (26) que obrigou as *Anti-Doping Organizations* (ADOs) a incorporar o seu conteúdo nos programas anti-doping, estando sujeitos a um nível mínimo apropriado de análises dependente, exclusivamente, do desporto e da disciplina. Os desportos que apresentam uma maior percentagem de obrigatoriedade para a análise de ERAs são: atletismo-longa distância (superior ou igual a 3000m), atletismo- biatlo, ciclismo- estrada, *ski-cross-country* e todos os tipos de triatlo. Este aumento do número de amostras testadas assim como conseqüentemente o número de amostras reportadas como positivas, demonstra que as referidas substâncias são utilizadas pelos praticantes desportivos e como tal é importante explorar a otimização de matrizes de colheita e técnicas de deteção.

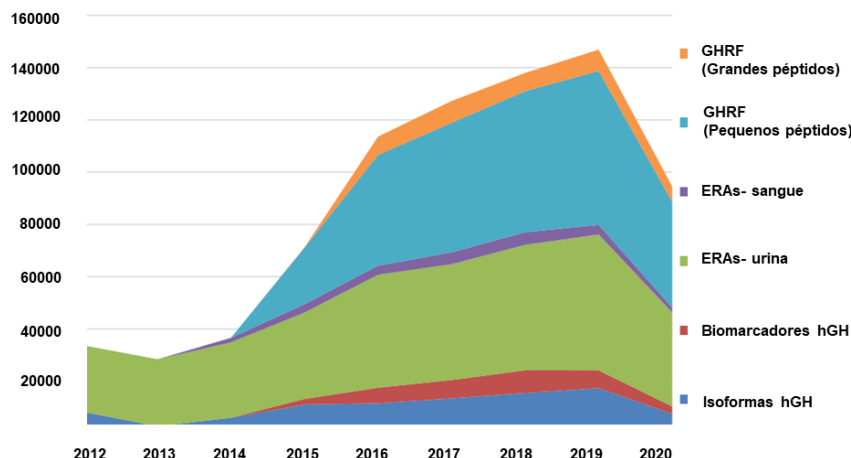


Figura 1.3- Comparação de amostras analisadas de ERAs no sangue e urina entre 2012-2020 (18)

## 1.6. Colheita, transporte e armazenamento de amostras de urina e sangue

O controlo de dopagem é um elemento essencial dos programas antidopagem para promover e proteger a integridade do desporto e a saúde dos praticantes desportivos. Estes são programados de forma estratégica para cumprir objetivos dos programas antidopagem nacionais e internacionais. Os controlos podem acontecer dentro ou fora de competição a qualquer hora e local podendo ser requerido ao praticante desportivo selecionado amostra de urina, sangue ou ambas. São solicitados pelo menos 90 mL para amostras de urina que são divididos em frasco “A” e “B” e para o sangue é recolhido volume suficiente para, de acordo com o tipo de análises a realizar, ter um tubo “A” e um tubo “B”. Assim, a um controlo de dopagem estão associadas uma amostra “A” e uma amostra “B”.

As amostras de urina devem ser sempre transportadas, o mais rapidamente possível, para o Laboratório que as irá analisar, segundo as regras de transporte definidas pela WADA. Se, por alguma razão logística, não for possível o transporte imediato das amostras de urina, que não deve exceder os sete dias após a data da colheita, então devem ser garantidas as condições de armazenamento (refrigeração/congelação) de forma a evitar a degradação das mesmas.

Para as amostras de sangue (sangue total em tubo EDTA e/ou seco), de forma a manter a sua integridade durante o transporte, é necessário um ambiente refrigerado e constante, medido por registador de dados de temperatura (datalogger). As amostras não podem ser congeladas para não afetar os analitos e devem chegar ao laboratório, idealmente, no mesmo dia em que são colhidas. Na **Tabela 1.1** encontram-se os tempos máximos permitidos dependendo da substância pesquisada (27).

**Tabela 1.1-** Horas máximas desde a colheita da amostra de sangue até chegada ao laboratório de acordo com a substância pesquisada (27)

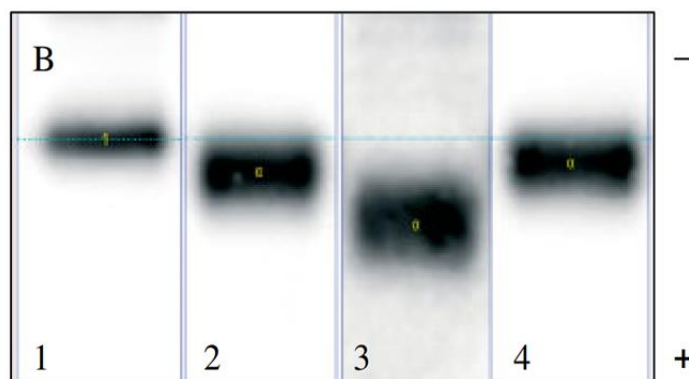
<b>Substância/método</b>	<b>Máximo de horas</b> após colheita
hGH- método das isoformas	96h
hGH- método dos biomarcadores	12h
EPO, HBOCs ou análise de transfusões sanguíneas	72h

As amostras de sangue para *Athlete Biological Passport* (ABP), apresentam especificações particulares, pois o período que devem chegar ao laboratório depende da média das temperaturas a que as amostras foram armazenadas (**Apêndice 3 - Tabela 8.3**). Por exemplo, se uma amostra for mantida a 8°C entre a colheita e a análise, poderá chegar ao laboratório 50 horas após a colheita.

As amostras podem apresentar irregularidades, tais como, incongruência entre os códigos dos frascos e dos documentos, sinais de adulteração, volume insuficiente, diferenças físico-químicas entre as amostras A e B, condições de transporte (temperatura, hora de entrega), informações incompletas (gênero), entre outros (4). Após o início do processo afeto à Cadeia de Custódia da amostra, o frasco “A” é aliquotado conforme o painel de análises solicitado. O frasco “B” mantém-se intacto e é congelado (-20°C). De acordo com o documento técnico TD2022EPO “Harmonization of analysis and reporting of erythropoietin (EPO) and other EPO-receptor agonists (ERAs) by polyacrylamide gel electrophoretic (PAGE) analytical methods.”(28), as amostras de urina para pesquisa de EPO e ERAs devem ser imediatamente congeladas (-20°C) após a sua chegada, exceto se forem analisadas em menos de 24 horas, podendo neste caso ficar refrigeradas (2-8 °C). A primeira análise realizada à amostra denomina-se triagem (Initial Testing Procedure- ITP) a partir da qual se pode obter um resultado, negativo ou suspeito (Presumptive Adverse Analytical Finding- PAAF). Caso a amostra seja suspeita, deverá ser sujeita a um procedimento de confirmação (Confirmation Procedure – CP) cujo resultado pode ser negativo, atípico (Atypical Finding) ou positivo (Adverse Analytical Finding). Caso a amostra seja positiva, o frasco B deverá ser logo armazenado a, pelo menos -70 °C. O frasco B é aberto apenas em circunstâncias excepcionais tais como falta de volume da amostra A ou solicitação de uma contra-análise.

As amostras de sangue (sangue total em tubo EDTA e/ou seco) são centrifugadas de forma a separar a fração do soro/plasma do concentrado eritrócitário de forma a evitar

a degradação. O remanescente fica anexado ao tubo com o concentrado eritrocitário e o restante processo de armazenamento é semelhante ao das amostras de urina. O cumprimento dos requisitos descritos para a colheita e transporte das amostras são fundamentais para uma análise de qualidade por parte dos laboratórios, que também possuem condições específicas de armazenamento das amostras. Às amostras de urina são realizadas pré-análises de forma a registrar o pH e a densidade. A medição do pH é relevante para compreender a presença de atividade microbiana, o que afeta a estabilidade da amostra e a interpretação dos resultados. Por exemplo, a clivagem da EPO, devido a atividade enzimática, conduz a uma perda do seu peso molecular, seja por glucanases que clivam estruturas de glicano ou por proteases afetando a sua cadeia de aminoácidos ou até pela perda de cadeias terminais de ácidos siálicos ( $\approx 4$  KDa) resultam na prática, da diminuição do peso molecular na técnica de SDS/SAR-PAGE refletindo numa maior descida da banda da EPO em direção ao ânodo, o que poderá resultar num falso positivo em amostras que contenham a presença de rEPO (**Figura 1.4**) (29).



**Figura 1.4-** SAR-PAGE: 1. Dynepo, 2. uEPO (NIBSC), 3. Urina com perda de peso molecular, 4. Amostra negativa fortificada com rEPO (29)

As amostras sem AAFs ou ATFs são conservadas por um período mínimo de três meses a contar da data do envio do resultado na plataforma online, *Anti-Doping Administration and Management System* (ADAMS), ou um máximo de dez anos após a data da colheita. Amostras que resultaram em AAFs ou ATFs são guardadas por um período mínimo de seis meses da data do lançamento do resultado no ADAMS (A ou B, conforme aplicável). Caso seja solicitado pela TA ou WADA, as amostras podem ser armazenadas por um período até 10 anos após a data da colheita.

As regras e cuidados a ter com amostras de sangue e urina começam no momento da colheita e mantêm-se até à sua destruição e são fundamentais para a qualidade e credibilidade dos resultados obtidos.

## 1.7. *Dried Blood Spots (DBS)*

*Dried Blood Spot (DBS)* é uma forma de obter uma amostra de sangue, por punção/incisão da pele para aceder a capilares, em que pequenos volumes de sangue são dispensados sobre um suporte absorvente que posteriormente é seco à temperatura ambiente. DBS é um método introduzido inicialmente em 1963 para a triagem da fenilcetonúria em recém-nascidos (30) e a sua utilização, desde então, foi estendida para o diagnóstico de outros distúrbios metabólicos e outras áreas tais como toxicologia forense (31), estudos farmacocinéticos para monitoramento terapêutico de medicamentos/drogas (32), diagnóstico clínico (33,34), monitorização de patologias (35) e análise de dopagem (**Apêndice 4 - Tabela 8.4**).

A WADA explora continuamente novas abordagens para a promoção de um desporto limpo e justo. Uma das ações com maior impacto foi o desenvolvimento de metodologias com recurso a amostras de sangue, já que, de uma forma direta ou indireta, facilitam a deteção de determinadas substâncias. A adesão a esta nova abordagem da luta contra o doping tem vindo a ser demonstrada pelo aumento da percentagem de colheitas desta matriz ao longo dos últimos anos (**Tabela 8.2**). No entanto, devido a requisitos específicos relacionados com a colheita, volume e transporte de amostras de sangue o recurso a este tipo de matriz torna-se um pouco limitativo. Por conseguinte, métodos alternativos para a recolha de sangue, tais como os DBS, estão a ser explorados e atualmente encontra-se a ser testado no mundo do doping. A WADA redigiu um documento técnico sobre esta matriz, denominado TD2021DBS - *Dried Blood Spots (DBS) for Doping Control: Requirements and Procedures for Collection, Transport, Analytical Testing and Storage* (28). Os DBS são uma estratégia promissora de colheita de amostras, que poderá complementar a atual estratégia de análise de urina e sangue. As aplicações têm sido demonstradas para diversas substâncias da lista de substâncias proibidas – *The Prohibited List* – da WADA(3), para dentro e fora de competição e nas diversas classes de substâncias (**Apêndice 4 - Tabela 8.4**).

Em 2019, a WADA, juntamente com sete agências antidopagem, anunciaram o desenvolvimento e implementação dos DBS como análise de rotina, tendo sido implementado nos Jogos Olímpicos e Paraolímpicos em Tóquio 2020 e nos de Inverno em Pequim 2022. Neste sentido, e por apresentar diversas vantagens, é uma metodologia que tem vindo a “ganhar” o seu lugar no mundo da antidopagem e encontra-se atualmente a ser desenvolvido nas áreas de I&D dos laboratórios de análises de dopagem.

### 1.7.1. Colheita das amostras, transporte e armazenamento

A utilização de micro volumes de sangue capilar, está atualmente a ser alvo de investigação como um complemento e alternativa ao volume (em mililitros) de sangue venoso necessário. Na prática consiste na obtenção de sangue capilar através da punção, com uma lanceta, na ponta lateral dos dedos (idealmente o anelar ou médio) ou antebraço. É massajado o local, desperdiçada a primeira gota e o sangue é então colhido através do local da punção por: micropipetas, tubos capilares, dispositivos próprios que possuem microcapilares de precisão ou de forma direta sem auxílio de materiais. O sangue é colocado em forma de círculos (*blood spots*) num papel à base de celulose ou num material absorvente alternativo sendo posteriormente absorvido e seco ao ar (36).

De forma a garantir a qualidade da colheita, não se deve sobrepor gotas de sangue nem colocar sangue coagulado, evitando a difusão não uniforme do sangue no papel. Segundo o TD2021DBS (28) o suporte absorvente permitido deve ser feito de papel de celulose sem tratamento ou um material absorvente alternativo (ex., polímero sintético) e deve apresentar uma divisão entre os *spots* correspondentes à amostra “A” e “B”, sendo recomendados cerca de 60 µL de sangue capilar na zona da amostra A e 40µL na B. A secagem dos *blood spots* deve ser realizada à temperatura ambiente, evitando a exposição direta à luz solar e ao calor, durante, pelo menos, 2 horas, podendo, no entanto, variar, dependendo da quantidade de sangue colhido e do tipo de papel utilizado. Após a secagem completa são colocados no interior de um saco de armazenamento, pouco permeável ao ar ou ainda em envelopes hermeticamente fechados, com a presença de um agente exsicante para proteger as amostras da humidade evitando a sua degradação ou contaminação. O transporte das amostras deve garantir as condições descritas nos pontos 9.1 a 9.3 *Transport of samples and documentation* do documento da WADA - *International Standard for Testing and Investigation* (ISTI)(37). O sistema de transporte autorizado deve assegurar que as amostras sejam transportadas de forma a garantir a sua integridade, identidade e segurança. As amostras de DBS são considerados material biológico não perigoso, o saco de transporte deve ser opaco, para proteger a amostra à exposição solar e podem ainda ser transportadas à temperatura ambiente. As amostras referidas também podem apresentar irregularidades, avaliadas à chegada dos laboratórios, tais como a ausência de dissecante no saco de transporte onde se encontra a amostra, a não secagem completa da amostra e a adesão dos *blood spots* ao recipiente. A congelação dos DBS

não é considerada uma irregularidade, pois não tem impacto na qualidade da análise posteriormente realizada (38).

Aquando da receção as amostras A e B devem ser facilmente separadas sem manipulação física e a amostra A deve-se manter refrigerada e protegida da luz até ao momento da aliquotagem, aquando deste momento os DBS devem atingir a temperatura ambiente dentro do saco de armazenamento com o dissecante, para evitar condensação. A restante amostra A volta a ser refrigerada (2-8 °C) até finalizar os procedimentos de triagem (ITP) e confirmação (CP), caso aplicável, e só posteriormente deve ser armazenada a -20 °C, a não ser que sejam especificados outros cuidados de armazenamento num documento técnico ou outro documento emitido pela WADA. A amostra B é conservada a -20 °C desde a sua chegada ao laboratório, à exceção de quando a A e B estão no mesmo suporte e nesse caso a B fica refrigerada até finalização do ITP e CP da amostra A(28).

Os períodos de armazenamento das amostras de DBS são idênticos aos descritos no ISL para sangue e urina (ver ponto 1.6 Colheita, transporte e armazenamento de amostras de urina e sangue).

### **1.7.2. Vantagens e limitações**

Os critérios para classificar uma matriz aceitável no controlo do doping visa promover o melhor para o praticante desportivo, para as organizações antidopagem e para os laboratórios. Em primeira instância o praticante desportivo é o interveniente com maior peso no processo do controlo de dopagem. Neste caso em particular torna-se fulcral classificar as vantagens e limitações de cada método de colheita de amostra de forma a encontrar o equilíbrio no processo, promovendo a prática de desporto e não a prejudicando.

A colheita de urina, matriz mais utilizada nas análises de dopagem, é passiva, mas intrusiva devido à presença do responsável pela colheita no momento da recolha da amostra e por vezes pode demorar diversas horas, se a micção espontânea não for possível devido a desidratação pós-exercício físico ou caso a densidade medida no local seja inferior à permitida para o volume de amostra colhido (37).

As amostras de sangue venoso são obtidas por uma técnica invasiva e implica a presença de um *blood collection officer*, profissional com competências para realizar o procedimento, mas com a vantagem de ser uma colheita de curta duração.

O custo relacionado com o cumprimento dos programas de dopagem, por parte das autoridades antidopagem, é elevado e está diretamente relacionado com a colheita,

transporte e armazenamento das amostras. As condições necessárias são mais rigorosas e obrigam a diversos gastos, tais como:

- Aquisição de materiais de colheita de urina e sangue venoso, com sistema de segurança, obrigatórios pela WADA. Um exemplo são os Kits da marca Berlinger, no qual o BEREG-Kit (urina) e o BEREG-KIT Small (sangue venoso) custam cerca de 15€ e 10€, cada um, respetivamente (**Figura 1.5**)(39);
- Garantia das condições de transporte e armazenamento das amostras desde a colheita até ao laboratório;
- Pagamento da extensão de armazenamento das amostras nos laboratórios acreditados pela WADA, após os 90 dias obrigatórios pelos laboratórios.



**Figura 1.5-** A- Frascos de colheita, transporte e armazenamento de amostras de urina com sistema de segurança. BEREG-kit, Berlinger B- Frascos de colheita, transporte e armazenamento de amostras de sangue com sistema de segurança. BEREG-kit Small, Berlinger

Em termos de invasão e nível de intrusão para o praticante desportivo, matrizes alternativas, têm vindo a surgir, tais como os DBS, fluído oral, cabelo, ou outros. No caso dos DBS é classificado como minimamente invasivo (40), devido à colheita originar a recolha de apenas cerca de 20-60  $\mu$ L por spot, dependendo da análise. Num estudo conduzido pela Autoridade Antidopagem da Dinamarca (AAD) com o objetivo de determinar e comparar, entre diferentes populações de praticantes desportivos, a perceção, a dor e a utilidade dos DBS face a colheitas por venipunção, concluiu que os praticantes desportivos classificam a colheita de DBS como fácil, rápida e indolor comparativamente com o método convencional de colheita de sangue. Numa outra vertente de comparar diferentes formas de colher sangue capilar, também foi comparada, neste estudo, a utilização de DBS, com sangue capilar colhido na ponta dos dedos, com dispositivos de microcolheita de sangue capilar no antebraço. Concluiu-se que tanto praticantes desportivos como responsáveis pela colheita, tendem a preferir a colheita no antebraço comparativamente à ponta dos dedos, no entanto outros fatores como o preço dos dispositivos utilizados no antebraço (TAP™ da Seventh Sense

Biosystems e Tasso M-20 da Tasso) podem ter impacto para a sua escolha pelas autoridades antidopagem (41).

As condições logísticas e de transporte são menos rigorosas, pois não obrigam a uma cadeia de frio que controle a temperatura desde a colheita à chegada ao laboratório, o espaço que as amostras ocupam no transporte é significativamente menor e as condições de armazenamentos nos laboratórios envolvem, na maioria das vezes, uma sala à temperatura ambiente ocupando pouco espaço. Caso seja necessária a refrigeração ou congelação, o espaço necessário em frigoríficos/arcas de congelação é também reduzido. As necessidades específicas de conservação têm vindo a ser testadas para diversas substâncias proibidas, pois o reduzido volume colhido permite a estabilidade dos compostos pela desativação de enzimas que conduzem à degradação das amostras. Solheim *et al.* avaliou a estabilidade do clenbuterol, um  $\beta$ 2-agonista, prescrito habitualmente para pacientes asmáticos, utilizados pelos atletas com o objetivo de perda de peso e aumento de massa muscular pelas suas propriedades anabólicas e lipolíticas, em amostras de DBS comparando com amostras urinárias. As amostras de DBS, originárias de voluntários do estudo de excreção que tomaram uma dose única de 80  $\mu$ g de clenbuterol, foram armazenadas, durante 365 dias, a diferentes temperaturas (temperatura ambiente e -80°C) e expostos a diferentes variáveis como a exposição solar e a presença de dissecante. Foi detetada a presença de clenbuterol nos DBS após 365 dias à temperatura ambiente, idealmente com dissecante e evitando a exposição solar, demonstrando assim a estabilidade do composto nos DBS e fortalecendo a premissa de que é uma alternativa vantajosa (42). Já Protti *et al.*, avaliou a estabilidade de canabinóide naturais e sintéticos em amostras de DBS, *Volumetric absorptive microsampling* (VAMS), descrito no ponto 1.7.3, e plasma. As amostras de DBS foram armazenadas 30 dias à temperatura ambiente e comparadas com as de plasma conservadas durante 30 dias a - 80 °C. Embora no plasma se registre um certo grau de estabilidade para alguns compostos, alguns apresentam variações na ordem dos 20% (THC-OH, THC-COOH, JWH-073 e JWH-081). Já nos DBS e VAMS, técnicas de microcolheita, o critério de aceitação foi cumprido para todos os compostos analisados, pelo que a estabilidade dos compostos foi considerada satisfatória(43). Aplicado à pesquisa de ERAs, Reverter-Branchat, avaliou a estabilidade de armazenamento dos DBS, durante 24h e 168h a 4°C e temperatura ambiente, com concentrações: 4 pg de rEPO e NESP e 37,5pg de CERA. A curto-médio prazo também foi testado o armazenamento durante 30 dias, à temperatura ambiente e 4 °C, com concentrações de: 8 pg de rEPO e NESP e 75 pg de CERA. A longo prazo foi testada a

estabilidade de amostras colhidas 72h, 100h e 104h após administração, durante 6 meses para rEPO e 3-5 meses para NESP colhidas 1, 3 e 9 dias após administração e conservadas às mesmas temperaturas indicadas anteriormente. Na generalidade, a curto prazo foi possível detetar todas as ERAs e as diferentes condições resultaram em capacidades de deteção idênticas. A médio e longo prazo observa-se a deteção de maiores quantidades de rEPO e NESP (**Anexo I - Figura 7.1**) nas amostras a 4 °C (44). Os resultados obtidos para a estabilidade dos diversos compostos/substâncias estudadas demonstram que os DBS, não exigindo grandes requisitos na colheita, transporte e armazenamento, são uma alternativa possível e válida aos tradicionais métodos de colheita. A introdução dos DBS no âmbito de acreditação de um laboratório obriga a uma validação do método, de modo a demonstrar que o mesmo é *fit-for-purpose*, ou seja, que cumpre os objetivos para os quais foi desenvolvido e dessa forma satisfaz as necessidades do cliente. Para os laboratórios é relevante que para a análise de substâncias e/ou métodos proibidos seja selecionada a matriz com maior cobertura analítica possível e que garanta uma boa relação custo-eficácia de modo que se consiga cumprir os prazos de resposta definidos no ISL. Atualmente o sangue capilar em DBS ainda não são uma matriz padronizada dentro dos procedimentos validados e acreditados dos laboratórios da WADA.

A evolução das tecnologias e métodos desenvolvidos nos laboratórios tem atingido um nível analítico que permite a deteção, em muitos casos, de micro-doses de substâncias em amostras de praticantes desportivos e são uma realidade na pesquisa de ERAs(45,46). O reduzido volume é um desafio associado à utilização de DBS, pois pequenas quantidades dos compostos requerem elevada sensibilidade instrumental e dos próprios métodos desenvolvidos.

O nível de exigência, na deteção das substâncias, imposto pela WADA aos laboratórios está descrito, por exemplo, no documento técnico TD2022MRPL (47), no qual o MRPL corresponde ao valor mínimo de concentração de uma substância proibida que um método deve ter capacidade analítica de detetar.

No TD2022EPO encontram-se os valores de MRPL associado às ERAs em urina e soro/plasma, estabelecidos em 2021 (**Tabela 1.2**).

O efeito do hematócrito (HCT), parâmetro percentual que fornece a informação do volume ocupado pelos glóbulos vermelhos no volume total de sangue, tem sido um dos principais pontos a ser apontados como limitação dos DBS.

**Tabela 1.2-** MRPL das ERAs, analisadas por métodos eletroforéticos por matriz de análise. Adaptado de (48)

ERA	Matriz de análise	
	Urina	Soro/plasma
rEPO	1 IU/L	10 IU/L
dEPO	1 pg/mL	10 pg/mL
CERA	5 pg/mL	25 pg/mL
EPO-Fc	5 pg/mL	25 pg/mL

A influência da dispersão do sangue no papel resulta num *bias* dependente do hematócrito do indivíduo, o que torna uma questão relevante em ensaios quantitativos. Na prática amostras de sangue com um hematócrito superior possuem mais glóbulos vermelhos tornando-as mais viscosas, o que resulta numa menor dispersão da gota no suporte de papel. Diferentes volumes apresentam diferentes dispersões do sangue no suporte e conseqüentemente a diferentes resultados analíticos (49). Na população geral, naturalmente pode ocorrer ligeiras flutuação do HCT, no entanto nos praticantes desportivos estas oscilações podem ser mais pronunciadas. Esta limitação poderá ser contornada, por exemplo, pela utilização de volumes definidos de sangue ou pela utilização de dispositivos de microamostragem de absorção volumétrica (VAMS)(50). Pelas características descritas e impulsionado pela pandemia global, COVID-19, a Agência Antidopagem Norte Americana (USADA) realizou um estudo piloto com o objetivo de explorar novas formas de colheita e formas de defender os praticantes desportivos que cumprem as regras ao permitir a testagem de forma mais simples e segura, através da realização de colheitas, de DBS, pelos próprios praticantes desportivos que são supervisionadas remotamente e enviadas por correio para análise (51).

### 1.7.3. Diferentes tipos de suportes e dispositivos

Os DBS são pela sua definição, suportes de amostra tipicamente compostos por línteres de algodão com mais de 98% de  $\alpha$ -celulose, que podem ou não ser sujeitos a tratamentos químicos, colocados entre dois cartões finos (36). Vários parâmetros influenciam a sua eficácia: retenção de partículas, adsorção, pH, propriedades da superfície, espessura, resistência, forma e densidade.

Diversos suportes à base de celulose encontram-se disponíveis no mercado, tais como *Whatman® FTA DMPK-A, B, ou C, Whatman® 903 Protein Saver Card, Ahlström® 226, Sartorius® TFN, Agilent® Bond Elut DMS cards, Whatman® BFC 180, Whatman® FTA®*

*Elute, Microsampling HemaXis DB10 kits, etc (Figura 1.6).* O *Whatman® 903 Protein Saver Card* é o mais habitualmente utilizado e foi inicialmente desenvolvido na década de 60 por Robert Guthrie e Ada Susi para deteção neonatal de fenilcetonúria. O *Whatman® 903 Protein Saver Card* encontra-se registado no *U.S Food & Drug Administration* (FDA) como *in vitro Class II medical device*. e amplamente utilizado para rastreio de doenças metabólicas em recém nascidos, doenças virais e deteção e monitorização de drogas terapêuticas (52,53).

Os cartões *Whatman® FTA* (Flinders Technology Associates) *DMPK-A* e *B* passam por um tratamento químico e quando em contacto com a amostra promovem a lise das membranas celular e nuclear das células, desnaturação das proteínas, inativação de enzimas, como por exemplo, inativação de nucleases protegendo os ácidos nucleicos, e impedem o crescimento bacteriano, oxidação e danos UV, conduzindo a uma maior estabilidade dos compostos. Também inativam rapidamente material viral ou outros organismos presentes na amostra impedindo o seu crescimento e não havendo por isso risco biológico associado ao seu manuseamento.

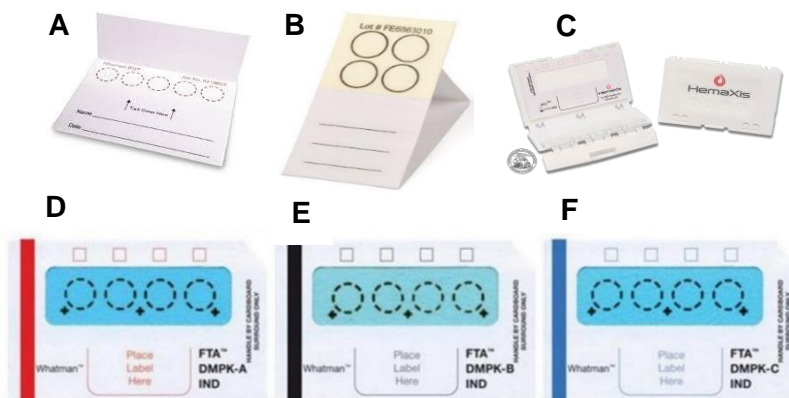
Os cartões *Whatman® BFC 180, Whatman® FTA DMPK-C, Sartorius® TFN* e *Ahlström® 226* como não são submetidos a nenhum tratamento químico, não possuem na sua composição substâncias químicas que possam interferir na análise. Podem ser a melhor escolha para a análise de proteínas visto não promover a sua desnaturação.

Os cartões *Whatman® FTA® Elute* ou *Agilent® Bond Elut DMS cards*, não têm na sua base celulose e passam por um tratamento químico que simplifica o manuseamento e processamento de ácidos nucleicos, uma vez que provoca a lise. Posteriormente, através da eluição dos *spots* o ADN é facilmente recuperado e permite a sua amplificação. A hemoglobina, conhecido inibidor de PCR, fica retida na matriz FTA, permitindo a recuperação do ADN numa solução livre de inibidores de PCR. De acordo com o fabricante reduzem também o efeito do hematócrito. Existe uma variante útil para amostras incolores, tais como saliva, urina, líquido cefalorraquidiano, entre outros, tendo em conta que muda de cor em contacto com a amostra.

Os dispositivos *Microsampling HemaXis DB10 kits* da empresa DBS Systems SA, permitem controlo na precisão do volume colhido, através da incorporação de um chip microfluídico com um papel de filtro padrão envolvidos por uma proteção de plástico, o que permite a padronização, aumentando a confiabilidade e eliminando o viés do hematócrito (**Figura 1.6**) (54,55).

Mais recentemente, foi introduzida no mercado uma nova técnica denominada *Volumetric absorptive microsampling* (VAMS) da Neoteryx, que utiliza um cabo de

plástico com uma ponta globular, constituída por um polímero hidrofílico com cerca de 4 mm de diâmetro, capaz de absorver um dos três volumes fixos: 10, 20 e 30 µL, sendo excluído o efeito do hematócrito. Para análise, apenas é necessário separar o cabo de plástico da ponta globular e eluir esta última (**Figura 1.7-A**) (55).



**Figura 1.6-** Diversos tipos de cartões utilizados nas DBS; A- Whatman® 903 Protein Saver Card; B- Whatman® FTA® Elute; C- Microsampling HemaXis DB10 kits; D-F- Whatman® FTA DMPK-A, B e C.

O TAP®, da empresa *Seventh Sense Biosystems*, é um dispositivo aprovado pela FDA, que permite a colheita e transporte de microamostragem de sangue, através da combinação de dois mecanismos, ação capilar e extração por vácuo pela ativação de um botão de pressão. O dispositivo, que contém heparina de lítio como anticoagulante, é colocado normalmente no antebraço e em 2-3 minutos colhe automaticamente cerca de 100 µL de sangue capilar, através da ativação de 30 microagulhas e no final da colheita ativa um indicador visual(56). O TAP II, um outro dispositivo, em desenvolvimento ainda utilizado apenas em investigação, tem como objetivo incluir um reservatório de sangue no dispositivo de colheita (**Figura 1.7-C**) (57).

O Tasso M-20, da Tasso, é um dispositivo idêntico ao TAP®, também aprovado pela FDA, que permite a autocolheita de amostras de sangue em 2 minutos com a diferença que a amostra é automaticamente colocada num suporte e cria 4 *dried blood spots* de 20 µL cada um (**Figura 1.7-D**) (58).



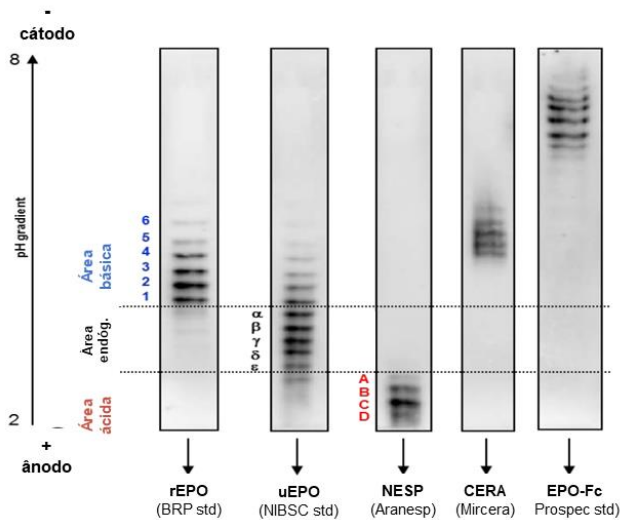
**Figura 1.7-** Dispositivos de microamostragem. A-VAMS (Neoteryx), B- TAP® (Seventh Sense Biosystems). C- TAPII (Seventh Sense Biosystems) e D- Tasso-M20 (Tasso)

O aumento da utilização dos DBS, devido aos seus benefícios e vantagens, tem impulsionado as empresas a produzir suportes e dispositivos cada vez mais reprodutíveis, robustos e precisos. Desta forma, a escolha deve variar tendo em conta o custo, o que for menos invasivo e doloroso para o indivíduo a testar, o que se pretende pesquisar, o que apresentar menor bias e o que melhor se adequa ao procedimento de deteção a aplicar.

## 1.8. Método *Gold-Standard*

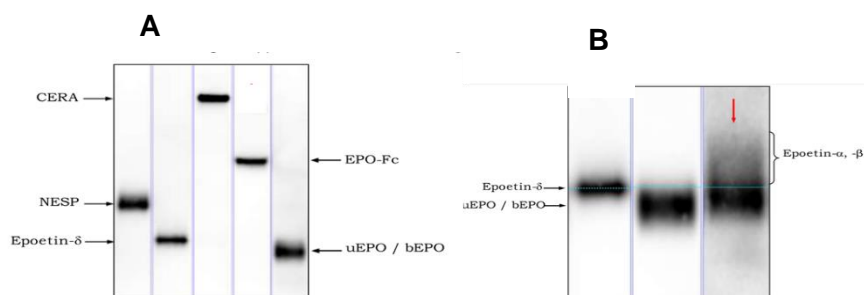
No final dos anos 90 tornou-se urgente desenvolver um método robusto e eficaz para a deteção de EPO e ERAs. A realidade da toma destas substâncias era uma certeza e o COI proibiu a sua utilização, no entanto os laboratórios não possuíam a desenvoltura analítica para a sua deteção. Através de métodos indiretos, hematológicos e bioquímicos, havia a indicação da estimulação da eritropoiese, mas era fulcral desenvolver um método que confirmasse a administração da substância e que permitisse distinguir a EPO endógena, hEPO, da EPO exógena, rEPO. O *western blot*, uma das técnicas analíticas mais importantes na investigação de proteínas e com uma extensa aplicação a diversas especialidades, desde clínica médica, biologia molecular, bioquímica, entre outras, revelou ser um método promissor para os laboratórios que realizam análises de dopagem. Devido às diferenças na estrutura da hEPO relativamente à recombinante, permitiu pela diferença de cargas, que fossem inicialmente separadas por focagem isoelétrica (IEF) uma vez que a banda endógena apresenta um ponto isoelétrico (pI) ente 3,92-4,42, provavelmente devido a modificações pós-traducionais, tais como a glicosilação, enquanto as rEPO possuem um pI ligeiramente mais elevado (**Figura 1.8**) (48). Inicialmente, no TD2004EPO “Harmonization of the method for the identification of epoetin alfa and beta (EPO) and darbepoetin alfa (NESP) by IEF-double blotting and chemiluminescent detection”(9), apenas eram indicados critérios para a deteção de epoetina  $\alpha$ ,  $\beta$  e NESP. Numa versão posterior - o TD2009EPO “Harmonization of the method for the identification of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (e.g. darbepoetin and methoxypolyethylene glycol-epoetin beta)”(59) - surge uma nova ERA possível de ser detetada, a metoxi polietilenoglicol-epoetina beta (CERA) e surge uma alternativa complementar ao IEF, o SDS-PAGE (Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) que, através de fatores como o uso do SDS e do gel da poliacrilamida, permitiu eliminar a influência da estrutura e da carga, sendo as proteínas separadas

apenas com base nas diferenças do peso molecular. No TD2013EPO “Harmonization of analysis and reporting of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (e.g. darbepoetin, pegserpoetin, peginesatide, EPO-Fc) by electrophoretic techniques”(60), novas ERAs são adicionadas, tais como a peginesatide e a EPO-Fc (**Figura 1.8**).



**Figura 1.8-** Perfis isoeletricos da uEPO e ERAs. rEPO: 3 bandas na área básica, as duas mais intensas pertencem à área básica. uEPO: bandas na área endógena. NESP: 3 bandas aceitáveis na área ácida. CERA e EPO-Fc: 4 bandas consecutivas na área básica correspondente. Adaptado de (48)

O SAR-PAGE (Sarcosyl-polyacrylamide gel electrophoresis), imunoenaios (ELISA) e métodos cromatográficos passam, com este TD a ser, tal como o IEF, uma opção para método de triagem (ITP). O SAR é um surfactante aniônico que confere carga negativa à proteína ao qual é aplicada corrente elétrica ocorrendo a separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular no gel constituído por poliacrilamida. A diferença de pesos moleculares: uEPO/bEPO (ca. 34 kDa), NESP (ca. 44-45 kDa), CERA (ca. 68-78 kDa), EPO-Fc (ca. 45,5 kDa) e rEPO(ca. 36-38 kDa) permite a separação das diferentes proteínas em diferentes bandas (**Figura 1.9 A**), sendo o desafio para esta análise a diferença e identificação da banda hEPO/rEPO, que, devido ao próximo peso molecular que possuem, criam uma área difusa ou tênue acima da banda da hEPO, denominando-se *smear* (**Figura 1.9 B**).



**Figura 1.9-** A- Perfil das ERAs por SAR-PAGE (NESP, Dynepo, CERA, EPO-Fc e hEPO. B- Perfil das bandas de Dynepo, hEPO e hEPO/rEPO pela técnica de SAR-PAGE. Adaptado de (48).

O SAR-PAGE é um procedimento extenso com elevados gastos, não permite uma análise simultânea de um elevado número de amostras e o composto SAR, sólido, é um composto cancerígeno que precisa de ser manuseado com os devidos cuidados.

No documento técnico atualmente em vigor, TD2022EPO “Harmonization of analysis and reporting of erythropoietin (EPO) and other epo-receptor agonists (ERAs) by polyacrylamide gel electrophoretic (PAGE) analytical methods” são descritas as técnicas permitidas para realizar o método de triagem (ITP) e confirmação (CP), dependendo da ERA analisada (**Anexo II - Tabela 7.1**).

A toma de microdoses de rEPO, pelos praticantes desportivos, é uma nova realidade, que consiste na toma de pequenas doses ao longo do tempo. A hora e o *timing* da toma tornam-se fundamentais para a probabilidade de deteção ser menor devido à rápida eliminação pelo organismo (24-48h).

A otimização do fluxo de trabalho, o aumento da reprodutibilidade e da qualidade dos resultados passa pela escolha dos anticorpos utilizados no procedimento, da automatização das etapas de lavagem e incubações do anticorpo, pelo processo de purificação por imunoafinidade da EPO e ERAs presente na amostra, entre outras. A otimização através destas etapas têm como principais objetivos eliminar interferentes e isolar as proteínas específicas para obtenção de um resultado robusto e inquestionável (61,62).



## 2. Objetivos do estudo

O Laboratório de Análises de Dopagem (LAD) é uma das entidades nacionais antidopagem (63) e funciona com autonomia técnica e científica, junto do Instituto Português do Desporto e Juventude (IPDJ, I. P.). Uma das competências que lhe estão atribuídas é a execução de análises relativas ao controlo da dopagem, a nível nacional ou internacional. Para a realização destas análises, o LAD tem de ser acreditado segundo a Norma ISO 17025 e cumprir com os requisitos da norma Internacional para laboratórios da WADA. Existem atualmente, em todo o mundo, 29 laboratórios acreditados pela WADA, com o objetivo de analisarem amostras de rotina de forma a incentivar um desporto justo e limpo. Um dos objetivos, destes laboratórios, e para o qual parte do seu orçamento é destinado, é a investigação e desenvolvimento. A otimização e/ou criação de métodos é algo essencial para a deteção das inúmeras substâncias pesquisadas em laboratórios deste âmbito. Sendo o sangue, depois da urina, umas das matrizes preferencialmente utilizada em análises de dopagem, a sua utilização coloca alguns desafios às entidades antidopagem, nomeadamente as condições de transporte do local da colheita até ao laboratório, tendo de ser refrigerado, agrava o custo da análise e condiciona a recolha da amostra. Para além disso, o procedimento de colheita implica a venipunção dos praticantes desportivos, com as desvantagens associadas a tal prática. De forma a colmatar estes obstáculos, alternativas têm sido testadas, sendo uma delas os *Dried Blood Spots* (DBS). Um dos métodos, realizados nos laboratórios antidopagem, que maior volume de amostra utiliza e que se encontra implementado para a matriz soro e plasma, é a deteção de Agonistas do Recetor da Eritropoietina (ERAs).

De forma a compreender se os DBS poderão ser um complemento viável ao que é atualmente utilizado (urina e sangue obtido por venipunção), através da implementação e otimização do método SAR-PAGE para deteção de EPO e ERAs a partir de DBS, definiram-se os seguintes objetivos específicos para o presente estudo:

- Comparar os resultados dos DBS, utilizando o método SAR-PAGE, com as matrizes convencionais (urina e sangue por venipunção);
- Identificar a preferência dos diferentes métodos de colheita (urina, sangue venoso e capilar) dos voluntários do estudo;
- Avaliar a estabilidade das ERAs em amostras colhidas por DBS.
- Comparar diferentes marcas de DBS de forma a compreender o impacto na recuperação das ERAs



## 3. Materiais e métodos

### 3.1. Amostras biológicas

Este estudo foi realizado entre os meses de janeiro a abril de 2022 e abrangeu um total de 30 voluntários saudáveis, entre os 21-65 anos, do género feminino e masculino, que não tomavam medicação e não sofriam de doença que pudesse influenciar a produção, metabolismo ou excreção de EPO. Antes da colheita das amostras biológicas obteve-se o consentimento informado, livre e esclarecido de cada um dos voluntários (**Apêndice 10**). O estudo obteve parecer positivo do Conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (CE-ESTeSL), com número CE-ESTeSL-Nº-52-2021 e a recolha de amostras e dados anonimizados cumpriram o estabelecido no Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados (RGPD) da União Europeia de 27 de abril de 2016.

Foram escolhidos quatro voluntários que forneceram amostras de urina, sangue capilar (DBS) e sangue total em tubo seco e EDTA. Aos restantes vinte e seis voluntários foram colhidas amostras de sangue capilar (DBS) e sangue por venipunção colhido para tubo de EDTA e tubo seco. Foi utilizado o Whatman® 903 *Protein Saver Card* e, através da utilização de lancetas, foi picada a lateral dos dedos e com recurso a uma micropipeta foram colhidos duas vezes 60 µL de sangue capilar. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente, pelo menos, durante duas horas, e passado este período foi medido o diâmetro dos *spots* com uma régua (precisão de 1mm), de forma a perceber a influencia do hematócrito na dispersão do suporte. O tubo seco foi centrifugado a 1400 g durante 15 minutos, de forma a separar o soro do concentrado eritrocitário em alíquotas de 0,5 mL cada.

As amostras de urina, dos quatro voluntários, possuíam volumes entre os 90-140 mL e após calibração dos respetivos equipamentos foram medidos o pH no potenciómetro (FiveEasy Plus™ Mettler Toledo) e a densidade no refratómetro (ATAGO™ Digital Hand-Held Pocket Refractometer: PAL-10S). A urina foi dividida em alíquotas de 7,5 mL cada uma. As amostras de sangue capilar (DBS), 20 *spots* de 60 µL, dos quatro voluntários mencionados, foram efetuadas com sangue venoso do tubo de EDTA, devido ao elevado número de volume necessário (≈ 1,2 mL) para o desenvolvimento do estudo.

As amostras de sangue capilar (DBS) foram utilizadas nos parâmetros 3.5.1 Seletividade, 3.5.2 Limite de deteção (LOD), 3.5.3 Robustez/ Comparação de diferentes marcas de DBS e 3.5.4 Estudo de estabilidade e capacidade de identificação. As

amostras de urina e soro foram utilizadas no parâmetro 3.5.4 Estudo de estabilidade e capacidade de identificação e o sangue total em tubo de EDTA utilizado no parâmetro 3.2 Hemograma.

## **3.2. Hemograma**

De forma a avaliar os parâmetros hematológicos, especialmente o hematócrito, foi realizado um hemograma às 30 amostras de sangue em tubo EDTA. O tubo, agitou durante 15 minutos num agitador de rolos e o hemograma foi realizado no equipamento XN-1000 *Hematology-analyser* da Sysmex, Antes de processar as amostras, foram analisados e validados três níveis de controlos internos, XN Check, com número de lote 1339 e validade de 27 de fevereiro de 2022.

Posteriormente as amostras foram conservadas a 4°C, à exceção das quatro amostras dos voluntários que serviram para realizar os DBS do estudo da estabilidade (ponto 3.5.4 Estudo de estabilidade e capacidade de identificação). Após a validação do hemograma, e da utilização para o estudo de estabilidade, as amostras foram destruídas.

## **3.3. Questionário**

Com o objetivo de determinar, ordenar e comparar a preferência, dos voluntários, sobre os diferentes tipos de colheita (urina, sangue venoso e capilar) e classificação dos níveis da dor, da colheita de sangue venoso e capilar realizadas para o estudo foi elaborado um questionário no qual foi utilizada uma escala numérica de avaliação de 1 (sem dor) a 10 (Dor elevada). Todos os trinta voluntários responderam ao questionário e os dados foram analisados no software estatístico *RStudio* e no *Microsoft Excel 10*.

## **3.4. Materiais de referência**

Os materiais de referência utilizados foram preparados e conservados conforme as especificações do fabricante.

- rEPO - material de referência BRP eritropoietina, lote 4, adquirido ao *Council of Europe*, inicialmente liofilizado, foi reconstituído com uma solução de 0.01% Insulina/PBS. A concentração da solução mãe: 13 000 UI/mL;

- Recombinant human erythropoietin-alpha Fc-Chimera (EPO-Fc)- material de referência EPO-alpha Fc Human, lote 1217PEPOFC, adquirido à Prospec, inicialmente liofilizado, foi reconstituído com uma solução de 0.01% Insulina/PBS. A concentração da solução mãe, originária da seringa, de 0.1 µg/µL;
- Metoxi polietilenoglicol-epoetina beta - material de referência MIRCERA, lote H0563H46, adquirido à Roche Farmacêutica, em formato seringa para injeção. A concentração da solução mãe, originária da seringa, de 166 µg/mL;
- Epoietina delta - material de referência Dynepo, lote 733044A, adquirido à Shire, em formato seringa para injeção. A concentração da solução mãe, originária da seringa, de 2000 UI/mL;
- Darbepoetina alfa - material de referência ARANESP, lote 1134168B, adquirido à AMGEN, em formato seringa para injeção. A concentração da solução mãe, originária da seringa, de 100 ug/mL.

À exceção da EPO-Fc, que após reconstituição foi armazenada a -20 °C, todos os materiais de referência foram conservados a -80 °C, e as suas alíquotas conservadas a -20 °C.

Para o material de referência ARANESP, MIRCERA e DYNEPO foi solicitada e fornecida a autorização excepcional de aquisição direta de medicamento ao INFARMED.

A mistura de quatro materiais de referência (Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA) numa solução denomina-se ERA-MIX3, que funcionando como um padrão, permite definir o peso molecular aparente das ERAs nos géis analisados. A concentração das ERAs utilizada no ERA-MIX3 para DBS foi de: 0,52 pg/µL Dynepo; 0,69 pg/µL de NESP; 1,71 pg/µL EPO-Fc e 0,68 pg/µL CERA. Para as amostras de urina e soro a concentração do ERA-MIX3 foi de: 0,78 pg/µL Dynepo; 0,98 pg/µL de NESP; 7,69 pg/µL de EPO-Fc e 3,08 pg/µL de CERA.

### **3.5. Parâmetros de análise**

Inicialmente foram testados 3 volumes distintos (20, 40 e 60 µL), de forma a otimizar o método e selecionar qual o volume que emite um melhor sinal de banda endógena.

### 3.5.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método discriminar um analito em particular numa mistura complexa, sem interferências significativas dos outros componentes dessa mistura, tais como metabolitos, impurezas, produtos de degradação, entre outros.

Para avaliar este parâmetro foram testadas 30 amostras de DBS (60µL de sangue total), de diferentes indivíduos, de forma a detetar a eritropoietina endógena (bEPO).

### 3.5.2. Limite de deteção (LOD)

O limite de deteção (LOD) é a quantidade mínima de analito que pode ser detetada por um método.

Numa primeira fase, cinco spots foram preparados, com 60 µL de sangue capilar, e permaneceram à temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente pipetou-se para o centro dos DBS, semi-secos, o volume das fortificações de BRP, CERA, NESP e EPO-Fc que ficaram à temperatura ambiente por mais uma hora. Testaram-se 5 concentrações distintas, C1-C5 (**Tabela 3.1**), tendo em conta a **Tabela 1.2** correspondente ao MRPL das amostras de sangue, descrito no TD2022EPO.

Numa segunda fase, testaram-se concentrações mais baixas (C6-C7) das 4 ERAs, seis spots com 60 µL de sangue capilar foram preparados e fortificados nas mesmas condições (C2-C7)(**Tabela 3.1**).

**Tabela 3.1-** Concentrações testadas, em amostras de DBS, para o parâmetro Limite de Deteção (LOD)

ERA	Concentração (pg/mL)						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
BRP (mUI/mL)	75,6	50,4	25,2	12,6	6,3	4,73	3,15
NESP	75,6	50,4	25,2	12,6	6,3	4,73	3,15
EPO-Fc	382	248	124	62	31	23,3	15,5
CERA	750	500	250	125	62,5	46,9	31,3

### 3.5.3. Robustez/ Comparação de diferentes marcas de DBS

A robustez de um método é uma medida da sua capacidade de permanecer inalterado após a introdução deliberada de pequenas alterações nos parâmetros desse método

tais como mudança de operador; utilização de diferentes lotes de alguns reagentes (MOPS, anticorpo primário, estreptavidina conjugada com HRP, entre outros), alteração das condições do blot e, a principal alteração, que consistiu na comparação de seis marcas de papel de filtro/DBS/VAMS, de forma a compreender o impacto na recuperação das ERAs. Foram testados os seguintes materiais:

- Whatman – 903 *Protein Saver Card*;
- Whatman – Papel de filtro nº1;
- Neoteryx – VAMS
- DBS Systems SA - *Microsampling HemaXis DB10 kits*
- MAIIA – *Dried Blood Spot Collection Card for erythropoietin analysis*
- Macherey-Nagel – Papel de filtro

Para cada tipo de suporte foram testadas amostras com 60µL de sangue capilar e com 60 µL de sangue capilar fortificado à concentração (C2) (**Tabela 3.1**). Todas as amostras foram preparadas segundo o descrito no ponto 3.6.3 Imunopurificação das amostras de DBS – Kit 1430, MAIIA.

Os *Microsampling HemaXis DB10 kits*, da empresa DBS Systems SA, os *Dried Blood Spot Collection Card for erythropoietin analysis*, da empresa MAIIA e os VAMS, da empresa Neoteryx, foram gentilmente fornecidos pelas respectivas empresas.

#### **3.5.4. Estudo de estabilidade e capacidade de identificação**

O estudo de estabilidade permite avaliar a estabilidade dos compostos, de forma a concluir se ocorre degradação dos mesmos.

As amostras de urina (U1-U4), soro (S1-S4) e DBS (DBS1-DBS4), solicitadas aos quatro voluntários, que foram preparadas e alíquotadas: 7,5 mL de urina, 500 µL de soro e 60µL de sangue capilar nos DBS 903 *Protein Saver Card*, *Whatman*. Todas as amostras foram fortificadas com a mesma quantidade de BRP, CERA, NESP e EPO-Fc: 3,02 mUI; 30,0 pg; 3,024 pg e 14,8 pg respectivamente. Conservaram-se a diferentes temperaturas durante diferentes períodos de tempo.

O estudo da estabilidade envolveu 4 fases distintas de acordo com o tempo de conservação aplicado às amostras em estudo. Numa primeira fase, as 4 amostras das diferentes matrizes foram analisadas de imediato, representando o tempo zero. Numa segunda fase, cada matriz foi conservada a três temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4°C e -20 °C, durante um mês e a terceira e quarta etapa, idêntica à segunda, a diferença consistiu no aumento do período de conservação, sendo este de dois e três meses respectivamente. Os DBS armazenados durante um, dois e três meses foram colocados dentro de saco de armazenamento com um agente exsicante de sílica gel.

## 3.6. Procedimento experimental

De acordo com o descrito no documento técnico, TD2022EPO, de pesquisa de EPO e ERAs, são diversos os passos associados a este procedimento analítico (61,62):

1. Imunopurificação da EPO e ERAs presente na amostra (urina, soro e DBS);
2. Eletroforese por SAR-PAGE;
3. Blot ou transferência básica e bloqueio com leite;
4. Incubação automatizada do anticorpo primário e estreptavidina conjugada com HRP;
5. Detecção quimioluminiscente;
6. Tratamento dos resultados (GASepo).

A primeira etapa consiste na preparação da amostra através de um processo de purificação por imunoafinidade da EPO e ERAs e tem como principais objetivos eliminar interferentes e isolar as proteínas específicas para obtenção de um resultado robusto e inquestionável.

### 3.6.1. Imunopurificação das amostras de urina – ELISA, StemCell

A preparação utilizando placas ELISA, da empresa STEMCELL, é um ensaio enzimático para detecção de EPO urinária humana (uEPO) e recombinante (rEPO). O ensaio utiliza dois anticorpos monoclonais criados contra a EPO urinária humana, que se ligam a dois epítopos da EPO e apresentam uma ligação de elevada afinidade tanto à EPO endógena como à recombinante.

Inicialmente, a 7,5 mL de urina, ajustou-se o pH da amostra com tampão 3,75 mM Tris-HCl (pH 7,4) e verificou-se o mesmo com tiras de teste de controlo de pH, confirmando-se o pH próximo de 7. A amostra foi ultra-filtrada em tubos Ultra Amicon-15 (30 kDa) e as lavagens efetuadas com tampão 50 mM Tris-HCl (pH 7,4). Posteriormente, a amostra foi concentrada por centrifugação em tubos Amicon Ultra-0,5 (30 kDa) e purificada *overnight* a 4°C em placas de ELISA revestidas com anticorpos. No dia seguinte, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) e secos à temperatura ambiente.

### 3.6.2. Imunopurificação das amostras de soro – Kit 1390, MAIIA

O kit de purificação da EPO, da empresa MAIIA, através da adição de tampões, permite a dissolução de precipitados e, após filtração da amostra, por vácuo, através de uma

coluna de gel, que contém resina, imobiliza anticorpos anti-EPO e captura tanto bEPO como rhEPO, e também epoetinas, tais como NESP, CERA e EPO-Fc.

O procedimento tem por base as orientações descritas pelo fabricante(64).

A 500 µL de soro foram adicionados tampões do kit (*Exposure Aid e Buffer for serum*) e água. Esta solução foi incubada à temperatura ambiente; filtrada com filtros 0,22 µm e posteriormente purificada ao ser filtrada pela coluna anti-EPO num sistema de vácuo (KNF Laboport) a um fluxo de 0,5-1 mL/min. Adicionou-se o tampão de eluição, específico para SAR-PAGE, de forma a eluir a EPO e ERAs presentes na coluna. Por fim, a amostra foi concentrada por centrifugação nos tubos *Ultracell YM-30*(64).

### **3.6.3. Imunopurificação das amostras de DBS – Kit 1430, MAIIA**

O procedimento tem por base as orientações descritas pelo fabricante(65) e o princípio do kit é idêntico ao descrito para o Kit 1390 (ponto 3.6.2 Imunopurificação das amostras de soro – Kit 1390, MAIIA).

Os spots foram recortados com uma tesoura, previamente desinfetada, e incubados com o tampão para soro durante 90 minutos sob agitação lenta *end-over-end*. A solução foi purificada ao ser filtrada pela coluna de gel anti-EPO num sistema de vácuo (KNF Laboport) à pressão de 300 mBar. Adicionou-se o tampão de eluição, específico para SAR-PAGE, de forma a eluir a EPO e ERAs presentes na coluna. Posteriormente a amostra foi concentrada por centrifugação em tubos Ultracell YM-30.

### **3.6.4. Eletroforese por SAR-PAGE**

As proteínas foram desnaturadas através do aumento da temperatura, a 95 °C (*Thermomixer Comfort*, Eppendorf), sendo convertidas numa estrutura linear. O ditioneitol (DTT) adicionado, cliva as pontes dissulfeto obtendo-se uma densidade de carga uniforme. Posteriormente adicionou-se tampão SAR *sample* (4x) (106mM Tris-HCl, 137mM Trizma® base, 8% N- *Lauroylsarcosine sodium salt*, 0.5mM EDTA, 10% glicerol, 10mM DTT, vermelho de fenol). O EDTA forma o complexo ião metálico [Fe(III)] que previne os grupos-SH da EPO, intencionalmente formados na preparação da amostra para aumentar a forma definida da banda, de serem reoxidados e aleatoriamente associados durante a eletroforese. A reassociação das pontes S-S levam a um aumento das bandas difusas, sendo este um passo crítico. Foi então adicionado bissulfito de sódio (antioxidante) ao tampão de corrida para obter bandas nítidas, denominando-se solução catódica.

A electroforese foi realizada utilizando *XCell SureLock MidiCell/MiniCell* com géis NuPAGE Novex 10% Bis-Tris 1.0-1.5 mm. O *MidiCell/MiniCell* é montado de acordo com

as instruções do fabricante. A cuba foi preenchida com tampão de corrida (50mM MOPS, 50mM Trizma® base, 0.1 % N-*Lauroylsarcosine sodium salt*, 1mM EDTA) e solução catódica. Utilizando micropipetas calibradas e verificadas, foram aplicados no gel as amostras purificadas por imunoafinidade (15 µL) e ERA-MIX3. Inseriu-se a cuba numa caixa de plástico num ambiente frio, de forma que o aumento da temperatura não criasse uma distorção do nível das bandas eletroforéticas. Com recurso à *electrophoresis power supply* – EPS 3501 XL criaram-se as condições constantes da corrida, 200V durante 75 minutos.

### **3.6.5. Blot ou transferência básica e bloqueio com leite**

Para fazer o *blot* do gel de poliacrilamida com a membrana PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) ativou-se a membrana com metanol, água, e tampão blot (48 mM Tris, 39 mM glicina, 0,00375% SAR, e 20% metanol). A sanduiche foi composta por papel *blot*, a membrana PVDF ativada e o gel equilibrados em tampão *blot*. A transferência no equipamento TE77 ECL *Semi-Dry Transfer Unit*, realizou-se durante 45 minutos a 1,54mA/cm<sup>2</sup>. Posteriormente bloqueou-se a membrana com leite sem gordura a 5%, durante 45 minutos, impedindo interações não específicas, aumentando assim a sensibilidade do método.

### **3.6.6. Incubação automatizada do anticorpo primário e estreptavidina conjugada com HRP;**

A membrana foi lavada com PBS e todas as etapas subsequentes de incubação e lavagem foram realizadas num processador automático, *BlotCycler* (Precision Biosystems), a 4 °C. Colocou-se a membrana numa bandeja e nas respetivas zonas do equipamento depositaram-se 3L de PBS, o anticorpo de rato biotilado com anti-EPO humana - clone AE7A5 BAM2871 (0,5 µg/mL em 1% LFM/PBS) e a estreptavidina conjugada com HRP (1:2000 em 1% LFM/PBS). O anticorpo reconhece um epítipo dentro dos primeiros 26 aminoácidos no terminal NH<sub>2</sub> da EPO humana que ao ser conjugado com a biotina, vai permitir que sejam criados múltiplos locais para a ligação do complexo biotina-estreptavidina, marcado com HRP que é a substância propiciadora da visualização. Uma vantagem para a utilização deste anticorpo, é a sua elevada sensibilidade, até cerca de oito vezes mais do que o mesmo anticorpo não biotilado (MAB2871). O *BlotCycler* foi programado de forma a permitir as incubações e lavagens tendo o programa uma duração total de 19 horas (**Tabela 3.2**).

**Tabela 3.2-** Condições do programa no *BlotCycler*

<b>ETAPA</b>	<b>DURAÇÃO (minutos)</b>
Anticorpo primário	720
Lavagem	5 x 9 ciclos de lavagem
Estreptavidina conjugada com HRP	300
Lavagem	5 x 9 ciclos de lavagem

### **3.6.7. Detecção quimioluminescente.**

A detecção quimioluminescente é o último passo do procedimento analítico.

Sobre a membrana PVDF é adicionada uma solução *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific) que consiste na junção do luminol, que é o substrato, com peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). O luminol oxida na presença de HRP e  $H_2O_2$  criando um estado de excitação (3- aminoftalato) que é visível ao emitir luz num determinado comprimento de onda. Este passo foi realizado utilizando a câmara CCD LAS-4000 (Fujifilm) permitindo assim a visualização das bandas específicas de cada um dos compostos.

### **3.6.8. Tratamento dos resultados**

As imagens foram tratadas e analisadas com o auxílio do software GASepo versão 2.3, que permitiu a análise qualitativa de resultados de SAR-PAGE para detecção de EPO e das ERAs(66).



## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Amostras biológicas

Após a colheita, as amostras de urina dos quatro voluntários, foram submetidas aos testes pré-analíticos que consistiram na medição do pH no potenciômetro (FiveEasy Plus™ Mettler Toledo) e da densidade no refratômetro (ATAGO™ Digital Hand-Held Pocket Refractometer: PAL-10S) (**Apêndice 5 - Tabela 8.5**). O pH variou entre os 5,51 e 6,59 apresentando valores normais, não havendo assim sinais de degradação das amostras. A densidade mínima permitida para o volume colhido é de 1,003 e todas as urinas apresentam valores superiores (4).

As colheitas de sangue capilar para DBS realizadas, aos 30 voluntários demoraram em média 2-3 minutos, demonstrando que a colheita de DBS é rápida e prática. Esta ação permitiu volume suficiente para dois spots de 60 µL cada um. Comparativamente com o volume de sangue capilar utilizado nos estudos desenvolvidos no doping (cerca de 20µL)(**Apêndice 4 - Tabela 8.4**), a utilização de volume no presente estudo foi substancialmente superior, 60 µL/spot, e a justificção para a escolha deste volume encontra-se detalhada no ponto 4.4 Parâmetros de análise.

Procedeu-se à secagem dos spots, que demorou em média duas horas até o papel ter aparência seca e cor vermelho-escuro, em vez de vermelho-claro, que é sua cor logo após a colheita. De forma a compreender o impacto que esta forma de colheita teria nos controlos de dopagem e na conservação da EPO e ERAs, seria interessante, no futuro, avaliar diferentes tempos de secagem, de forma a encontrar um mínimo aceitável e confortável tanto para praticantes desportivos como para responsáveis das colheitas.

Posteriormente à secagem dos spots, os mesmos foram medidos com uma régua, variando os resultados entre 12-15 mm (**Apêndice 6 - Tabela 8.6**). O tamanho das amostras de DBS têm demonstrado a sua diminuição de forma proporcional e linear com o aumento do valor do hematócrito. No presente estudo este fator não tem influência, pois o sangue foi medido (60 µL) antes de ser colocado no suporte. A grande maioria dos resultados, 90%, encontram-se entre os 13-14 mm, demonstrando a proximidade da medida, na dispersão do sangue no suporte, independentemente do hematócrito dos voluntários (35,9%-48,4%). Estes resultados demonstram que é possível realizar a colheita de sangue capilar sem recurso a um instrumento de medição, tal como a micropipeta, e apenas controlar o volume com um diâmetro pré-definido que necessita de ser preenchido na sua totalidade. Desse modo, o responsável pela colheita saberia o volume necessário.

## 4.2. Hemograma

Da análise ao tubo de EDTA no XN-1000 *Hematology-analyser* da Sysmex, resultou um hemograma completo (**Apêndice 6 - Tabela 8.7**) com o foco de interesse direcionado para o valor do hematócrito (**Apêndice 6 - Tabela 8.6**) que apresentou um valor mínimo de 35.9%, máximo de 48.4%, obtendo-se uma média de 41.13%. A dispersão dos resultados é baixa, encontrando-se dentro dos intervalos esperados para indivíduos saudáveis do género masculino e feminino e da classe etária. Todos os hemogramas foram analisados e validados.

## 4.3. Questionário

Foram recolhidos e analisados os trinta questionários de todos os voluntários que participaram no presente estudo. O questionário consistiu em 3 perguntas, na primeira foi pedido aos voluntários para ordenarem a colheita da matriz preferencial, existindo 3 opções (urina, sangue venoso e capilar). A matriz preferencial de 73.3% dos voluntários é a urina e, também 73.3% dos voluntários classifica o sangue venoso como a opção que menos prefere (**Apêndice 7 - Gráfico 8.1**). O sangue capilar encontra-se na segunda opção mais votada pela escolha de 63.3 % dos voluntários. A seleção prende-se com o facto de a colheita de urina ser uma técnica menos invasiva e não estar associada a dor. No entanto em contexto de controlo de dopagem um facto que pode deixar determinadas pessoas desconfortáveis é a micção ser controlada visualmente pelo responsável do controlo, sendo considerado para muitas pessoas uma invasão da sua privacidade. A segunda e terceira pergunta envolveu quantificar numa escala numérica do nível de dor, em que 1 correspondia a “sem dor” e 10 a “dor elevada”, da colheita de sangue venoso e sangue capilar. A média de classificação de dor para a colheita de sangue venoso foi de 3,8 (dor ligeira-moderada), enquanto para o sangue capilar foi de 2,3 (dor nula-ligeira)(**Apêndice 7 - Tabela 8.8**). Na classificação de sangue venoso, 3 voluntários atribuíram valores máximos de 7 e 8 correspondendo a dor moderada-elevada. Pela distribuição do **Gráfico 8.2** e **Gráfico 8.3** é evidente que o sangue capilar se encontra com uma distribuição maior nos níveis mais baixos de dor; 83.3% dos voluntários dá valores entre 1-3 (dor nula-ligeira).

O valor médio, do presente estudo, para o nível de dor da colheita de sangue capilar (2,3) no dedo é mais elevado comparando os resultados descritos por Solheim *et al.*, no qual o valor médio é 1,8 (dor nula-ligeira).

Estes resultados demonstram a perspectiva dos voluntários relativamente às colheitas e é evidente que a colheita de sangue capilar para os DBS é menos intrusiva e dolorosa, havendo a preferência desta comparativamente com a colheita de sangue venoso.

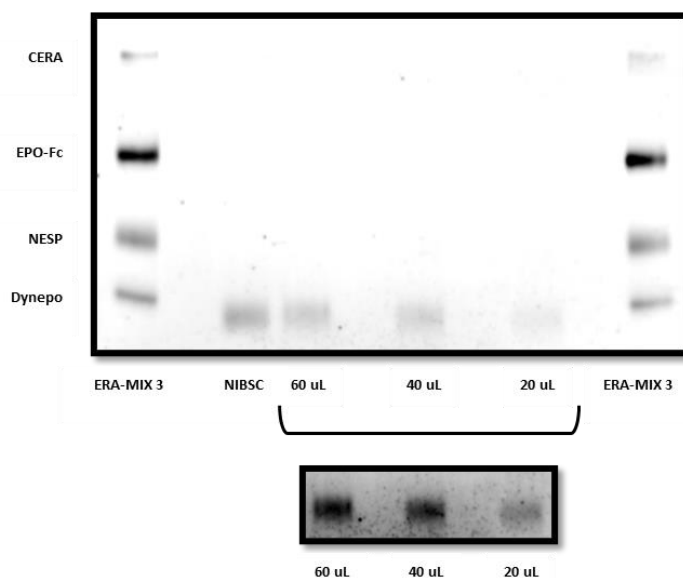
#### 4.4. Parâmetros de análise

Anteriormente às colheitas de sangue capilar dos trinta voluntários, o método foi testado e otimizado, de forma a definir qual o volume a trabalhar nos parâmetros em estudo. Foram testados três spots com volumes de sangue distintos (20, 40 e 60  $\mu\text{L}$ ). Todos os resultados foram obtidos com sucesso e foi possível observar o resultado esperado, a banda endógena (bEPO)(Figura 4.1). Apesar de ter sido possível ver as bandas expectáveis, é importante realçar que a intensidade das bandas é significativamente inferior às presentes nas amostras de urina e soro/plasma, o que resulta num aumento de *background* e menor relação sinal/ruído. No entanto com o aumento do contraste, no Software GASepo, é possível visualizar uma maior intensidade das bandas. Outra alternativa que futuramente poderá ser testada são as condições do *blot*, de forma a possibilitar a transferência da bEPO do gel para a membrana, testando diversas variantes, tais como duração de tempo e amperagem.

A concentração de EPO varia de indivíduo para indivíduo, habitualmente num spot com cerca de 60  $\mu\text{L}$  de sangue, a um hematócrito de 40%, a bEPO expectável vai de 0,300-1,700 pg,(44) o que origina diferentes intensidades da banda EPO, este fator influenciou a escolha do volume final, pois apesar de na amostra analisada ser visível todos os volumes, optou-se por seleccionar os 60  $\mu\text{L}$  por apresentar uma banda mais intensa e confortável para a análise dos resultados permitindo ver concentrações que se encontrem dentro da sensibilidade do método.

Segundo as regras dos controlos de dopagem, existe a necessidade de colher volume suficiente para o método de triagem (ITP) e confirmação e eventualmente repetição, caso haja necessidade. O TD2021DBS obriga uma colheita de, pelo menos, 2 spots (2 x 20  $\mu\text{L}$ ) para a amostra “A” e um spot (1 x 20  $\mu\text{L}$ ) para a amostra “B”. De acordo com os resultados obtidos e atendendo a que o volume ideal seleccionado foi de 60  $\mu\text{L}$ , numa colheita de sangue capilar para DBS e posterior análise de EPO e ERAs aconselha-se à colheita de dois spots de 60  $\mu\text{L}$  para a amostra “A” e um spot com de 60  $\mu\text{L}$  para a amostra “B”, totalizando um volume de 180  $\mu\text{L}$ . Este volume, para alguns indivíduos por exemplo com baixo fluxo sanguíneo, poderá envolver mais do que uma punção. A

redução do volume poderia ser uma solução, mas envolve a diminuição da quantidade de EPO e ERAs, o que levaria a uma diminuição da sensibilidade e consequentemente menor capacidade de detetar concentrações mais baixas.

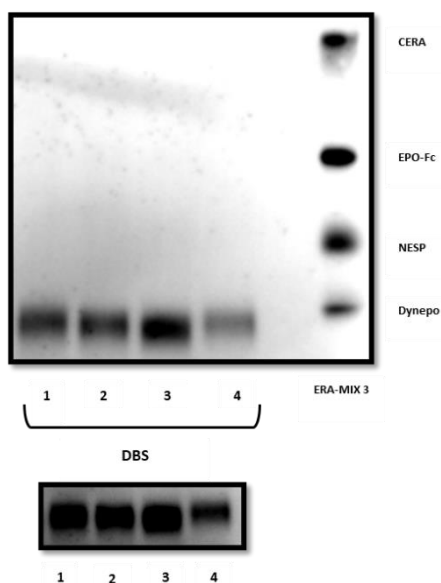


**Figura 4.1-** Resultado SAR-PAGE, para definição do volume de trabalho (20,40 e 60  $\mu$ L). ERA MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA. NIBSC (0,2 mUI)

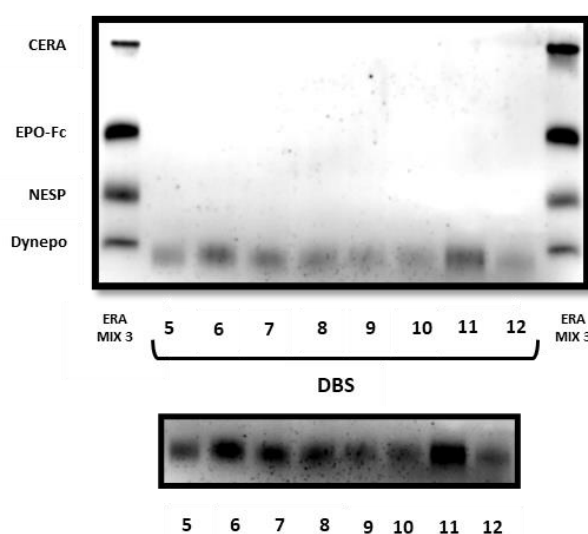
#### 4.4.1. Seletividade

O estudo da seletividade permite a um laboratório fazer a avaliação de bandas inespecíficas que possam interferir com a avaliação dos resultados e que podem conduzir à emissão de resultados falsos positivos, uma das grandes preocupações do mundo do doping. Para este estudo, analisaram-se 30 DBS de diferentes voluntários, em três momentos distintos. Na **Figura 4.3** encontram-se os resultados das amostras de DBS 1-4, na **Figura 4.2** as amostras DBS 5-12 e por fim na **Figura 4.4** as amostras DBS 13-30. Em algumas amostras analisadas durante o estudo, observaram-se bandas inespecíficas na zona da EPO-Fc. O mesmo foi observado num estudo semelhante realizado por Heiland *et al.*(67). Tal fenómeno é igualmente comum em amostras de soro/plasma, devido à elevada quantidade de proteínas presentes. A presença da banda inespecífica não afeta a leitura da EPO, nem das ERAs, no entanto deverá ser evitado especialmente em procedimentos de confirmação. Segundo o TD2022EPO, um método de confirmação tem de se distinguir do método de triagem por uma das seguintes opções: aplicação de um procedimento de imunopurificação diferente, utilização de uma

técnica distinta de separação eletroforética (IEF-PAGE vs. SDS-PAGE vs. SAR-PAGE, quando aplicável), realização de um duplo blot quando é utilizado o anticorpo biotilado no método de triagem e ainda a utilização de um anticorpo de detecção diferente. Atendendo às regras descritas, alternativas de técnicas de imunopurificação poderão ser exploradas, tais como ELISA, MAIIA e *beads* magnéticas, e/ou a possibilidade de realização do duplo blot para redução das bandas inespecíficas.

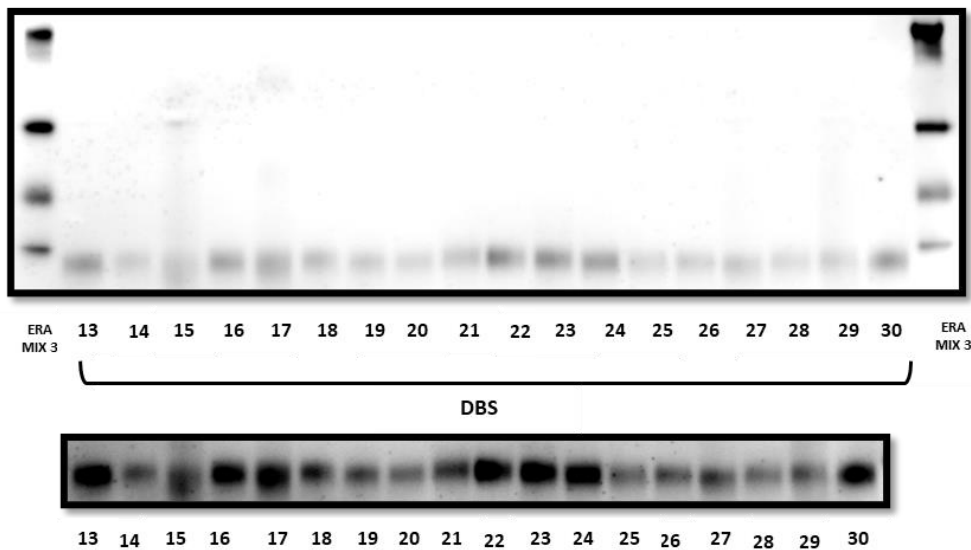


**Figura 4.3-** Resultado SAR-PAGE seletividade. Amostras DBS 1-4. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA



**Figura 4.2-** Resultado SAR-PAGE seletividade. Amostras DBS 5-12. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

Todas as amostras apresentaram a banda endógena abaixo da linha de *cut-off* definido pela epoletina delta e nenhuma apresentou bandas inespecíficas. O GASepo calcula um parâmetro denominado volume absoluto da banda, que são valores diretos de cálculos internos que se encontram relacionados com as intensidades dos pixels da câmara usada para detecção da imagem. Tal como referido, as bandas apresentam diferentes intensidades, sendo umas mais intensas (DBS 1-3, 6-7 e 11) e outras menos intensas (8-10, 15 e 27) (**Apêndice 8 - Tabela 8.9**).



**Figura 4.4-** Resultado SAR-PAGE seletividade. Amostras DBS 13-30. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

Todas as bandas de bEPO foram visíveis e analisadas demonstrando que o método apresenta uma sensibilidade de 100%. Segundo o **Apêndice 6 - Tabela 8.7** é possível observar que os valores de HCT mais baixos correspondem às amostras 8, 9, 13, 24 e 30 e destas apenas as amostras 8 (35.9%) e 9 (36.6%) apresentam uma intensidade mais baixa (**Apêndice 8- Tabela 8.9**). Por outro lado, as amostras 24 e 30, com HCT de 36.8% e 37.2% respetivamente, correspondem às bandas analisadas mais intensas. A medição do volume antes da aplicação no suporte foi a forma que se encontrou de excluir o *bias* do HCT e os resultados demonstram concordância com esse facto. Verificou-se que as diferentes percentagens de hematócrito, com intervalo de 35.9 a 48.4%, não afetaram a deteção de bEPO.

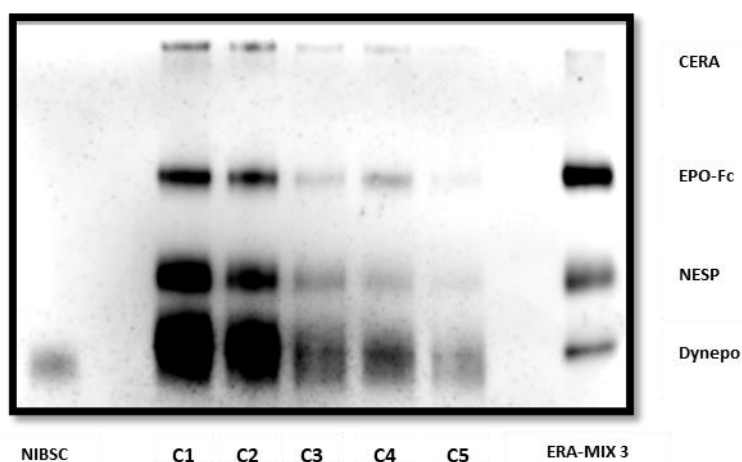
Demonstrou-se também que a análise de sangue capilar, em DBS, que sofre imunopurificação, através do Kit MAIIA 1430, seguido de *Western-blot* com eletroforese SAR-PAGE, é um método capaz de detetar bEPO, demonstrando ser altamente sensível e específico. De forma a aumentar a sensibilidade, principalmente para a deteção de concentrações baixas, é importante explorar a otimização do método. Testar diferentes tempos e condições de incubação *end-over-end* na imunopurificação, volumes de tampão de eluição, condições de *blot* podem ser alguns dos exemplos a ser testados no futuro.

#### 4.4.2. Limite de detecção (LOD)

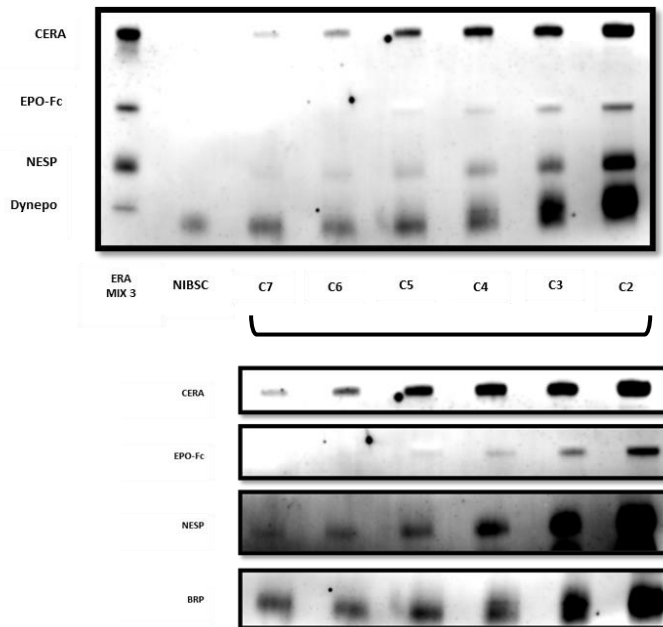
De forma a testar a quantidade mínima de analitos que podem ser detetados pelo método foi feito o estudo do Limite de Detecção (LOD). Para tal, foram fortificados 5 DBS, previamente preenchidos com 60 µL de sangue capilar, com 5 concentrações de 4 tipos de materiais de referência de ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA) para avaliar a capacidade de detecção da concentração mais baixa.

Em todas as concentrações, C1-C5 (**Tabela 3.1**), foram observadas as bandas das 4 ERAs distintas. A sua deteção e identificação foi feita com base na posição do perfil da banda no software analítico GASepo, em conformidade com o TD2022EPO, mostrando que a imunopurificação e o *Western blot* não afetaram a mobilidade das ERAs.

Através da observação da **Figura 4.5** e da avaliação dos volumes absolutos do **Apêndice 8 - Tabela 8.10** é possível analisar a diminuição da intensidade das bandas à medida que a concentração diminui. Todas as concentrações são possíveis de observar, inclusive a C5, apesar de necessitar de maior contraste, bem como todas as bandas das respetivas ERAs. Tendo em conta que todas as ERAs foram observadas ao visualizar os resultados da C1, com uma concentração muito intensa, complementou-se a análise do LOD com a testagem de concentrações mais baixas, retirando o C1 para não ofuscar a intensidade de concentrações mais baixas (**Figura 4.6**).



**Figura 4.5-** Resultado SAR-PAGE para o Limite de deteção (LOD). Cinco concentrações, C1-C5 de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA



**Figura 4.6-** Resultado SAR-PAGE para o Limite de detecção (LOD). Seis concentrações, C2-C7 de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

Durante o estudo do LOD foi também avaliada a robustez do método. Neste sentido, aumentou-se a duração do blot de 45 para 75 minutos e testou-se os *Dried Blood Spot Collection Card for erythropoietin analysis*, da empresa MAIIA. A análise destes resultados permitiu observar a banda da CERA, NESP e BRP na C6 e C7 e de EPO-Fc na C5. A diferença de intensidade da CERA entre ambas as figuras (**Figura 4.5** e **Figura 4.6**), poderá ser resultado de uma maior afinidade com o DBS e/ou o aumento da duração do blot.

O TD2022EPO, que define como obrigatório que o valor do LOD corresponda a, pelo menos, 50% do valor do MRPL. Na C7, se compararmos com os MRPLs das ERAs para soro/plasma (**Tabela 1.2**), corresponde a 1,25 vezes o valor para a CERA; 0,32 vezes o valor do NESP e BRP e a C5 corresponde a 1,25 vezes o valor da EPO-Fc. A CERA e EPO-Fc apresentam valores mais elevados, e como seria de esperar, as quantidades detetáveis em DBS são mais baixas, pois o volume dos DBS é menor (60 µL), comparativamente com o volume de urina (7,5 mL) e sangue (500 µL), que são 125 e 8 vezes mais altos.

Baseado nos resultados obtidos os limites de detecção são: 31,3 pg/mL para a CERA; 31 pg/mL para a EPO-Fc; 3,15 pg/mL para o NESP e 3,15 mUI/mL para o BRP (**Tabela**

4.1). Estes resultados demonstram que, caso sejam analisados futuramente amostras de sangue capilar em DBS haverá a necessidade de definir valores de MRPL realistas para a CERA e EPO-Fc, tendo em conta que os valores de NESP e BRP encontram-se bem definidos. De forma a cumprir as regras do LOD, pelo menos 50% MRPL, os valores estabelecidos para o MRPL deveriam rondar 2,5 vezes os valores definidos para o LOD. Comparando o estudo realizado por Heiland *et al.*, os mesmos valores de LOD foram definidos para EPO-Fc, ambos 31 pg/mL, e valores inferiores no presente estudo foram definidos para NESP (3,15 pg/mL), CERA (31,3 pg/mL) e BRP (3,15 mUI/mL), pois os obtidos por Heiland *et al.* foram 12,6 pg/mL; 62,5 pg/mL e 3,7 mUI/mL correspondentemente (67).

**Tabela 4.1-** Valores de LOD em sangue capilar (DBS) definidos para as ERAs: CERA, EPO-Fc, NESP e rEPO (BRP), resultados obtidos pela leitura da **Figura 4.6**

<b>ERA</b>	<b>LOD pg/mL</b>
<b>BRP (rEPO) (mUI/mL)</b>	3,15
<b>NESP</b>	3,15
<b>EPO-Fc</b>	31
<b>CERA</b>	31,3

#### 4.4.3. Robustez/ Comparação de diferentes marcas de DBS

A robustez é a capacidade de um determinado método permanecer inalterado após a introdução deliberada de pequenas alterações. Neste sentido, para a avaliação da robustez foram aplicadas algumas alterações, tais como diferentes lotes de reagente: anticorpo de rato biotinizado com anti-EPO humana - clone AE7A5 BAM2871 (Bio-Techne), no qual foram utilizados o lote CLNM072103 e CLNM0721021, *Streptavidin:Biotinylated Peroxidase Complex* (Biospa) com utilização do lote 464-1 e 480-3 e MOPS (Sigma) utilizando os lotes #BCBD6511 e #BCBZ7716. Também foram utilizados dois tipos distintos de géis de poliacrilamida, o *NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Gels 1,5 mm 10 wells* e o *NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Gels 1,0mm 20 wells*, que apresentam diferentes tamanhos, espessuras e condições da eletroforese e do *blot*. A estabilidade a um e dois meses, descrita no ponto 4.4.4 Estudo de estabilidade e

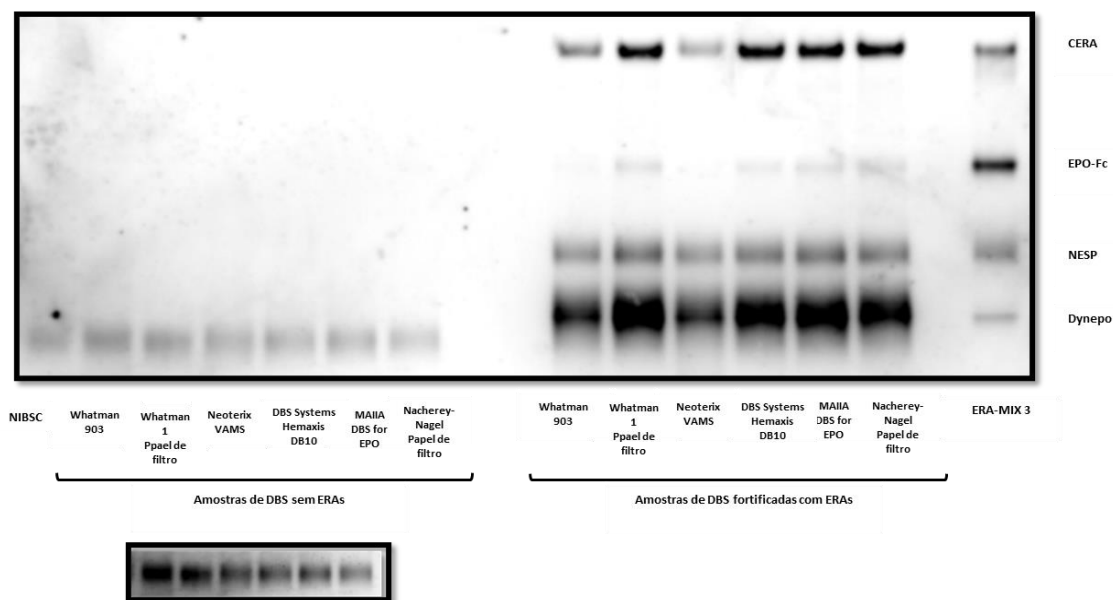
capacidade de identificação , foi realizada por diferentes operadores na matriz urina (**Figura 4.12** e **Figura 4.15**). Relativamente a equipamentos, foram utilizadas diferentes fontes de alimentação e unidades de transferências TE77 ECL *Semi-Dry Transfer Unit*. Diferentes DBS e condições de blot foram testados para o parâmetro do LOD. O método demonstrou ser robusto uma vez que todas as alterações acima mencionadas não influenciaram os resultados.

Sendo o principal objetivo do estudo compreender a viabilidade da detecção de ERAs em DBS, foram selecionados diferentes suportes DBS e VAMS. Para comprovar se o método é robusto com a alteração do suporte escolhido, e por outro, apresentam todos sensibilidades aproximadas na detecção de ERAs. De forma a comparar os diversos produtos no mercado, que respondem a diferentes necessidades, testaram-se seis suportes distintos, nos quais foram analisadas amostras negativas e fortificadas com as quatro ERAs:

- **903 Protein Saver card (Whatman)** – suporte selecionado para análise dos parâmetros descritos anteriormente (LOD, Seletividade, ...) por se estar a pesquisar uma glicoproteína, pelas referências bibliográficas (68–70), pela capacidade de volume (75-80  $\mu$ L) e pela acessibilidade no valor de compra.
- **Dried Blood Spot Collection Card for erythropoietin analysis** – da empresa MAIIA, encontra-se em fase de protótipo, no entanto foi fornecido pela casa comercial, pelo que ainda não se encontra no mercado, no entanto será o produto mais específico para a detecção de EPO e ERAs e deste modo teria todo o interesse em ser testado.
- **Papel de filtro Whatman e Macherey-Nagel** – foram incluídos no estudo para compreender até que ponto um material comumente encontrado num laboratório poderá servir para pesquisa de EPO e ERAs.
- **VAMS da Neoteryx e o Microsampling Hemaxis DB10 Kits da DBS Systems SA.** – ambos descritos na literatura (54,68,71) e com a vantagem de controlar o volume colhido e analisado. Optou-se por testar os dois dispositivos para comparar se teria alguma influência na sua escolha e para contornar a questão do volume de sangue capilar colhido, de forma a que o hematócrito não fosse um fator associado a erro.

Em todos os suportes foram utilizados 60  $\mu$ L de sangue capilar que secaram durante uma hora e posteriormente foram fortificados com uma solução que continha as quatro

ERAs que secaram sobre o sangue durante outra hora. Todos os spots passaram pelo mesmo procedimento de imunopurificação e método de detecção. De forma a comprovar a robustez do método e excluir eventuais enviesamentos, a comparação dos diferentes suportes foi realizada por dois operadores distintos.



**Figura 4.7-** Resultados de SAR-PAGE para a comparação de diferentes suportes de DBS. Do lado esquerdo apresentam-se os resultados de amostras apenas com bEPO e do lado direito amostras fortificadas com 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

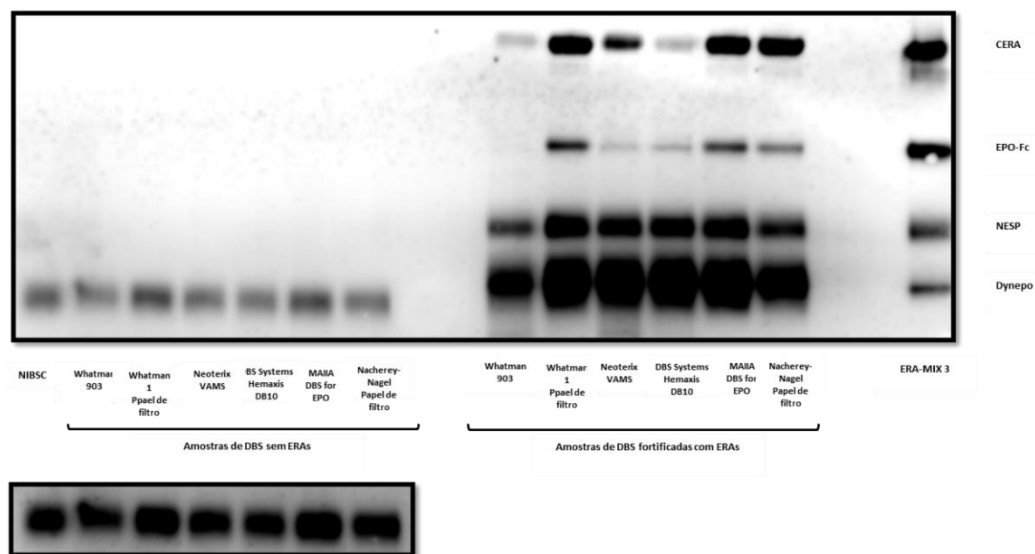
Os resultados apresentados para a banda endógena (**Figura 4.7** e **Figura 4.8**), demonstram bandas visíveis em todos os suportes e as diferenças dos volumes relativos da banda (**Apêndice 8- Tabela 8.11** e **Tabela 8.12**) são mínimos. Os que apresentam valores mais elevados, e consequentemente bandas mais visíveis, são o papel de filtro nº1 (Whatman) e o DBS *Collection Card* para EPO (MAIIA). Os restantes apresentam valores semelhantes, sendo o que apresenta valores mais baixos é o papel de filtro da Macherey-Nagel. Também na análise das amostras fortificadas com ERAs, o papel de filtro nº1 (Whatman) e o DBS *Collection Card* para EPO (MAIIA) foram os que apresentaram melhores resultados. A única exceção é na CERA, que apresenta melhores resultados nos DBS da MAIIA e no *Microsampling Hemaxis DB10 Kits*. Os que mostram volumes relativos de banda e intensidades mais baixas é o 903 *Protein Saver card* (Whatman) e o VAMS (Neoterix). No caso do Whatman 903 a banda da EPO-Fc não apresenta sinal analítico. Tal facto verificou-se para a primeira experiência realizada

(Figura 4.7) tendo por isso sido realizado um novo procedimento experimental nas mesmas condições e concentrações (Figura 4.8). Novamente não se obteve sinal para a banda correspondente à EPO-Fc. Como no estudo dos restantes parâmetros LOD e estabilidade os resultados foram satisfatórios, com a mesma concentração de EPO-Fc, estudos adicionais terão de ser realizados para esclarecimento destes resultados obtidos. No entanto poderemos afirmar que os restantes suportes apresentam melhores resultados do que o *903 Protein Saver* (Whatman).

Ao analisar a Figura 4.7 e Figura 4.8 observam-se melhores resultados especificamente nas bandas endógenas (bEPO) na Figura 4.8, o que poderá ser consequência do aumento do tempo do blot aplicado. Já nas ERAs é possível observar um aumento de intensidade da maioria das bandas, mais especificamente do *smear* bEPO/rEPO e do NESP. No entanto na EPO-Fc e na CERA também são observadas diferenças significativas.

Dos resultados apresentados é possível concluir que o papel de filtro nº1 (Whatman) e o DBS *Collection Card* para EPO (MAIIA) apresentam bandas mais intensas de ERAs comparativamente com os outros suportes fortificados com a mesma quantidade de ERAs e volume de sangue (60 µL). O papel de filtro é um material comum nos laboratórios e não apresenta spots delineados, já o suporte da MAIIA ainda não se encontra à venda, mas é o único suporte específico para a análise de EPO e ERAs. Os resultados obtidos na presente análise de comparação são os expectáveis.

Outros dispositivos, tais como TAPII (Seventh Sense Biosystems) e o Tasso-M20 (Tasso), são opções que devem ser testadas para a análise de EPO e ERAs, pois apresentam vantagens tais como a microcolheita de sangue capilar no antebraço, que demonstrou ser preferencial por parte dos praticantes desportivos e dos responsáveis pelos controlos de dopagem (41).

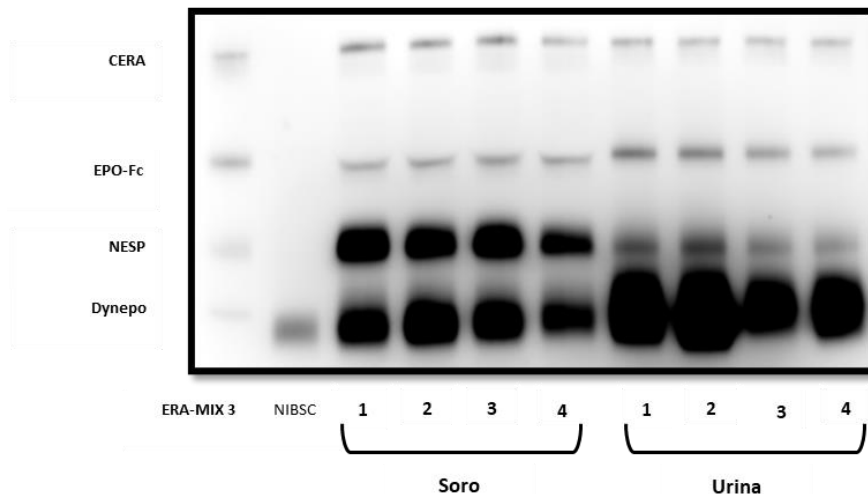


**Figura 4.8-** Resultados de SAR-PAGE para a comparação de diferentes suportes de DBS. Do lado esquerdo apresentam-se os resultados de amostras apenas com bEPO e do lado direito amostras fortificadas com 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

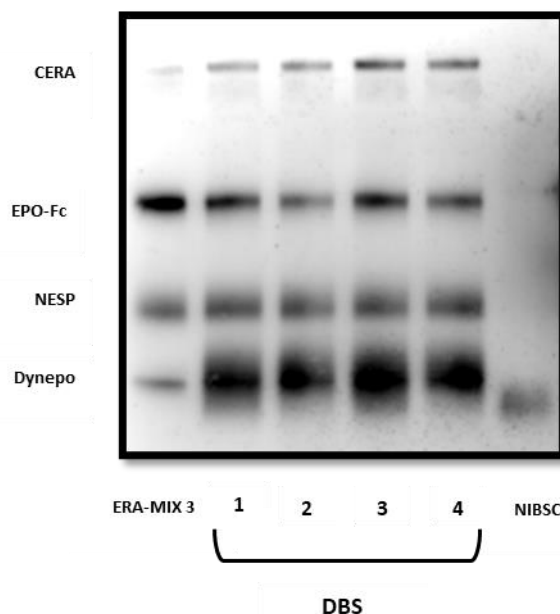
#### 4.4.4. Estudo de estabilidade e capacidade de identificação

Para testar a estabilidade das ERAs ao longo do tempo e em diferentes condições de conservação, foram colhidas amostras de urina, sangue venoso e sangue capilar a quatro voluntários, identificadas com DBS1 a DBS4, U1 a U4 e S1 a S4 respectivamente. Por ser um estudo preliminar foram apenas selecionadas quatro amostras de indivíduos de ambos os sexos. As amostras foram conservadas a diferentes temperaturas: ambiente, 4 °C e -20 °C durante um, dois e três meses. Para comparar a estabilidade, no fim destes períodos de tempo, as amostras foram analisadas imediatamente depois de terem sido colhidas e fortificadas.

As amostras de DBS foram analisadas imediatamente após a fortificação (**Figura 4.10**) e apresentam bandas intensas e detetáveis em todas as ERAs. O mesmo acontece com as amostras de urina e soro (**Figura 4.9**), tal como esperado, por já se conhecer o comportamento das ERAs nestas matrizes. A EPO endógena das amostras de urina e soro apresenta uma elevada intensidade, apesar disso todas figuram com uma intensidade que permite facilmente a leitura e conseqüentemente a sua deteção.



**Figura 4.9-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em soro e urina imediatamente após colheita e fortificação das amostras. 1-4 soro: Amostras com 500  $\mu$ L de sangue soro e fortificação de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). 1-4 urina: Amostras com 7,5 mL de urina e fortificação de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (1,5 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

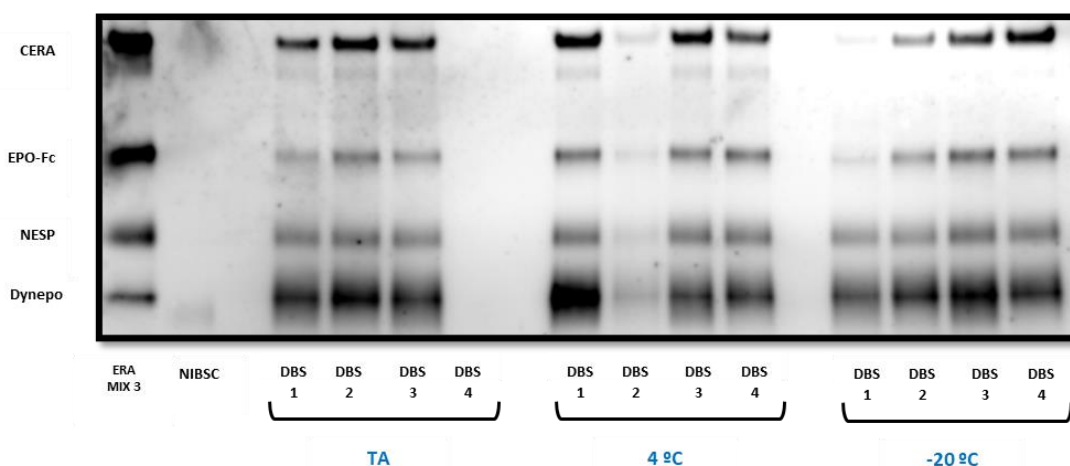


**Figura 4.10-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em DBS imediatamente após colheita e fortificação das amostras. 1-4 DBS: Amostras de DBS com 60  $\mu$ L de sangue venoso total e fortificação de 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA). NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

Ao fim de um mês todas as amostras foram analisadas nas condições referidas anteriormente. Os DBS, visualmente, não apresentaram nenhuma alteração física, demonstrando a eficácia da conservação no saco de armazenamento com um agente exsicante de sílica gel. Na generalidade, todos os DBS, independentemente da temperatura de conservação apresentam bandas intensas em todas as ERAs (**Figura 4.11**). O DBS4 armazenado à temperatura ambiente, por erro foi perdido na pipetagem

do gel da eletroforese e não se conseguiu recuperar. Desconsiderando este, e tendo em conta os restantes resultados, seria de esperar que, se tivesse sido pipetado, todas as bandas para todas as ERAs seriam visualizadas. Já o DBS2 a 4 °C e o DBS1 a -20 °C aparentam menor definição das bandas. No caso no DBS2, após a eluição a 95 °C, parte do seu volume foi perdido, por abertura da tampa espontaneamente. A CERA do DBS1 a -20 °C pode ser resultado de uma degradação ou de menor passagem das proteínas do gel para a membrana no blot, ou ainda por perda de volume durante o processo de imunopurificação. A diferença das temperaturas não reflete uma diferença significativa na conservação dos compostos analisados. Apesar das exceções descritas, os resultados, após um mês, permitem concluir que os DBS são um suporte que permitem a estabilidade das diferentes ERAs.

As amostras de urina ao final de um mês de conservação apresentam degradação das ERAs em todas as temperaturas, tornando-se mais evidente nas armazenadas à temperatura ambiente (**Figura 4.12**). A esta temperatura, apenas é possível detetar um *smear* evidente, típico do rEPO na amostra U3, as restantes ERAs degradaram-se. De referir que estas amostras após a centrifugação, apresentavam maior quantidade de sedimento, por comparação com as amostras analisadas imediatamente após a colheita.

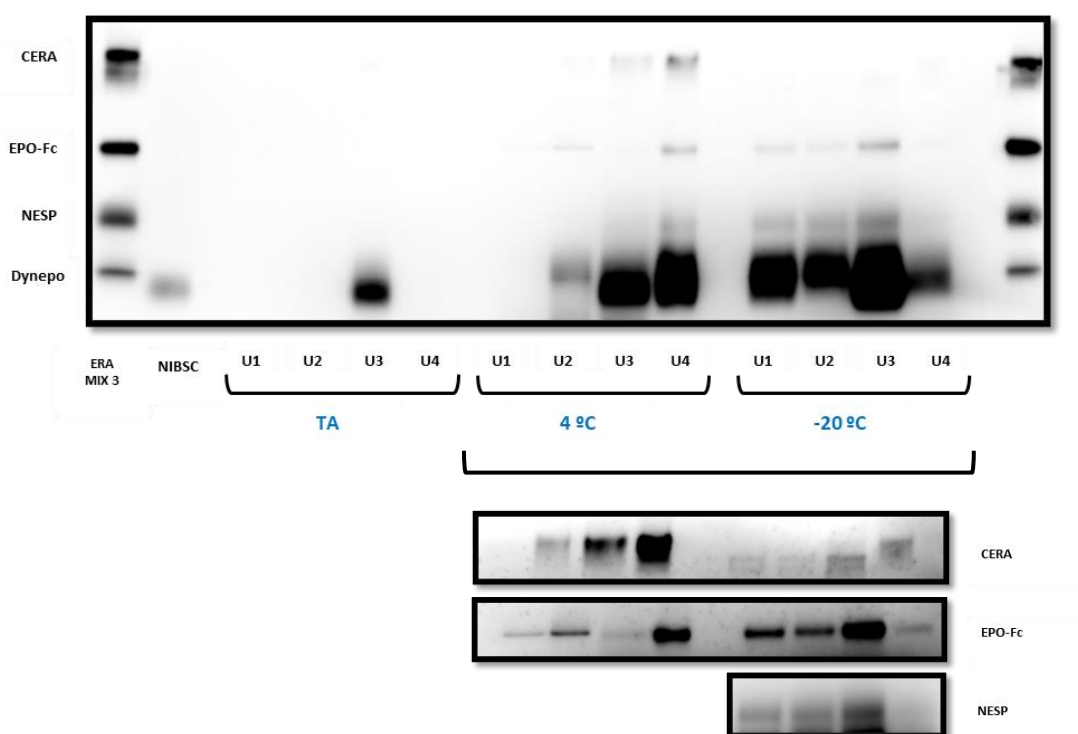


**Figura 4.11-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de sangue capilar em DBS conservadas durante 1 mês a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de sangue capilar em DBS. NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

A 4°C é possível, com contraste, observar bandas de BRP, EPO-Fc e CERA em três amostras (U2-4). A CERA apresenta melhores resultados a 4 °C comparativamente com as outras temperaturas nas quais é totalmente degradada. Apenas numa amostra (U4) é possível detetar NESP. A -20 °C já é possível identificar a banda da darbepoietina alfa

(NESP) em três amostras (U1-3). As bandas da EPO-Fc são detetadas em todas as amostras das temperaturas 4 °C e -20 °C, no entanto aparenta melhores resultados conservadas a -20 °C. Comparando estas bandas de EPO-Fc, com as das amostras analisadas imediatamente após a sua colheita e fortificação, é possível visualizar um decréscimo da intensidade das bandas. Passado um mês, a degradação é evidente, ao apresentar uma banda delgada. Em todas as amostras, armazenadas a 4 °C e -20 °C, é possível detetar o BRP, a exceção ocorre na U1 a 4°C.

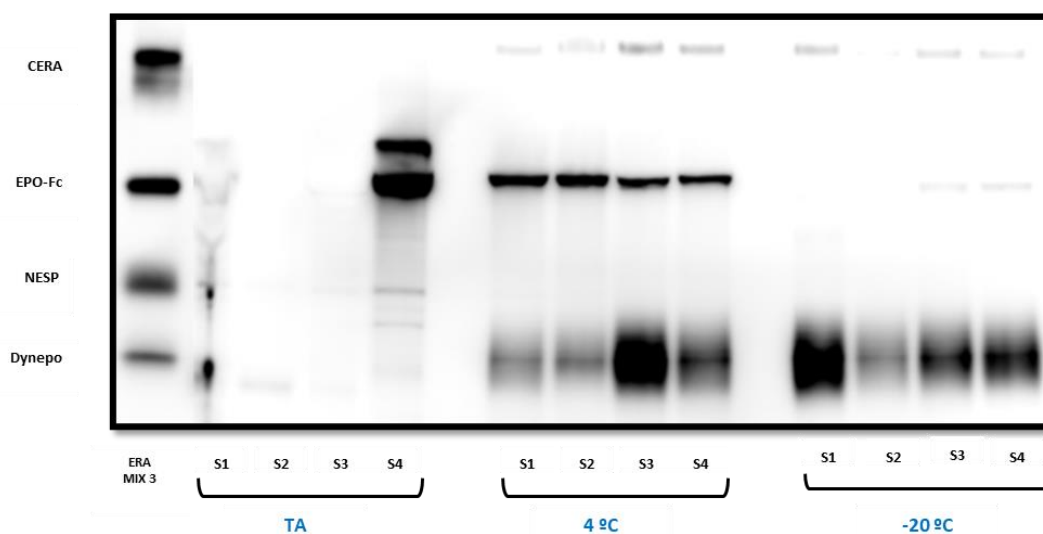
Esta avaliação dá suporte à conservação das amostras para análise de EPO e ERAs em amostras de urina e sangue descritas no TD2022EPO, em que no caso de não serem analisadas em 24 horas, devem ser armazenadas a -20 °C até à sua análise.



**Figura 4.12-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de urina conservadas durante 1 mês a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de urina. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste para as bandas de CERA, EPO-Fc da temperatura 4 °C e -20 °C e para as bandas de NESP da temperatura -20 °C. NIBSC (1,5 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

As amostras de soro à temperatura ambiente, apesar de apresentarem sinais de degradação foram utilizadas. Na imunopurificação, para estas amostras, a passagem na coluna anti-EPO do Kit MAIIA demorou cerca de 5 vezes mais tempo do que as amostras a 4 °C e -20 °C. Desta forma diversas bandas inespecíficas aparecem nos resultados das amostras armazenadas à temperatura ambiente, no entanto nenhuma

apresenta o mesmo peso molecular e forma das apresentadas no ERA-MIX3 (**Figura 4.13**). As amostras que foram refrigeradas apresentam, no geral, menor intensidade das bandas, mas é possível detetar as bandas do BRP, EPO-Fc e CERA. Já a darbepoietina alfa foi degradada a qualquer temperatura de conservação. As amostras congeladas apresentam todas as bandas de CERA e BRP. A EPO-Fc foi detetada em duas amostras (S3-4), demonstrando melhor conservação a 4 °C. Tal como detetado em diversas avaliações (17,62), também aqui é demonstrado que a estabilidade da CERA e da EPO-Fc é superior nas amostras de sangue comparativamente com as amostras da urina.

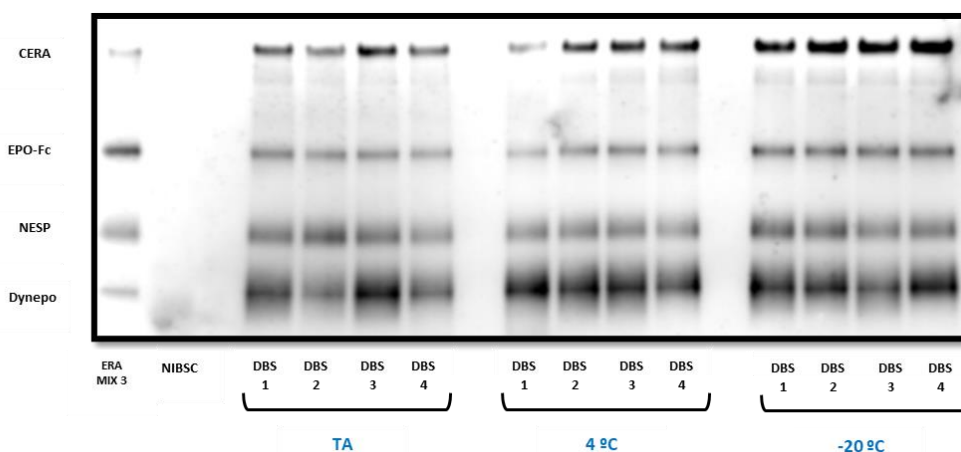


**Figura 4.13-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de soro conservadas durante 1 mês a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. S1-S4: Amostras de soro. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

Ao fim de dois meses, todas as amostras voltaram a ser analisadas. As amostras de DBS apresentaram bandas em todas as ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA) (**Figura 4.14**). As amostras (DBS2- 4°C e DBS1 a -20 °C) analisadas ao fim de um mês apresentaram pouca intensidade das bandas, no entanto no resultado a dois meses é possível observar todas as bandas com a mesma intensidade que as restantes, excluindo assim a possibilidade de degradação. A amostra DBS4 à temperatura ambiente, que não foi pipetada no 1º mês, por perda de volume da amostra, apresenta bons resultados, sendo o resultado esperado tal como mencionado anteriormente. A única diferença possível de avaliar entre temperaturas de armazenamento, ocorre com a CERA que a -20 °C apresenta bandas mais intensas comparativamente com as respetivas bandas à temperatura ambiente e 4 °C.

É então demonstrado que todas as ERAs são estáveis em DBS quando armazenadas à temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C durante, pelo menos, dois meses, não existindo degradação dos compostos.

Os resultados das amostras de urina ao fim de dois meses (**Figura 4.15**), são idênticos aos apresentados ao fim de um mês (**Figura 4.12**), no entanto algumas bandas visualizadas ao fim de 1 mês apresentam agora degradação. O aspecto físico das amostras é semelhante ao descrito para o 1º mês, havendo um aumento da quantidade de sedimento após a centrifugação da preparação das amostras.



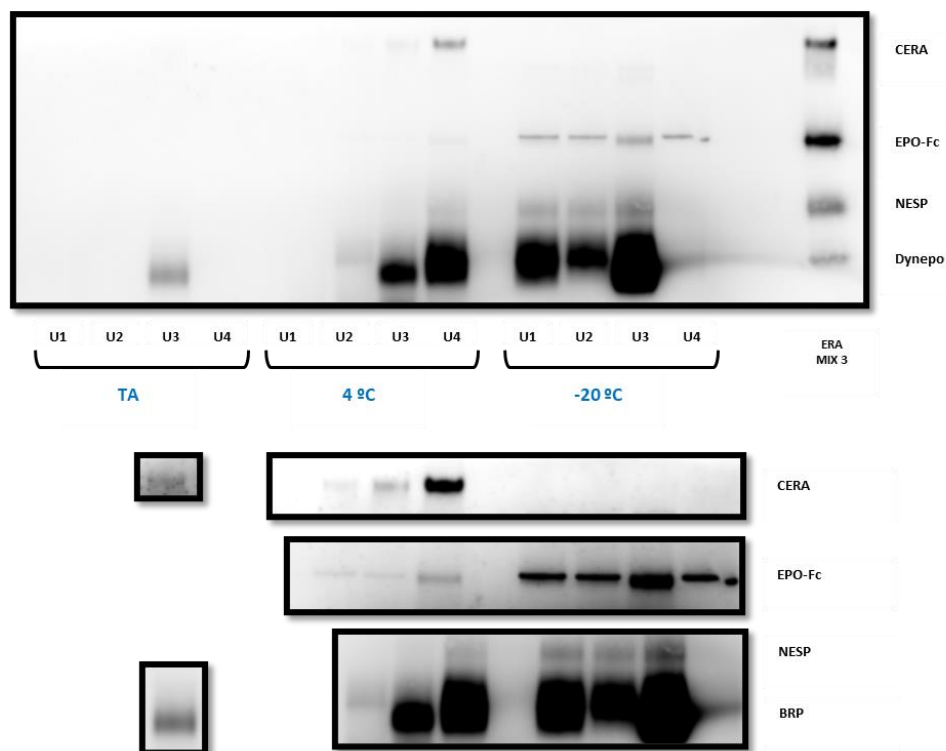
**Figura 4.14-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de sangue capilar em DBS conservadas durante 2 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de sangue capilar em DBS. NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

Avaliando os resultados, a única amostra visível à temperatura ambiente, U3, apresenta uma diminuição da intensidade do *smear* do rEPO e da CERA. As amostras refrigeradas apresentam também degradação na sua generalidade não sendo praticamente possível observar as bandas da EPO-Fc. A -20 °C a U4 apenas apresenta banda de EPO-Fc, pois o BRP e o NESP foram totalmente degradados.

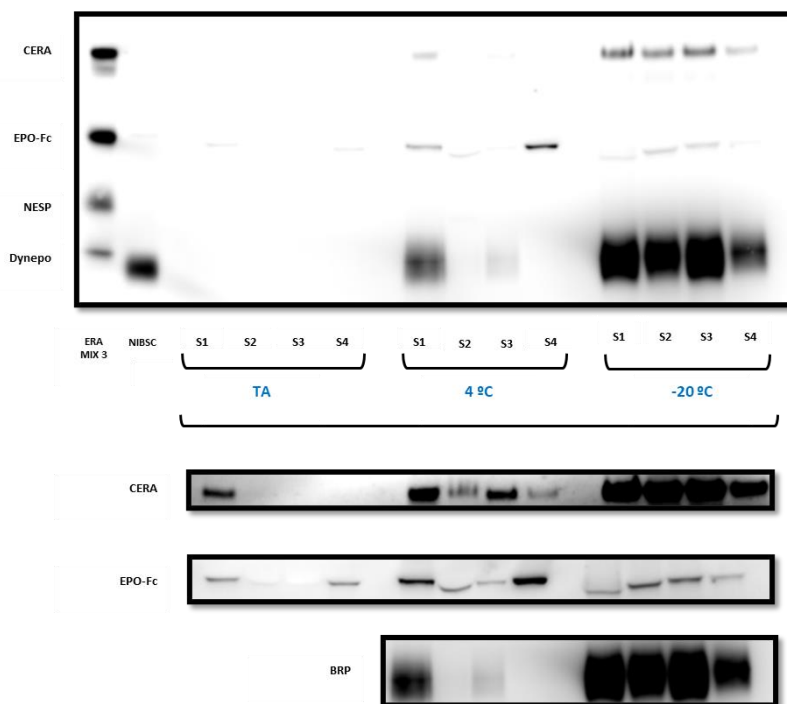
Continua a ser possível concluir que as amostras de urina são mais estáveis a -20 °C do que quando armazenadas à temperatura ambiente e a 4 °C.

As amostras de soro também foram analisadas ao fim de dois meses (**Figura 4.16**) e diferenças significativas são visualizadas para as diferentes ERAs. Todas as amostras, contrariamente às analisadas a um mês, foram centrifugadas e foi rejeitado o sedimento existente, principalmente nas conservadas à temperatura ambiente. Este passo permitiu que todas demorassem o mesmo tempo na passagem da coluna anti-EPO da MAIIA. É possível observar bandas na zona da EPO-Fc e a amostra S1 também apresenta uma banda de CERA. As amostras refrigeradas sofreram notoriamente degradação nas

bandas de bEPO/rEPO, que já não é possível observar na S1 e S4, assim como as bandas de EPO-Fc e CERA que perderam intensidade na sua generalidade. As amostras congeladas apresentam os melhores resultados, sendo possível observar, em todas as amostras as bandas de bEPO/rEPO, CERA e EPO-Fc. Esta última, no entanto, apresenta diminuição do peso molecular na amostra S1 e S2.



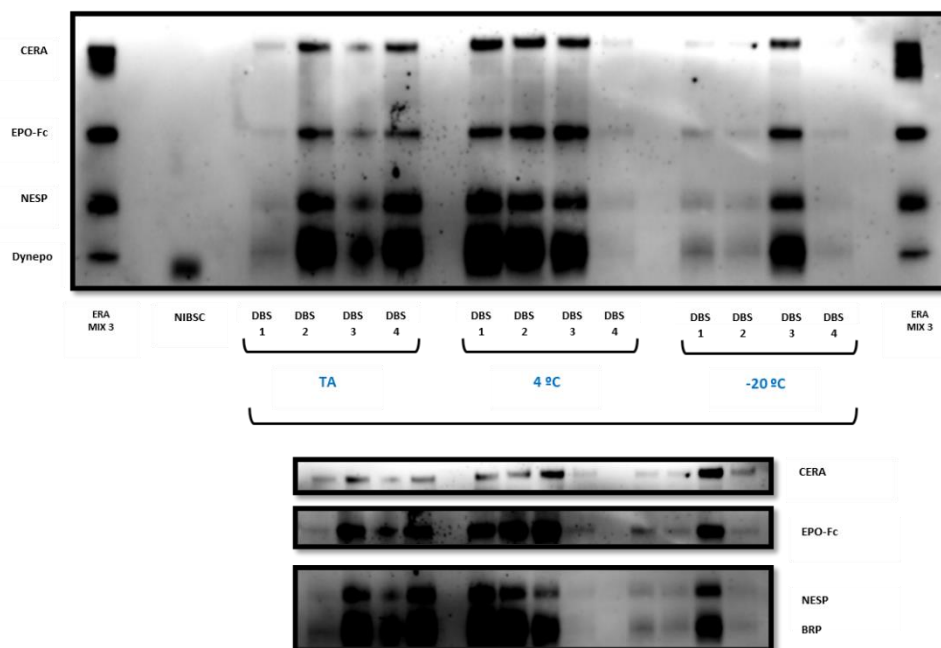
**Figura 4.15-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de urina conservadas durante 2 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de urina. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste para as bandas de CERA e BRP da temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C, para as bandas de NESP e EPO-Fc da temperatura 4°C e -20 °C. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA



**Figura 4.16-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de soro conservadas durante 2 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. S1-S4: Amostras de soro. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste para as bandas de CERA e EPO-Fc da temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C, para as bandas de BRP da temperatura 4°C e -20 °C. NIBSC (1,5 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

Ao fim de três meses, período de tempo obrigatório para armazenamento das amostras por parte dos laboratórios de antidopagem, analisaram-se as amostras: DBS, soro e urina.

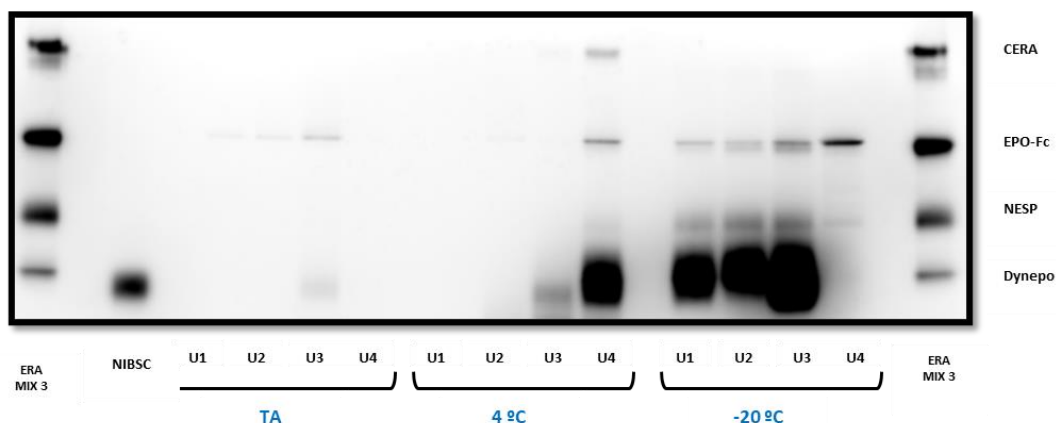
No processo de imunopurificação dos DBS (**Figura 4.17**) observou-se que os spots se desfaziam com maior frequência após a agitação *end-over-end*, tal facto influenciou a velocidade da passagem pela coluna anti-EPO por vácuo, sendo esta mais lenta. Em todas as amostras é possível observar todas as ERAs, no entanto algumas necessitam de maior contraste para a sua deteção, encontrando-se maior incidência nas amostras armazenadas a -20 °C (DBS 1,2 e 4). Comparativamente com os períodos anteriormente estudados, as amostras DBS3 a -20 °C, DBS 1 à temperatura ambiente e DBS 4 a 4°C apresentam bandas menos intensas. Tal facto poderá ser justificado pela degradação das amostras ou pela ineficiência da imunopurificação pelo acumular do DBS junto à coluna anti-EPO. As amostras armazenadas à temperatura ambiente (DBS 2-4) e refrigeradas a 4 °C (DBS 1-3) apresentam bandas muito intensas de todas as ERAs, complementando os resultados observados ao fim de um e dois meses.



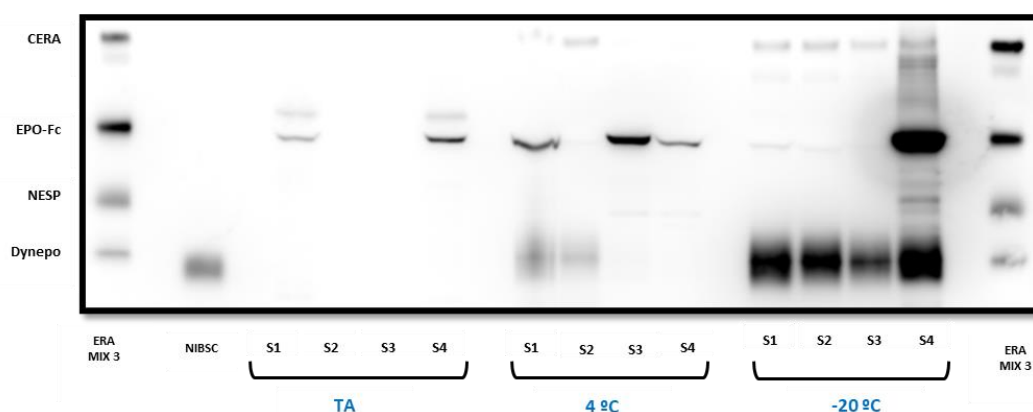
**Figura 4.17-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de sangue capilar em DBS conservadas durante 3 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de sangue capilar em DBS. NIBSC (0,2 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

Ao fim de três meses foi novamente medido o pH às amostras de urina, observando-se valores concordantes com um processo de degradação diretamente proporcional com o aumento da temperatura (**Apêndice 9 - Tabela 8.13**). As amostras de urina (**Figura 4.18**) congeladas apresentam valores de pH idênticos às analisadas imediatamente (**Apêndice 5 - Tabela 8.5**), enquanto que as amostras que foram conservadas à temperatura ambiente e a 4°C apresentam valores superiores, indiciando atividade microbiana, o que afeta a estabilidade dos compostos na amostra.

Após análise da imagem no GASepo, as bandas na zona da EPO-Fc nas amostras DBS1-3 à temperatura ambiente apresentam um peso molecular ligeiramente superior, indicando a presença de bandas inespecíficas, resultado da degradação das amostras. As amostras de soro, após centrifugação, apresentavam uma elevada quantidade de sedimento, sendo este maior nas amostras armazenadas à temperatura ambiente. Estas amostras apresentam bandas inespecíficas resultado da degradação da amostra. A esta temperatura a presença de bandas inespecíficas demonstram a degradação das amostras. Este mesmo processo ocorre também nas amostras a 4 °C que, ao fim de um mês de armazenamento, aparentava ser a temperatura ideal para BRP, EPO-Fc e CERA (**Figura 4.19**). A -20 °C é possível observar 100% das bandas de BRP e CERA.



**Figura 4.18-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de urina conservadas durante 3 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. U1-U4: Amostras de urina. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste para as bandas de CERA e BRP da temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C, para as bandas de NESP e EPO-Fc da temperatura 4°C e -20 °C. ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA



**Figura 4.19-** Resultados de SAR-PAGE para o estudo de estabilidade em amostras de soro conservadas durante 3 meses a 3 temperaturas distintas: temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C. S1-S4: Amostras de soro. Abaixo encontra-se aplicado maior contraste para as bandas de CERA e EPO-Fc da temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C, para as bandas de BRP da temperatura 4°C e -20 °C. NIBSC (1,5 mUI). ERA-MIX 3: Mistura de materiais de referência Dynepo, NESP, EPO-Fc e CERA

Na amostra S4 é possível visualizar uma banda intensa na zona EPO-Fc provavelmente por ter apresentado uma elevada resistência na passagem pelo filtro devido ao elevado nível de degradação.

Os resultados das amostras de urina demonstram, tal como descrito no TD2022EPO, melhores resultados quando congeladas a -20 °C. A única exceção ocorreu com a CERA que apresenta melhores resultados quando refrigerada, apesar disso a sua deteção não é possível ao fim de três meses. A casa comercial aconselha à refrigeração na

conservação deste material de referência, no entanto já é conhecido a sua instabilidade na urina, apresentando maior sensibilidade no soro/plasma (17,62).

As amostras de soro apresentam degradação evidente ao fim de um, dois e três meses, apresentando, tal como as amostras de urina melhores resultados quando congeladas a -20 °C. A EPO-Fc e CERA, na maioria dos resultados, comparando com as amostras de urina, são mais estáveis no soro, no entanto o NESP ao fim do 1º mês já não foi observado. O rEPO, que representa a maior percentagem de AAFs das ERAs, é mais estável nas amostras de sangue, visto ser detetável em 100% das amostras, enquanto na urina é detetado em apenas 75%, ao fim de dois meses de conservação.

No caso dos DBS não foram observadas diferenças significativas nas temperaturas de conservação, contrariamente ao detetado por Reverter-Branchat *et al.* que observaram uma diminuição de 59% de rEPO e 9% de NESP em amostras conservadas a temperatura ambiente comparativamente com as refrigeradas a 4 °C. Apesar de ao fim de três meses, três amostras conservadas a -20 °C apresentam menor intensidade das bandas de ERAs, que poderá ser resultado da ineficiência da imunopurificação ou degradação, foi possível a deteção de todas as ERAs em todas as amostras analisadas a diferentes temperaturas. Atendendo aos resultados obtidos, é possível transportar e conservar amostras para análise de EPO e ERAs à temperatura ambiente. Uma vez que o transporte de amostras pode ocorrer com temperaturas extremas, superiores a 37 °C, seria interessante no futuro analisar o impacto de temperaturas nesta gama de estabilidade dos compostos em causa.

Os DBS demonstraram ser um suporte que permite a conservação (40,42,44,69,72,73) das diferentes ERAs ao longo de, pelo menos, três meses, sendo o único a apresentar bandas em todas as ERAs no período de estudo. Com isto demonstrou-se serem uma possível alternativa para a análise de EPO e ERAs comparativamente com as amostras convencionais de urina e sangue venoso (soro).

Através do presente estudo de estabilidade dos compostos/capacidade de identificação é possível concluir que através da análise das imagens representadas nas **Figura 4.10** e **Figura 4.9**, que o método utilizado é *fit-for-purpose* na deteção das ERAs: BRP, NESP, EPO-Fc e CERA, em amostras de sangue capilar (DBS).



## 5. Conclusão

Uma elevada percentagem dos orçamentos anuais das autoridades de antidopagem está diretamente relacionado com a colheita, transporte e armazenamento das amostras. As condições necessárias são rigorosas e obrigam a diversos gastos para cumprir as normas exigidas no ISL pela WADA. Uma alternativa viável é a colheita de sangue capilar conservada em DBS, que permite reduzir os custos pelas condições logísticas serem menos exigentes. Para além disso é uma colheita menos invasiva, consistindo numa punção, na ponta do dedo, com a obtenção de 60  $\mu\text{L}$  por *spot*, acabando por ser uma alternativa preferencial, pelos praticantes desportivos face à sua avaliação de dor.

O presente estudo que teve como objetivo compreender se o sangue capilar em DBS era um complemento viável para a deteção de EPO e ERAs, aplicando a metodologia já reconhecida pela WADA e implementada pelos diversos laboratórios antidopagem, obteve resultados promissores. Dos trinta voluntários selecionados, obteve-se uma sensibilidade de 100% ao detetar as bandas de bEPO em todos os indivíduos. Os limites de deteção (LOD) foram definidos em sangue capilar (DBS) para as quatro principais ERAs: BRP, NESP, EPO-Fc e CERA sendo respetivamente 3.15 mUI/mL, 3.15 pg/mL, 31 pg/mL e 31,3 pg/mL. Seguindo os valores definidos no TD2022EPO, conclui-se que é necessário adaptar os valores do MRPL para as ERAs CERA e EPO-Fc, tendo em conta que o valor mínimo obrigatório é 50% do MRPL definido. Através da colheita e fortificação de amostras de soro, urina e sangue capilar, a quatro voluntários, obteve-se uma especificidade de 100% ao identificar em todas as amostras as 4 ERAs analisadas de acordo com o descrito no TD2022EPO. Da análise das três matrizes armazenadas a diferentes temperaturas (ambiente, 4 °C e -20 °C) durante três meses pode-se concluir que os DBS, armazenados a qualquer temperatura dentro de um saco de conservação juntamente com um agente exsicante de sílica gel e protegidos de luz, permitem a conservação de todas as ERAs, contrariamente às amostras de soro e urina. No entanto a toma de micro-doses é uma realidade e os valores de LOD obtidos para sangue capilar em DBS são mais elevados do que os definidos para o soro e urina. Juntando a este facto é importante referir que a análise dos DBS permite apenas a deteção de poucas substâncias devido ao reduzido volume obtido. Estes resultados permitem concluir que a colheita de sangue capilar e posterior conservação em DBS são um complemento viável às matrizes urina e soro/plasma na deteção de EPO e ERAs por métodos eletroforéticos.



## 6. Referências bibliográficas

1. Yesalis C, Bahrke M. History of doping in sport. *Int Sport Stud.* 2002;24(1):42–76.
2. Anti-doping W. World Anti-Doping Code 2021. World Anti-Doping agency (WADA) [Internet]. 2021; Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021\\_wada\\_code.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf)
3. World Anti-Doping Agency (WADA). Prohibited List. World Anti-Doping agency [Internet]. 2022; Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents>
4. World Anti-Doping Agency (WADA). International Standard Laboratories 2021 [Internet]. 2021. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl\\_2021.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf)
5. Lasne F, Martin L, Crepin N, & de Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem.* 2002;311(2):119–26.
6. Kwon SU, Kim JS, Adamson J. Research That Revolutionized Patient Care - 50th years in hematology. In: American Society of Hematology. 2008. p. 6–7.
7. Wide L, Bengtsson C, Berglund B O, & Ekblom B. Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. *Med Sci Sport Exerc.* 1995;27(11):1569–76.
8. Lasne F, De Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature.* 2000;405(6787):635.
9. Agency WA-D. WADA Technical Document –TD2004EPO- Harmonization of the method for the identification of epoietin alfa and beta (EPO) and darbepoietin alfa (NESP) by IEF-double blotting and chemiluminescent detection [Internet]. World Anti-Doping agency. 2004. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA\\_TD2004EPO\\_Harmonization\\_Method\\_Identification\\_Recombinant\\_Erythropoietins\\_Analogues\\_EN.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_TD2004EPO_Harmonization_Method_Identification_Recombinant_Erythropoietins_Analogues_EN.pdf)
10. Suresh S, Rajvanshi PK, Noguchi CT. The Many Facets of Erythropoietin Physiologic and Metabolic Response. *Front Physiol.* 2020;10(January):1–20.
11. Recny MA, Scoble HA, Kim Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem.* 1987;262(35):17156–63.
12. Hodges VM, Rainey S, Lappin TR, Maxwell AP. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;64(2):139–58.
13. He R, Oliveira JL, Hoyer JD, Viswanatha DS. Hematopathology 3rd Edition. In 2018. p. 712–60.
14. Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J. Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *Int J Biol Macromol.* 2007;41(3):354–7.

15. Reichel C, Gmeiner G. Erythropoietin and Analogs. In: Handbook of Experimental Pharmacology. 2010. p. 251–86.
16. Elliott S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *Br J Pharmacol*. 2008;154(3):529–41.
17. 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;1(11–12):494–504.
18. World Anti-Doping Agency. Testing Figures Report (2020) [Internet]. 2021. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf)
19. World Anti-Doping Agency. Testing Figures Report (2013) [Internet]. 2014. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada\\_2013\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_report\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2013_anti-doping_testing_figures_report_en.pdf)
20. World Anti-Doping Agency. Testing Figures Report (2014) [Internet]. 2015. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada\\_2014\\_anti-doping-testing-figures\\_full-report\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2014_anti-doping-testing-figures_full-report_en.pdf)
21. World Anti-Doping Agency. Testing Figures Report (2015) [Internet]. 2016. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2015\\_wada\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_report\\_0.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2015_wada_anti-doping_testing_figures_report_0.pdf)
22. World Anti-Doping Agency. Testing Figures Report (2016 ) [Internet]. 2017. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2016\\_anti-doping\\_testing\\_figures.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2016_anti-doping_testing_figures.pdf)
23. World Anti-Doping Agency. Testing Figures Report (2017) [Internet]. 2018. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2017\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_en\\_0.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2017_anti-doping_testing_figures_en_0.pdf)
24. World Anti-Doping Agency. Testing Figures Report (2018) [Internet]. 2018. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018\\_testing\\_figures\\_report.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018_testing_figures_report.pdf)
25. Agency WA-D. Testing Figures Report (2019) [Internet]. 2020. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019_anti-doping_testing_figures_en.pdf)
26. WADA. WADA Technical Document for Sport Specific Analysis – TD2021SSA. 2021.
27. World Anti-Doping Agency (WADA). 2021 Code Implementation Support Program Guidelines for Sample Collection. 2021;1–57.
28. WADA. TD2021DBS: Dried Blood Spots (DBS) for doping control - Requirements and procedures for collection, transport, analytical testing and storage [Internet]. WADA. 2021. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2021dbb\\_final\\_eng.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2021dbb_final_eng.pdf)
29. Reichel C, Kulovics R, Jordan V, Watzinger M, Geisendorfer T. SDS-PAGE of recombinant and endogenous erythropoietins: Benefits and limitations of the method for application in doping control. *Drug Test Anal*. 2009;1(1):43–50.

30. Guthrie R, Susi A. A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics*. 1963;32(September):338–43.
31. Luginbühl M, Stöth F, Schröck A, Gaugler S, Weinmann W. Quantitative determination of phosphatidylethanol in dried blood spots for monitoring alcohol abstinence. *Nat Protoc* [Internet]. 2021;16(1):283–308. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-020-00416-x>
32. Dillenburg Weiss TL, Gössling G, Venzon Antunes M, Schwartzmann G, Linden R, Gasparin Verza S. Evaluation of dried blood spots as an alternative matrix for therapeutic drug monitoring of abiraterone and delta(4)-abiraterone in prostate cancer patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;195.
33. Karp DG, Danh K, Espinoza NF, Seftel D, Robinson P V., Tsai C ting. A serological assay to detect SARS-CoV-2 antibodies in at-home collected finger-prick dried blood spots. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76913-6>
34. Liu L, Jin X, Wu Y, Yang M, Xu T, Li X, et al. A Novel Dried Blood Spot Detection Strategy for Characterizing Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7(October):1–10.
35. Heider K, Wan JCM, Hall J, Belic J, Boyle S, Hudecova I, et al. Detection of ctDNA from Dried Blood Spots after DNA Size Selection. *Clin Chem*. 2020;66(5):697–705.
36. Wenkui Li MSL. Dried Blood Spots Applications and Techniques. 2014. 21–31 p.
37. WADA. World Anti-Doping Code International Standard: Testing and Investigations (ISTI). World Anti-Doping. 2019.
38. McDade TW. Development and validation of assay protocols for use with dried blood spot samples. *Am J Hum Biol*. 2014;26(1):1–9.
39. Berlinger. Berlinger [Internet]. Available from: <https://www.berlinger.com/doping-control/product-overview>
40. McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*. 2007;44(4):899–925.
41. Solheim SA, Ringsted TK, Nordsborg NB, Dehnes Y, Levernæs MCS, Mørkeberg J. No pain, just gain: Painless, easy, and fast dried blood spot collection from fingertip and upper arm in doping control. *Drug Test Anal*. 2021;13(10):1783–90.
42. Solheim SA, Jessen S, Mørkeberg J, Thevis M, Dehnes Y, Eibye K, et al. Single-dose administration of clenbuterol is detectable in dried blood spots. *Drug Test Anal*. 2020;12(9):1366–72.
43. Protti M, Rudge J, Sberna AE, Gerra G, Mercolini L. Dried haematic microsamples and LC–MS/MS for the analysis of natural and synthetic cannabinoids. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2017;1044–1045:77–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.038>
44. Reverter-Branchat G, Ventura R, Ezzel Din M, Mateus J, Pedro C, Segura J. Detection of erythropoiesis-stimulating agents in a single dried blood spot. *Drug Test Anal*. 2018;10(10):1496–507.

45. Reichel C, Erceg D, Lorenc B, Scheiblhofer V, Farmer L, Zanitzer K, et al. Data from a microdosed recombinant human erythropoietin administration study applying the new biotinylated clone AE7A5 antibody and a further optimized sarcosyl polyacrylamide gel electrophoresis protocol. *Drug Test Anal.* 2021;(July 2020):1–10.
46. Marchand A, Martin JA, Collot D, Hoang O, Roulland I, Semence F, et al. Combined administration of microdoses of growth hormone and erythropoietin: Effects on performance and evaluation of GH detection capability using anti-doping methods. *Drug Test Anal.* 2019;11(11–12):1698–713.
47. World Anti-Doping Agency (WADA). WADA Technical Document – TD2022MRPL Minimum Required Performance Levels and applicable Minimum Reporting Levels for non-threshold substances analyzed by Chromatographic - Mass Spectrometric analytical methods. 1.0. 2022.
48. WADA. WADA Technical Document – TD2022EPO Harmonization of analysis and reporting of erythropoietin (EPO) and other epo-receptor agonists (ERAs) by polyacrylamide gel electrophoretic (PAGE) analytical methods [Internet]. 2022. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/td2022epo\\_v1.0\\_final\\_eng\\_0.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/td2022epo_v1.0_final_eng_0.pdf)
49. Ambach L, Menzies E, Parkin MC, Kicman A, Archer JRH, Wood DM, et al. Quantification of cocaine and cocaine metabolites in dried blood spots from a controlled administration study using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2019;11(5):709–20.
50. Spooner N, Denniff P, Michielsen L, De Vries R, Ji QC, Arnold ME, et al. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: Overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis.* 2015;7(6):653–9.
51. Fedoruk MN. Virtual drug testing: Redefining sample collection in a global pandemic. *Bioanalysis.* 2020;12(11):715–8.
52. Rottinghaus E, Bile E, Modukanele M, Maruping M, Mine M, Nkengasong J, et al. Comparison of ahlstrom grade 226, Munktell TFN, and Whatman 903 filter papers for dried blood spot specimen collection and subsequent HIV-1 load and drug resistance genotyping analysis. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):55–60.
53. Rottinghaus EK, Beard RS, Bile E, Modukanele M, Maruping M, Mine M, et al. Evaluation of dried blood spots collected on filter papers from three manufacturers stored at ambient temperature for application in HIV-1 drug resistance monitoring. *PLoS One.* 2014;9(10):1–5.
54. Marchand A, Roulland I, Semence F, Audran M. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) technology for IGF-1 quantification by automated chemiluminescent immunoassay in dried blood. *Growth Horm IGF Res.* 2020;50(December 2019):27–34.
55. Neoteryx. VAMS [Internet]. Available from: <https://www.neoteryx.com/mitra-clamshell-blood-collection-device?hsLang=en>
56. Biosystems SS. TAP® [Internet]. Available from: <https://company.yourbiohealth.com/products/tap/>
57. Biosystems SS. TAP II. Available from: <https://company.yourbiohealth.com/products/tap-ii/>

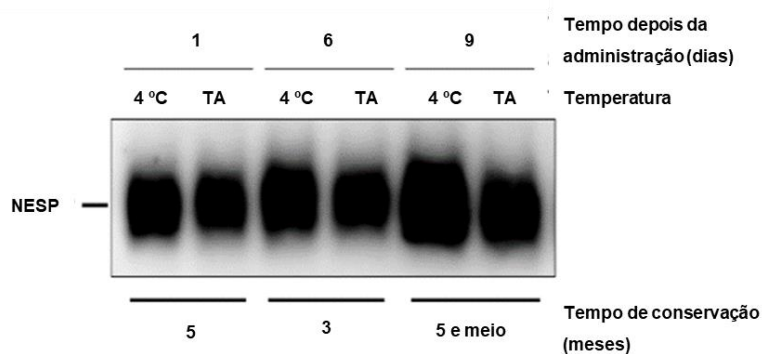
58. Tasso. TASSO M-20. Available from: <https://www.tassoinc.com/tasso-m20>
59. World Anti-Doping Agency (WADA). WADA Technical Document –TD2009EPO-Harmonization of the method for the identification of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (e.g. darbepoetin and methoxypolyethylene glycol-epoetin beta. 2009.
60. World Anti-Doping Agency (WADA). WADA Technical Document – TD2013EPO Harmonization of analysis and reporting of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (e.g. darbepoetin, pegserpoetin, peginesatide, EPO-Fc) by electrophoretic techniques. 2013.
61. Reihlen P, Blobel M, Kempkes R, Reichel C, Völker Schänzer E, Majer B, et al. Optimizing SAR-PAGE. *Drug Test Anal.* 2015;7(11–12):1014–6.
62. Zhou X, Zhang L, He S, Shen L, He C. Comparison and optimization of SAR-PAGE tests for erythropoietins in doping analysis. *Drug Test Anal.* 2020;12(1):109–18.
63. Diário da República 1.<sup>a</sup> série. Lei n.º 111/2019 de 10 de setembro [Internet]. 2019 p. 5688–724. Available from: <https://files.dre.pt/1s/2019/09/17300/0000300057.pdf>
64. MAIIA. EPO Purification Kit 1390. 2021 p. 1–2.
65. MAIIA. EPO Purification Gel Kit – For Blood 1430. 2019 p. 1–2.
66. Bajla I, Holländer I, Minichmayr M, Gmeiner G, Reichel C. GASepo - A software solution for quantitative analysis of digital images in Epo doping control. *Comput Methods Programs Biomed.* 2005;80(3):246–70.
67. Heiland CE, Ericsson M, Pohanka A, Ekström L, Marchand A. Optimizing detection of erythropoietin receptor agonists from dried blood spots for anti-doping application. *Drug Test Anal.* 2022;(March):1–10.
68. Marchand A, Roulland I, Semence F, Ericsson M. EPO transgene detection in dried blood spots for antidoping application. *Drug Test Anal.* 2021;13(11–12):1888–96.
69. Moeller BC, Yang Z. Evaluation of dried blood spots as an alternative sample matrix for equine antidoping analysis. *Drug Test Anal.* 2021;13(2):386–96.
70. Salamin O, Gottardo E, Schobinger C, Reverter-Branchat G, Segura J, Saugy M, et al. Detection of stimulated erythropoiesis by the RNA-based 5'-aminolevulinate synthase 2 biomarker in dried blood spot samples. *Clin Chem.* 2019;65(12):1563–71.
71. Salamin O, Garcia A, González-Ruiz V, Rossi F, Bigard X, Déglon J, et al. Is pain temporary and glory forever? Detection of tramadol using dried blood spot in cycling competitions. *Drug Test Anal.* 2020;12(11–12):1649–57.
72. Tretzel L, Thomas A, Geyer H, Delahaut P, Schänzer W, Thevis M. Determination of Synacthen® in dried blood spots for doping control analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(16):4709–20.
73. Verplaetse R, Henion J. Quantitative determination of opioids in whole blood using fully automated dried blood spot desorption coupled to on-line SPE-LC-MS/MS.

- Drug Test Anal. 2016;8(1):30–8.
74. Peng SH, Segura J, Farré M, De La Torre X. Oral testosterone administration detected by testosterone glucuronidation measured in blood spots dried on filter paper. *Clin Chem.* 2000;46(4):515–22.
  75. Thomas A, Geyer H, Guddat S, Schänzer W, Thevis M. Dried blood spots (DBS) for doping control analysis. *Drug Test Anal.* 2011;3(11–12):806–13.
  76. Möller I, Thomas A, Geyer H, Schänzer W, Thevis M. Development and validation of a mass spectrometric detection method of peginesatide in dried blood spots for sports drug testing. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(9):2715–24.
  77. Thomas A, Geyer H, Schänzer W, Crone C, Kellmann M, Moehring T, et al. Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(5):1279–89.
  78. Cox HD, Rampton J, Eichner D. Quantification of insulin-like growth factor-1 in dried blood spots for detection of growth hormone abuse in sport. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(6):1949–58.
  79. Tretzel L, Thomas A, Geyer H, Gmeiner G, Forsdahl G, Pop V, et al. Use of dried blood spots in doping control analysis of anabolic steroid esters. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2014;96:21–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.03.013>
  80. Cox HD, Hughes CM, Eichner D. Sensitive quantification of IGF-1 and its synthetic analogs in dried blood spots. *Bioanalysis.* 2014;6(19):2651–62.
  81. Kojima A, Nishitani Y, Sato M, Kageyama S, Dohi M, Okano M. Comparison of urine analysis and dried blood spot analysis for the detection of ephedrine and methylephedrine in doping control. *Drug Test Anal.* 2016;8(2):189–98.
  82. Tretzel L, Thomas A, Geyer H, Pop V, Schänzer W, Thevis M. Dried blood spots (DBS) in doping controls: a complementary matrix for improved in- and out-of-competition sports drug testing strategies. *Anal Methods.* 2015;7(18):7596–605.
  83. Tretzel L, Görgens C, Geyer H, Thomas A, Dib J, Guddat S, et al. Analyses of Meldonium (Mildronate) from Blood, Dried Blood Spots (DBS), and Urine Suggest Drug Incorporation into Erythrocytes. *Int J Sports Med.* 2016;37(6):500–2.
  84. Ferro P, Ventura R, Pérez-Mañá C, Farré M, Segura J. Evaluation of fibronectin 1 in one dried blood spot and in urine after rhGH treatment. *Drug Test Anal.* 2017;9(7):1011–6.
  85. Reverter-Branchat G, Bosch J, Vall J, Farré M, Papaseit E, Pichini S, et al. Determination of recent growth hormone abuse using a single dried blood spot. *Clin Chem.* 2016;62(10):1353–60.
  86. Cox HD, Miller GD, Lai A, Cushman D, Eichner D. Detection of autologous blood transfusions using a novel dried blood spot method. *Drug Test Anal.* 2017;9(11–12):1713–20.
  87. Cox HD, Eichner D. Mass Spectrometry Method to Measure Membrane Proteins in Dried Blood Spots for the Detection of Blood Doping Practices in Sport. *Anal Chem.* 2017;89(18):10029–36.

88. Dib J, Tretzel L, Piper T, Lagojda A, Kuehne D, Schänzer W, et al. Screening for adiponectin receptor agonists and their metabolites in urine and dried blood spots. *Clin Mass Spectrom* [Internet]. 2017;6:13–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2017.10.002>
89. Thomas A, Thevis M. Analysis of insulin and insulin analogs from dried blood spots by means of liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal*. 2018;10(11–12):1761–8.
90. Protti M, Catapano MC, Samolsky Dekel BG, Rudge J, Gerra G, Somaini L, et al. Determination of oxycodone and its major metabolites in haematic and urinary matrices: Comparison of traditional and miniaturised sampling approaches. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2018;152:204–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.043>
91. Lange T, Walpurgis K, Thomas A, Geyer H, Thevis M. Development of two complementary LC-HRMS methods for analyzing sotatercept in dried blood spots for doping controls. *Bioanalysis*. 2019;11(10):923–40.
92. Luginbühl M, Angelova S, Gaugler S, Längin A, Weinmann W. Automated high-throughput analysis of tramadol and O-desmethyltramadol in dried blood spots. *Drug Test Anal*. 2020;12(8):1126–34.
93. Lange T, Thomas A, Walpurgis K, Thevis M. Fully automated dried blood spot sample preparation enables the detection of lower molecular mass peptide and non-peptide doping agents by means of LC-HRMS. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(15):3765–77.
94. Salamin O, Nicoli R, Xu C, Boccard J, Rudaz S, Pitteloud N, et al. Steroid profiling by UHPLC-MS/MS in dried blood spots collected from healthy women with and without testosterone gel administration. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2021;204:114280. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114280>

## 7. Anexos

### Anexo I



**Figura 7.1-** Estabilidade do NESP, após período de armazenamento a longo prazo (3-5 ½ meses). Adaptado de (44).

### Anexo II

**Tabela 7.1-** Técnicas eletroforéticas para análise de ERAs na urina e no sangue (soro e/ou plasma) (48)

ERAs	ITP	CP
rEPO		SDS- ou SAR-PAGE
NESP	IEF-PAGE e/ou (SAR-PAGE ou SDS-PAGE*)	IEF ou SDS- ou SAR-PAGE
CERA*		IEF ou SDS- ou SAR-PAGE
EPO-Fc*		IEF ou SDS- ou SAR-PAGE

\*Devido ao elevado tamanho, que pode afetar a sua excreção na urina, a CERA e a EPO-Fc são detetadas de forma mais eficiente no soro/plasma do que na urina.

## 8. Apêndices

### Apêndice 1

Tabela 8.1- Classes de substâncias e métodos proibidos(3)

<b>SUBSTÂNCIAS</b>	<b>S0</b>	Substâncias não aprovadas
	<b>S1</b>	Agentes anabolizantes
	<b>S2</b>	Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos.
	<b>S3</b>	Beta-2 Agonistas
	<b>S4</b>	Hormonas e modeladores metabólicos
	<b>S5</b>	Diuréticos e agentes mascarantes
<b>MÉTODOS</b>	<b>M1</b>	Manipulação do sangue e dos componentes sanguíneos
	<b>M2</b>	Manipulação física e química
	<b>M3</b>	Doping genético e celular

## Apêndice 2

**Tabela 8.2-** Resumo de valores descritos no *Testing Figures Report*, de 2013 a 2020, para as amostras de ERAs em urina e sangue

	<b>Nº amostras urina</b>	<b>Nº amostras sangue</b>	<b>AAFs urina</b>	<b>AAFs sangue</b>	<b>AAFs TOTAL</b>	<b>% AAFs</b>
<b>2013</b>	25 623	*	61	2	63	1,78
<b>2014</b>	28811	1752	60	5	65	2,06
<b>2015</b>	32 999	3219	45	1	46	1,21
<b>2016</b>	43 246	3464	44	22	66	1,37
<b>2017</b>	44 322	4531	56	29	85	1,85
<b>2018</b>	47 955	4792	61	16	77	1,57
<b>2019</b>	51 929	3757	78	14	92	3,40
<b>2020</b>	35 947	1845	29	3	32	3,17

\*valor não reportado pela WADA no *Testing Figures Report* (2013)

## Apêndice 3

**Tabela 8.3-** Correlação entre a temperatura média no transporte da amostra de sangue com o período de tempo entre a colheita e recepção (27)

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Período de tempo entre a colheita e a recepção (horas)</b>
15	35
12	41
10	46
9	48
8	50
7	53
6	55

## Apêndice 4

Tabela 8.4- Bibliografia desenvolvida no âmbito das análises de dopagem com recurso a *Dried Blood Spots* (DBS)

Referência Bibliográfica	Aplicação	Classe	Substância	Tipo de DBS e volume	Método
Peng <i>et al.</i> , 2000 (74)	Administração oral de testosterona detectada por glucuronidação de testosterona medida em DBS em papel de filtro	S1- Agentes Anabólicos	Testosterona	<u>Whatman</u> Papel de filtro 41  20 uL	GC-MS
Thomas <i>et al.</i> , 2011 (75)	DBS para controlo de análises de dopagem	S3 Beta-2-agonistas S6- Estimulantes S7- Narcóticos S8-Canabinóides	Cocaina, salbutamol, efedrina/pseudoefedrina, amfetamina, JWH-018 e benzoilecgonina	<u>Whatman</u> FTA® DMPK A.B e C  20 uL	LC-MS
Möller, <i>et al.</i> , 2012 (76)	Desenvolvimento e validação de um método de detecção espectroscópica de peginesatide massa em manchas de sangue secas para testes de drogas desportivas.	S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos	Peginesatide	<u>Whatman</u> FTA DMPK-A, B e C <u>Macherey-Nagel</u> NucleoCards <u>Sartorius</u> Papel de filtro TFN <u>Munktell</u> Papel de filtro TFN  20 uL	LC-MS
Thomas <i>et al.</i> , 2012 (77)	Determinação sensível de substâncias proibidas em DBS para controlo de doping por espectrómetro de massas híbrido quadrupolo-Orbitrap	S1 - Agentes anabólicos S3 - Beta-2-agonistas S4- Hormonas e moduladores metabólicos S8-Canabinóides P1 Beta-bloqueante	THC, THC-COOH, Metilhexaneamina, metilfenidato, cocaina, niquetamida, MDEA, N-metil-3,4-metilenodioxianfetamina, estricnina, mesocarbo, salbutamol, formoterol, clenbuterol, metandienona, stanozolol, andarina, hidroclorotiazida, bisoprolol, propranolol, metoprolol, anastrozol, clomifeno, exemestano , dexametasona e budesonida	<u>Sartorius</u> Papel de filtro TFN <u>Munktell</u> Papel de filtro TFN <u>Whatman</u> FTA DMPK-C  20 uL	Espectrómetro de massas híbrido quadrupolo-Orbitrap

Referência Bibliográfica	Aplicação	Classe	Substância	Tipo de DBS e volume	Método
Cox <i>et al.</i> , 2013 (78)	Quantificação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) em manchas de sangue seco para detecção de abuso de hormonas de crescimento no desporto.	S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos	IGF-1	<u>Agilent</u> Bond Elut DMS cards 20 uL	LC-MS/MS
Tretzel <i>et al.</i> , 2014 (79)	Utilização de DBS na análise de controlo de doping de ésteres de esteróides anabolizantes	S1- Agentes Anabólicos	Testosterona	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C 20 uL	LC-MS/MS
Cox <i>et al.</i> , 2014 (80)	Quantificação do IGF-1 e dos seus análogos sintéticos em DBS	S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos	IGF-1	<u>Agilent</u> Cartão Bond Elut Dry Matrix Spotting (DMS) <u>Whatman</u> FTA® DMPK-C 20 uL	LC-MS
Tretzel <i>et al.</i> , 2015 (72)	Determinação de Synacthen® em DBS para análise de amostras de controlo de doping por LC-MS/MS	S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos	Tetracosactido (ACTH)	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C 20 uL	LC-MS/MS
Kojima <i>et al.</i> , 2015 (81)	Comparação de análise de urina e DBS para a deteção de efedrina e metilefedrina no controlo de doping	S6- Estimulante	Efedrina e metilefedrina	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C 20 uL	UPLC-MS/MS
Verplaetse <i>et al.</i> , 2015 (73)	Determinação quantitativa de opiáceos em sangue total sangue utilizando um sistema automatizado de DBS-SPE-LC-MS/MS	S7- Narcóticos	morfina, codeína, oxycodona, hidrocodona, fentanil e norhidrocodona	<u>Ahlstrom-Munksjö</u> Ahlstrom 226 DBS cards 10 uL	LC-MS/MS
Tretzel <i>et al.</i> , 2015 (82)	DBS nos controlos de doping: a matriz complementar para melhorar as estratégias de testagem de substâncias proibidas dentro e fora de competição	S1- Agentes Anabólicos S6- Estimulantes	Stanozolol, dehidroclorometiltestosterona e pseudoefedrina	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C 20 uL	LC-MS/MS
Tretzel <i>et al.</i> , 2016 (83)	Análise de Meldónio (Mildronato) a partir de DBS e urina com sugestão de incorporação da substância nos glóbulos vermelhos	S4- Hormonas e moduladores metabólicos	Meldonium	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C 20 uL	LC-HR-MS/MS

Referência Bibliográfica	Aplicação	Classe	Substância	Tipo de DBS e volume	Método
Ferro <i>et al.</i> , 2016 (84)	Avaliação da Fibronectina 1 após tratamento rhGHem DBS e urina	<i>Contexto da investigação preventiva das análises de dopagem</i>	Fibronectina 1 (biomarcador de IGF-1 e rhGH)	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C  Não especificado	ELISA
Reverter-Branchat <i>et al.</i> , 2016 (85)	Determinação de Hormona do crescimento, tomada recentemente, através de uma única mancha de DBS	S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos	hGH	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C  3– 6-mm diâmetro	Imunoensaios
Cox <i>et al.</i> , 2017 (86)	Deteção de transfusões de sangue autólogo usando um novo método de DBS	M1- Manipulação do sangue e dos componentes sanguíneos	Transfusões de sangue autólogo	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C  20 uL	LC-MS
Cox <i>et al.</i> , 2017 (87)	Método de Espectrometria de Massa para a Medição de Proteínas da Membranas celular em DBS na deteção de doping.	M1- Manipulação do sangue e dos componentes sanguíneos	CD71 e Banda 3	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C  20 uL	LC-MS e Citometria de Fluxo
Dib <i>et al.</i> , 2017 (88)	Triagem de Agonistas do Recetor da Adiponectina e seus metabolitos na Urina e DBS	<i>Contexto da investigação preventiva das análises de dopagem</i>	AdipoRon e 112254	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C  20 uL	LC-HR-MS/MS
Protti <i>et al.</i> , 2017 (43)	Microamostras hematológicas e LC-MS/MS para a análise de canabinóides sintéticos e naturais	S8-Canabinóides	THCs sintéticos e naturais	<u>Whatman</u> 903 <i>Protein saver card</i> FTA® DMPK C <u>Neoteryx</u> Mitra™  10 uL	LC-MS/MS
Reverter-Branchat <i>et al.</i> , 2018 (44)	Deteção Agentes Estimulantes da eritropoiese em DBS	S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos	ESAs	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C  25 uL	Eletroforético e <i>Western-blot</i>
Thomas <i>et al.</i> , 2018 (89)	Análise de insulina e análogos por LC-HRMS	S4- Hormonas e moduladores metabólicos	Insulina e análogos	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C  20 uL	LC-HRMS

Referência Bibliográfica	Aplicação	Classe	Substância	Tipo de DBS e volume	Método
Protti <i>et al.</i> , 2018 (90)	Determinação da oxicodeona e dos seus principais metabolitos em matrizes urinárias e sanguíneas: Comparação de matrizes tradicionais e abordagens miniaturizadas	S7- Narcóticos	Oxicodeona	<u>Whatman</u> 903 Protein saver card  Não especificado	LC-MS/MS
Ambach <i>et al.</i> , 2018 (49)	Quantificação de cocaína e seus metabolitos em DBS num estudo de administração controlada utilizando LC-MS/MS	S7- Narcóticos	Cocaína e metabolitos (benzoilecgonina-BE, metil-éster de ecgonina - EME, norcocaína, hidroxil-BE e cocaetileno)	<u>Whatman</u> 903 <i>Protein saver card</i>  25 uL	LC-MS/MS
Salamin, <i>et al.</i> , 2019 (70)	Deteção de Estimulantes da eritropoiese através do RNA de ALAS2 em DBS	M1- Manipulação do sangue e dos componentes sanguíneos	ALAS 2	<u>Whatman</u> 903™ <i>protein saver cards</i>  20 uL	RT-qPCR
Lange <i>et al.</i> , 2019 (91)	Desenvolvimento de dois métodos complementares LC-HRMS para análise de sotatercept em DBS para controlo de doping	S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos	Sotatercept	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C  20 uL	LC-HRMS
Luginbühl <i>et al.</i> , 2020 (92)	Análise Automatizada de Alto Rendimento para pesquisa de Tramadol e O-desmetiltramadol em DBS	S7- Narcóticos	Tramadol e O-desmetiltramadol (Subst. Monitorização)	<u>Ahlstrom-Munksjö</u> AutoCollect™ cards  20 uL	LC-MS/MS
Lange <i>et al.</i> , 2020 (93)	Preparação automatizada de amostras de DBS permitindo a detecção de peptídeos com baixa massa molecular e agentes com estruturas não peptídicas através de LC-HRMS	S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos	Agonistas do recetor do GnRH, ghrelin, hGH, e ADH Versão sintética de um activo região β4 da timusina	<u>Seventh Sense Biosystems</u> Dispositivo "TAP" baseados em microagulha  20 uL	LC-HRMS
Solheim <i>et al.</i> , 2020 (42)	Administração de dose única de clenbuterol em DBS	S1- Agentes Anabólicos	Clenbuterol	<u>Whatman</u> FTA® DMPK C  20 uL	LC-MS/MS

Referência Bibliográfica	Aplicação	Classe	Substância	Tipo de DBS e volume	Método
Salamin <i>et al.</i> , 2020 (71)	Deteção de tramadol usando DBS em competições de ciclismo	S7- Narcóticos **	Tramadol	DBS Systems SA Microsampling HemaXis DB10 kits 10 uL	UPLC-HRMS
Moeller <i>et al.</i> , 2020 (69)	Avaliação de DBS como uma matriz alternativa para análise de dopagem equina	S1- Agentes Anabólicos S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos S3 Beta-2-agonistas S4- Hormonas e moduladores metabólicos S9- Glucocorticóides	*	Whatman 903 Protein saver card 35 uL	LC-MS/MS
Marchand <i>et al.</i> , 2020 (54)	Utilização de VAMS ( <i>Volumetric Absorptive Microsampling</i> ) para deteção de IGF-1 através da quantificação por imunoenensaio de quimioluminescência automatizado em sangue seco	S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos	IGF-1	Neoteryx Mitra™ 20 uL	Imunoensaio de quimioluminescência automatizado
Marchand <i>et al.</i> , 2021 (68)	Deteção do transgene da EPO em DBS para análises de dopagem	M3- Dopng genético e celular	Transgene da EPO	Whatman 903 Protein saver card ThermoFisher Nucleic-Card™ Neoteryx Mitra™ 20 uL	PCR
Salamin <i>et al.</i> , 2021 (94)	Perfil esteroidal por UHPLC-MS/MS em DBS de mulheres saudáveis com e sem administração de gel de testosterona	S1- Agentes Anabólicos	Perfil esteroidal	Whatman 903 Protein saver card 20 uL	UHPLC-MS/MS

\* Terbutalina, Zilpaterol, Albuterol, Fenoterol, ractopamina, formoterol, clenbuterol, bambuterol, 15β-hidroxitestosterona, isoflupredona, 4-Androstene-3,6,17 triona, flumetasona, 11 β -hidroxitesterona, 16 β -hidroxitesterona, Androsta-1,4,6-triene-3,17-diona, boldiona, Estra-4,9-diene-3,17-dione, dexametasona, andarina, metilprednisolona, trenbolona, boldenona, 9-dehidroandrostenediona, ostarina, zearalanol, Androsta-1,4-diene-3,11,17-trione, nandrolona, noretisterona, 16 β -hidroxistanazolol, gestrionona, testosterona, 1-androstendiona, 17-hidroxiprogesterona, epinandrolona, Norgestrel, metiltesterona, formestano, epitesterona, clostebol, progestina sintética altrenogest, noretandrolona, calusterona, tamoxifeno, metolclostebol, stanazolol, roxadustat, acetato epitesterona, acetato testosterona, GW-1516, propionato de testosterona, undecilenato de boldenona, decanoato de testosterona e undecilenato de testosterona

## Apêndice 5

Tabela 8.5- Medição do pH e densidade das 4 amostras de urina de diferentes voluntários no imediato

AMOSTRA URINA	pH	DENSIDADE
1	6,59	1,008
2	5,58	1,010
3	6,53	1,023
4	5,51	1,018

## Apêndice 6

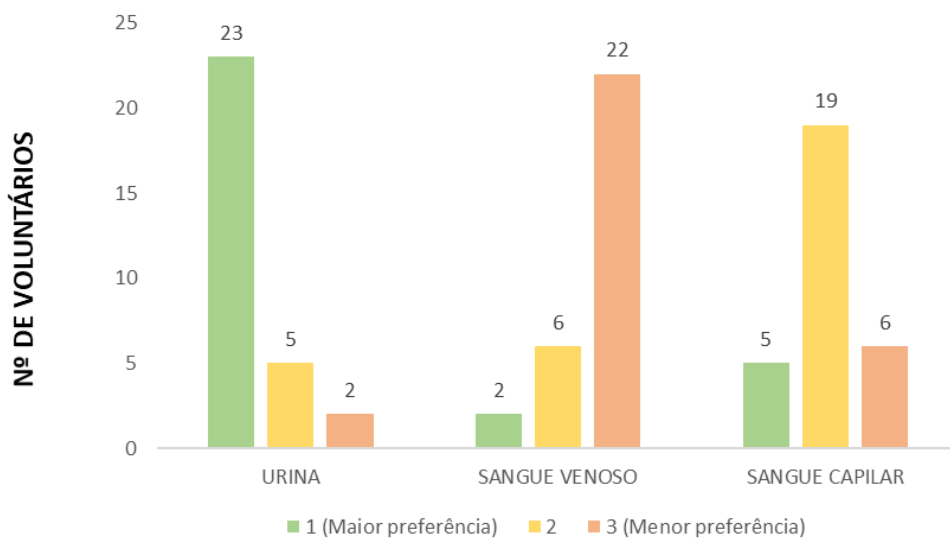
Tabela 8.6- Resultados de hematócrito, resultante do hemograma completo analisado no tubo de EDTA e diâmetro (mm) dos blood spot após secagem

AMOSTRA	HEMATÓCRITO (%)	DIÂMETRO DO SPOT (MM)	AMOSTRA	HEMATÓCRITO (%)	DIÂMETRO DO SPOT (MM)
1	39,2	14,0	16	41,0	12,0
2	45,7	13,0	17	44,6	13,0
3	40,4	14,0	18	42,3	14,0
4	40,4	14,0	19	40,1	14,0
5	41,0	14,0	20	41,4	13,0
6	38,2	13,0	21	40,2	13,0
7	47,2	14,0	22	45,7	13,0
8	35,9	13,0	23	40,0	14,0
9	36,6	13,0	24	36,8	13,0
10	48,4	14,0	25	38,8	14,0
11	42,1	14,0	26	38,2	12,0
12	42,2	14,0	27	40,9	14,0
13	36,5	14,0	28	44,9	13,0
14	41,8	15,0	29	39,2	14,0
15	47,0	14,0	30	37,2	13,0

**Tabela 8.7-** Hemograma realizado ao tubo de sangue venoso com EDTA no equipamento XN-1000 (Sysmex)

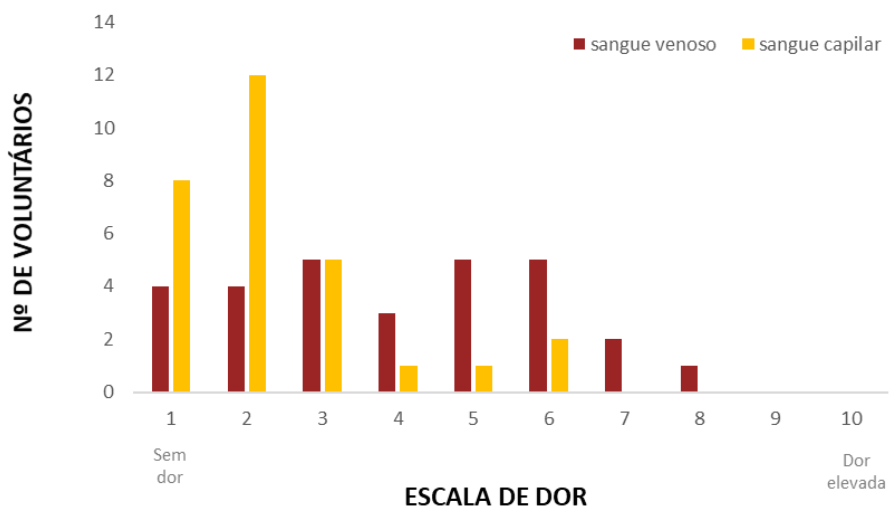
<b>Nº AMOSTRA</b>	<b>WBC</b> 10 <sup>3</sup> /µL	<b>RBC</b> 10 <sup>6</sup> /µL	<b>HGB</b> g/Dl	<b>HCT</b> %	<b>MCV</b> fl	<b>MCH</b> pg	<b>MCHC</b> g/Dl	<b>PLT</b> 10 <sup>3</sup> /µL	<b>MPV</b> fl	<b>RDW-CV</b> %	<b>RET</b> %	<b>NEUT</b> %	<b>LINF</b> %	<b>MONO</b> %	<b>EOSI</b> %	<b>BAS</b> %
1	8,17	4,45	13,6	39,2	88,1	30,6	34,7	208	11,4	12,4	1,51	60,4	29,3	8,6	1,2	0,5
2	6,32	4,15	12,6	36,7	88,4	30,4	34,3	207	10,9	11,9	1,32	56,1	35,2	7,0	1,3	0,3
3	5,73	4,75	13,7	40,4	85,1	28,8	33,9	251	11,1	13,3	2	51,4	35,3	8,6	4,5	0,2
4	4,57	4,72	13,9	40,4	85,6	29,4	34,4	244	11,6	12,3	1,02	47,3	36,5	9,6	5,9	0,7
5	8,24	4,88	13,7	39,2	80,3	28,1	34,9	302	10,4	12,3	1,7	64,6	26,9	6,9	1,1	0,5
6	6,86	4,34	13,3	38,2	88,0	30,6	34,8	265	11	12,1	1,32	51,7	39,9	7,4	0,0	1,0
7	5,37	5,46	16,6	47,2	86,4	30,4	35,2	209	10,3	11,6	1,67	50,1	50,4	40,4	7,8	1,1
8	4,43	4,29	12,7	35,9	83,7	29,6	35,4	266	9,4	12,7	1,4	38,1	49,9	8,8	2,5	0,7
9	6,52	4,86	11,9	36,6	75,3	24,5	32,5	264	10,3	13,2	1,03	51,1	40,5	5,8	2,3	0,3
10	4,5	5,7	16,4	48,4	84,9	28,8	33,9	269	11,9	12,7	1,45	46,1	44,4	8,4	0,9	0,2
11	8,19	4,65	14,7	42,1	90,5	31,6	34,9	237	12,2	12	2,17	51,6	37,2	8,1	2,9	0,2
12	13,56	4,62	14,5	42,2	91,3	31,4	34,4	279	10,9	13,3	1,37	66	24,7	6,9	1,8	0,6
13	4,99	4,14	12,6	36,5	88,2	30,4	34,5	309	11,2	12,9	1,67	61,9	30,1	6,8	0,8	0,4
14	6,15	4,97	14,6	41,8	84,1	29,4	34,9	268	11,3	12,1	1,54	57,1	30,2	10,2	2,3	0,2
15	8,2	5,49	16,5	47,0	85,6	30,1	35,1	224	11,7	12,1	1,27	56,8	30,9	9,0	3,0	0,4
16	5,95	4,73	14,5	41,0	86,7	30,7	35,4	218	10,4	11,6	1,13	49	40	7,7	2,5	0,8
17	9,63	4,83	14,8	44,6	92,5	30,7	33,2	220	12,2	12,6	1,54	63,9	26,5	6,0	3,2	0,4
18	8,89	4,93	14,9	42,3	85,8	30,2	35,2	224	12,4	12,8	1,22	52,5	40,8	5,4	0,6	0,7
19	9,59	4,54	13,7	40,1	88,3	30,2	34,2	256	12,8	12,6	1,92	64,6	28,2	5,6	1,3	0,3
20	6,58	4,59	14,6	41,4	90,2	31,8	35,3	296	9,3	12,2	1,78	54	35,6	7,1	2,1	1,2
21	5,55	5,16	13,3	40,2	77,9	25,8	33,1	288	11,4	13,4	1,07	56,6	28,1	9,9	5,0	0,4
22	5,42	5,34	15,3	45,7	85,6	28,7	33,5	248	10,1	11,5	1,47	46,3	43	7,9	2,2	0,6
23	3,88	4,73	13,5	40	84,6	28,5	33,8	201	11,7	13,2	0,9	42	43,3	11,1	3,1	0,5
24	6,09	3,86	12,3	36,8	95,3	31,9	334	331	10,1	12	1,71	65,5	26,1	6,1	1,3	1,0
25	4,16	4,46	13,4	38,8	87,0	30,0	34,5	147	11,3	12,3	1,57	42,8	46,9	7,9	1,2	1,2
26	3,63	4,3	14,6	41,3	96,0	34,0	35,4	234	11,6	11	1,23	46	42,1	8,3	3,3	0,3
27	5,99	4,71	14,3	40,9	86,8	30,4	35,0	205	10,9	12,2	1,42	53,2	37,9	7,2	1,2	0,5
28	8,35	5,07	16,2	44,9	88,6	32,0	36,1	227	10,6	12,7	1,55	58,4	34,7	4,7	1,7	0,5
29	9,53	4,67	15,2	42,8	91,6	32,5	35,5	214	11,5	11,9	1,24	42,5	39,7	7,1	9,5	1,2
30	8,98	4,4	13,0	37,2	84,5	29,5	34,9	265	10,5	13,3	1,43	69,9	21,7	6,0	1,7	0,7

## Apêndice 7

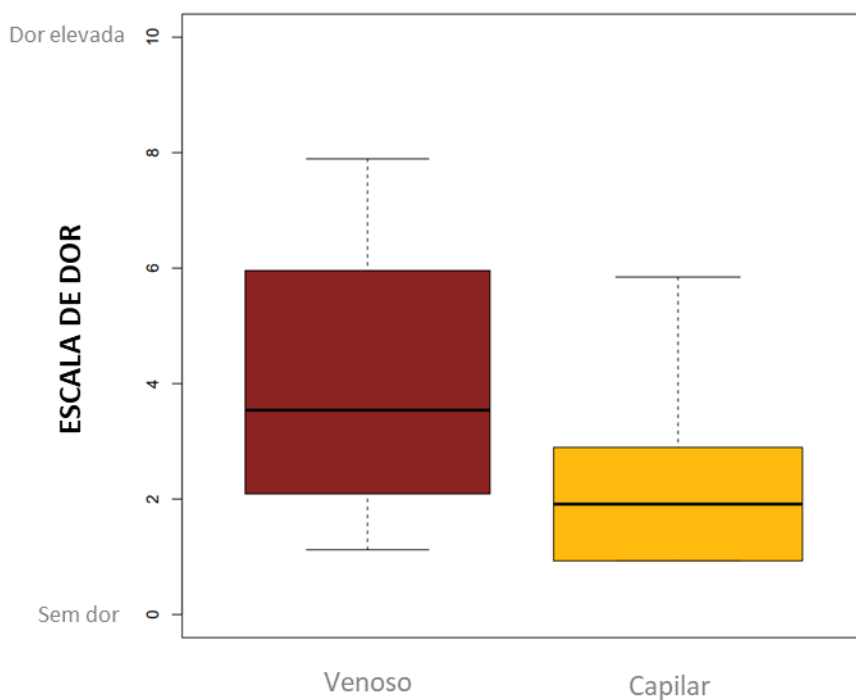


### MATRIZ

**Gráfico 8.1-** Análise dos resultados do questionário realizado aos voluntários sobre a preferência (1-3) na matriz de colheita: urina, sangue venoso e sangue capilar. 1 (maior preferência) e 3 (menos preferência)



**Gráfico 8.2-** Análise dos resultados do questionário realizado aos voluntários sobre o nível de dor, em escala numérica (1-10), da colheita de sangue venoso (bordeaux) e capilar (amarelo).



### COLHEITA DE SANGUE

**Gráfico 8.3-** *Boxplot* dos dados resultantes do questionário feito aos voluntários sobre o nível de dor da colheita de sangue venoso (bordeaux) e capilar (amarelo).

**Tabela 8.8-** Dados resultantes do boxplot dos valores da escala de dor do sangue venoso e capilar. Valores representados: mínimo, 1º quartil, mediana, média, 3º quartil e máximo.

COLHEITA	DADOS					
	Mínimo	1º Q	Mediana	Média	3ºQ	Máximo
SANGUE VENOSO	1	2	3,5	3,8	5,75	8
SANGUE CAPILAR	1	1	2	2,33	3	6

## Apêndice 8

**Tabela 8.9-** Valores do volume absoluto das bandas endógenas dos 30 voluntários (DBS1-30) representados na **Figura 4.3, Figura 4.2 e Figura 4.4**

Nº DBS	VOLUME ABSOLUTO DA BANDA
1	10100670
2	6945311
3	9788166
4	5295518
5	9949095
6	11559930
7	8213183
8	654686
9	546838
10	239341
11	9532274
12	4715851
13	5356186
14	2094969
15	167410
16	4839395
17	4493623
18	3054791
19	2196788
20	2382976
21	4153973
22	6787681
23	6146373
24	6231733
25	2801189
26	3093453
27	183726
28	2719118
29	2360694
30	6001288

**Tabela 8.10-** Valores do volume absoluto das bandas das 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA) nas 5 concentrações testadas para o parâmetro do limite de detecção (LOD) representado na **Figura 4.5**.

ERA	VOLUME RELATIVO DA BANDA				
	C1	C2	C3	C4	C5
<b>CERA</b>	2135019	1800889	798301	1040168	185507
<b>EPO-Fc</b>	14735800	10334270	1661264	2863794	275151
<b>NESP</b>	23017990	18862090	2324784	1160737	542267
<b>BRP</b>	80343170	54225480	3450506	2171200	1427259

**Tabela 8.11-** Valores do volume absoluto das bandas da endógena (bEPO) e das 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA) nos 6 diferentes suportes testados para o parâmetro de comparação de DBS representado na **Figura 4.7**.

ERA	VOLUME RELATIVO DA BANDA					
	Whatman 903	Whatman PF* nº1	Neoterix VAMS	DBS Systems DB10	MAIIA DBS card	Macherey-Nagel PF*
<b>bEPO</b>	18504430	22938780	21867680	22359430	21005590	15366500
<b>CERA</b>	19356580	40881150	14339850	42154030	43388420	43821910
<b>EPO-Fc</b>	1177671	4025498	322534	3021471	4637434	7967421
<b>NESP</b>	19303220	25885610	16672760	21931740	25173990	21295510
<b>bEPO/BRP</b>	100620400	149113300	85262050	131750400	137604200	124787300

\* PF- Papel de filtro

**Tabela 8.12-** Valores do volume absoluto das bandas da endógena (bEPO) e das 4 ERAs (BRP, NESP, EPO-Fc e CERA) nos 6 diferentes suportes testados para o parâmetro de comparação de DBS representado na **Figura 4.8**

ERA	VOLUME RELATIVO DA BANDA					
	Whatman 903	Whatman PF* nº1	Neoterix VAMS	DBS Systems DB10	MAIIA DBS card	Macherey-Nagel PF*
<b>bEPO</b>	15304070	23813410	21407710	15698280	25372770	17540750
<b>CERA</b>	4000157	69265650	19344740	7317456	75974320	70459250
<b>EPO-Fc</b>	--	14912770	2159297	3634486	13626650	9819097
<b>NESP</b>	17631970	33733330	25992390	27793340	29194550	22124010
<b>bEPO/BRP</b>	48801060	99763200	84558460	94392400	106524800	71723490

## Apêndice 9

**Tabela 8.13-** Medição do pH e densidade das 4 amostras de urina de diferentes voluntários ao fim de 3 meses armazenadas a diferentes temperaturas

AMOSTRA URINA	TEMP. AMBIENTE	pH	
		4 °C	-20 °C
<b>1</b>	8,67	7,70	6,80
<b>2</b>	8,16	6,17	5,57
<b>3</b>	8,51	6,66	6,52
<b>4</b>	6,63	5,98	5,50



### Consentimento, Informado, Livre e Esclarecido

Pág. 1 de 3

#### **Desenvolvimento e implementação de um método de pesquisa de ERAs em amostras de Dried Blood Spots (DBS)**

**Responsáveis pelo estudo:** Sara da Costa (mestranda), Prof. Doutor Paulo Paixão (orientador) e Prof. Doutor Miguel Brito (orientador)

**Instituição de acolhimento:** Laboratório de Análises de Dopagem – Instituto Português do Desporto e Juventude (IPDJ)

Este documento, designado Consentimento, Informado, livre e Esclarecido, contém informação importante em relação ao estudo para o qual foi abordado/a, bem como o que esperar se decidir participar no mesmo. Leia atentamente toda a informação aqui contida. Deve sentir-se inteiramente livre para colocar qualquer questão, assim como para discutir com terceiros a decisão da sua participação neste estudo.

**Objetivo do estudo:**

Compreender se os *Dried Blood Spots* (DBS) são uma alternativa viável à tradicional colheita de sangue realizada aos praticantes desportivos para a deteção de substâncias dopantes (Agonistas do Recetor da Eritropoietina - ERAs).

**Duração e local de participação:**

A participação será apenas necessária aquando da colheita de uma amostra de Dried Blood Spots (DBS), que durará cerca de 1 minuto. O local será numa das salas do edifício do Laboratório de Análises de Dopagem. As amostras de sangue (soro e plasma, 500 µL cada) serão aproveitadas de análises clínicas realizadas aos indivíduos por rotina.

**Procedimentos utilizados na colheita:**

Amostra de *Dried Blood Spots* (DBS). Técnica de colheita de sangue, na qual se coloca a amostra num papel e a mesma é seca. Técnica utilizada para o teste do pezinho nos recém-nascidos.

**Participação voluntária:**

A participação neste estudo é voluntária e revogável, podendo desistir da colaboração em qualquer momento, sem necessidade de justificação e sem discriminação por tal desejo.

**Riscos e benefícios associados à participação no estudo:**

Não existem quaisquer riscos na realização do estudo para os participantes.

**Responsabilidade:**

Não estão previstos riscos associados a esta investigação. No entanto, uma equipa de enfermagem e médica, presente no edifício, poderá apoiar em qualquer eventualidade.

**Cobertura de seguros:**

Não aplicável.

**Finalidade dos resultados:**

A divulgação dos resultados finais do trabalho será feita a partir da dissertação pública da tese, participação em reuniões científicas e através da publicação em revistas com revisão por pares.

**Contacto em caso de dúvidas:**

Sara da Costa– sara.santos@ipdj.pt – 962 596 620

**Assinatura do participante**

Li, estou interessado/a e concordo em participar no estudo proposto.

(O/A Participante) \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

*Obrigada pela sua participação!*

**Investigador/Equipa de Investigação**

Nome da pessoa que obtém o consentimento \_\_\_\_\_

Assinatura da pessoa que obtém o consentimento \_\_\_\_\_