

## **Método de focalización isoeléctrica para la detección de eritropoyetina recombinante**

### **Iselectric focusing Method for the detection of recombinant Erythropoyetine**

**Gema E. García Dafonte<sup>1</sup> ; Raquel Montesino Seguí<sup>2</sup> ; José Cremata<sup>3</sup> ; Víctor Cabrera Oliva<sup>4</sup> ; Mario Granda Fraga<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup> MSc Bioquímica Clínica, Investigador Auxiliar. Laboratorio Antidoping, Instituto de Medicina del Deporte.

<sup>2</sup> Dr. Ciencias Biológicas, Investigador Titular. Laboratorio de Carbohidratos de la Dirección de Investigaciones Biomédicas. Centro Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Ciudad Habana.

<sup>3</sup> Dr. Ciencias Biológicas, Investigador Titular. Laboratorio de Carbohidratos de la Dirección de Investigaciones Biomédicas. Centro Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

<sup>4</sup> MSc Ciencias del Deporte, Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina del Deporte.

[vcabrera@infomed.sld.cu](mailto:vcabrera@infomed.sld.cu)

<sup>5</sup> Dr. Ciencias Biológicas, Investigador Titular. Instituto de Medicina del Deporte.

#### **RESUMEN**

Desde la inclusión, en el año 1990, de la Eritropoyetina (EPO) en el listado de sustancias prohibidas por el Comité Olímpico Internacional (COI) hasta la fecha, el uso de la hormona recombinante con fines de dopaje se ha popularizado en virtud del demostrado incremento de la capacidad aeróbica del atleta y la carencia de métodos analíticos para su detección inequívoca.

En el 2000 se propone el primer método directo para la detección de EPO recombinante (EPOr) en la orina, por el Laboratorio Antidoping de Francia. El método se basa en las sutiles diferencias encontradas entre el patrón de glicosilación de la hormona natural con respecto a la recombinante cuando se procesan las muestras por técnicas de isoelectroenfoque, transferencia e inmunodetección las cuales involucran el uso de anticuerpos monoclonales, conjugados enzimáticos y sustrato quimioluminiscente garantizándose de esta forma la especificidad y sensibilidad de la determinación analítica.

Los inconvenientes del método se relacionan con la necesidad de personal especializado en técnicas electroforéticas, la laboriosidad y el consumo de tiempo, no obstante ha contribuido de manera decisiva en el control del consumo de EPOr en el deporte. Es actualmente la metodología analítica vigente desde su implementación en los Juegos Olímpicos de Sydney 2000.

El presente trabajo muestra los resultados preliminares logrados en colaboración con el Departamento de Carbohidratos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), en la estandarización de la metodología vigente para la

detección de la Eritropoyetina recombinante (EPOr). Se logró la visualización de 5 mg de las diferentes EPOr ensayadas por focalización isoelectrica (FI) empleando el conjugado enzimático anti EPO-HRP de producción nacional con revelado colorimétrico. Aplicaciones de EPO de 0.15 ng/100 µL fueron detectadas empleando la técnica "Dot-blotting" con el sistema de amplificación avidina-biotina-peroxidasa y revelado quimioluminiscente.

Estos resultados son alentadores para el propósito final de la técnica que debe detectar la presencia de la hormona en la orina en el orden de los 0.2 ng (200 pg).

**Palabras Claves:** EPO, Focalización isoelectrica, Doping, Glicosilación.

## **ABSTRACT**

Eritropoyetina (EPO) was included in the list of substances forbidden by the International Olympic Committee (IOC) in the 2000. The determination of recombinant (EPOr) in urine samples was introduced by the Laboratory Antidoping of France in 1990, as the first intent to introduce a direct method for the detection of EPO. The method is based on subtle differences found among the moisture of glycosilation of the natural hormone regarding the recombinant when which process the signs for techniques of isoelectric focusing, transference and immunodetection themselves they implicate the use of monoclonal antibodies, conjugated enzymatic and quimioluminiscent substrates taking guarantees in this way specificity and sensibility of the analytical determination. The present work evidences the worked out preliminaries achieved in association with Carbohydrate Department of the Center of Genetic Engineering and Biotecnology (CIGB), in the standardization of the methodology in use for the detection of recombinant Eritropoyetine (EPOr). The level of detection of EPOr by isoelectric focusing was of 5 ng using the conjugated enzymatic anti EPO HRP of national production. Concentration of 0,15 ng/100 EPO were applied and detected using the technical Dot blotting with the system of amplification avidina-biotina- peroxidase and revealed by chemoluminescence. These results are encouraging for the final purpose of the technique which represent the hormone in urine in the order of 0,2 ng (200 pg) must detect.

**Keywords:** EPO, Focalización isoelectrica, Doping, Glicosilación

## **INTRODUCCIÓN**

Las propiedades anfotéricas de las proteínas han sido utilizadas en la separación de macromoléculas por técnicas electroforéticas como la denominada focalización isoelectrica (FI). Esta consiste en la migración de iones en un campo eléctrico en presencia de un gradiente de pH el cual aumenta gradualmente desde el ánodo hasta el cátodo; durante la migración la proteína se detiene a un valor de pH que se corresponde con el punto isoelectrico (pI) de la misma (1). La posterior transferencia de las proteínas a membranas apropiadas, permite la visualización de las isoformas presentes en la muestra combinando la inmuno detección con el revelado quimioluminiscente. Esta técnica es una poderosa herramienta analítica que garantiza la especificidad y la sensibilidad en el orden de los picogramos (pg).

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoproteica sintetizada y liberada a nivel renal en respuesta a las demandas de oxígeno en sangre, su función es estimular la producción de glóbulos rojos por la médula ósea (eritropoyesis) favoreciendo el transporte de O<sub>2</sub> por la sangre. El proceso natural puede desencadenarse por la administración exógena de eritropoyetina recombinante (EPOr), disponible

comercialmente desde 1985 para el tratamiento de anemias relacionadas con la insuficiencia renal crónica y algunos desarrollos tumorales (2,3).

En los últimos años se ha incrementado el uso ilegal de la hormona en el deporte, principalmente en especialidades donde la capacidad aeróbica del atleta juega un rol principal (eventos de resistencia en deportes como: ciclismo, natación y esquí de fondo), lo que se ha visto favorecido por la carencia de métodos analíticos confiables para la detección de la EPOr.

En el año 2000 el Laboratorio Antidoping de Francia publicó el primer procedimiento analítico para la detección de EPOr en orina (4). Los autores se apoyaron en la potencialidad analítica de la FI para resolver entre el patrón electroforético de la EPO endógena y la recombinante. El revelado de ambos patrones se realizó por un sistema de inmuno detección que incluía el uso de: anticuerpos monoclonales (AcM) específicos para la detección de la hormona, sistema de amplificación avidina-biotina-enzima, sustrato quimioluminiscente y la captación de imágenes por autoradiografía o analizador luminiscentes (5,6).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras**

Se trabajó con preparaciones de EPOr previamente desalinizadas y concentradas hasta 1mg/mL en tubos de ultrafiltración con membranas de poro 10 kDa (Millipore, E.U). Las preparaciones provenían de:

EPO-HC11: hormona recombinante expresada en cultivo de células de glándula mamaria de ratón.

EPO-GMGE: hormona recombinante expresada en cultivo de células de glándula mamaria de chiva.

EPO-CHO: hormona recombinante expresada en cultivo de células de ovarios de hámster chino, purificadas por cromatografía de afinidad, en matriz Blue-Sepharosa y Quelato-Sepharosa.

EPOref: hormona recombinante expresada en cultivo de células de ovarios de hámster chino, purificadas por cromatografía de intercambio iónico-aniónico, empleada como marcador del ánodo en la corrida electroforética.

### **Reactivos y soluciones**

AcM anti-EPO: anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce EPO humana, clone AE7A5 (R&D System, E.U).

Anti-ratón biotinilado: anticuerpo de carnero que reconoce IgG de ratón conjugado con biotina (Pierce, EU).

Conjugado enzimático estreptavidina-biotina- peroxidasa (complejo estreptavidina-HRP), (Biospa, Italia).

Conjugado enzimático: AcM anti EPO acoplado a peroxidasa (anti-EPO-HRP), (CIGB Santi Spiritu, Cuba).

Solución de anfolinas Servalyt (Serva, E.U) en rangos de pH de 2 – 4, 4 – 6 y 6 –8.

Solución de bloqueo: leche descremada (Regilait, Francia), al 5% en tampón fosfato-salino (PBS), pH 7.4.

Solución de sustrato colorimétrico: diaminobenzidina- peróxido de hidrógeno (DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 0.1% en PBS.

Solución de transferencia: tampón Tris-glicina (25mM Tris, 192mM glicina).  
Solución de sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, EU).  
Urea, acrilamida, bis-acrilamida (BioRad, EU)

### **Focalización Isoeléctrica en gel prehidratado de poliacrilamida (sistema automatizado)**

Para la separación de las isoformas se aplicó 5 uL (5 µg/aplicación) de las preparaciones de EPOr sobre un gel de dimensiones 43x50x0.45 cm "PhastGel Dry" (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia), previamente hidratado en una mezcla de urea 4 M y anfolitas de pH 2.5-5 y pH 3-10 por 30 min. en agitación a temperatura ambiente (TA). Las condiciones de corrida fueron: pre-enfoque (750 V, 2.5 mA, 3.5 W y 90 Vh), entrada de las muestras (150 V, 25 mA, 3.5 W y 15 Vh) y separación de isoformas (750 V, 2.5 mA, 3.5 W y 417 Vh); en todas las etapas se mantuvo una temperatura de 15°C.

Para la inmuno detección primeramente se transfirieron las isoformas separadas a membrana de nitrocelulosa (Millipore, EU) por transferencia pasiva en solución de transferencia durante 2 h a 37°C en cámara húmeda. La membrana fue saturada (bloqueo) con leche descremada al 5% en PBS, 1 h a TA; posteriormente se adicionó el conjugado enzimático anti EPO-HRP (dilución 1/1000 en PBS) e incubó a 37°C durante 1 h. La membrana se lavó exhaustivamente (seis cambios) con PBS-leche 0.5%, y finalmente la señal colorimétrica se visualizó por la adición de la solución de sustrato DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Focalización Isoeléctrica en gel de poliacrilamida (sistema Multiphor II)**

La focalización se realizó aplicando 20 uL (5 µg/ aplicación) de las EPOr sobre un gel de dimensiones 11x24x0.1 cm de poliacrilamida (T5C3) preparado según lo descrito en Principios y Métodos de Focalización Isoeléctrica<sup>1</sup>, con 7 M urea y gradiente de pH 2-6 (anfolitas al 2% en rangos de pH de 2-4 y 4-6), según el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) código MS020E05<sup>7</sup>. Las condiciones de corrida, empleando el sistema de electroforesis Multiphor II (Amersham Biosciences) fueron: pre-enfoque a voltaje constante (250 V, 150mA, y 70W), por 30 min. y separación de las isoformas a potencia constante (1W/cm de longitud, 2000 V, 131 mA y 2653Vh), en ambas etapas se mantuvo una temperatura de 8± 2°C.

Posteriormente se la transferencia semi-seca (sistema Multiphor II) a membranas de PVDF en tampón de transferencia, a 1 mA/cm<sup>2</sup> por 30 min. a TA. Los pasos de bloqueo, incubación con conjugado anti-EPO-HRP, lavados y revelado colorimétrico se realizó según lo anteriormente descrito.

### **Inmuno detección mediante la técnica "DOT-BLOTING"**

Se aplicó 100 uL de EPO-CHO (0.15, 0.6 y 2.5 ng/100 uL) a membranas de PVDF previamente bloqueadas según lo descrito anteriormente, la membrana se incubó por 1 h a TA con el AcM anti-EPO (1:1000 PBS-leche 1%) y se realizaron los lavados correspondientes. Las proteínas fueron transferidas a una segunda membrana de PVDF (PVDF II) por transferencia semi-seca en solución de ácido acético al 0.7% (transferencia ácida), 1 mA/cm<sup>2</sup> por 10 min.

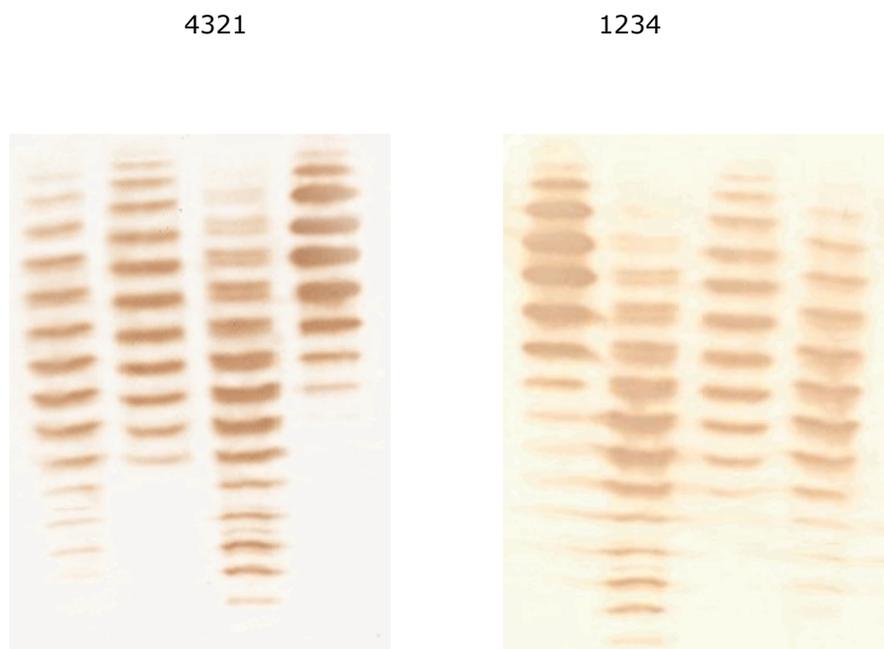
Posterior al bloqueo de la segunda membrana (PVDF II), se adicionó anti ratón biotinilado (1:4000 PBS-leche 1%) durante 18 h a 4 °C. Se lavó e incubó la membrana con el complejo estreptavidina-HRP (1:2000 PBS-leche1%) por 1 h a TA; se repiten los lavados y por último se adicionó el sustrato quimioluminiscente

Covalight para la detección de la señal por autoradiografía utilizando Hyperfilm-ECL (Amersham, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los patrones electroforéticos obtenidos al procesar muestras de EPOr aplicadas sobre geles preparados en el laboratorio (11x24 cm) y corridas en el sistema Multiphor II (fig. 1), fueron comparables con los obtenidos al aplicar las mismas muestras sobre geles pre-hechos, utilizando el sistema comercial automatizado (fig. 2). De aquí se sugiere que la estandarización del sistema de focalización en geles 11x24 cm ofrece una alternativa al sistema automatizado para el control de calidad de las preparaciones de EPOr, con ventajas en cuanto a sensibilidad (porque admite trabajar con volúmenes mayores de aplicación) y posibilidad de procesar mayor número de muestras por corrida.

Las isoformas características para cada proteína recombinante fueron visualizadas en ambos sistemas utilizando el revelado colorimétrico para la enzima peroxidasa (anti-EPO-HRP, sustrato DAB), aplicando 5 ug.



**Figura 1.** Corrida en gel 11x24cm

- 1- EPO ref
- 2- EPO HC11
- 3- EPO-CHO
- 4- EPO-GMGE-3

**Figura 2.** Corrida en el Fast System.

- 1- EPO ref
- 2- EPO HC11
- 3- EPO-CHO
- 4- EPO-GMGE-3

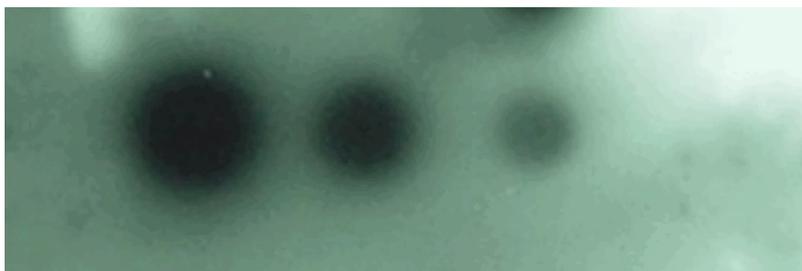
Las figuras 1 y 2 muestran diferentes patrones electroforéticos para las EPOr evaluadas (EPOref, EPO HC11, EPO-GMGE, y EPO-CHO) lo que pudiera explicarse por la diferente procedencia de las proteínas analizadas (células de ovarios de hamsters chino, glándula mamaria de ratón y glándula mamaria de chiva). Se ha reportado que durante el proceso de incorporación de oligosacáridos a la cadena polipeptídica de 166 aminoácidos ocurren cambios sutiles en las cadenas de carbohidratos responsables de la microheterogeneidad de la molécula y la

generación de múltiples isoformas o glicofomas dentro de una misma preparación. Se ha demostrado que este proceso de glicosilación está influenciado por la naturaleza de la célula hospedera y por las condiciones ambientales, lo que explica la obtención de patrones electroforéticos distintos para las preparaciones de EPO estudiadas (8,9).

Por último se puede observar en estas figuras la influencia de los procedimientos cromatográficos utilizados durante la purificación de la hormona de manera tal que se eliminan o refuerzan isoformas expresadas en el medio de cultivo. Este es el caso de las EPOref. y EPO-CHO ambas procedentes de la misma célula hospedera (células de ovarios de hamsters chino) pero purificadas por matrices cromatográficas diferentes.

La EPOref. se purificó por cromatografía de intercambio iónico-aniónico quedando retenidas en la matriz cromatográfica las moléculas con predominio de cargas negativas, desechándose las glicofomas básicas; los resultados de la corrida electroforética no muestra bandas en la zona básica y sin embargo se observa el reforzamiento de bandas en la zona ácida, esta preparación se utilizó como marcador para el ánodo. La EPO-CHO fue purificada por cromatografía de afinidad en matriz Blue-Sepharosa y Quelato-Sepharosa donde sí están presentes todas las glicofomas sintetizadas.

**La figura 3** muestra los resultados del DOT-BLOT donde se logró la detección mínima de 0.15ng de EPO, incrementándose el nivel de detección a cientos de picogramos, resultado alentador para la estandarización de esta metodología en el Laboratorio Antidoping del IMD .



Teniendo en cuenta que la EPO en la orina se encuentran alrededor de 10 ng/L (6); al concentrarse el fluido mil veces (7), se obtendría una muestra de 10 ng/uL, lo cual es equivalente a la detección de 200 pg en 20 uL de aplicación, valor de concentración superior al visualizado en la figura 3.

Previo a la extrapolación de este resultado a FI deben analizarse por DOT-BLOT muestras con concentraciones inferiores a la detectada, ajustando los pasos de: lavado, transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF y tiempo de exposición con el revelado quimioluminiscente. El propósito de estos experimentos es disminuir los niveles de fondo de la quimioluminiscencia y aumentar la eficiencia de la transferencia de las proteínas. Las modificaciones pretenderían incrementar la sensibilidad del método y visualizar todas las glicofomas presentes en la EPO natural y recombinante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Isoelectric Focusing. Principles and Methods. Pharmacia Fine Chemicals.
- 2- Winearls C.G, Oliver D.O, Pippard M.J, Reid C, Downing M.R, Cotes P.M. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* 1986; 2: 1175-1178.
- 3- Locatelli F, Del Vecchio L. Dabepoetin alfa Amgen. *Curr Opin Investig Drugs* 2001; 2: 1097-104
- 4- Lasne F, Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine, an artificial hormone taken to boost athletic performance can now be detected. *Nature* 2000; 405: 635.
- 5- Lasne F. Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J. Immunol. Methods* 2001; 253: 125-131.
- 6- Lasne F, Martin L, Crepin N, Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal. Biochem.* 2002; 311: 119-126
- 7- Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT), código MS020E05.
- 8- Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M. Carbohydrate structure of erythropoietin cDNA. *J Biol. Chem.* 1987; 262: 12059-12076
- 9- Rice K.G, Takahashi N, Namiki Y, Tran A.D, Lisi P.J, Lee Y.C. Quantitative mapping of the N-linked sialoligosaccharides of recombinant erythropoietin: combination of direct high-performance anion-exchange chromatography and 2-aminopyridine derivatization. *Anal. Biochem.* 1992; 206: 278-287.