

22

CAPÍTULO

SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS, HORMÔNIOS E O CONTROLE DA DOPAGEM NO ESPORTE

Cinthia de Carvalho Mantovani
Marcelo Filonzi dos Santos
Mauricio Yonamine

22.1 INTRODUÇÃO

“*Doping*” pode ser definido como o uso de métodos e substâncias com o objetivo específico de aumentar o desempenho em atividades físicas e/ou mentais, apesar dos efeitos adversos para a saúde¹. A etimologia vem do idioma dos *boers*, uma população localizada ao sul da África. “Dop” é uma infusão estimulante utilizada em festas religiosas dessa população sul-africana².

A busca constante do homem de se superar, obtendo resultados positivos para a força e potência, está presente em todos os momentos da história da humanidade. Na Bíblia, segundo Csáky, ocorreu um caso de dopagem: Eva ofereceu o fruto proibido a Adão, afirmando que, se ele o comesse, ficaria tão forte e poderoso quanto Deus³.

Há relatos bibliográficos nos quais, o imperador chinês Shen-Nunge, no ano de 2737 a.C., descreve o efeito estimulante da planta “Ma Huang”, utilizada pelos atletas chineses. De fato, essa folha contém altas concentrações de efedrina, um estimulante do sistema nervoso central que teria a capacidade de aumentar a força de trabalho⁴. Sabe-se também da utilização, por atletas gregos, de dietas especiais e estimulantes, cujo objetivo era deixá-los mais fortes e aptos à prática esportiva.

No início do século XIX, era frequente a ingestão pelos ciclistas e outros atletas de alto desempenho de álcool, cafeína, cocaína e estricnina. Nos Jogos Olímpicos de 1904, Thomas Hicks obteve o primeiro lugar na maratona com a ajuda de ovo cru, injeções de estricnina e doses de conhaque durante a prova. As restrições ao uso de drogas nos esportes tornaram-se evidentes durante a década de 1920⁵.

Nos Jogos Olímpicos de Los Angeles de 1932, houve rumores de que as vitórias da equipe de natação japonesa estavam associadas ao uso de substâncias^{6,7}. Há relatos do uso de estricnina nos Jogos de Melbourne, em 1956⁸.

Os esteroides anabolizantes ainda não eram amplamente utilizados durante as competições olímpicas de 1960, limitando-se aos atletas da antiga União Soviética e levantadores de peso dos Estados Unidos. Porém, a informação de que essas substâncias seriam capazes de aumentar a massa muscular propiciou sua utilização sem qualquer controle, principalmente nos esportes nos quais o uso da força é o diferencial, como levantamento de peso, arremesso, lançamento, saltos e corridas. Na olimpíada seguinte, em 1964, era visível a nítida diferença entre prováveis competidores usuários de anabolizantes e aqueles que não os utilizaram^{9,10,11,12}.

Ainda na década de 1960, utilizou-se o *doping* sanguíneo. Um pouco antes das competições de ciclismo, esqui e provas de velocidade, atletas europeus receberam a transfusão de glóbulos vermelhos, hemocomponentes responsáveis pelo transporte de oxigênio¹³.

22.2 CRIAÇÃO DE REGULAMENTOS DO CONTROLE DA DOPAGEM

Com o objetivo de manter o ideal olímpico e preservar o espírito dos Jogos, em 1967 foi criado o Comitê Olímpico Internacional (COI) ou, em inglês, International Olympic Committee (IOC). Esse comitê, formado por especialistas em medicina do esporte e toxicologia, criou a Lista de

Substâncias Proibidas, cuja atualização é anual (ver adiante). A primeira relação de substâncias e métodos proibidos é mostrada na Tabela 22.1. Os primeiros testes para dopagem em eventos olímpicos ocorreram nos Jogos Olímpicos de Inverno de Grenoble, em 1968, e nos Jogos de Verão, na Cidade do México¹⁴.

Tabela 22.1 Primeira listagem de classes de substâncias e métodos proibidos elaborada pelo Comitê Olímpico Internacional

| ANO | CLASSES DE SUBSTÂNCIAS E MÉTODOS PROIBIDOS |
|------|--|
| 1967 | Estimulantes do sistema nervoso central |
| | Estimulantes psicomotores |
| | Aminas simpatomiméticas |
| | Analgésicos narcóticos |

Em 1998, em Lausanne, na Suíça, ocorreu o I Simpósio Mundial *Antidoping*, cuja finalidade era resolver as dúvidas geradas pelo Tour de France, em 1997. No simpósio, surge a pergunta: “Quem deve realizar o exame *antidoping*? O Estado ou o movimento olímpico”? O simpósio é finalizado com a criação da Agência Mundial Antidopagem (AMA), com sede em Lausanne e composta por representantes dos cinco continentes, com base na igual representação do movimento olímpico e autoridades públicas¹⁴. A AMA (em inglês, World Anti-Doping Agency – WADA), criada em 1999, é o órgão máximo mundial no controle *antidoping*.

O primeiro exame *antidoping* realizado no Brasil ocorreu antes da criação do COI: no dia 23 de abril de 1964, em um jogo de futebol entre as equipes do Grêmio e Internacional². Esse evento tem apenas valor histórico.

No Brasil, oficialmente, o controle oficial de dopagem foi implementado em 1972, pela Deliberação nº 5/72 do Conselho Nacional de Desportos (CND). Em 2003, foi instituída a Comissão de Combate ao *Doping*, que propôs ao Conselho Nacional de Esportes (CNE), através das diretrizes registradas na Resolução nº 2 (de 2004), do Ministério do Esporte, as normas básicas de controle de dopagem nas partidas, provas ou equivalentes do desporto¹⁵.

Em 2008, através do Decreto nº 6.653, é promulgada a convenção internacional contra o *doping* nos esportes, celebrada em Paris, no dia 19 de outubro de 2005¹⁶. Através do Decreto nº 7.630, de 2011, foi instituída a Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem (ABCD), na estrutura

regimental do Ministério do Esporte. O Brasil, país-sede dos Jogos Olímpicos e Paraolímpicos de 2016, cujas competições ocorreram na cidade do Rio de Janeiro, atendeu à exigência da WADA, com a criação de um órgão específico de controle de dopagem no país¹⁷.

22.3 CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES DE DOPAGEM

O controle antidopagem objetiva preservar os valores reais das competições, ou seja, o real espírito do esporte. Este pode ser definido como a celebração do espírito, corpo e mente humanos, e tem agregados os seguintes valores:

- Ética, jogo justo e honestidade.
- Saúde.
- Excelência em desempenho.
- Educação e caráter.
- Alegria e diversão.
- Trabalho em equipe.
- Empenho e dedicação.
- Respeito por regras e leis.
- Respeito próprio e com os outros participantes.
- Coragem.
- Comunidade e solidariedade.

De fato, o *doping* é fundamentalmente contrário ao espírito do esporte¹⁸.

Anualmente, no mês de janeiro, a WADA atualiza as listas de substâncias e métodos proibidos*. Outras federações esportivas utilizam essa listagem para a elaboração de regulamentações.

Existem, de acordo com a classificação da WADA, diferentes agentes de dopagem e métodos proibidos cujo controle pode ocorrer dentro e/ou fora das competições esportivas¹⁹. A listagem completa é relativamente grande e não será apresentada na íntegra neste capítulo. A informação completa está disponível na *homepage* da WADA. Para fins didáticos, as seguintes substâncias e métodos são apresentados, de acordo com os critérios da entidade:

* Disponíveis em <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List/>.

Substâncias (S) e métodos (M) proibidos dentro e fora do período de competições

- S0. Substâncias não aprovadas: qualquer substância farmacológica não aprovada por agências reguladoras governamentais.
- S1. Agentes anabólicos
 - 1) Esteroides anabólicos androgênicos
 - 2) Outros agentes anabólicos
- S2. Hormônios peptídicos, fatores de crescimento e substâncias correlatas
 - 1) Agentes estimulantes da eritropoiese
 - 2) Gonadotrofina coriônica (*chorionic gonadotropin* – CG) e hormônio luteinizante (*luteinizing hormone* – LH) em indivíduos do sexo masculino
 - 3) Corticotrofinas e seus fatores de liberação
 - 4) Hormônio do crescimento (*growth hormone* – GH), fator de crescimento do tipo insulina (*insulin-like growth factor-1* – IGF-1), fatores de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* – FGFs), fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor* – HGF), fatores de crescimento mecânico (*mechanogrowth factor* – MGFs), fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* – PDGF) e fator de crescimento vascular-endotelial (*vascular endothelial growth factor* – VEGF)
- S3. Beta-2 Agonistas
- S4. Moduladores hormonais e metabólicos
 - 1) Inibidores da aromatase
 - 2) Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (*selective estrogen receptor modulators* – SERMs)
 - 3) Outras substâncias antiestrogênicas
 - 4) Agentes modificadores da(s) função(ões) da miostatina
 - 5) Moduladores metabólicos
 - a) Insulina
 - b) Agonistas do receptor ativado de proliferação peroxissomal δ (*peroxisome proliferator-activated receptor delta* – PPAR δ) e agonistas do eixo proteína quinase PPAR δ -AMP-ativada (*AMP-activated protein kinase* – AMPK)
- S5. Diuréticos e outros agentes mascarantes
- M1. Manipulação de sangue e componentes sanguíneos

- 1) A administração ou reintrodução de qualquer quantidade e de qualquer origem autóloga, alogênica (homóloga) ou heteróloga de sangue ou células vermelhas no sistema circulatório
- 2) Transportadores de oxigênio artificiais
- 3) Qualquer forma de manipulação intravascular de sangue ou componentes sanguíneos por meios químicos ou físicos
 - M2. Manipulação química e física
- 1) Adulteração, ou tentativa de adulteração, a fim de alterar a integridade e validade das amostras coletadas no controle de dopagem
- 2) Infusão intravenosa e/ou injeção de volume superior a 50 mL em um período de 6 horas, exceto para atletas com justificativa médica
 - M3. *Doping* genético
- 1) Transferência de ácidos nucleicos ou fragmentos de ácidos nucleicos
- 2) Uso de células normais ou geneticamente modificadas

Substâncias (S) e métodos (M) proibidos durante competições

- S6. Estimulantes
 - 1) Estimulantes não especificados
 - 2) Estimulantes especificados
- S7. Narcóticos
- S8. Canabinoides
- S9. Glicocorticoides

Substâncias (P) proibidas em esportes específicos

- P1. Álcool
- P2. Betabloqueadores

22.4 CONTROLE DA DOPAGEM

Como já dito, o controle da dopagem iniciou-se, efetivamente, no ano de 1968. As competições monitoradas foram os Jogos Olímpicos de Inverno, na cidade de Grenoble, na França, e nos Jogos de Verão, na Cidade do México¹⁵. Nessas oportunidades, foram analisados somente alguns estimulantes e narcóticos, pois a tecnologia analítica existente era limitada²⁰.

Nas Olimpíadas de Munique, em 1972, foi utilizada pela primeira a tecnologia de cromatografia gasosa (CG, ou, em inglês, *gas chromatography* – GC) acoplada ao detector de nitrogênio-fósforo (DNP, ou, em inglês, *nitrogen-phosphorus detector* – NPD) para as triagens das amostras²¹, buscando-se estimulantes e opioides²². Um sistema de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (EM, ou em inglês, *mass spectrometry* – MS) foi utilizado para confirmações²³.

No início da década de 1970, não havia métodos analíticos padronizados disponíveis para a análise de esteroides anabolizantes por GC-MS. Além disso, não eram possíveis, ainda, testes de rotina em larga escala. Essa situação impulsionou a pesquisa e o desenvolvimento de testes de triagem com a tecnologia de imunoensaios. Não era um teste específico para o uso de esteroides anabolizantes, pois a urina humana pode conter tais substâncias de origem endógena²³.

Durante as Olimpíadas de Montreal, ocorrida em 1976, 15% das amostras foram analisadas em busca de esteroides anabolizantes, utilizando a técnica de imunoensaios²².

Um fato curioso ocorreu após as Olimpíadas de Moscou, em 1980: após as competições, o dr. Manfred Donike desenvolveu um novo método para análises de testosterona exógena. A técnica foi aplicada retroativamente em todas as amostras de urina. Os resultados apontaram 20% de positividade em todos os atletas, incluindo homens e mulheres. Nesse grupo, houve dezesseis medalhistas de ouro²⁴.

Nos Jogos Olímpicos de Los Angeles, em 1984, já se conhecia o hormônio do crescimento, assim como seu uso para melhora no desempenho esportivo²⁴ (e, após três olimpíadas, em 1996, alguns atletas referiram-se aos Jogos Olímpicos de Atlanta como os “jogos do hormônio do crescimento”, devido à grande utilização entre os competidores²⁵).

Ainda em 1984, ao término das atividades, 24 ciclistas masculinos da equipe norte-americana também admitiram *doping* sanguíneo antes das competições^{26,27}. Nesse ano, como resultado da parceria entre a empresa Hewlett-Packard, (fabricante de instrumentos científicos e computadores) e a Universidade da Califórnia, houve a possibilidade de análise de 100% das amostras para esteroides anabolizantes. A razão testosterona/epitesterona, utilizada como critério para detectar o uso proibido de testosterona, foi determinada empregando a tecnologia de GC-MS²².

O destaque negativo nos Jogos de Seul, em 1988, foi a constatação de uso de um esteroide anabolizante pelo velocista Ben Johnson. Não foi o único caso positivo: dois levantadores de peso, medalhistas de ouro, apresentaram

diuréticos na urina²⁴. Uma investigação do jornal *The New York Times* concluiu que pelo menos metade dos atletas utilizaram esteroides anabolizantes durante essa olimpíada na tentativa de melhorar o desempenho²⁸.

Na década seguinte, verificou-se o uso de esteroides anabolizantes, hormônio de crescimento e eritropoietina recombinante não somente no halterofilismo e em provas de velocidade, mas também no hóquei, natação, ciclismo, voleibol, handebol, pentatlon e futebol^{24,29}.

Em 2000, nos Jogos de Sidnei, novamente o uso de substâncias proibidas foi o destaque das competições. Houve dezenas de artigos publicados a respeito desse problema no esporte³⁰⁻³⁸.

Para o controle da dopagem na América Latina, há três países credenciados pela Associação Mundial *Antidoping*, localizados, respectivamente, na América Central, América do Sul e América do Norte: Cuba, Colômbia e México³⁹.

No Brasil, através da Federação Paulista de Futebol, no ano de 1974, introduziu-se o controle da dopagem, com exames realizados no Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (LAT/FCF/USP)¹⁵.

Durante os anos de 1993 a 2004, no mundo, observa-se que a porcentagem de resultados analíticos adversos, ou seja, positivos, variou de 1% a 2%. Esteroides anabolizantes, estimulantes, corticosteroides e *cannabis* foram as classes de substâncias com maiores incidências, conforme mostrado na Tabela 22.2¹⁵.

Tabela 22.2 Quantificação dos agentes de dopagem, classificados e analisados entre 1994 e 2004

| CLASSES | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 |
|----------------------------------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Agentes anabólicos | 891 | 986 | 1.131 | 967 | 856 | 973 | 946 | 914 | 966 | 872 | 1.191 |
| Hormônios | 3 | 9 | 4 | 5 | 12 | 20 | 12 | 26 | 41 | 79 | 78 |
| Agonista beta-2* | — | — | — | 393 | 479 | 536 | 489 | 398 | 382 | 297 | 381 |
| Diuréticos e agentes mascarantes | 78 | 73 | 60 | 101 | 92 | 142 | 96 | 126 | 159 | 161 | 157 |
| Estimulantes | 347 | 310 | 281 | 356 | 412 | 532 | 453 | 352 | 392 | 516 | 382 |
| Narcóticos | 42 | 34 | 37 | 47 | 18 | 9 | 14 | 29 | 13 | 26 | 15 |
| Canabinoides | 75 | 224 | 154 | 164 | 233 | 312 | 295 | 298 | 347 | 378 | 518 |
| Corticosteroides | 2 | — | — | — | — | — | 89 | 46 | 249 | 286 | 548 |
| Betabloqueadores | 15 | 14 | 6 | 11 | 12 | 24 | 21 | 20 | 15 | 30 | 25 |

* Antes de 1996, possuíam a classificação de “agentes anabólicos”.

Os cientistas mundiais dos esportes estão em constante luta contra o tempo, buscando novas tecnologias para detectar substâncias proibidas nas competições. Para todos os profissionais envolvidos nos exames de dopagem, o maior desafio é a enorme heterogeneidade bioquímica e metabólica das substâncias utilizadas para o *doping*⁴⁰.

22.5 SUBSTÂNCIAS PROIBIDAS

Nas seções subsequentes, serão abordadas as substâncias proibidas pela WADA no ano de 2014. Por razões didáticas, estas serão divididas em “substâncias exógenas” e “substâncias endógenas e similares sintéticos”. De maneira geral, as substâncias como os beta-2 agonistas, moduladores hormonais e metabólitos, diuréticos, estimulantes, narcóticos, canabinoides e betabloqueadores, constantes do primeiro grupo, são produzidas através de síntese química. Ademais, o controle da dopagem no esporte para estas é realizado através de técnicas cromatográficas. Dessa forma, tendo em vista o escopo do presente livro, a abordagem de tais substâncias será sucinta.

Maior enfoque será dado ao tópico “substâncias endógenas e similares sintéticas” já que este se destina a explanação acerca de hormônios e peptídeos que apresentam correlação com técnicas de biotecnologia em sua produção e/ou detecção no controle da dopagem no esporte.

22.5.1 Substâncias exógenas

Os beta-2 agonistas são potentes broncodilatadores utilizados há muito tempo na terapêutica para controle da asma. Além dessa aplicação, também são empregados na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e em outras doenças respiratórias, podendo ser utilizados isoladamente ou em combinação com corticosteroides inalatórios⁴¹⁻⁴³.

Na prática esportiva, esses fármacos são usados devido ao potencial efeito anabolizante e estimulante. Na parte anaeróbia, ocorre aumento da massa muscular em consequência da inibição da degradação proteica^{44,45}. Na parte aeróbia, estudos sugerem aumento do rendimento físico após a inalação de salbutamol, salmeterol, formoterol e terbutalina. O clenbuterol parece estimular diretamente as células lipídicas e acelerar a quebra de triglicerídeos para formar ácidos graxos livres. O efeito termogênico do clenbuterol pode ser aumentado com o uso concomitante de hormônios da tireoide e/

ou hormônio de crescimento⁴⁶. Os principais efeitos colaterais são: tremores musculares, vasodilatação pulmonar, vertigens, sudorese, câibras musculares, parada cardíaca²².

Já os diuréticos são agentes terapêuticos utilizados para aumentar a taxa de excreção urinária e eliminação de sódio, a fim de ajustar o volume e composição dos fluidos corpóreos ou eliminar excesso de líquidos dos tecidos. Eles são utilizados na terapia clínica para o tratamento de diversas doenças e síndromes, tais como hipertensão, cirrose hepática, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, doenças renais e pulmonares e, de modo geral, redução dos efeitos adversos da retenção de sais e/ou água⁴⁷. Os diuréticos foram inicialmente proibidos nos esportes (durante e fora das competições) em 1988. Duas características dos diuréticos motivaram sua inclusão na listagem de substâncias proibidas. Devido às suas propriedades farmacológicas, os diuréticos promovem rápida perda de água, resultando em diminuição da massa corpórea. Dessa forma, são utilizados por atletas de modalidades esportivas em que o peso determina a categorização do competidor. Além disso, os diuréticos podem ser usados para mascarar a administração de outras substâncias proibidas através do aumento do volume urinário, e consequente redução na concentração dos marcadores da dopagem nesta amostra. Os efeitos colaterais mais relatados são desidratação, problemas renais, dores de cabeça, náuseas e câibras. Em particular, o fármaco espirolactona pode causar ginecomastia, impotência sexual e menstruação irregular⁴⁸.

Os estimulantes, por sua vez, são utilizados para melhora do desempenho esportivo pois, devido ao aumento nas neurotransmissões do sistema nervoso central, acarretam maior estimulação mental, melhora na concentração e fortalecimento da resistência física⁴⁹. As principais substâncias dessa classe, cafeína, anfetamina, efedrina e cocaína, atuam sobre o sistema monoaminérgico, afetando os níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina. Dentre os efeitos colaterais correlacionados ao uso dessas substâncias, pode-se citar aumento da pressão arterial, dor de cabeça, arritmia, ansiedade e tremores²².

Os narcóticos representam uma importante classe farmacológica de analgésicos, com ação no sistema nervoso central. São utilizados pelos atletas para alívio da dor, de modo que, sob efeito dessas substâncias, mesmo com lesões musculares os competidores tornam-se capazes de realizar esforços físicos⁴⁹. Os principais efeitos adversos são constipação e sonolência⁵⁰.

O uso de canabinoides (substâncias presentes na maconha, haxixe e *skank*) e a melhora no desempenho esportivo é considerado tema controverso. O consumo de canabinoides antes da competição pode resultar em tomada de decisão inadequada pelo atleta, acarretando sérias lesões ou

acidentes envolvendo outros competidores, principalmente em eventos nos quais os movimentos devem ser realizados em curtos espaços de tempo⁵¹. Uma possível utilização como agente de dopagem pode estar correlacionada à ação nos sistemas de recompensa e prazer do cérebro, resultando numa diminuição da ansiedade e estresse dos atletas⁵². Os efeitos adversos incluem o desenvolvimento de esquizofrenia e outras doenças mentais, respiratórias crônicas e câncer⁵³.

Os betabloqueadores são proibidos em alguns esportes específicos, os quais necessitam de precisão para serem praticados. Esses fármacos são responsáveis por diminuir a frequência cardíaca e tremores dos atletas, podendo representar melhora no desempenho esportivo em modalidades de tiro, arco e flecha e sinuca⁵⁰. Os principais efeitos adversos associados ao uso de betabloqueadores são fadiga, redução da temperatura de extremidades corpóreas, hipoglicemia e broncoespasmos em atletas asmáticos.

O consumo de bebidas alcoólicas é prática antiga na humanidade e, devido à sua venda lícita, o etanol é a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo. Na dopagem no esporte, atletas poderiam fazer uso do álcool com o objetivo de aumentar a autoconfiança e diminuir a tensão e o estresse. Entretanto, estudos mostram que o consumo de álcool entre os atletas está correlacionado com efeitos negativos sobre a saúde e o desempenho esportivo. Em baixas doses, o álcool apresenta efeitos sedativos sobre o atleta; em altas doses, observa-se comprometimento da habilidade psicomotora, como tempo de reação, equilíbrio e coordenação⁵⁴. Dessa forma, esta é uma substância proibida em diversos esportes.

De maneira geral, a detecção das substâncias supracitadas, ou de seus biomarcadores, em amostras biológicas dos atletas é suficiente para que seja configurado um caso de dopagem no esporte. Para algumas substâncias específicas, são tolerados níveis máximos da substância nas amostras biológicas e, em outros casos, como citado, o fármaco pode ser utilizado pelo atleta desde que haja prévia autorização, baseada em indicação médica. Resumidamente, as análises conduzidas para o controle da dopagem de tais substâncias consistem, inicialmente, em testes imunológicos de triagem. Caso algum resultado positivo seja identificado, este é então confirmado através de técnicas de cromatografia líquida ou gasosa acopladas a detectores de chamas, nitrogênio-fósforo, espectrometria de massas, dentre outros.

22.5.2 Substâncias endógenas e similares sintéticos

22.5.2.1 Esteroides anabólicos androgênicos

Por estimular a síntese de proteínas, esses hormônios contribuem para o desenvolvimento dos músculos esqueléticos, com aumento de força (5% a 20%) e peso corporal (2 Kg a 5 Kg), devido ao ganho de massa corporal magra. Parece não melhorar o rendimento aeróbio⁵⁵.

Os efeitos adversos do uso de esteroides são: hirsutismo, acne, atrofia testicular, alopecia, ginecomastia em homens, virilização de mulheres, hipertrofia clitoriana e problemas hepáticos⁵⁶.

22.5.2.2 Glicocorticoides

Glicocorticoides são hormônios fisiológicos produzidos na região do córtex renal. Na clínica médica, seu potencial terapêutico é incontestável em várias doenças crônicas inflamatórias. Na área esportiva, sua utilização por via oral, retal, intravenosa e intramuscular é proibida, sendo permitida somente em preparações dermatológicas (cremes e pomadas, por exemplo) e em condições terapêuticas, nas quais é necessário informar seu uso para “autorização de uso terapêutico”. Devido às suas propriedades farmacológicas proporcionarem alívio da dor e da inflamação de tecidos lesionados, seu uso, quando não autorizado, é classificado como *doping*⁵⁷. Os principais efeitos colaterais são fragilidade dos tendões, rompimentos musculares, retenção hídrica, fadiga crônica, infecções locais e generalizadas e problemas cardiovasculares.

22.5.2.3 Hormônio do crescimento humano e fator de crescimento semelhante à insulina I

O hormônio de crescimento humano (*human growth hormone* – hGH) é um hormônio peptídico produzido e secretado pela hipófise⁵⁸. O hGH é responsável pelo estímulo de inúmeros processos celulares, apresentando efeitos sobre o metabolismo proteico, lipídico, mineral e de carboidratos⁵⁹.

O hGH foi obtido pela primeira vez em 1956 através da extração e purificação de glândulas pituitárias cadavéricas, sendo empregado no tratamento

de pacientes com hipopituitarismo. Durante muitos anos, o hGH cadavérico foi a única alternativa terapêutica, até que, em 1985, tornou-se prática obsoleta devido à sua correlação com o desenvolvimento da doença priônica de Creutzfeldt-Jakob⁶⁰. Em 1987, a indústria farmacêutica passou a comercializar a primeira versão do hormônio do crescimento humano recombinante (*recombinant human growth hormone* – rhGH).

O início da utilização do hGH como agente de dopagem é desconhecido; entretanto, publicações científicas indicam que na década de 1980 atletas já utilizavam tal hormônio, visando obter aumento no desempenho esportivo. Inicialmente empregado por praticantes de esportes que requerem força, atualmente sua utilização estende-se também a outras modalidades, como de resistência. Devido às dificuldades no controle da dopagem no esporte, acredita-se que este seja um dos principais agentes utilizados pelos atletas⁶¹.

Quando utilizado no tratamento da deficiência de hGH, observa-se a normalização da composição corporal dos indivíduos com aumento da massa muscular e redução do componente lipídico, assim como melhora da capacidade aeróbica e aumento do consumo máximo de oxigênio⁵⁶. De maneira geral, o hGH é administrado a atletas por longos períodos e em doses até dez vezes maiores do que a terapêutica⁵⁸. Além disso, tendo em vista que o hGH estimula a síntese proteica por mecanismo distinto daquele dos esteroides anabolizantes, essas substâncias são utilizadas em combinação pelos atletas, a fim de obter efeito aditivo sobre o desenvolvimento muscular⁶¹.

Apesar de sua utilização como agente da dopagem no esporte, o aumento do desempenho esportivo é questionável^{58,62}. Além disso, tendo em vista as doses suprafisiológicas empregadas pelos atletas, diversos efeitos deletérios são correlacionados com tal prática. Acromegalia, retenção de fluidos, inchaço nos tornozelos, hipertensão, dor de cabeça, diabetes e cardiomiopatia caracterizada por anormalidades na estrutura e função do músculo cardíaco são alguns dos possíveis efeitos adversos da dopagem no esporte com hGH^{56,63}. Ademais, embora atualmente a produção de hGH pela indústria farmacêutica seja realizada através de tecnologia de DNA recombinante, ainda é possível encontrar no mercado negro suprimentos de hGH cadavérico, o que pode ocasionar o desenvolvimento da doença priônica de Creutzfeldt-Jacob⁶³.

A detecção da dopagem no esporte por rhGH é, atualmente, um dos maiores desafios para as agências e laboratórios antidopagem. Diferentemente de outras substâncias usadas na dopagem, o rhGH não pode ser distinguido do hGH endógeno, já que ambos apresentam sequência de aminoácidos idêntica. Dessa forma, é necessária a detecção de níveis acima do

fisiológico para que a dopagem com rhGH seja comprovada. Entretanto, esta é uma abordagem que também apresenta inúmeras limitações⁶³. O hGH apresenta meia-vida plasmática consideravelmente reduzida, de aproximadamente 15 minutos, e de 8 a 16 horas após administração intramuscular e 11 a 20 horas após administração intracutânea do rhGH os níveis do hormônio voltam aos valores basais. Além disso, os níveis circulantes do hGH são consideravelmente variáveis devido ao padrão pulsátil de secreção e à influência de diversos fatores como idade, exercícios, sono, estresse e estado nutricional⁶². Consequentemente, a detecção de elevada concentração sérica pode ser meramente reflexo da secreção endógena do hormônio⁶³.

Tendo em vista as limitações anteriormente citadas, duas abordagens têm sido preconizadas como adequadas para a identificação da dopagem no esporte por rhGH. A primeira delas consiste na detecção das diferentes isoformas moleculares do hGH. O hGH endógeno ocorre no organismo em múltiplas isoformas, todas derivadas de um único gene presente na hipófise. A isoforma majoritária é a de 22 KDA, seguida pela isoforma de 20 KDA e, em menor proporção, pelos fragmentos de 17 KDA⁵⁶. Sabe-se que, como resposta à administração de rhGH, ocorre aumento de diversos fatores que, através de *feedback* negativo, inibem a secreção endógena de hGH. Diferentemente do hGH, o rhGH consiste somente na isoforma de 22 KDA. Dessa forma, quando da administração de rhGH, a relação entre as isoformas é alterada, sendo observado aumento na proporção de 22 KDA frente às outras isoformas. Essa alteração na proporção é atualmente a base teórica do método de detecção da dopagem no esporte por rhGH⁶².

A proporção entre a isoforma de 22 KDA e as demais isoformas do hGH é determinada através de dois imunoenaios que empregam anticorpos monoclonais. Um dos ensaios é responsável pela detecção da isoforma de 22 KDA e outro pela detecção das demais isoformas do hGH. A elevação da razão entre os ensaios é utilizada para detectar os casos de dopagem esportiva, sendo que os *cutoffs* empregados pela WADA foram derivados de análises de amostras de atletas quando em condições reais de controle da dopagem^{64,65}. Ademais, a WADA preconiza que qualquer resultado analítico adverso deva ser confirmado por teste diferente daquele empregado na análise inicial. Dessa forma, para detecção da dopagem por rhGH são utilizados dois kits diferentes de imunoenamo, que, apesar de apresentarem princípio comum, reconhecem diferentes epítomos do hormônio⁶³.

Os imunoenaios empregados atualmente pelos laboratórios acreditados pela WADA consistem em tubo revestido com anticorpos de captura e anticorpos de detecção diretamente rotulados com éster de acridina, que

apresenta sinal luminescente quando excitado por energia específica. Esses ensaios apresentam prolongada estabilidade e elevada sensibilidade e especificidade^{58,65}. Entretanto, o método de detecção através das isoformas apresenta limitações. A principal desvantagem desse método é a sua estreita janela de detecção, já que o rhGH é depurado rapidamente do organismo, e 48 horas após a administração de rhGH a secreção do hormônio endógeno volta ao normal. Assim, essa técnica apresenta maior aplicabilidade nos testes fora de competição⁶³. Vale ainda lembrar que a administração de hGH cadavérico, disponível comercialmente no mercado negro, não pode ser detectada por essa metodologia por apresentar a mesma composição de isoformas que o hGH endógeno⁶⁵.

Essa abordagem foi aplicada pela WADA inicialmente no controle da dopagem dos jogos olímpicos de Atenas (2004) e Turim (2006), e nenhum resultado positivo foi verificado⁶².

A segunda abordagem empregada para detecção da dopagem no esporte com hGH baseia-se no princípio de que a sua ação anabólica e metabólica acarreta produção de proteínas que podem ser utilizadas como marcadores da administração desse hormônio⁶³. Os estudos epidemiológicos *GH-2000* e *GH-2004*⁵⁸, patrocinados pelo COI, União Europeia, WADA e U. S. Anti-Doping Agency (USADA), foram conduzidos com o objetivo de identificar e avaliar a aplicabilidade de diferentes marcadores. Dentre os 25 potenciais marcadores da utilização de rhGH, dois deles, o fator de crescimento relacionado à insulina (IGF-I) e o peptídeo pró-colágeno tipo III (P-III-NP), foram selecionados para o controle da dopagem no esporte. Estes apresentam vantagens frente à metodologia anteriormente descrita, já que a variação diária nos níveis de ambos os marcadores e a influência de fatores como gênero, etnia, prática de exercícios e lesões esportivas é reduzida⁵⁸. Além disso, o aumento nos níveis desses marcadores é dependente da dose de rhGH administrada, e as chances de resultado falso positivo são reduzidas, pois o IGF-I e o P-III-NP são produzidos em tecidos diferentes⁶³. A janela de detecção dessa abordagem é de uma a duas semanas, mais longa do que aquela da detecção das isoformas⁶⁵.

O IGF-I é um hormônio peptídico com 70 aminoácidos, massa de 7,6 KDa e uma estrutura bastante homóloga à da insulina e da proinsulina⁶⁶. Ele é secretado por vários tecidos, mas o fígado é a principal fonte do IGF-I circulante⁶⁷.

Muitos tecidos apresentam atividade anabólica estimulada pela ação do IGF-I, resultando na síntese de DNA e várias proteínas⁶⁸. Ele exerce seus efeitos após ligar-se ao receptor do tipo 1, estruturalmente semelhante ao

receptor de insulina. Esse receptor é expresso na superfície de vários tecidos, exceto no fígado e adipócitos^{69,70}.

O IGF-I circulante encontra-se ligado a seis proteínas ligantes de IGF, denominadas IGFBP-1 até IGFBP-6. Essas proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais, como fosforilação, glicosilação e proteólise. Essas alterações podem modificar as suas afinidades pelo IGF-I. Os IGFBPs exercem papel de proteínas transportadoras na circulação e no meio extracelular, prolongam a meia-vida do IGF-1 e controlam sua liberação metabólica⁷¹.

A forma mais predominante, IGFBP-3, participa da formação de um complexo ternário, cuja massa é 150 KDA. Os constituintes desse complexo são uma molécula de IGFBP-3, uma molécula de IGF-1 e uma glicoproteína (88 KDA), denominada subunidade ácido-volátil (*acid-labile subunit* – ALS). Esse complexo não consegue atravessar o endotélio capilar e atua como um reservatório. A existência deste explica a pequena variação circadiana do IGF-I^{72,73}.

O hormônio IGF-I aumenta a lipólise, a síntese de glicogênio e de proteínas musculares e diminui a degradação de proteína muscular⁷⁴. Uma interessante ação do IGF-I na área esportiva é o aumento da massa muscular. Ratos criados em laboratório, com os nomes sugestivos de “Schwarzenegger”, receberam injeções intramusculares com o gene para IGF-I. Os resultados mostraram de 20% a 30% de aumento nas massas musculares desses roedores, quando comparados com animais controles. Além disso, a expectativa de vida foi maior e a recuperação de lesões, mais rápida^{75,76}. Estudos recentes mostraram o aumento da síntese de colágeno nos tecidos humanos após injeções de IGF-I⁷⁷.

A análise do IGF-I total apresenta a vantagem de ser mais robusta e menos suscetível às variáveis pré-analíticas. Além disso, valores de referência foram estabelecidos para diversas técnicas⁷⁸⁻⁸².

A concentração sérica do IGF-I total varia de acordo com a idade, estado nutricional, fatores hereditários e atividade hormonal (esteroides, insulina, hormônios da tireoide). Os níveis de IGF-I são baixos no nascimento, aumentam durante a infância e têm um pico máximo durante a puberdade. O envelhecimento é acompanhado de uma redução gradual do IGF-I total circulante após a terceira década de vida (10% a cada dez anos)⁸³⁻⁸⁶. Nas análises para quantificar a concentração de IGF-I total é essencial classificar os indivíduos de acordo com a idade. Além da idade, estudos mostraram alta variabilidade entre grupos com pessoas saudáveis, sugerindo, também, a importância de fatores hereditários⁸⁷⁻⁸⁹.

O IGF-I e o P-III-NP podem ser detectados normalmente nos indivíduos. Assim, a comprovação do uso de rhGH é realizada através da detecção de níveis dos marcadores acima daqueles normalmente aferidos nos atletas de elite. Os estudos *GH-2000* e *GH-2004*, através da análise de número significativo de atletas, estabeleceram os valores de referência empregados nos testes de dopagem⁵⁸. Um importante achado desses estudos consiste no fato de que os níveis dos marcadores são dependentes da idade do atleta, sendo que especial cuidado deve ser dispensado no caso de atletas jovens, ainda em fase de crescimento. Esse fato está correlacionado ao padrão de produção do hGH durante a vida, que aumenta durante a puberdade, chegando ao valor máximo no começo da idade adulta e sofrendo declínio posteriormente com o avanço da idade⁶³.

O radioimunoensaio competitivo foi a técnica inicial para a quantificação de IGF-I sérico. O IGF-I circulante está ligado ao IGFBP, e verificou-se que os ensaios sofreram interferência das ligações às proteínas, resultando em valores inexatos e inconsistentes. A cromatografia por filtração de gel ácido foi o método capaz de remover as proteínas interferentes⁹⁰, mas os procedimentos envolvidos nessa técnica são trabalhosos e ela não é usada rotineiramente nos laboratórios. O método mais comum para remover a interferência das proteínas é o deslocamento ácido da IGFBP, com consequente precipitação, deixando o IGF-I livre na amostra⁹¹.

Um problema com essa técnica é que pequenas proteínas ligantes, como, por exemplo, IGFBP1 e IGFBP4, que não se ligam ao ALS, não são removidas completamente durante a etapa de precipitação e permanecem na amostra⁹². Outro problema é a coprecipitação de IGF-I, resultando numa subestimação da concentração do IGF-I⁹³. A técnica de precipitação ácido-etanol pode ser melhorada com a adição de excesso de IGF-II para saturar proteínas ligantes remanescentes após a etapa de precipitação, pois o IGF-II apresenta maior afinidade pelas proteínas ligantes⁹⁴.

As imunoanálises contemporâneas do IGF-I apresentam a tendência de usar o modelo imunométrico não competitivo, pois a especificidade das análises do IGF-I é melhorada com o uso de dois anticorpos em dois sítios anti-gênicos. Além disso, esses ensaios podem ser executados rapidamente com equipamentos automatizados⁹⁵. Entretanto, as etapas pré-analíticas de precipitação com álcool-etanol e/ou adição de excesso de IGF-II são necessárias para minimizar a interferência das proteínas de ligação.

Quando imunoensaios são utilizados em laboratórios *antidoping*, as regras estabelecidas pela WADA exigem a aplicação de dois imunoensaios em cada analito (exemplo: IGF-I), e os anticorpos utilizados nesses

imunoensaios devem reconhecer epítomos diferentes⁹⁶. Não é um requerimento fácil de ser realizado, pois os laboratórios produtores dos testes nem sempre divulgam informações sobre a especificidade do epítopo de seus imunoensaios comerciais. Além disso, os fabricantes podem alterar seus imunoensaios e reagentes sem ampla divulgação e, mais ainda, como apresentado no projeto *GH-2000*, algumas das análises utilizadas nos estudos originais *GH-2000* e *GH-2004* não estão mais disponíveis no mercado. Na prática, kits imunológicos apresentaram resultados inconsistentes para o IGF-I, devido a alterações nas suas composições no decorrer dos anos⁹⁷.

Apesar dos fabricantes seguirem procedimentos operacionais padrão estabelecidos para minimizar variações, é imperativo um sistema de controle de qualidade rigoroso nos ensaios que utilizam o IGF-I⁹⁸. Essa variação limita a comparação de estudos atuais com anteriores. Com o objetivo de resolver esse conflito, pesquisas foram desenvolvidas a fim de alinhar os resultados atuais com os previamente descritos⁹⁹⁻¹⁰¹. A WADA, considerando complicações de natureza jurídica, não pode utilizar essa estratégia de comparações. Atualmente, estão em desenvolvimento limites de decisões específicas para cada análise de IGF-I, quantificando esse hormônio em amostras de atletas de elite⁷⁴.

Imunoensaios são empregados para detecção de IGF-I e P-III-NP. Entretanto, até a data da presente publicação, testes para triagem e confirmação estão sendo desenvolvidos e validados, não estando disponíveis comercialmente para o controle da dopagem. Dessa forma, a abordagem através de marcadores ainda não foi oficialmente aprovada pela WADA⁶⁴.

Além das abordagens anteriormente descritas, outras metodologias estão em desenvolvimento. Técnicas baseadas na aplicação de eletroforese bidimensional (2D-PAGE) seguida por *immunoblotting*, *microarray* para detecção de alterações da expressão gênica de leucócitos do sangue periférico, identificação de novos e mais eficientes marcadores e métodos por espectrometria de massas e nanotecnologia para detecção da dopagem com hGH têm sido estudados no meio científico e, futuramente, podem vir a ser empregados no controle da dopagem⁵⁸.

22.5.2.4 Eritropoietina

A eritropoietina humana (hEPO) é um hormônio glicoproteico produzido predominantemente nos rins. A hEPO estimula a proliferação e diferenciação dos precursores eritroides, estando diretamente relacionada ao número

de eritrócitos circulantes. Em 1985, o gene da hEPO foi isolado e caracterizado, possibilitando a produção de hormônio eritropoietina recombinante (rhEPO) através de técnicas de biotecnologia¹⁰². No final da década de 1980, a rhEPO foi aprovada para uso terapêutico, possibilitando o tratamento de doenças como insuficiência renal crônica, câncer, insuficiência cardíaca crônica, HIV, hepatite C e doenças autoimunes^{23,102,103}.

A rhEPO é obtida por tecnologia de DNA recombinante, sendo sua produção realizada em células de ovário de *hamster* chinês ou em células renais de filhote de *hamster* nas quais o gene humano da EPO foi transfectado¹⁰⁴. A rhEPO apresenta sequência de 165 aminoácidos idêntica à hEPO. Entretanto, seu padrão de glicosilação é dependente da linhagem celular empregada na produção do hormônio e determina a meia-vida deste no organismo, sendo, portanto, essencial para a atividade biológica¹⁰².

Como citado anteriormente, a disponibilidade comercial da rhEPO tornou possível o tratamento de inúmeras doenças em que a produção endógena encontra-se reduzida ou até mesmo extinta. Tendo em vista o aumento no número de eritrócitos circulantes e, conseqüentemente, no aporte de oxigênio para os músculos, esse hormônio tem sido utilizado por atletas com o objetivo de aumentar o desempenho no esporte, especialmente em modalidades aeróbicas como ciclismo e corrida de longa distância¹⁰². Estudos mostraram que o uso da rhEPO aumenta a disponibilidade de oxigênio no organismo e reduz substancialmente o tempo de exaustão dos atletas^{104,105}. Entretanto, a dopagem no esporte com rhEPO tem sido correlacionada a inúmeros efeitos adversos, como falência cardíaca, infarto do miocárdio, hipertensão, trombose, edema e aplasia de células vermelhas¹⁰⁶.

No ano seguinte à aprovação da rhEPO para uso terapêutico, devido às suspeitas acerca de seu uso na dopagem no esporte, a COI adicionou esse hormônio à Lista de Substâncias Proibidas¹⁰⁷. Apesar da proibição, na época inexistiam métodos capazes de detectar as rhEPO em matrizes biológicas. Tendo em vista as limitações metodológicas, diversas federações esportivas internacionais instituíram métodos indiretos para o controle da dopagem no esporte¹⁰³. Essa abordagem baseia-se na mensuração de parâmetros hematólogicos como hemoglobina, hematócrito e reticulócitos, que sofrem alterações quando da administração de rhEPO. Os resultados aferidos dos atletas são então comparados com os valores de referência da população em geral, já que não são observadas diferenças significativas entre esses grupos para os parâmetros anteriormente citados^{102,104}. Embora os métodos indiretos não possam ser empregados como confirmatórios devido à baixa seletividade e especificidade, durante alguns anos foram a única ferramenta disponível

para o controle da dopagem. Um resultado acima dos limites máximos estabelecidos pelas federações poderia ser utilizado para impedir o atleta de participar da competição devido aos possíveis danos à saúde¹⁰³.

Somente uma década após a inclusão das rhEPO à Lista de Substâncias Proibidas no esporte foi desenvolvida uma metodologia passível de ser utilizada no controle da dopagem^{108,109}. Desde 2003, a detecção direta da rhEPO em sangue e urina faz parte do programa oficial antidopagem, sendo regulada pela WADA¹⁰². Em 2009, a agência divulgou documento técnico¹¹⁰ que descreve a metodologia e os critérios para interpretação dos resultados, visando com isso à harmonização dos testes entre os laboratórios¹⁸. Mais recentemente, esse documento foi atualizado¹⁹. Modificações na descrição inicial do procedimento foram necessárias devido à disponibilidade no mercado de rhEPO com características diferentes daquelas inicialmente comercializadas nos anos 1990, o que tornou ainda mais complexa a detecção desses hormônios em matrizes biológicas¹⁰⁷.

As rhEPOs, devido às diferenças na glicosilação, apresentam carga, massa, composição glicídica e ponto isoelétrico diferente da hEPO, o que permitiu a separação e detecção dos hormônios^{103,105,111}. A rhEPO apresenta carga menos negativa se comparada à hEPO, sendo que o eletroferograma do hormônio exógeno apresenta 4 a 5 bandas na região básica, enquanto o hormônio endógeno apresenta 14 bandas nas regiões básica e ácida¹⁰⁶. Na metodologia oficial da WADA, alíquotas de urina ou sangue são inicialmente submetidas à ultrafiltração, precipitação seletiva de proteínas ou imunopurificação. Posteriormente, realiza-se focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE) para separação das isoformas de rhEPO, seguida por duas etapas de *immunoblotting* (*double-blotting*). No primeiro *immunoblotting*, as proteínas do gel são transferidas e incubadas com anticorpo anti-EPO. O segundo *immunoblotting* é realizado com o objetivo de evitar que proteínas presentes na urina reajam com o anticorpo anti-EPO, resultando em interferências no resultado¹⁰⁷. Para tanto, os anticorpos adsorvidos na primeira membrana são transferidos para uma segunda membrana, enquanto o antígeno e as proteínas interferentes permanecem na primeira membrana. Essa segunda membrana é submetida ao segundo *blotting* com anticorpo com afinidade específica ao anti-EPO, sendo a revelação do gel realizada por quimioluminescência^{23,102}.

O documento técnico da WADA¹¹² também determina que nos casos em que há resultado presuntivo de dopagem com rhEPO, eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), eletroforese em gel de poliacrilamida – lauroil sarcosinato de sódio (SAR-PAGE) ou

cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas devem ser realizadas, visando à confirmação do resultado.

Do ponto de vista metodológico, a detecção da rhEPO é tarefa desafiadora por diversos motivos. Sua concentração em sangue e urina é baixa, a detecção do hormônio exógeno não pode ser realizada através de uma única banda e a EPO endógena apresenta isoformas comuns a algumas das rhEPOs¹⁰². Além disso, os efeitos da administração de rhEPO sobre o aporte de oxigênio para os músculos são mantidos por três semanas após a interrupção do uso do hormônio, mas a janela de detecção do método direto para doses regulares é de poucos dias após a última administração¹⁰³⁻¹⁰⁵. Dessa forma, é essencial que o controle da dopagem no esporte por rhEPO seja realizado também fora dos períodos de competição.

Tendo em vista as limitações da metodologia direta para a detecção de rhEPO, a WADA tem patrocinado diversas pesquisas com o objetivo de aprimorar o método vigente e desenvolver novos métodos⁵⁹. Atualmente, a abordagem que emprega o imunoensaio de isoformas assistido por membrana (*membrane-assisted isoform immunoassay* – MAIIA) tem sido proposta a fim de complementar a metodologia anteriormente descrita. Apesar de esse método apresentar resultados promissores para o controle da dopagem, até o presente momento não foi aceito oficialmente pela WADA^{103,107}.

22.5.2.5 Hormônio luteinizante e gonadotrofina coriônica humana

O hormônio luteinizante (LH) e a gonadotrofina coriônica (hCG) são hormônios glicoproteicos compostos por duas cadeias de polipeptídios, sendo uma delas a subunidade α , comum aos demais hormônios dessa família, e outra a subunidade β , que determina a atividade biológica do hormônio¹¹³. Em mulheres, o LH sintetizado na hipófise desencadeia a ovulação e estimula a síntese de progesterona e estrógeno⁵⁹. O hCG, por sua vez, é produzido em abundância pelas células trofoblásticas placentárias durante a gestação, estimulando a produção de hormônios esteroides nos ovários. Também é produzido por alguns tipos de tumores^{113,114}.

Em indivíduos do sexo masculino, ambos os hormônios agem sobre as células de Leydig estimulando a produção de testosterona sem que, entretanto, a razão testosterona/epitestosterona, utilizada na detecção da dopagem no esporte com testosterona exógena, seja alterada^{59,115}. Dessa forma, o LH e o hCG são utilizados pelos atletas como agentes indiretos na dopagem

no esporte, com o objetivo de aumentar a produção endógena de testosterona ou normalizá-la nos casos de administração prolongada de esteroides anabolizantes, já que esta última acarreta supressão da síntese endógena. De maneira oposta, o LH e o hCG não são proibidos pela WADA para atletas do sexo feminino, já que a administração de tais hormônios apresenta efeitos negligenciáveis sobre os níveis de testosterona e, consequentemente, sobre o desempenho esportivo. Ademais, no caso do hCG, hormônio utilizado como marcador de gravidez, seu monitoramento pode representar invasão da privacidade da atleta⁵⁹.

O hCG e o LH são empregados com fins terapêuticos em mulheres nos casos de reprodução assistida, com o objetivo de estimular a ovulação, e em homens no tratamento da infertilidade associada ao hipogonadismo. Atualmente, hormônios recombinantes estão disponíveis comercialmente para uso terapêutico, facilitando a utilização na dopagem no esporte. O LH apresenta reduzida meia-vida no organismo, sendo necessárias doses consideravelmente altas para que seja obtido aumento da produção de testosterona. No caso do hCG, a meia-vida do hormônio é maior devido à glicosilação do peptídeo. Isso faz com que os efeitos sobre a produção de testosterona sejam mais pronunciados, tornando esse hormônio mais atraente do ponto de vista da dopagem no esporte¹¹⁵. Embora o hCG não seja amplamente utilizado por atletas, desde sua proibição, em 1987, alguns casos foram detectados no esporte⁵⁹.

A detecção da dopagem no esporte por hCG e LH é realizada em amostras de urina através de imunoensaios, que também são empregados para fins clínicos. A WADA determina que dois imunoensaios com características distintas são necessários para confirmação de um resultado positivo, sendo que no caso do hCG ambos devem apresentar limite de detecção de pelo menos 5 UI/L¹¹⁶. De maneira geral, os imunoensaios disponíveis comercialmente para detecção de hCG e empregados no controle da dopagem no esporte baseiam-se no princípio “*sandwich*”, que consiste em anticorpos de captura que estão imobilizados em fase sólida e anticorpos ligados a enzimas, compostos luminescentes ou fluorescentes, para mensuração do antígeno. A maior parte dos ensaios empregam anticorpos monoclonais; entretanto, alguns são compostos por anticorpos monoclonais e soro policlonal.

Recentemente, métodos que empregam a imunoextração e a espectrometria de massas foram desenvolvidos com o objetivo de serem utilizados como testes confirmatórios da dopagem no esporte com hCG. Entretanto, não há relatos da utilização dessa metodologia no controle da dopagem.

Sob condições normais, pequenas quantidades desse hormônio são secretadas pela hipófise de homens e mulheres, sendo a concentração sérica circulante inferior a 5 UI/L¹¹⁴.

22.6 DOPAGEM GENÉTICA

Avanços tecnológicos têm permitido, nos anos recentes, o emprego de ferramentas genéticas para o tratamento de diversas patologias. A terapia genética, mais especificamente, pode ser definida como a transferência de material genético (transgene) para células humanas com o objetivo de substituir um gene defeituoso ou estimular a síntese endógena de proteínas¹¹⁷. Doenças como diabetes, anemia, distrofias musculares e deficiências do sistema imunológico são alvos de pesquisas para o emprego terapêutico de modificação genética de sítios específicos do genoma humano. Apesar da eficácia demonstrada em alguns modelos animais, atualmente somente dois medicamentos de terapia genética foram aprovados internacionalmente para comercialização¹¹⁸. Ademais, a terapia genética ainda é considerada de alto risco e necessita de aprimoramentos. Efeitos adversos sérios, como leucemia, respostas imunológicas exacerbadas e até mesmo mortes, já foram relatados em estudos clínicos com terapia genética em humanos¹¹⁹.

Os benefícios da terapia genética podem favorecer inúmeros pacientes. Entretanto, o aprimoramento e a disponibilidade de tais tratamentos podem fazer com que estes venham a ser utilizados por atletas com o objetivo de aumentar o desempenho esportivo¹¹⁸. Por esse motivo, em 2004 a WADA adicionou à Lista de Substâncias Proibidas no esporte a dopagem genética, que foi definida como “o uso não terapêutico de genes, elementos genéticos e/ou células que apresentem capacidade de aumentar o desempenho esportivo”¹²⁰. A versão de 2014 da Lista de Substâncias Proibidas proíbe “a transferência de ácidos nucleicos ou sequências de ácidos nucleicos” e “o uso de células normais ou geneticamente modificadas” que apresentam potencial de aumentar o desempenho esportivo do atleta¹⁹. Apesar dos esforços, o controle da dopagem genética consiste tarefa desafiadora para os laboratórios e órgãos reguladores, já que sua detecção em amostras biológicas, devido às características da terapia e às similaridades com compostos endógenos, é bastante complexa¹¹⁷.

Na terapia gênica, os genes responsáveis pela produção de determinada molécula com função biológica são identificados e inseridos no organismo humano através de técnicas *in vivo* e *ex vivo*. A abordagem *in vivo* consiste

na produção do gene de interesse em plasmídeo bacteriano, purificação deste e injeção direta do DNA no tecido-alvo. Sendo essa técnica pouco efetiva, atualmente empregam-se vetores virais que transferem o material genético de interesse para células-alvo do hospedeiro¹¹⁸. Nesse caso, o DNA e o RNA viral responsáveis pela replicação e patogenicidade são suprimidos, reduzindo a imunogenicidade do vírus¹²¹. A técnica *ex vivo*, por sua vez, consiste na retirada de células do organismo do paciente, seguida de cultura destas, após o que o gene de interesse é inserido no DNA celular, sendo as células reintroduzidas no organismo do paciente⁴⁰.

Quando introduzido no organismo, seja por técnicas *in vivo* ou *ex vivo*, o transgene é transcrito pela maquinaria celular, gerando proteína ou hormônio potencialmente indistinguível do endógeno¹¹⁷. Essa similaridade, importante para que o tratamento não seja alvo de respostas imunológicas no paciente, é também um atrativo para atletas que desejam alterar seu desempenho esportivo sem serem detectados nos testes de controle da dopagem no esporte¹²². Diversos genes atualmente sob estudo apresentam potencial para melhora do desempenho esportivo. Dentre eles, vale citar os genes da eritropoietina (hEPO), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), hormônio do crescimento humano (GH), antagonistas de miostatina e endorfinas e encefalinas¹¹⁸.

A eritropoietina, como citado anteriormente, é um hormônio amplamente utilizado por atletas com o objetivo de aumentar a produção de eritrócitos e, conseqüentemente, a capacidade de oxigenação do organismo. A terapia gênica envolvendo o gene da hEPO já foi testada *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de tratar patologias em que a produção desse hormônio esteja comprometida¹¹⁸. Estudos mostraram aumento na produção do hormônio; entretanto, devido a problemas de segurança, até a presente data nenhuma terapia gênica com esse fim foi aprovada para uso em humanos¹¹⁷.

Além da eritropoietina, o gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também pode ser alvo da dopagem genética por atletas que almejam melhora da capacidade aeróbica. O VEGF é uma proteína com importante papel sobre a angiogênese^{118,121}. A terapia gênica com VEGF poderia ser usada por atletas como alternativa à dopagem sanguínea, visando ao aumento no transporte de oxigênio através do estímulo da angiogênese na musculatura e nos sistemas cardiovascular e pulmonar. No âmbito terapêutico, o VEGF tem sido estudado com o objetivo de tratar doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e doença arterial periférica¹¹⁷. Entretanto, até o momento, seu sucesso é limitado, já que a angiogênese é um processo complexo que envolve a interação entre inúmeros fatores angiogênicos¹²³.

No que se refere aos atletas de modalidades em que a massa muscular é importante para o desempenho esportivo, algumas proteínas e hormônios podem ser alvo de dopagem genética. Como citado anteriormente, o hormônio do crescimento (hGH) apresenta efeitos anabólicos sobre a musculatura e aumento do metabolismo de carboidratos e lipídios, sendo um dos principais agentes utilizados na dopagem no esporte⁵⁹. Além desse hormônio, o IGF-I, proteína produzida no fígado em resposta ao estímulo do hGH, é o principal mediador dos efeitos desse hormônio. O IGF-I previne a perda de massa muscular relacionada ao envelhecimento e, em indivíduos saudáveis, causa hipertrofia muscular e cicatrização após dano muscular¹¹⁷.

Tendo em vista os efeitos fisiológicos do IGF-I e hGH, seus genes podem ser alvo de dopagem genética. No âmbito terapêutico, métodos visando ao aumento da produção endógena de IGF-I são de interesse médico no tratamento de doenças degenerativas musculares, câncer, HIV e envelhecimento, condições nas quais os pacientes apresentam considerável perda de massa muscular¹¹⁸. Estudos com animais de experimentação mostraram aumento da massa muscular e redução da degradação muscular em decorrência do envelhecimento¹¹⁷. No caso da dopagem genética, o aumento na produção de IGF-I pode ser obtido não somente através da dopagem genética direta, mas também através de seu aumento indireto, via hGH. Este último hormônio age sobre um número maior de processos no organismo, de modo que os efeitos da manipulação gênica de hGH seriam mais inespecíficos, se comparados ao IGF-I.

A miostatina apresenta efeito negativo sobre o crescimento do músculo esquelético, sendo que a deleção ou mutação de seu gene acarreta hiperplasia e hipertrofia com aumento da massa muscular¹¹⁷. Atualmente, o silenciamento do gene de miostatina vem sendo estudado como alternativa terapêutica para o tratamento de distrofias musculares¹²³. Entretanto, devido à sua ação sobre a musculatura esquelética, este também seria um candidato à dopagem no esporte.

O emprego da terapia gênica envolvendo encefalinas e endorfinas tem sido avaliado em estudos clínicos para o tratamento da dor crônica associada a determinadas doenças, como o câncer¹²². Ensaios clínicos em humanos apresentaram resultados promissores, podendo essas substâncias ser empregadas no tratamento de dores locais e específicas com poucos efeitos adversos e baixo potencial de abuso, se comparadas aos opioides¹¹⁸. No caso da dopagem no esporte, a redução da percepção de dor durante o exercício permitiria aos atletas maior esforço físico e, consequentemente, melhora no desempenho esportivo.

Apesar dos diversos estudos em andamento, até o momento nenhum caso de dopagem gênica foi relatado. Entretanto, com o contínuo desenvolvimento da terapia gênica, essa é uma ameaça cada vez mais iminente. Como já dissemos, a detecção da dopagem genética é desafiadora, já que, em alguns casos, a proteína expressa pode ser idêntica à proteína endógena. Ademais, se o transgene é responsável pela expressão de proteínas ou moléculas de RNA que ficam restritas ao interior da célula ou ao sítio de sua produção, a detecção só se faz possível através de biópsia do tecido¹²².

Tradicionalmente, o controle da dopagem no esporte é realizado através da detecção da substância ou de seus produtos de biotransformação (metabólitos) em amostras biológicas e de marcadores de efeitos¹¹⁹. Até o presente momento, nenhum método específico para detecção da dopagem genética foi aprovado pela WADA ou utilizado pelos laboratórios acreditados¹¹⁸. Mas, apesar das limitações, algumas abordagens têm sido propostas para o controle da dopagem genética.

De maneira geral, os métodos empregados no controle da dopagem no esporte podem ser divididos em diretos e indiretos. No caso dos métodos diretos, a detecção direta em amostras biológicas das proteínas codificadas pelo gene modificado seria uma abordagem pouco provável, já que muitas delas estão presentes em níveis não detectáveis¹¹⁸. Entretanto, em alguns casos, modificações pós-translacionais características dos diferentes tipos celulares, podem permitir a diferenciação entre a proteína endógena e aquela produzida através do transgene, de maneira análoga à detecção da dopagem no esporte por rhEPO¹²². Nesse caso, a focalização isoeletrica poderia ser empregada para detecção da dopagem¹¹⁷.

Além da detecção das proteínas, uma alternativa seria a detecção direta do vetor no organismo do atleta. Para tanto, uma estratégia proposta seria a biópsia do local de infecção. Apesar de apresentar janela de detecção relativamente grande, essa abordagem apresenta limitações, já que o conhecimento da área corporal em que foi realizada a inserção é necessário e, de maneira geral, a biópsia é considerada procedimento invasivo, não sendo empregado no controle da dopagem¹¹⁷. Técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) em matrizes biológicas como sangue e urina também têm sido preconizadas, entretanto, apresentam limitações já que falsos positivos são possíveis nos casos em que o atleta foi infectado por um vírus comum e a janela de detecção é reduzida^{118,123}.

Outra possibilidade para detecção direta da dopagem genética baseia-se no emprego de testes moleculares para diferenciação entre o DNA genômico e o DNA complementar. Este último não apresenta íntrons em sua

estrutura, podendo ser distinguido do DNA genômico através da PCR e de *Southern blotting*¹²⁴.

Analogamente à indústria agrícola, a adição de marcador ao transgene possibilitaria a detecção, por técnica de PCR, da dopagem com medicamentos de terapia gênica¹¹⁸. Entretanto, essa marcação pode acarretar aumento da imunogenicidade e comprometimento da eficácia. Ademais, poderia representar custos maiores para as indústrias farmacêuticas, que podem não aceitar esse tipo de procedimento¹¹⁷. Tendo em vista suas desvantagens, atualmente é pouco provável que a marcação da terapia gênica seja adotada visando ao controle da dopagem no esporte.

Diferentemente dos métodos diretos, a abordagem indireta baseia-se na avaliação dos efeitos da modificação genética em células, tecidos ou no organismo como um todo¹²⁴. Para tanto, a detecção de possíveis respostas imunes aos vetores da terapia gênica e às proteínas resultantes do transgene pode ser utilizada¹¹⁸. Essa técnica, entretanto, apresenta desvantagem, pois, no caso de vetores virais, não permite a diferenciação entre uma infecção natural e a introdução intencional do vetor no organismo¹¹⁷.

Recentemente, o uso do transcriptoma, que consiste na mensuração de mRNA do organismo, tem sido proposto no controle da dopagem genética. As análises, através de PCR em tempo real (*real-time PCR*) e microarranjos (*microarray*), permitiriam identificar mudanças na expressão gênica e, conseqüentemente, a dopagem genética¹²⁴. Além dessa, técnicas de proteômica, através de separação por eletroforese bidimensional, eletroforese capilar ou cromatografia líquida bidimensional, e identificação e quantificação por espectrometria de massas, permitem a detecção e quantificação de inúmeras proteínas expressas no organismo. Alguns grupos específicos, por exemplo, poderiam ser utilizados como marcadores da dopagem no esporte. A metabolômica, por sua vez, através da análise de metabólitos de baixa massa molecular, permitiria avaliar mudanças na função celular, acarretadas pela dopagem genética¹²⁵. Contudo, algumas limitações práticas desses procedimentos incluem a necessidade de testes regulares dos atletas e a determinação de níveis de referência. Além disso, alguns atletas podem apresentar mutações e polimorfismos no material genético, que seriam responsáveis por alterações metabolômicas sem que haja, entretanto, ocorrência de dopagem¹¹⁷.

22.7 SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS

O uso de suplementos nutricionais por atletas é uma preocupação, pois em muitos países a fabricação e rotulagem dos suplementos podem não seguir regras rígidas, o que pode levar a um suplemento que contenha uma substância não declarada e proibida de acordo com os regulamentos *antidoping*. Um número significativo de testes positivos foi atribuído ao mau uso de suplementos. Ingerir um suplemento alimentar mal rotulado não é uma defesa adequada para a acusação de dopagem¹⁸.

Na Tabela 22.3, são mostradas algumas substâncias proibidas pela lista-gem da WADA e que foram encontradas em suplementos nutricionais cujos rótulos os declaravam como “não hormonais”¹²⁶.

Tabela 22.3 Incidência de substâncias proibidas pela WADA em suplementos nutricionais rotulados como “não hormonais” no período de dezembro de 2002 a agosto de 2005, analisados no Laboratório de Controle de *Doping* de Ghent (Bélgica), acreditado pela WADA

| SUBSTÂNCIA ENCONTRADA | QUANTIDADE (n) |
|--------------------------------|----------------|
| De-hidroepiandrosterona | 27 |
| Testosterona | 18 |
| 4-Androsteno-3,17-diona 16 | 16 |
| 19-Nor-4-Androsteno-3,17-diona | 9 |
| Di-hidrotestosterona 8 | 8 |
| Nandrolona | 5 |
| 5-Androsteno-3b, 17b-diol 5 | 5 |
| 17a-Metiltestosterona | 2 |

A Comissão Médica do COI realizou, em alguns países, análises em suplementos para detectar esteroides anabolizantes. Os fabricantes dos suplementos não conformes omitiram nos rótulos dos produtos estudados a presença de substâncias proibidas pela WADA¹²⁷. Os resultados são mostrados na Tabela 22.4.

Tabela 22.4 Resultados de análises de suplementos nutricionais, realizadas pelo Comitê Olímpico Internacional (COI)

| PAÍS | TOTAL ANALISADO | RESULTADOS POSITIVOS | PORCENTAGEM DE RESULTADOS POSITIVOS (%) |
|----------------|-----------------|----------------------|---|
| Países Baixos | 31 | 8 | 25,8 |
| Reino Unido | 37 | 7 | 18,9 |
| Estados Unidos | 240 | 45 | 18,8 |
| Itália | 35 | 5 | 14,3 |
| Alemanha | 129 | 15 | 11,6 |

A Tabela 22.3 mostra uma significativa proporção de produtos contaminados com substâncias banidas pela WADA e não listadas pelos fabricantes dos suplementos analisados.

A efedrina, um estimulante presente na listagem da WADA, cuja concentração na urina acima do permitido é considerada *doping*¹⁹, também foi encontrada em suplementos alimentares. Frequentemente é citada como um “produto natural”. Seu uso pode acarretar problemas cardiovasculares, inclusive morte súbita¹²⁷.

A preocupação com as informações presentes nos rótulos encontra-se no Artigo 10 do Decreto 6.653 de 2008¹⁶. Consta neste documento a necessidade da agência regulatória federal encorajar o estabelecimento de boas práticas de comercialização e distribuição de suplementos nutricionais entre os produtores, incluindo o fornecimento de informações relativas à composição analítica e garantia de qualidade.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC nº 18/2010¹²⁸, estabeleceu a seguinte classificação dos suplementos para uso nas atividades físicas:

- Suplemento hidroeletrólítico.
- Suplemento energético.
- Suplemento proteico.
- Suplemento para substituição parcial de refeições.
- Suplemento de creatina.
- Suplemento de cafeína.

Existem situações nas quais é possível aos atletas o uso de substâncias ou métodos não permitidos presentes nas listagens da WADA. Para isso, os

médicos dos atletas devem solicitar “autorizações para uso terapêutico”. Se a WADA considerar que a concessão ou recusa de uma autorização de uso para fins terapêuticos não respeitou a norma internacional referente a autorizações para fins terapêuticos, a WADA poderá anular essa decisão¹⁸.

22.8 CONCLUSÕES

A busca humana pela superação de seus próprios limites por meio do uso de substâncias e métodos manipulados pelo próprio homem ocorre desde os tempos mais remotos da origem da vida humana. Frutas, raízes, poções com excrementos, hormônios animais e humanos, naturais e sintéticos são alguns exemplos de substâncias utilizadas. Estimulantes e hormônios utilizados durante as Grandes Guerras Mundiais encontraram, nos eventos esportivos, um amplo comércio. Muitos atletas consideram o esporte como a única forma de ascensão social, *status*, prestígio e reconhecimento, de modo que pressões dos familiares, patrocinadores, técnicos e colegas de equipe resultam na utilização de substâncias e métodos proibidos.

A biotecnologia contribui de maneira significativa para o cenário do *doping*. O desenvolvimento de hormônios sintéticos e similares, inicialmente na área clínica, proporcionou o surgimento de moléculas interessantes para melhora do desempenho dos competidores. A evolução tecnológica dos exames antidopagem resultou em métodos capazes de detectar substâncias presentes há algumas décadas nos esportes. Porém, novas drogas proibidas pelas agências regulatórias surgem a uma velocidade muito maior que as validações de metodologias comprovadas cientificamente para exames de controle do *doping*.

22.9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como resultado dos avanços biotecnológicos, a indústria farmacêutica continuamente disponibiliza para comercialização novos medicamentos. Parte considerável dessas novas substâncias são proteínas e peptídeos recombinantes que apresentam grande similaridade aos compostos endógenos. A esse fato associam-se particularidades das substâncias e do padrão de administração, tornando o controle da dopagem no esporte um desafio metodológico crescente¹²⁹. Dessa forma, estratégias de monitoramento que permitam a identificação de atletas dopados de maneira independente do

desenvolvimento farmacológico têm sido preconizadas no controle da dopagem no esporte.

Essa abordagem, sob o nome de Passaporte Biológico, baseia-se no contínuo monitoramento de determinados biomarcadores presentes em amostras biológicas dos atletas. De maneira análoga ao que ocorre na medicina preventiva, o acompanhamento individual dos atletas permitiria detectar alterações das condições fisiológicas normais, indicando indiretamente a ocorrência de dopagem²³. Alterações em parâmetros hematológicos específicos podem, por exemplo, indicar a utilização de métodos ou substâncias que acarretam aumento no transporte de oxigênio. Mais recentemente, as tecnologias “ômicas” (proteômica e metabolômica) demonstraram potencial de diagnóstico para diferentes doenças e também para a identificação de marcadores da dopagem¹²⁹.

Apesar de promissor, o passaporte biológico ainda apresenta aplicação limitada no controle da dopagem. Até a data desta publicação, somente o protocolo para marcadores hematológicos havia sido validado, tendo sido implementado pela União Internacional de Ciclismo em 2008 e, em 2009, aprovado pela WADA^{130,131}. Entretanto, avanços tecnológicos podem permitir que esta venha a ser uma ferramenta na busca de violações das regras antidopagem, assim como no direcionamento dos tradicionais testes empregados no controle da dopagem.

REFERÊNCIAS

1. Lippi G, Guidi G. Doping and sports. *Minerva Medicine*. 1999;90(9):345-57.
2. Paiva CC, Doneda D, Dias DV, de Rose EH, Cordeiro JMS, da Costa LP, Bucher R, Santin S. Valores Humanos, Corpo e Prevenção. A procura de Novos Paradigmas para a Educação Física. Brasil, Ministério da Educação; 1989.
3. Csáky TZ. Doping. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 1972;12(2):117-23.
4. De Rose EH, Neto Aquino FR, Levy R. Informações sobre Uso de Medicamentos no Esporte. Rio de Janeiro: Comitê Olímpico Brasileiro; 2010.
5. World Anti-Doping Agency (WADA). A Brief History of Anti-doping. c. 2010 [Internet]. [Cited 2013 Dec 3]. Available from: <http://www.wada-ama.org/en/about-wada/history/>.
6. Boje O. *Bulletin of the Health Organization of the League of Nations*. 1939;8:439-69.
7. Hoberman J. *Mortal Engines: The Science of Performance and the Dehumanization of Sport*. New York: Free Press; 1922.
8. Donohoe T, Johson N. *Foul play: Drug use in sport*. Oxford: Blackwell; 1986.
9. Connolly H. Hearings before the Subcommittee to Investigate Juvenile Delinquency (testimony before the Committee on the Judiciary, United States Senate). Ninety-third Congress, first session. 1973 Jun 18, Jul 12-13.
10. Gilbert B. Drugs in sport: Part 1. Problems in a turned-on world. *Sports Illustrated*. 1969:64-72.
11. Payne AH. Anabolic steroids in athletics. *British Journal of Sports Medicine*. 1975;9:83-8.
12. Todd T. Anabolic steroids: The gremlins of sport. *Journal of Sport History*. 1987;14:87-107.
13. Williams M. Blood doping in sports: A review. *Journal of Drug Issues*, 1980;10(3), 331-9.
14. Fraser AD. Doping control from a global and national perspective. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2004;26:171-4.
15. Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. *Fundamentos de Toxicologia*. 3. ed. São Paulo: Ateneu; 2008.
16. Brasil. Decreto n. 6.653. 18 Nov 2008.
17. Brasil. Decreto n. 7.630. 30 Nov 2011.
18. World Anti-Doping Agency (WADA). *World Anti-doping Code*. 2009.
19. World Anti-Doping Agency (WADA). *The World Anti-Doping Code. The 2014 Prohibited List. International Standard*.
20. Dickman S. East Germany: Science in the disservice of state. *Science*. 1991;254:26-7.

21. Donike M, Jaenick L, Stratmann D, Hollmann W. Gas chromatographic detection of nitrogen-containing drugs in aqueous solutions by means of the nitrogen detector. *J Chromatogr.* 1970;52(2):237-50.
22. Neto-Aquino FR. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 2001;7(4):138-48.
23. Catlin DH, Fitch KD, Ljungqvist A. Medicine and science in the fight against doping in sport. *Journal of Internal Medicine.* 2008;264:99-114.
24. Todd J, Todd T. Significant events in the history of drug testing and the Olympic movement: 1960-1999. In: Wilson W, Derse E, editors. *Doping in Elite Sport*, Champaign: Human Kinetics; 2001. p. 65-128.
25. Bamberger M, Yaeger D. Over the edge. *Sports Illustrated.* 1997;15:60-70.
26. Cramer RB. Olympic cheating: The inside story of illicit doping and the U.S. cycling team. *Rolling Stone.* 1985 Feb:25-30.
27. Zorpette G. The chemical games: Blood doping breakthrough. *Scientific American.* 2000 Sep.
28. Janofsky M. System accused of failing test posed by drugs. *New York Times.* 1988 Nov 17.
29. Dubin C. Commission of inquiry into the use of drugs and banned practices intended to increase athletic performance (catalogue no. CP32-56/1990E). Ottawa: Canadian Government Publishing Center; 1990
30. Abrahamson A, Wharton D. Behind the rings: Inside the Olympic movement. *Los Angeles Times.* 2000 Aug 20:1A.
31. Longman J. Struggles threaten U.S. Olympic movement. *New York Times.* 2000 Nov 26.
32. Begley S, Clifton T. The drug charade. *Newsweek.* 2000 Sep 11:42-5.
33. Cazeneuve B, Layden T. Inside Olympic sport. *Sports Illustrated.* 2000 Aug 14:67.
34. Fish M. 2000 Olympics: Tests nearly useless as new drugs pop up. *Atlanta Journal and Constitution.* 2000 Sep 9:12F.
35. Harvey R. Ignoring steroid issue is a national pastime. *Los Angeles Times.* 2000 Oct 15.
36. Humphries T. Late operation on blind eye. *Irish Times.* 2000 Sep:63.
37. Reid S. The obvious answer. *Orange County Register.* 2000 Aug 6:1D.
38. Sullivan R, Song S. Are drugs winning the Games? *Time.* 2000 Sep 11:90-2.
39. World Anti-Doping Agency (WADA). Accredited Laboratories for Doping Control Analysis. 2013 [Internet]. [Cited 2013 Dec 4]. Available from: <http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Anti-Doping-Laboratories/Accredited-Lab-Locations/Americas/>.
40. Azzazy HM, Mansour MM, Christenson RH. Doping in the recombinant era: strategies and counterstrategies. *Clinical Biochemistry.* 2005;38:959-65.

41. Tashkin DP, Fabbri LM. Long-acting beta-agonists in the management of chronic obstructive pulmonary disease: current and future agents. *Respir Res.* 2010;11:149-63.
42. Chung KF, Caramori G, Adcock IM. Inhaled corticosteroids as combination therapy with β -adrenergic agonists in airways disease: present and future. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010;65:853-71.
43. Mapel DW, Hurley JS, Dalal AA, Blanchette CM. The role of combination inhaled corticosteroid/long-acting β -agonist therapy in COPD management. *Prim Care Respir J.* 2010;19:93-103.
44. Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, Etlinger JD. Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2 -receptor agonist. *Am J Physiol.* 1988;254:726-32.
45. Ryall JG, Sillence MN, Lynch GS. Systemic administration of β_2 -adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. *Br J Pharmacol.* 2006;147:587-95.
46. Fragkaki AG, Georgakopoulos C, Sterk S, Nielen MWF. Sports doping: Emerging designer and therapeutic β_2 agonists. *Clinica Chimica Acta.* 2013;425:242-58.
47. Jackson EK. Diuretics. In: Brunton L, Lazo J, Parker K, editors. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11. ed. New York: McGraw-Hill; 2006. p. 737-70.
48. Cadwallarder A, de La Torre X, Tieri A, Botrè F. The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis. *British Journal of Pharmacology.* 2010;161:1-16.
49. Hemmersbach P, de la Torre R. Stimulants, narcotics and β -blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control. *Journal of Chromatography B.* 1996;687:221-38.
50. Trout GJ, Kazlauskas R. Sports drug testing – an analyst's perspective. *Chem Soc Rev.* 2004;33:1-13.
51. Hilderbrand RL. High-Performance Sport, Marijuana, and Cannabimimetics. *Journal of Analytical Toxicology.* 2011;35: 624-37.
52. Campos DR, Yonamine M, de Moraes Moreal RL. Marijuana as Doping in Sports. *Sports Med.* 2003;33(6):395-9.
53. Hall W. Adverse health effects of non-medical cannabis use. *Lancet.* 2009;374:1383-91.
54. Eichner ER. Ergolytic drugs in medicine and sports. *Am J Med.* 1993;94(2):205-11.
55. Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 2004;8:513-54.
56. Duntas LH, Popovic V. Hormones as doping in sports. *Endocrine.* 2013;43(2):303-13.
57. Dvorak J, Feddermann N, Grimm K. Glucocorticosteroids in football: use and misuse. *Br J Sports Med.* 2006;40(I):48-54.

58. Barroso O, Schamasch P, Rabin O. Detection of GH abuse in sport: Past, present and future. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19(4):369-74.
59. Barroso O, Mazzoni I, Rabin O. Hormone abuse in sports: the antidoping perspective. *Asian J Androl.* 2008;10(3):391-402.
60. Holt RI, Erotokritou-Mulligan I, Sönksen PH. The history of doping and growth hormone abuse in sport. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19(4):320-6.
61. Holt RI, Sönksen PH. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. *Br J Pharmacol.* 2008;154(3):542-56.
62. Ding J, List EO, Okada S, Kopchick JJ. Perspective: proteomic approach to detect biomarkers of human growth hormone. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19(4):399-407.
63. Holt RI. Detecting growth hormone abuse in athletes. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401(2):449-62.
64. Jing J, Yang S, Zhou X, He C, Zhang L, Xu Y, Xie M, Yan Y, Su H, Wu M. Detection of doping with rhGH: excretion study with WADA-approved kits. *Drug Test Anal.* 2011;3(11-12):784-90.
65. Baumann GP. Growth hormone doping in sports: a critical review of use and detection strategies. *Endocr Rev.* 2012;33(2):155-86.
66. Daughaday WH, Salmon WD, Van Den Brande JL, Van Wyk JJ. On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;65:1075-6.
67. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor-I. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(13):7324-9.
68. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16:3-34.
69. Bolinder J, Lindblad A, Engfeldt P, Arner P. Studies of acute effects of insulin-like growth factors I and II in human fat cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;65:732-7.
70. Caro JF, Poulos J, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger EG, Sinha MK. Insulin-like growth factor 1 binding in hepatocytes from human liver, human hepatoma, and normal regenerating, and fetal rat liver. *J Clin Invest.* 1988;81:976-81.
71. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev.* 1997;18:801-31.
72. Twigg SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the labile subunit. *J Biol Chem.* 1998;273:6074-9.
73. Finth SM, Ganeshprasad U, Baxter RC. Structural determinants of ligand and cell surface binding of insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Biol Chem.* 1998;273:2631-8.

74. Guha N, Cowan DA, Sönksen PH, Holt RIG. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) misuse in athletes and potential methods for detection. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405:9669-83.
75. Barton-Davis ER. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1998;95 (26):15603-7.
76. Lee S, Barton ER, Sweeney HR, Farrar RP. Viral expression of insulin like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol.* 2004;96:1097-104.
77. Hansen M, Boesen A, Holm L, Flyvbjerg A, Langberg H, Kjaer M. Local administration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates tendon collagen synthesis in humans *Scand J Med Sci Sports.* 2013;23:614-9.
78. Kawai N, Kangasi S, Takano-Watou S. Serum free insulin-like growth factor-I (IGF-I), total IGF-I and IGF-binding protein-3 concentrations in normal children and children with growth hormone deficiency. *Metabolism.* 1999;84: 82-9.
79. Juul A, Bang P, Hertel NT. Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size and body mass index. *J Clin Metab.* 1994;78:744-52.
80. Yamamoto H, Sohmiya M, Oka N, Kato Y. Effects of aging and sex on plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels in normal adults. *Acta Endocrinol.* 1991;124:497-500.
81. Paolisso G, Ammendola S, del Buono A. Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy centenarians: relationship with plasma leptin and lipid concentrations, insulin action, and cognitive function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2204-9.
82. Hilding A, Hall K, Wivall-Helleryd IC. Serum levels of insulin-like growth factor-I in 152 patients with growth hormone deficiency aged 19–82 years in relation to IGF-I in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2013-9.
83. Landin-Wilhelmsen K, Wilhelmsen L, Lappas G. Serum insulin-like growth factor-I in a random population sample of men and women: relation to age, sex, smoking habits, coffee consumption and physical activity, blood pressure and concentrations of plasma lipids, fibrinogen, parathyroid hormones and osteocalcine. *Clin Endocrinol.* 1994;41:351-7.
84. D'Costa AP, Ingram RL, Leham JE, Sonntag WE. The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor-I during normal ageing. *J Reprod Fert Suppl.* 1993;46:87-98.
85. Copeland KC, Colletti RB, Devlin JT, McAuliffe TL. The relationship between insulin-like growth factor 1, adiposity and aging. *Metabolism.* 1990;39:584-7.

86. Harris TB, Kiel D, Roubenoff R. Association of insulin-like growth factor-I with body composition, weight history, and past health behaviors in the very old: the Framingham Heart Study. *J Am Geriatr Soc.* 1997;45:133-9.
87. Grogean T, Vereault D, Millard PS, Kiel D, MacLean D, Orwoll E, Greenspan S, Rosen CJ. A comparative analysis of methods to measure IGF-I in human serum. *Endocr Metab.* 1997;4:109-14.
88. Rosen CJ, Kurland ES, Vereault D, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY, Witte S, Rogers J, Bilezikian JP. Association between serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and a simple repeat in IGF-I gene-implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2286-90.
89. Hong Y, Pedersen NL, Brismar K, Hall K, de Faire U. Quantitative genetic analyses of insulin-like growth factor-I (IGF), IGF binding protein-1 (IGFBP-1) and insulin levels in middle-aged and elderly twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:1791-7.
90. Daughaday WH, Ward AP, Goldberg AC, Trivedi B, Kapadia M. Characterization of somatomedin binding in human serum by ultracentrifugation and gel filtration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;55:916-21.
91. Daughaday WH, Parker KA, Borowsky S, Trivedi B, Kapadia M. Measurement of somatomedin-related peptides in fetal, neonatal, and maternal rat serum by insulin-like growth factor (IGF) I radioimmunoassay, IGF-II radioreceptor assay (RRA), and multiplication-stimulating activity RRA after acid – ethanol extraction. *Endocrinology.* 1982;110(2):575-81.
92. Mesiano S, Young IR, Browne CA, Thorburn GD. Failure of acid – ethanol treatment to prevent interference by binding proteins in radioligand assays for the insulin-like growth factors. *J Endocrinol.* 1988;119(3):453-60.
93. Clemmons DR. IGF-I assays: current assay methodologies and their limitations. *Pituitary.* 2007;10(2):121-8.
94. Blum WF, Breier BH. Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. *Growth Regul.* 1994;4(1):11-9.
95. Khosravi MJ, Diamandi A, Mistry J, Lee PD. Noncompetitive ELISA for human serum insulin-like growth factor-I. *Clin Chem.* 1996;42:1147-54.
96. World Anti-Doping Agency (WADA). The World Anti-Doping Code. International Standard for Laboratories. 2012 [Internet]. [Cited 2013 Dec 2]. Available from: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/ISL/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf.
97. Bidlingmaier M. Pitfalls of insulin-like growth factor I assays. *Horm Res.* 2009;71(1):30-3.
98. Miller WG, Erek A, Cunningham TD, Oladipo O, Scott MG, Johnson RE. Commutability limitations influence quality control results with different reagent lots. *Clin Chem.* 2011;57(1):76-83.

99. Erotokritou-Mulligan I, Eryl Bassett E, Cowan D, Bartlett C, Milward P, Sartorio A, Sonksen PH, Holt RI. The use of growth hormone (GH)-dependent markers in the detection of GH abuse in sport: Physiological intra-individual variation of IGF-I, type 3 pro-collagen (P-III-P) and the GH-2000 detection score. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(4): 520-6.
100. Holt RI, Erotokritou-Mulligan I, McHugh C, Bassett E, Bartlett C, Fityan A, Bacon J, Cowan D, Sonksen P. The GH-2004 project: the response of IGF-I and type III pro-collagen to the administration of exogenous growth hormone (GH) in non-Caucasian amateur athletes. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(1):45-54.
101. Guha N, Erotokritou-Mulligan I, Burford C, Strobridge G, Brigg J, Drake T, Bassett EE, Cowan D, Bartlett C, Sonksen PH, Holt RI. Serum insulin-like growth factor-I and pro-collagen type III N-terminal peptide in adolescent elite athletes: implications for the detection of growth hormone abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2969-76.
102. Tsitsimpikou C, Kouretas D, Tsarouhas K, Fitch K, Spandidos DA, Tsatsakis A. Applications and biomonitoring issues of recombinant erythropoietins for doping control. *Ther Drug Monit*. 2011;33(1):3-13.
103. Schumacher YO, Saugy M, Pottgiesser T, Robinson N. Detection of EPO doping and blood doping: the hematological module of Athlete Biological Passport. *Drug Test Anal*. 2012;4(11):846-53.
104. Jelkmann W, Lundby C. Blood doping and its detection. *Blood*. 2011;118(9):2395-404.
105. Lundby C, Robach P, Saltin B. The evolving science of detection of 'blood doping'. *Br J Pharmacol*. 2012;165(5):1306-15.
106. Lippi G, Franchini M, Salvagno GL, Guidi GC. Biochemistry, physiology, and complications of blood doping: facts and speculation. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006;43(4):349-91.
107. Reichel C. Recent developments in doping testing for erythropoietin. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(2):463-81.
108. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*. 2000;405(6787):635.
109. 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):119-6.
110. World Anti-Doping Agency (WADA). WADA Technical Document – TD2009 EPO. Harmonization of the method for the identification of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (i.e. darbepoetin and pegserpoetin). 2009 [Internet]. [Cited 2013 Nov 12]. Available from: http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/TD_EPO_2009.pdf.

111. Segura J, Pascual JA, Gutiérrez-Gallego R. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. *Anal Bioanal Chem.* 2007;388(7):1521-9.
112. World Anti-Doping Agency (WADA). WADA Technical Document – TD2013EPO. Harmonization of analysis and reporting of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (i.g. darbepoetin, pegserpoetin, peginesatide, EPO-Fc) by electrophoretic techniques. 2013 [Internet]. [Cited 2013 Dec 5]. Available from: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA-TD2013EPO-Harmonization-Analysis-of-Recombinant-Erythropoietins-EN.pdf.
113. Stenman UH, Hotakainen K, Alfthan H. Gonadotropins in doping: pharmacological basis and detection of illicit use. *Br J Pharmacol.* 2008;154(3):569-83.
114. Kicman AT, Brooks RV, Cowan DA. Human chorionic gonadotrophin and sport. *Br J Sports Med.* 1991;25(2):73-80.
115. Handelsman DJ, Goebel C, Idan A, Jimenez M, Trout G, Kazlauskas R. Effects of recombinant human LH and hCG on serum and urine LH and androgens in men. *Clin Endocrinol (Oxf.)*. 2009;71(3):417-28.
116. Strahm E, Marques-Vidal P, Pralong F, Dvorak J, Saugy M, Baume N. Influence of multiple injections of human chorionic gonadotropin (hCG) on urine and serum endogenous steroids concentrations. *Forensic Sci Int.* 2011;213(1-3):62-72.
117. Fischetto G, Berman S. From gene engineering to gene modulation and manipulation: can we prevent or detect gene doping in sport? *Sports Med.* 2013;43(10):965-77.
118. Van der Gronde T, de Hon O, Haisma HJ, Pieters T. Gene doping: an overview and current implications for athletes. *Br J Sports Med.* 2013;47(11):670-8.
119. Friedmann T, Rabin O, Frankel MS. Gene doping and sport. *Science.* 2010;327(5966):647-8.
120. World Anti-Doping Agency (WADA). The World Anti-Doping Code. The 2004 Prohibited List. International Standard.
121. Fallahi A, Ravasi A, Farhud D. Genetic doping and health damages. *Iran J Public Health.* 2011;40(1):1-14.
122. Gould D. Gene Doping: Gene delivery for Olympic victory. *Br J Clin Pharmacol.* 2012;76(2):292-8.
123. Battery L, Solomon A, Gould D. Gene doping: Olympic genes for Olympic dreams. *J R Soc Med.* 2011;104(12):494-500.
124. Oliveira RS, Collares TF, Smith KR, Collares TV, Seixas FK. The use of genes for performance enhancement: doping or therapy? *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(12):1194-1201.
125. McKanna TA, Toriello HV. Gene doping: the hype and the harm. *Pediatr Clin North Am.* 2010;57(3):719-27.

126. Thuyne WV, Eeno PV, Delbeke FT. Nutritional supplements: prevalence of use and contamination with doping agents. *Nutrition Research Reviews*. 2006;19:147-58.
127. Pipe A, Ayotte C. Nutritional supplements and doping. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2002;12:245-9.
128. Brasil. RDC n. 18, 27 Apr 2010.
129. Sottas P, Robinson N, Rabin O, Saugy. The Athlete Biological Passport. *Clin Chem*. 2011;57(7):969-76.
130. Wozny M. The biological passport and doping in athletics. *Lancet*. 2010;376(9735):79.
131. Zorzoli M. The Athlete Biological Passport from the perspective of an anti-doping organization. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(9):1423-5.