



Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus Araraquara

**“Doping no esporte: uso de eritropoietina,  
propriedades, efeitos e detecção”**

Júlia Seyssel Ortolani

Araraquara, 2012

Júlia Seyssel Ortolani

**“Doping no esporte: uso de eritropoietina,  
propriedades, efeitos e detecção”**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de  
Farmacêutico-Bioquímico

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite  
Departamento de Análises Clínicas

Araraquara, 2012

# Sumário

---

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Introdução.....                                                                                             | 4  |
| Agência Mundial Antidoping .....                                                                            | 7  |
| Eritropoietina Humana.....                                                                                  | 9  |
| Eritropoietinas Recombinantes e Análogos.....                                                               | 13 |
| Eritropoietinas recombinantes $\alpha$ , $\beta$ , $\omega$ e $\Delta$ .....                                | 13 |
| Análogo farmacológico - Darbepoetina alfa (NESP) .....                                                      | 15 |
| Ativador constante do receptor de eritropoietina (Continuous Erythropoietin Receptor Activator) – CERA..... | 16 |
| Fármaco Mimético - Hematide® .....                                                                          | 17 |
| Eritropoietina e o esporte .....                                                                            | 18 |
| Dopagem sanguínea.....                                                                                      | 18 |
| Transfusões autólogas.....                                                                                  | 19 |
| Transfusões heterólogas .....                                                                               | 20 |
| Influência da altitude .....                                                                                | 20 |
| Doping sanguíneo e a WADA.....                                                                              | 21 |
| Métodos de detecção .....                                                                                   | 22 |
| Métodos indiretos.....                                                                                      | 23 |
| Método Direto - IEF .....                                                                                   | 24 |
| Pré concentração da amostra.....                                                                            | 25 |
| Eletroforese por focalização isoeletrica .....                                                              | 25 |
| Dupla Transferência .....                                                                                   | 25 |
| Revelação da Membrana.....                                                                                  | 26 |
| Uso dos testes .....                                                                                        | 27 |
| Vantagens e desvantagens dos métodos indireto e direto. ....                                                | 28 |
| Passaporte biológico .....                                                                                  | 30 |
| Métodos alternativos .....                                                                                  | 32 |
| Dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE) .....                                                                  | 32 |
| Lauril Sarcosinato de Sódio – SAR-PAGE .....                                                                | 34 |
| Eletroforese bidimensional - 2DE-PAGE .....                                                                 | 34 |
| Membrana de imunopurificação - “Membrane assisted isoform immunoassay” (MAIIA) .....                        | 35 |
| rEPO, análogos da EPO e o controle da WADA.....                                                             | 36 |
| Coleta de amostras.....                                                                                     | 37 |

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Punições aos atletas flagrados .....                            | 38 |
| Formas de mascarar o uso de rEPO e análogos da EPO .....        | 39 |
| Efeitos colaterais do uso de estimulantes de eritropoiese ..... | 41 |
| Estatísticas de uso e casos de atletas flagrados .....          | 43 |
| Terapia gênica como contribuição ao doping genético .....       | 47 |
| A futura detecção de doping por EPO .....                       | 49 |
| Conclusão .....                                                 | 50 |
| Bibliografia .....                                              | 52 |

## Introdução

---

A origem da palavra doping é incerta. O termo *dop*, já fazia parte do dialeto africano Kafir e significava infusão estimulante de plantas medicinais (CBCM, 2011). Já em holandês, *dop* designava uma bebida alcoólica de cascas de uva que prometia aumentar a força e a vitalidade dos guerreiros da tribo Zulu (PIVETTA, 2004).

A palavra doping foi incluída pela primeira vez em um dicionário inglês no ano de 1889, significando uma mistura de drogas narcóticas utilizada em cavalos puro sangue para aumentar o desempenho em competições (CBCM, 2011).

Atualmente, segundo o código da Agência Mundial Antidoping, WADA considera-se doping a utilização de substâncias ou métodos capazes de aumentar artificialmente o desempenho esportivo, sejam eles potencialmente prejudiciais à saúde do atleta ou a de seus adversários, ou contra o espírito do jogo. Quando duas destas três condições estão presentes, o doping é caracterizado (WADA, World Anti-doping Code 2009).

A eritropoietina (EPO) é uma das drogas de uso proibido a atletas, segundo a lista anual da WADA. Este hormônio é uma proteína glicosilada com o potencial de estimular a eritropoiese, aumentando assim a quantidade de glóbulos vermelhos sanguíneos e indiretamente aumentando a capacidade de transporte de oxigênio aos tecidos. Os atletas, com este transporte incrementado, são beneficiados em esportes que exigem resistência física, tendo grande vantagem se comparados a atletas que não fizeram uso de eritropoietina.

Buscando tratamentos para pacientes anêmicos, que possuem uma menor concentração de glóbulos vermelhos no sangue, em 1985 foi feito o sequenciamento dos aminoácidos da cadeia da EPO, e foi possível gerar um clone genético desta glicoproteína (NG *et al.*, 2003). Este clone, conhecido por eritropoietina recombinante, rEPO, foi aprovado pela Agência de Controle de Alimentos e Medicamentos – FDA (E.U.A.) em junho de 1989 para o uso em pacientes com insuficiência crônica renal (FISHER, 2003).

O aumento em 10-20% da concentração de hemoglobinas no sangue tem o efeito de aumentar a disponibilidade de oxigênio aos músculos e conseqüentemente melhorar a performance aeróbica (WADLER, 1994). Buscando esta vantagem, muitos atletas se submeteram a transfusões sanguíneas, aumentando assim a quantidade de hemácias no sangue e o transporte de oxigênio.

Assim como todas as transfusões sanguíneas, estas para fins esportivos também apresentam inúmeros riscos à saúde do receptor que vão desde simples inflamações no local da punção até a possibilidade de contrair vírus como o HIV e Hepatites. Outro inconveniente é que as hemácias transfundidas têm um tempo de vida curto, ao redor de 30 dias, e sua destruição prematura leva ao aumento de bilirrubina (HOD *et al.*, 2010).

No final da década de 80, com os avanços dos medicamentos à base de rEPO para o tratamento da anemia, houve uma substituição da técnica de transfusão sanguínea pelo uso irracional de rEPO no cenário esportivo.

O reflexo deste abuso pôde ser observado entre os anos 1987 e 1991, quando foram relatados mais de vinte óbitos de atletas profissionais por

insuficiências cardíacas inexplicáveis (CAZZOLA, 2000; WADLER, 1994). No ano de 1988, surgiram diversos rumores de uso indiscriminado da rEPO nos Jogos Olímpicos de Seul, Coréia do Sul e Jogos Olímpicos de inverno de Calgary, Canadá (SYTKOWSKI, 2004).

Há diversos efeitos colaterais relacionados ao aumento descontrolado de células sanguíneas como complicações trombóticas, hipertensão arterial, aumento da viscosidade sanguínea entre outros. Tendo em vista a saúde dos atletas e a ética esportiva, em 1990 o Comitê Olímpico Internacional (COI) banuiu o uso deste hormônio recombinante no meio esportivo, mesmo sem existir na época técnicas capazes de detectar a presença de rEPO e diferenciá-la da forma endógena, EPO.

Atualmente já se têm bastante estudadas e definidas as propriedades farmacológicas, bio- e físico-químicas tanto da EPO como de sua forma recombinante, rEPO. Com este conhecimento foi possível avançar nos métodos de análise e detecção do hormônio, favorecendo desta maneira o controle de doping.

Há dois tipos de métodos de detecção: os diretos, que indicam a presença de EPO exógena administrada, e os indiretos, que somente permitem afirmar que houve um incremento no número de células e outros fatores do sangue, mas que não indicam a causa (DELANGHE, BOLLEN, BEULLENS, 2008).

O método direto empregado por todos os laboratórios credenciados junto a Agência Internacional Anti Doping para a detecção de EPO, rEPO e seus análogos farmacológicos foi descrito em 2000 por LASNE e colaboradores que através da matriz urina busca-se, por focalização isoelétrica, seguida de dupla transferência, algum outro tipo de eritropoietina, se não a endógena, já que estas possuem

diferentes perfis isoeletricos. Há também a análise do perfil das eritropoietinas por eletroforese com dodecil sulfato de sódio (SDS), mas neste caso as diferenças entre elas são devidas aos pesos moleculares distintos (LASNE & DE CEAURRIZ, 2000; DEHNES, LAMON, LÖNNBERG, 2010).

Apesar da focalização isoeletrica ser o método mais utilizado pelos laboratórios da WADA, a sua execução exige técnicos bastante treinados, um laboratório equipado, é um procedimento demorado (aproximadamente 36h) e caro (400 Euros por amostra) (PELTRE & THORMANN, 2003). Segundo Franke e Heid, 2006, o anticorpo primário não tem especificidade suficiente para a EPO, podendo desta forma reagir com outras proteínas e influenciando o resultado (FRANKE & HEID, 2006). Apesar desta possível ligação cruzada, não são descritos muitos resultados falsos positivos (boa especificidade). Já a sensibilidade do teste é um ponto a ser melhorado, para evitar que atletas que fizeram uso da substância não sejam flagrados. (PELTRE, THORMANN, 2003).

Ao mesmo tempo que as técnicas de detecção se aprimoram, novas drogas surgem no mercado. Ainda no final da década de 90, usando técnicas de DNA, foi produzido um análogo da EPO, a darbepoetina alfa (Aranesp<sup>®</sup>), que em comparação a eritropoietinas apresenta um maior tempo de meia vida (2-3 vezes), maior potência *in vivo* e com isto a administração da darbepoetina é menos frequente e a resposta biológica esperada é a mesma (EGRIE & BROWNE, 2001).

## Agência Mundial Antidoping

---

Antes mesmo de haver qualquer método de detecção destas substâncias de doping, na década de 1920 já se lutava contra a dopagem esportiva para garantir



que os méritos dos esportistas fossem atingidos apenas por esforços humanamente possíveis.

Foi apenas no ano de 1999 que foi criada a Agência Mundial Antidoping (WADA, sigla em inglês) para incentivar uma cultura isenta de doping no esporte e coordenar, promover e monitorar em nível internacional, o combate à dopagem, sob todas as formas. A WADA é mantida com verbas governamentais e de organizações mundiais de esportes (BOWERS, 2009). A ausência de um vínculo direto da WADA com órgãos governamentais dos países evita que a ética esportiva seja prejudicada por questões políticas, como já foi visto no passado (WILBER, 2002).

A missão da WADA é “promover, coordenar e monitorar o combate contra o doping no esporte”. Juntamente com a criação da WADA, foram criados inúmeros documentos que passaram a reger o cenário do controle da dopagem. Dentre estes, incluem-se uma lista anual de substâncias e métodos proibidos (WADA, The 2012 Prohibited List, 2012) e o anteriormente citado, Código da WADA (WADA, World Anti-Doping Code, 2009).

A lista de substâncias e métodos proibidos pela WADA enumera substâncias que colocam em risco a saúde do atleta, ou que irão gerar uma competição desleal com os demais participantes. Especialistas se reúnem anualmente para revisar a lista e possivelmente incluir novas substâncias que tenham, por ventura, surgido no decorrido ano. Posteriormente, uma equipe multiprofissional de médicos, técnicos e pesquisadores a aprova, e esta é implementada em janeiro do ano que está por vir.

No Código da WADA, publicado pela primeira vez em 2004, estão redigidas normas e regras de todas as etapas do controle de dopagem, assim como os

direitos e deveres dos atletas e laboratórios frente a um teste. Atualmente este código já está em sua 3ª versão e possibilita uma harmonização e padronização das ações tomadas em todas as partes do mundo.

A Agência Mundial Anti Doping também é responsável por reconhecer e credenciar os laboratórios que poderão executar análises e obter resultados aceitáveis. Os laboratórios precisam estar acreditados na norma técnica ISO/IEC 17025, e precisam ser apoiados por alguma organização nacional anti doping (BOWERS, 2009).

Para manter e garantir a constante qualidade e performance de seus laboratórios associados, a WADA envia periodicamente algumas amostras de atletas, ou amostras brancas para que estes as analisem e enviem seus pareceres (IVANOVA, BOGHOSIAN, RABIN, 2007).

## Eritropoietina Humana

---

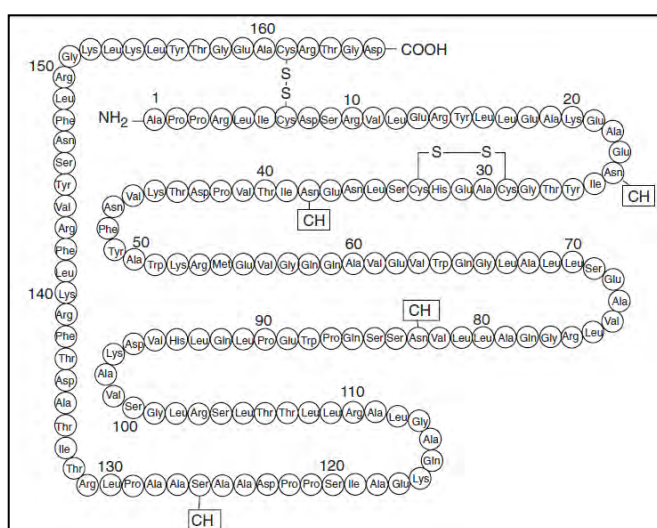
Em adultos o tempo de vida de uma célula sanguínea vermelha é de aproximadamente 120 dias. Para manter este equilíbrio é necessária a renovação diária de 0,8 a 1% das células circulantes no sangue (ISRAELS & ISRAELS, 2003). Este intenso ciclo só é possível devido à morte programada das mesmas (apoptose) e principalmente à constante hematopoiese, que envolve a produção e maturação de células para o sangue, tanto eritrócitos como também células linfóides e mielóides (ROBINSON *et al.*, 2006).

Os eritrócitos, também chamados de glóbulos vermelhos ou hemácias, não possuem núcleo, retículo endoplasmático, ribossomos e mitocôndrias, ou seja, não

sofrem mitose, sendo a eritropoiese a única maneira de produção de novas células. A ausência destas organelas citoplasmáticas e nucleares tem a finalidade de otimizar a capacidade de carregamento de hemoglobina, proteína componente do eritrócito, e responsável direta pelo transporte de oxigênio ( $O_2$ ) e gás carbônico ( $CO_2$ ) (DAVID, 2009; GARNIER *et al.*, 2002).

Em adultos, a eritropoietina (EPO) é sintetizada principalmente nas células de revestimento dos capilares peritubulares renais (90%), pelo fígado (<10%) e também uma pequena porção é de origem cerebral. Já em fetos, as células hepáticas são as principais produtoras da EPO (FISHER, 2003).

Este hormônio tem natureza glicoproteica e seu peso molecular é de 30,4 KDa. O gene da EPO se localiza no braço longo do cromossomo 7q11-22. O gene contém cinco éxons, que codificam o pré-hormônio EPO de 193 aminoácidos e quatro íntrons. Posteriormente há uma perda de 27 aminoácidos na porção terminal de  $NH_2$ . A forma ativa da eritropoietina contém então 165 aminoácidos dispostos em uma única cadeia polipeptídica. A partir desta cadeia há quatro ligações a



**Figura 1:** Estrutura primária da EPO: 165 aminoácidos, duas pontes dissulfeto intramoleculares, ligando as cisteínas 29-33 e 6-161. Estão também representadas as quatro ligações de carboidratos (CH) nas asparaginas das posições 24, 38 e 83 e à serina na posição 126 **Fonte:** LAPPIN, 2003).

polissacarídeos nas posições 24, 38, 83 e 126 e duas ligações dissulfeto intramoleculares (CHOI, KIM, PARK, 1996), conforme exemplificado na figura 1.

Carboidratos são as macromoléculas mais abundantes na eritropoietina, correspondendo a 40% de sua composição. Os carboidratos mais frequentes são o ácido siálico, seguido pelas hexoses N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilneuramínico. Enquanto que a cadeia peptídica é essencial para a ligação EPO-receptor, os carboidratos são responsáveis pela manutenção da estrutura terciária e por evitar a rápida depuração hepática, favorecendo a atividade *in vivo* da molécula (DORDAL, WANG, GOLDWASSER, 1985).

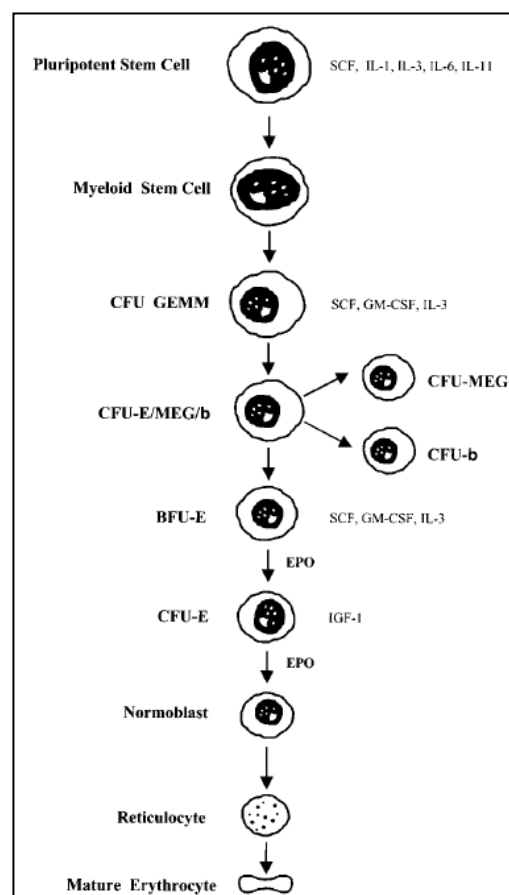
A produção de eritropoietina ocorre sempre que o número de eritrócitos esteja abaixo do normal ou quando, por outros motivos, a taxa de oxigênio circulante esteja abaixo do limite. Essa menor oferta de O<sub>2</sub> circulante, conhecida por hipóxia, é percebida por estruturas sensíveis localizadas no córtex renal e pode ser devida a inúmeras causas como menor concentração de hemoglobina (ex. anemia), reduzida pressão de oxigênio (ex. altitudes elevadas) e até mesmo quando a afinidade por O<sub>2</sub> está aumentada, como em casos de esforço físico intenso (JELKMANN, 2004; GARCIA *et al.*, 2007; ROBINSON *et al.*, 2006).

Em situações de hipóxia, o fator HIF-1 (Hypoxia inducible factor) será ativado pela dimerização das subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  e induzirá a expressão do gene da eritropoietina, traduzindo assim o hormônio (JELKMANN, 2004).

A EPO formada será direcionada à medula óssea, onde irá estimular a eritropoiese (CHOI, KIM, PARK, 1996). Na medula óssea as células pluripotentes sofrem maturação, sob influência de diversas citocinas. A eritropoietina é

responsável por induzir a maturação mais tardia, e quase final da formação do eritrócito. As células progenitoras eritrocitárias (BFU-E) e principalmente as unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) e os pró-normoblastos possuem receptores específicos da EPO e quando em contato com o hormônio são estimuladas a se maturarem a normoblastos, reticulócitos e até se tornarem finalmente eritrócitos maduros.

Além de acelerar a maturação das CFU-Es e pró-normoblastos, a eritropoietina possui também a função de evitar a morte programada destas células. Mesmo em condições fisiológicas normais a concentração do hormônio EPO no sangue é baixa. Esta baixa, porém presente, concentração de EPO é fundamental ao equilíbrio do sistema eritrocitário. Quando há o aumento de eritropoietina, será evitada a apoptose de mais células, aumentando a população destas (ANDRÉASSON *et al.*, 2000).



**Figura 2:** Eritropoiese desde a célula pluripotente até o eritrócito maduro. Do lado direito estão listadas todas citocinas que estimulam a maturação da célula inicial. São elas: Fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF), fator estimulador de células-tronco (SCF), fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11), fator de crescimento semelhante à Insulina-1 (IGF-1) e eritropoietina (EPO) **Fonte:** FISHER, 2003.

Desde o aumento da EPO circulante até a maturação destes novos eritrócitos há um intervalo de dois a três dias e este rápido desenvolvimento apóia a teoria de

que a EPO atua em células que já iniciaram a sua maturação, já que o tempo total de maturação é de cinco a sete dias (RASSIER, NATALI, DE ROSE, 1995; ROBINSON, 2006).

## Eritropoietinas Recombinantes e Análogos

---

A busca por medicamentos para pacientes anêmicos que necessitavam de constantes transfusões sanguíneas empenhou o desenvolvimento de fármacos que atuassem mimetizando os efeitos da eritropoietina. Devido ao grande impacto positivo que um medicamento com esse efeito teria, a EPO foi o primeiro fator de crescimento hematopoiético a ser clonado (JACOBS *et al.*, 1985).

### Eritropoietinas recombinantes $\alpha$ , $\beta$ , $\omega$ e $\Delta$

Em 1977, Miyake, Kung e Goldwasser a partir de 2550 litros de urina de pacientes com anemia aplástica isolaram e purificaram o hormônio eritropoietina (MIYAKE, KUNG, GOLDWASSER, 1977). Alguns anos mais tarde, quando já se dominavam técnicas mais aprimoradas, foi caracterizada a região responsável por codificar o gene da EPO no DNA humano e foi feito o sequenciamento dos aminoácidos da EPO (JACOBS *et al.*, 1985).

Quando a sequência das bases nitrogenadas foi estabelecida, o cDNA codificador da EPO foi inserido no material genético de células ovarianas de hamsters chineses e estes passaram a produzir eritropoietina recombinante.

Após a aprovação da Agência de Controle de Alimentos e Medicamentos – FDA (E.U.A.) em junho de 1989, o primeiro medicamento a base de eritropoietina

recombinante a se tornar disponível no mercado foi a rEPO $\alpha$ , sob vários nomes comerciais como Epogen<sup>®</sup>, Procrit<sup>®</sup>, Eprex<sup>®</sup>, Erypo<sup>®</sup>, Espo<sup>®</sup> (JELKMANN 2008).

Um ano após, foi também lançada no mercado outro tipo de eritropoietina recombinante, a do tipo beta (rEPO $\beta$ ). As letras gregas indicam pequenas diferenças na glicosilação da molécula, mas a cadeia peptídica é obrigatoriamente a mesma, pois esta é geneticamente controlada. Apesar de ambas, rEPO $\alpha$  e rEPO $\beta$ , serem sintetizadas em células ovarianas de hamsters chineses, por serem linhagens de células distintas, a estrutura da cadeia glicosídica gerada entre estas é diferente (REICHEL & GMEINER, 2010).

A rEPO $\beta$  apresenta um perfil mais básico que rEPO $\alpha$ . Esta diferença confere à rEPO $\beta$  características farmacocinéticas e farmacodinâmicas diferentes que resultam em uma maior atividade biológica quando comparada à rEPO $\alpha$ .

Comercialmente a rEPO $\beta$  era encontrada sob o nome de Recormon<sup>®</sup>, e a partir de 1997 houve uma alteração para NeoRecormon<sup>®</sup> (JELKMANN 2008).

Foram também desenvolvidos outros tipos de eritropoietinas recombinantes, a ômega (rEPO $\omega$ ) e a delta (rEPO $\Delta$ ), sintetizadas também a partir de cDNA mas em células renais de hamsters jovens e em células de fibrossarcoma humano respectivamente (DEICHER & HÖRL, 2004; PASCUAL, 2004).

Os principais fatores que determinam a composição glicídica das eritropoietinas são o tipo de célula que hospedou o c-DNA, as condições de cultura e os procedimentos de purificação da proteína (JELKMANN, 2007). Sendo assim, já eram esperadas diferentes atividades biológicas consequentes de distintas composições glicídicas entre rEPO  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  e  $\Delta$ .

### **Análogo farmacológico - Darbepoetina alfa (NESP)**

Sabe-se que a quantidade de resíduos de ácidos siálicos componentes da cadeia glicosídica está diretamente ligada ao tempo de meia vida da molécula e à ligação ao receptor da eritropoietina. Desta forma, uma maior quantidade de resíduos de ácido siálico presente na composição diminuirá a afinidade por seu receptor específico, porém, ainda assim, a molécula apresentará maior atividade biológica devido ao seu aumentado tempo de meia vida (EGRIE & BROWNE, 2001).

Com base nestes estudos, foi projetado um análogo farmacológico hiperglicosilado da EPO. Uma mutação na sequência original da EPO permitiu a substituição de cinco aminoácidos, o que gerou mais dois sítios de ligações glicosídicas. Como se podia esperar, a nova molécula criada, nomeada de Darbepoetina Alfa ou também conhecida como NESP – Novel Erythropoiesis Stimulating Protein, apresenta um tempo de meia vida 3 vezes maior que das rEPOs (25,3h x 8,5h) (MACDOUGALL *et al.*, 1999) e também maior peso molecular (38500 x 30400 daltons) (FISHER, 2003).

Medicamentos cujo princípio ativo é a darbepoetina alfa, assim como o Aranesp<sup>®</sup>, são considerados de segunda geração (JELKMANN, 2008). Estes medicamentos significaram um grande avanço para pacientes em tratamento de insuficiências renais crônicas, pois a darbepoetina, ao contrário das eritropoietinas recombinantes, é administrada somente uma vez por semana ou a cada duas semanas (LOCATELLI *et al.*, 2001).

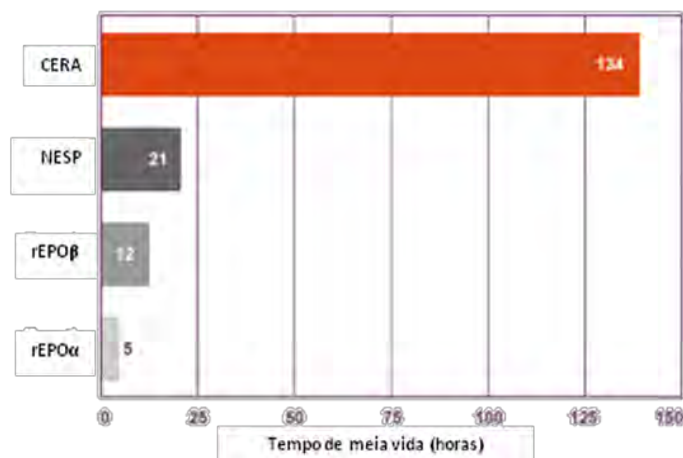


### **Ativador constante do receptor de eritropoietina (Continuous Erythropoietin Receptor Activator) – CERA**

Este fármaco, lançado no mercado no ano de 2007, com o nome de Mircera<sup>®</sup>, foi quimicamente desenvolvido pela fusão de uma molécula de EPO a um polímero de metoxi polietileno glicol. Este polímero, por seu grande tamanho, afeta muitas das propriedades da molécula de eritropoietina. O complexo formado tem peso de 69-78 KDa e a interação com o receptor de EPO é diferenciada (MACDOUGALL & ECKARDT, 2006; REICHEL & GMEINER, 2010; REICHEL, 2011).

A CERA por possuir uma afinidade de 50 a 100 vezes menor pelo receptor, se comparada à EPO endógena, possui também um maior tempo de meia vida, podendo chegar a 140 horas. A ligação da CERA com seu receptor é demorada, e quando finalmente ocorre, há um rápido desligamento, permitindo assim múltiplos estímulos ao receptor (JARSCH *et al.*, 2008; BAGUÉ, 2011).

Desta forma, o tratamento de pacientes que fazem uso de Mircera<sup>®</sup> é muito conveniente, já que somente exige aplicações a cada três semanas em casos de tratamento de câncer por quimioterapia ou uma aplicação mensal para pacientes com insuficiência renal crônica não grave (DMOSZYNSKA *et al.*, 2004; MACDOUGALL & ECKARDT, 2006; SULOWICZ *et al.*, 2007). Em comparação às outras eritropoietinas farmacológicas, a CERA possui maior tempo de meia vida, fato este representado no gráfico 1.



**Gráfico 1:** Representação dos tempos de meia vida de aplicações intra-venosas dos diferentes estimulantes de eritropoiese CERA, NESP, rEPO $\beta$  e rEPO $\alpha$ . Nota-se o grande destaque da CERA, com 134 horas. **Adaptado de:** LA ROCHE LTD, Mircera<sup>®</sup> mode of action.

### Fármaco Mimético - Hematide<sup>®</sup>

Miméticos da EPO são pequenas moléculas capazes de mudar a conformação e assim ativar o receptor da EPO, gerando os mesmos efeitos de aumento de eritropoiese (WRIGHTON *et al.*, 1996; DIAMANTI-KANDARAKIS, *et al.*, 2005).

Hematide<sup>®</sup>, mimético da EPO, é um peptídeo dimérico estimulador da eritropoiese com elevado tempo de meia vida devido à ligação do peptídeo com uma molécula de metoxi polietileno glicol. Este mimético foi desenvolvido para uso terapêutico em pacientes com anemia associada à insuficiência renal crônica e câncer (RICHARD *et al.*, 2006).

Ainda não disponível no mercado, mas já em fase III de testes clínicos, além de seu elevado tempo de meia vida, quando comparado a outros medicamentos estimuladores da eritropoiese, o Hematide<sup>®</sup> apresenta maior estabilidade à temperatura ambiente e também é menos imunogênico, evitando o surgimento de aplasia eritróide pura mediada por anticorpos anti-eritropoietina (MACDOUGALL, 2008; MACDOUGALL & ASHENDEN, 2009). Além disto, o processo de fabricação não envolve técnicas de engenharia genética e a administração em pacientes sob

tratamento seria feita uma vez por mês, o que facilitaria e tornaria o tratamento mais barato (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2006, MACDOUGALL *et al.*, 2006).

## Eritropoietina e o esporte

---

A intensidade e a duração do esforço físico estão diretamente ligadas ao treinamento e a capacidade de transporte de oxigênio e outros nutrientes aos músculos exigidos durante o esforço.

Conforme o esforço, o oxigênio é consumido rapidamente e é observada uma diminuição do desempenho muscular. Aumentando a massa de eritrócitos, a capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue também é aumentada, retardando assim o decaimento do desempenho (LIPPI & GUIDI, 2000; BAGUÉ, 2011).

### **Dopagem sanguínea**

O termo doping sanguíneo surgiu no final da década de 70, para se referir ao aumento artificial de massa de eritrócitos com o intuito de melhorar a disponibilidade de oxigênio. Tal feito pode ser conseguido através de transfusões sanguíneas autólogas, heterólogas, permanência em ambientes com menor disponibilidade de oxigênio ou pelo mais recente uso de formas recombinantes ou análogas da EPO (RASSIER, NATALI, DE ROSE, 1996; CAZZOLA, 2000).

Após as Olimpíadas de 1984 em Los Angeles, EUA, quando sete atletas da equipe americana admitiram terem feito transfusões sanguíneas para benefício esportivo, o doping sanguíneo foi adicionado à lista da WADA de métodos não permitidos no esporte (KLEIN, 1985; ROBINSON *et al.*, 2006).

Para transfusões sanguíneas havia basicamente dois processos distintos: transfusão autóloga, quando o atleta recebia uma bolsa com seu próprio sangue anteriormente coletado, ou a transfusão heteróloga, quando atletas recebiam bolsa de sangue de outras pessoas que apresentavam compatibilidade sanguínea.

### **Transfusões autólogas**

De quatro a oito semanas antes da competição, são coletadas de duas a três porções de 450 mL de sangue do atleta. As células sanguíneas são separadas do plasma, e este é rapidamente reinfundido no atleta. As células sanguíneas são então tratadas e congeladas ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) em solução de glicerol.

A drástica diminuição de oxigênio no sangue causada pela retirada de eritrócitos será logo percebida pelas anteriormente citadas estruturas sensíveis à hipóxia no córtex renal, que aumentarão a taxa de EPO produzida. Por volta da terceira semana, os níveis de eritrócitos estarão normalizados.

De um a sete dias antecedentes à competição, as bolsas armazenadas serão descongeladas, lavadas em soluções de alta osmolaridade para remover todo o glicerol, resuspensas em uma solução salina e reinfundida no atleta (RASSIER, NATALI, DE ROSE, 1996; BIRKELAND & HEMMERSBACH, 1999).

Este procedimento de estocagem leva a uma significativa perda de 15% dos eritrócitos, e os demais apresentam menor flexibilidade, e também menor capacidade de transporte de  $\text{O}_2$  (BERGLUND & HEMMINGSON, 1987). Por duas semanas a quantidade de eritrócitos se mantém aumentada em 8-20% (GLEDHILL, 1982; RASSIER, NATALI, DE ROSE, 1996).

## **Transfusões heterólogas**

Este tipo se diferencia da transfusão autóloga pela origem do sangue, que neste caso seria de algum doador com compatibilidade sanguínea. O sangue coletado pode ser diretamente reinfundido no atleta, ou o sangue pode ser armazenado, seguindo os princípios acima descritos.

Enquanto a transfusão autóloga apresenta riscos de flebite e trombose intravenosa, além destes, na transfusão heteróloga há o grande risco de serem transmitidas doenças infecto-contagiosas principalmente por vírus, como o HIV ou outras doenças como as hepatites e também outro fator de perigo deste método seria a incompatibilidade dos diversos tipos sanguíneos.

## **Influência da altitude**

Sabe-se que ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio estimulam estruturas sensíveis à hipóxia a produzir EPO (JELKMANN, 2004; GARCIA *et al.*, 2007; ROBINSON *et al.*, 2006). Desde 1940, treinar e viver em altitudes elevadas é uma das estratégias para se melhorar o desempenho em competições ao nível do mar (BALKE, NAGLE, DANIELS, 1965; DANIELS & OLDRIDGE, 1970). No ano de 2001, Stray-Gundersen, Chapman e Levine, em um estudo comprovaram que treinos em altitudes elevadas não eram tão benéficos. Foi desenvolvido um novo método de treinamento para atletas: “Living high – Training low”, nome em inglês de tal método, com significado em português de viver em altas altitudes e treinar em baixas (STRAY-GUNDERSEN, CHAPMAN, LEVINE, 2001).

A vivência em altitudes elevadas gera inúmeras respostas fisiológicas, incluindo o aumento da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, que são muito benéficas para aumentar a resistência esportiva. Por outro lado, não é

recomendado que os treinamentos sejam feitos também em altitudes, já que a intensidade, a frequência e a duração do esforço serão muito limitadas pela pressão reduzida de oxigênio. Sendo assim, os treinamentos serão mais produtivos se realizados ao nível do mar (ASHENDEN, 2000; STRAY-GUNDERSEN, CHAPMAN, LEVINE, 2001).

Estudos posteriores demonstraram um incremento de 5% na massa de eritrócitos de atletas que por 24 dias estiveram sob o “Living high-Training low” (WEHRLIN *et al.*, 2005).

Para facilitar treinamentos de atletas que não residem perto de áreas de altitudes elevadas, foram desenvolvidas câmaras hipobáricas que artificialmente têm reduzida pressão de oxigênio, estimulando também a produção de eritrócitos. Atletas realizam seus treinamentos normalmente e apenas se isolam nessas câmaras para dormir, sendo também beneficiados já que a câmara simula altitudes (HYPOXICO, altitude training systems; JOYNER, 2002).

Apesar de muitos atletas utilizarem o “Living high-Training low”, estudos recentes questionam a eficácia do treinamento e comprovaram que por mais que possa ocorrer um aumento na massa eritrocitária, este não é significativo, e não irá aumentar a quantidade de oxigênio circulante, uma vez que atletas já possuem alta capacidade aeróbica (ROBACH, 2012; SIEBENMANN, 2012).

## **Doping sanguíneo e a WADA**

O doping sanguíneo está incluído na lista de métodos e substâncias proibidas da WADA, dentro do sub-ítem M1 de métodos de “aumento da transferência de

oxigênio”, como citado abaixo, em tradução do Comitê Olímpico Brasileiro (COB) da lista da WADA:

**“MÉTODOS PROIBIDOS**

**M1. AUMENTO DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO**

*Os seguintes são proibidos:*

1. *Doping sanguíneo, incluindo o uso de sangue autólogo, homólogo ou heterólogo ou de produtos de glóbulos vermelhos de qualquer origem.*
2. *Aumento artificial da captação, transporte ou aporte de oxigênio, incluindo, mas não limitado aos perfluoroquímicos, efaproxiral (RSR13) e produtos à base de hemoglobina modificada (ex.: substitutos de sangue com base em hemoglobina, produtos de hemoglobina microencapsulados), excluindo oxigenação Suplementar.”*

**Fonte:** [http://www.cob.org.br/pesquisa\\_estudo/pdfs/TB\\_Lista\\_Antidoping\\_06jan.pdf](http://www.cob.org.br/pesquisa_estudo/pdfs/TB_Lista_Antidoping_06jan.pdf)

Segundo número 1 do sub-ítem M1 de métodos proibidos, estão proibidos todos os tipos de doping sanguíneo. Já o uso de câmaras hipobáricas, ou a vivência e treinamento em altitudes elevadas não são especificamente listados, mas se incluem no número 2 por serem consideradas formas artificiais de captação, transporte ou aporte de oxigênio.

## Métodos de detecção

---

Os níveis de EPO encontrados nos fluidos biológicos são muito baixos (DELANGHE, BOLLEN, BEULLENS, 2008). A disponibilidade de oxigênio, variações fisiológicas individuais, patologias, treinamento físico, hidratação e horário da coleta são todas variáveis que influenciam na concentração de EPO, ficando difícil estabelecer um valor normal deste hormônio para indivíduos. A molécula de EPO é de estrutura complexa e de elevada massa molecular, o que dificulta ainda mais a diferenciação da rEPO e análogos do hormônio endógeno (MAGNANI, 1999; BREYMAN, 2000; BENTO, 2008).

Foram desenvolvidas duas linhas de testes, os indiretos e os diretos. Testes indiretos apenas indicam, através de marcadores biológicos, que há alguma alteração nos níveis normais de células sanguíneas, porém mesmo havendo esta alteração não é possível afirmar que houve o uso de rEPO ou algum análogo de EPO. Já os testes diretos identificam bioquimicamente em urina o hormônio EPO e/ou a presença do hormônio exógeno.

### **Métodos indiretos**

Preocupados com a saúde dos atletas, e com o controle do abuso de estimulantes da eritropoiese, em 1997 foram estabelecidos limites máximos de hematócritos de atletas. Para homens, o hematócrito não poderia passar de 50% e para mulheres 47%. Anos após, também ficou estabelecido que 17 g/dL seria o valor máximo de hemoglobina plasmática. Atletas que estivessem acima destes limites seriam impedidos de participar da competição e ficariam afastados dos esportes por duas semanas para que houvesse uma diminuição na concentração de eritrócitos, e o esforço físico não envolvesse riscos à saúde.

Esses limites eram marcadores indiretos do uso recente de rEPO, mas foram seguidos de controvérsias e dúvidas quanto à sua eficiência e veracidade (EKBLOM & BERGLUND, 1991; BREYMANN, 2000; BENTO, 2003).

Para os Jogos Olímpicos de 2000, na Austrália, foi desenvolvida a segunda geração de métodos indiretos. Este novo método baseava-se nas alterações fisiológicas do sangue em resposta ao uso de EPO exógena (ZORPETTE, 2000). Cinco parâmetros hematopoiéticos seriam avaliados, e posteriormente enquadrados em dois modelos matemáticos: ON e OFF. Além do hematócrito (Hct), deveriam ser analisadas, para cada amostra, a concentração de EPO em soro, do receptor solúvel



de transferrina (sTfR), porcentagem de reticulócitos (ret) e porcentagem de macrócitos (macro) (ZORPETTE, 2000; PARISOTTO *et al.*, 2000; PARISOTTO *et al.*, 2001; PASCUAL *et al.*, 2004; SEGURA, PASCUAL, GALLEGO, 2007).

Os dois modelos matemáticos eram úteis para detectar diferentes momentos de abuso de rEPO e análogos. O modelo ON seria para flagrar o uso atual ou bastante recente, já o método OFF detectaria rEPO quando seu último uso tivesse sido feito há algumas semanas antes da coleta de sangue (PASCUAL *et al.*, 2004).

### **Método Direto - IEF**

Simultaneamente ao desenvolvimento do teste indireto, também no ano de 2000, foi criado na França um promissor método direto em urina que provava ser capaz de diferenciar a rEPO e análogos da EPO a partir da diferença de carga de suas moléculas devido ao diferente sítio de formação das cadeias glicosídicas. A EPO endógena é mais ácida que as formas recombinantes e assim podem ser separadas (RUSH, 1995; LASNE & DE CEAURRIZ, 2000; WANG *et al.*, 2002; ROBINSON *et al.*, 2006 ).

Isoeletrofocalização (IEF) seguida de dupla transferência foi o protocolo desenvolvido por Lasne e colaboradores (2000), que ainda é, com algumas adaptações, o método empregado pela WADA e todos seus laboratórios acreditados na busca em matriz urina de estimuladores da eritropoiese.

O método pode ser dividido em quatro etapas, pré concentração da amostra, eletroforese por focalização isoeletrica, dupla transferência e revelação por quimioluminescência, descritas abaixo segundo artigos citados.

### ***Pré concentração da amostra***

A etapa de pré concentração da amostra é feita por ultrafiltração, onde vinte mililitros de urina passam por diversas etapas de filtração em membranas de 30 KDa. O retentato é lavado e ao final recolhe-se um volume reduzido (20 µL) de urina de 700 a 1000 vezes mais concentrada que a inicial, e que possui apenas moléculas de massa molecular superior a 30.000Da, faixa onde encontra-se a EPO.

### ***Eletroforese por focalização isoeétrica***

Para a eletroforese da etapa seguinte é utilizado um gel de 1 mm de espessura feito de poliacrilamida e uréia. Em equipamento de eletroforese sob placa refrigerada, é feita uma pré focalização para que seja organizado o gradiente de pH. São aplicados então 20 µL de cada urina a ser analisada e fornecida corrente elétrica específica para que a migração das proteínas ocorra.

Proteínas submetidas à eletroforese migram através do gel e param ao atingirem seu ponto isoeletrico. Entende-se por ponto isoeletrico a região onde a carga líquida dos grupamentos iônicos da proteína é zero.

### ***Dupla Transferência***

As proteínas em seus respectivos pontos isoeletricos no gel serão então transferidas a uma membrana de polivideno e após bloqueio, para impedir ligações a proteínas sem interesse, esta membrana será imersa em solução de 1µg/mL de anticorpo primário (Ac1°) monoclonal anti EPO humana (LASNE & DE CEAURRIZ, 2000; LASNE *et al.*, 2002; REICHEL & GMEINER, 2010).

Espera-se que o anticorpo primário se ligue especificamente às moléculas de EPO. O complexo EPO-Anticorpo primário é então transferido em meio ácido e sob

corrente elétrica para outra membrana de polivideno. Este processo da segunda transferência é feito para prevenir que anticorpos primários que se ligaram inespecificamente às proteínas se liguem ao anticorpo secundário (LASNE, 2001).

A segunda membrana entra em contato com o anticorpo secundário (anti-anticorpo IgG) e posteriormente com o conjugado estreptavidina peroxidase.

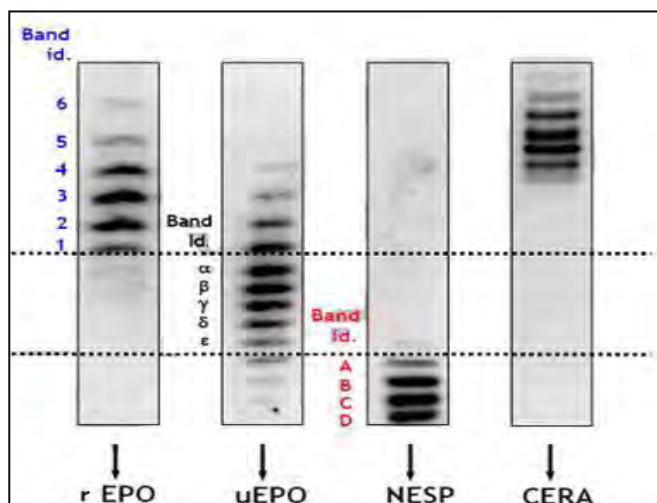
### ***Revelação da Membrana***

Para a revelação a membrana é submersa em substrato quimioluminescente e posicionada em uma câmara de quimioluminescência. São capturadas diversas imagens entre 1 e 60 minutos de exposição. A intensidade da quimioluminescência emitida será representada por bandas na imagem final. As bandas das amostras são comparadas com controles e com base em documentos técnicos expedidos pela WADA, os resultados são interpretados. No documento técnico TD EPO 2009 - WADA são estabelecidos critérios para positividade de amostras (LASNE & DE CEAURRIZ, 2000; LASNE, 2001; LASNE *et al.*, 2002; WADA - Technical Document EPO, 2009; REICHEL & GMEINER, 2010; REICHEL, 2011).

Na figura 3 há uma típica imagem de revelação de IEF. Nota-se o diferente perfil das eritropoietinas listadas. As bandas na área mais alta da imagem são de proteínas que possuem características mais básicas, ao contrário das mais ácidas, que se localizam na parte inferior da imagem. A zona intermediária é ocupada basicamente pela EPO endógena (segunda coluna da imagem), sendo o perfil esperado para pessoas saudáveis e que não fazem uso de estimuladores de eritropoiese. Atletas que utilizam alguma das formas exógenas do hormônio apresentarão o perfil de eritropoietina mais ácido ou mais básico que o normal (WADA - Technical Document EPO 2009).

A eritropoetina endógena apresenta bandas na faixa de pH de 3,92 a 4,42, a rEPO  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam na faixa de 4,42 a 5,11 e a NESP tem seus valores de ponto

isoeletrico em torno do Ph 3.7 – 4 (LASNE & DE CEAURRIZ, 2000).



**Figura 3:** Perfil isoeletrico das diferentes eritropoietinas testadas. rEPO (Eritropoietina recombinante), uEPO (eritropoietina endógena), NESP (Darbepoetina alfa) e CERA (Ativador constante do receptor de eritropoietina **Adaptado de :** WADA

Technical Document EPO, 2009.

## Uso dos testes

A comissão médica do Comitê Olímpico Internacional (COI) aprovou o modelo ON do teste indireto desenvolvido por Parisotto e colaboradores (2000) para detectar o abuso de rEPO. Durante as Olimpíadas de Sydney o método indireto ON foi utilizado em combinação com o método direto, recém desenvolvido por Lasne e De Ceaurriz (2000), baseado na isoelectrofocalização seguida de dupla transferência. (LASNE & DE CEAURRIZ, 2000; PARISOTTO *et al.*, 2000; PARISOTTO *et al.*, 2001; WILBER, 2002; DELANGHE, BOLLEN, BEULLENS, 2008).

Os testes indiretos que apresentaram resultados fora do padrão foram confirmados pelo teste direto. A execução destes dois testes exigia a coleta de dois tipos de materiais biológicos: sangue para o teste indireto e urina para o teste direto. Apesar do esforço, neste evento esportivo nenhum atleta foi flagrado pelo uso de rEPO (SEGURA, PASCUAL, GALLEGU 2007).

O modelo indireto OFF, criado para detectar usos menos recentes de estimuladores da eritropoiese, não foi aprovado pelo COI (PARISOTTO *et al.*, 2001; WILBER, 2002).

Nos jogos olímpicos de inverno de Salt Lake City (2002) o modelo combinado voltou a ser utilizado, porém só seriam reportados casos positivos de doping, caso ambos os testes (indireto e direto) fossem positivos (COI, Post games report, 2002).

Em junho de 2003 foi decidido pela WADA que a detecção de EPO recombinante em todos os eventos esportivos seria feita somente através da matriz urina, afirmando que mesmo sem os testes indiretos, qualquer resultado do teste direto que fosse classificado como positivo já seria válido para comprovar situação de doping (PASCUAL *et al.*, 2004; DELANGHE, BOLLEN, BEULLENS, 2008).

### **Vantagens e desvantagens dos métodos indireto e direto.**

Apesar de ser relativamente barato, rápido e evidenciar todas as formas de doping sanguíneo, o maior inconveniente do teste indireto é exigir matriz biológica sangue. A coleta de sangue é considerada um processo invasivo, que exige profissional preparado para realizar a punção, condições assépticas e certo repouso do atleta (BANFI & DOLCI, 2003). Outra desvantagem deste método é que o armazenamento de uma amostra sanguínea B, para uso em contraprovas, não é possível devido à instabilidade dos parâmetros biológicos medidos neste método. (SEGURA, PASCUAL, GALLEGGO 2007).

O teste direto desenvolvido na França em 2000 continua a ser o empregado pela WADA e seus laboratórios acreditados em todo o mundo. Para a execução deste teste são necessários 20 mL da urina do atleta (e outros 20 mL para a

contraprova). A matriz urina é utilizada, pois a concentração da maioria dos metabólitos de agentes dopantes é muito maior que a concentração encontrada no sangue. Além disto, a coleta de urina não é invasiva, é fácil e pode ser congelada para posterior análise sem a perda de suas propriedades (BIRKELAND & HEMMERSBACH, 1999; BENTO, 2008).

Há diversos autores, porém, que acreditam que, apesar de ter um enorme potencial, o método direto ainda não é totalmente eficiente para a detecção da rEPO e análogos. Os diversos artigos publicados questionam a eficiência do teste devido à dificuldade de padronização interlaboratorial do método, possibilidade de proteases mascararem resultados (LAMON *et al.*, 2007a), falso-positivos relacionados à excessiva proteinúria (BEULLENS, DELANGHE, BOLLEN, 2006) e o problema mais apontado por autores é a interação não específica de proteínas aleatórias com o anticorpo monoclonal primário de EPO (KHAN *et al.*, 2005; BEULLENS, DELANGHE, BOLLEN, 2006; FRANKE & HEID, 2006; KHAN & BAKER, 2007; DELANGHE, BOLLEN, BEULLENS, 2008), problema este que segundo a criadora do teste é evitado se for feito o passo da segunda transferência em meio ácido (LASNE, 2001).

Além disso, é preciso enfatizar que o referido método também exige um laboratório equipado, técnicos treinados, são necessárias aproximadamente 36 horas para que se chegue aos resultados e o custo é bastante elevado, em torno de 424 € por gel (laboratórios europeus) (PELTRE & THORMANN, 2003, WADA, Report of The Wada Working Group on Anti-Doping Costs, 2006).

A concentração da eritropoietina na urina de pessoas saudáveis é naturalmente baixa, por volta de 1IU/L. O teste direto detecta EPO ou recombinantes

da EPO na urina quando estes estão em concentrações maiores que 0,4 IU/L (LASNE et al., 2002) e sabe-se também que a meia vida da rEPO é bastante curta, seis horas com administração intra venosa (SALMONSON, 1990). Estes fatores fazem com que a janela de detecção da rEPO na urina seja limitada . Em estudo de Lamon e colaboradores (2007) foi encontrado que só se detectava NESP em urina por IEF quando a aplicação (única) havia sido feita entre 0-7 dias, e rEPO, nas mesmas condições de aplicação poderia ser encontrada somente se a análise fosse feita em até 4 dias após a aplicação (LAMON *et al.*, 2007b).

### **Passaporte biológico**

Os testes indiretos de primeira geração para rEPO e análogos da eritropoietina são avaliados segundo modelos estatísticos que estabeleceram valores máximos limites de hematócrito (50% para homens e 47% para mulheres) e 17 g/dL sendo o valor máximo de hemoglobina plasmática (EKBLUM, BERGLUND, 1991; BREYMANN, 2000; BENTO, 2003). Porém estes valores foram encontrados adicionando-se dois desvios padrões ao valor encontrado em uma população normal (ROBINSON *et al.* 2002; SAUGY & ROBINSON 2006; SAUGY, ROBINSON, SAUDAN, 2009), e, além disto, estes limites não consideram variações de idade, condicionamento físico, altitude da cidade de residência e estados fisiológicos diferentes, como, por exemplo, gravidez (WHO 2001). Como estes valores têm uma grande variação inter individual, logo questionou-se a validade do enquadramento de atletas nestes limites (SAUGY, ROBINSON, SAUDAN, 2009; ZORZOLI, 2011).

Atletas que vivem em áreas de altitudes elevadas, naturalmente possuem uma maior concentração de hemoglobina para compensar a menor pressão parcial de oxigênio (JELKMANN, 2004; GARCIA *et al.*, 2007; ROBINSON *et al.*, 2006).

Estes atletas, se enquadrados nos limites até então utilizados seriam afastados desnecessariamente do esporte. Para eliminar a variabilidade entre indivíduos destes parâmetros sanguíneos e garantir que as condições específicas de cada atleta sejam consideradas, diversos estudos propuseram a avaliação intra-individual, ou seja, a realização de exames sanguíneos periódicos. Todos os resultados obtidos do atleta seriam compilados em um passaporte biológico individual e, desta forma, seus novos resultados seriam avaliados segundo seus próprios parâmetros individuais prévios (SOTTAS, ROBINSON, SAUGY, 2010; ZORZOLI, 2011).

Após anos de discussão a respeito da implementação do passaporte biológico no auxílio do combate ao doping, em janeiro de 2010 a WADA publicou um protocolo de operações que serve de base para todas as organizações antidoping. Este protocolo não força a adesão ao passaporte biológico, porém, as organizações que quiserem monitorar seus atletas através do passaporte biológico devem seguir as recomendações da WADA para que o método seja válido (WADA, Athlete Biological Passport Operating Guidelines, 2010).

Dentre as diversas recomendações do protocolo, com o intuito de diminuir as variações pré-analíticas e analíticas dos procedimentos, foi definida a maneira correta de executar a coleta do sangue, como deve ser a identificação da amostra, o transporte ideal, a análise em si e, principalmente, como devem ser armazenadas as informações obtidas dos resultados de cada análise.

A WADA definiu quais informações devem ser coletadas para que o aumento no transporte de oxigênio seja, por substâncias estimuladoras da eritropoiese ou por doping sanguíneo, detectado. Além do hemograma, é avaliada a presença de mais nove marcadores hematológicos que refletem a taxa de eritropoiese. Dentre os



marcadores destacam-se a contagem de eritrócitos, porcentagem de reticulócitos e o hematócrito do sangue do atleta. Qualquer grande alteração no conjunto desses fatores pode ser um indício de doping (WADA - Athlete Biological Passport Operating Guidelines, 2010).

O passaporte biológico não substituirá os métodos diretos de detecção de estimulantes da eritropoiese na urina, sendo apenas um passo prévio para identificar amostras de sangue suspeitas. Os princípios do passaporte biológico, assim como os demais testes indiretos, não se baseiam em encontrar a substância nos fluidos corpóreos, mas sim em detectar os efeitos fisiológicos desta substância no corpo humano. A confirmação destas urinas suspeitas continua a ser feita por métodos diretos (SAUGY, ROBINSON, SAUDAN, 2009; WADA, Athlete Biological Passport Operating Guidelines, 2010; ZORZOLI, 2011).

## Métodos alternativos

---

### **Dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE)**

Frente às inúmeras incertezas do método direto de IEF, em 2007 Kohler e colaboradores desenvolveram outro teste direto para detecção de rEPO e análogos utilizando gel de dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, um detergente aniônico que interage com proteínas conferindo-as cargas negativas (KOHLE, *et al.*, 2007; BAGUE, 2011; REICHEL, 2011).

A distinção das eritropoietinas endógenas recombinantes e análogas no gel de SDS ocorre devido aos diferentes pesos moleculares que essas apresentam (SKIBELI, NISSEN-LIE, TORJESEN, 2001; REICHEL, 2011). Em ordem crescente estas moléculas podem ser assim organizadas segundo pesos moleculares: EPO

endógena (34KDa), rEPO  $\alpha$  e  $\beta$  (36-38 KDa), NESP (38,5-40 KDa) e por último, apresentando maior peso molecular devido à sua ligação a um polímero de metoxi polietileno glicol, CERA (69-78 KDa) (REICHEL & GMEINER, 2010; REICHEL, 2011).

Diferentemente da IEF que separa moléculas segundo seus pontos isoelétricos, no gel de SDS a massa molecular irá determinar a posição de migração de cada uma das proteínas aplicadas. Proteínas com menores pesos moleculares irão migrar mais rapidamente pelo gel em direção ao anodo, enquanto que proteínas maiores migram menos.

Vinte mililitros da urina a ser testada são imunopurificados, para se evitar a sobrecarga de proteínas que não a EPO. Há uma etapa de redução de proteínas com ditioneitol, forte agente redutor, e após a eletroforese no gel de SDS a dupla transferência e revelação quimioluminescente são executadas da mesma forma que no método da IEF (BAGUÉ, 2011).

Desde 2009 a detecção por SDS tem sido utilizada como apoio para confirmar evidências positivas da IEF (BAGUÉ, 2011). Também é um método muito utilizado para a detecção específica da rEPO $\Delta$ , já que esta gera uma banda bastante característica no gel de SDS e a janela de detecção é aumentada, quando comparada à IEF (KOHLENER *et al.*, 2007; GMEINER *et al.*, 2010). Por todas estas vantagens, o uso de SDS está listado como método recomendado de confirmação de resultado positivo no documento técnico da WADA, TD2009EPO, que estabelece parâmetros de interpretação dos resultados obtidos (WADA - TD2009EPO, 2009; REICHEL, 2011).

## **Lauril Sarcosinato de Sódio – SAR-PAGE**

A molécula de CERA, devido ao polímero de grande massa conjugado, tem a ligação com o anticorpo primário prejudicada e, além disto, o polímero sofre interação com o gel de SDS atrapalhando os resultados, sendo assim não muito indicada a detecção de CERA por SDS. Este problema foi solucionado por Reichel e colaboradores, que em 2009 desenvolveram método parecido ao SDS, porém que fazia uso de outro detergente aniônico, o lauril sarcosinato de sódio. Este detergente é mais específico e ao invés de interagir com o polímero de CERA, somente interage com a cadeia protéica do análogo da EPO.

Além de muito útil na detecção de CERA, o SAR-PAGE é também muito sensível para a diferenciação de todos os demais análogos e recombinantes da EPO endógena.

## **Eletroforese bidimensional - 2DE-PAGE**

A separação de proteínas feita pelo método da eletroforese bidimensional combina a IEF (separação por pontos isoelétricos) com o SDS-PAGE (separação por diferença de massas) (DELANGHE, BOLLEN, BEULLENS, 2008). Este gel 2DE, diferentemente da IEF, já apresenta um gradiente de pH fixo e isto favorece a reprodutibilidade do método (REICHEL, 2011).

As urinas são tratadas com acetonitrila, que causa a precipitação das proteínas, adiciona-se um padrão interno e após a eletroforese em gel bi-dimensional há apenas uma única transferência e a revelação ocorre por quimioluminescência como nos demais métodos (KHAN *et al.*, 2005; REICHEL, 2011).

O 2DE é um método sensível, específico e confirmatório de evidências positivas na IEF, porém, é muito caro e necessita de um gel para cada amostra e não apresenta boa resolução para isoformas de EPO muito ácidas. Apesar de cumprir com muitos dos requisitos da WADA para desenvolver um novo método de EPO não está citado no documento técnico de EPO da WADA e não é frequentemente utilizado pelos laboratórios acreditados (PELTRE & THORMANN, 2003; RABIN *et al.*, 2006; DELANGHE, BOLLEN, BEULLENS, 2008; WADA – TD2009EPO, 2009; REICHEL, 2011).

### **Membrana de imunopurificação - “Membrane assisted isoform immunoassay” (MAIIA)**

A membrana imunopurificadora MAIIA foi desenvolvida como alternativa à etapa de purificação de amostras por ultrafiltração. Partindo de amostras imunopurificadas, o teste direto por isoeletrofocalização, seguido de dupla transferência, se mostra muito mais sensível e específico para a detecção de EPO, rEPO e análogos (DEHNES, LAMON, LÖNNBERG, 2010).

A urina (20 ml) é aplicada à coluna que contém a membrana impregnada de anticorpos monoclonais para EPO. Devido à elevada especificidade dos anticorpos às moléculas de EPO endógena e recombinante, estas, se presentes na urina, ligar-se-ão aos anticorpos ficando imobilizadas. A urina filtrada será descartada e então um tampão de lavagem irá eluir todas as moléculas da membrana. Ao final são obtidos 55 µL de tampão com possíveis moléculas de EPO (DEHNES, LAMON, LÖNNBERG, 2010; MAIIA: Recomendações de uso, 2011).

Se comparada à purificação por ultrafiltração, a imunopurificação favorece resultados com maior resolução das diferentes isoformas, evita a sobrecarga de

proteínas que descaracterizam as bandas, e diminui o “*background noise*” (sinal de fundo) no gel de poliacrilamida (DEHNES, LAMON, LÖNNBERG, 2010).

A interação não específica de proteínas aleatórias com o anticorpo monoclonal primário de EPO, listada por muitos autores como a maior inconveniência do método direto (KHAN *et al.*, 2005; BEULLENS, DELANGHE, BOLLEN, 2006; FRANKE & HEID, 2006; KHAN & BAKER, 2007; DELANGHE, BOLLEN, BEULLENS, 2008), é drasticamente reduzida quando se faz a purificação por imunoafinidade. O anticorpo monoclonal utilizado pela MAIIA é distinto do anticorpo empregado na IEF, mas ambos são bastante específicos para EPO endógena, recombinante e análogos. Com isto, a probabilidade de ocorrerem ligações cruzadas com proteínas que não a EPO ou estimulantes da eritropoiese é bastante diminuída (DEHNES, LAMON, LÖNNBERG, 2010).

## rEPO, análogos da EPO e o controle da WADA

---

A proibição do uso de rEPO ou análogos da EPO está descrita na lista anual de substâncias proibidas da WADA, classificada no item S2 - Hormônios peptídicos, fatores de crescimento e substâncias afins. Abaixo, o exato trecho da referida lista traduzido pelo Comitê Olímpico Brasileiro (COB):

**“SUBSTÂNCIAS PROIBIDAS  
S2. HORMÔNIOS PEPTÍDICOS, FATORES DE CRESCIMENTO E  
SUBSTÂNCIAS AFINS.**

*As seguintes substâncias e seus fatores de liberação são proibidos:*

1. *Agentes estimuladores da eritropoiese [ex.: eritropoietina (EPO), darbepoietina (dEPO), estabilizadores de fatores induzíveis por hipóxia (HIF), metoxi polietileno glicol-epoetina beta(CERA), peginesatide(Hematide)].”*

**Fonte:** [http://www.cob.org.br/pesquisa\\_estudo/pdfs/TB\\_Lista\\_Antidoping\\_06jan.pdf](http://www.cob.org.br/pesquisa_estudo/pdfs/TB_Lista_Antidoping_06jan.pdf)

## **Coleta de amostras**

Atletas são monitorados pelo controle de dopagem em competições e também durante o período de treinamento. O atleta pode ser notificado a qualquer momento que foi selecionado para submeter-se aos testes. A escolha dos atletas pode ser aleatória ou direcionada. No caso de atletas que apresentaram repentinas melhoras de desempenho, parâmetros biológicos anormais, lesões, comportamento anormal e ausência não justificada em competições, têm maiores chances de serem selecionados. Além disto, envolvimento prévio em doping do atleta ou de seu treinador e rumores de uso de substâncias ilícitas também são pontos a se considerar na escolha (WADA, International Standard for Testing, 2012).

Os atletas escolhidos são normalmente notificados pessoalmente e assinam um termo de notificação. A partir deste momento, um representante oficial da entidade controladora de doping irá acompanhar o atleta até o fim da coleta das amostras. Se for necessário, o atleta poderá receber atenção médica, cumprir compromissos com a imprensa, participar de outros eventos esportivos no mesmo dia ou premiações, porém sempre com o acompanhamento do representante.

Ao atleta podem ser requisitadas amostras de sangue e/ou urina. Para o controle de eritropoietina, recombinantes e análogos são normalmente solicitadas amostras de urina. Após apresentar um documento oficial com foto, o atleta deve coletar, na presença do representante, no mínimo 40 mL de urina, a serem divididos em dois frascos intitulados “A” e “B”. Os frascos serão lacrados e armazenados em caixa de isopor para o transporte até o laboratório responsável pela análise. Ao final da coleta todos os presentes assinam que os procedimentos foram corretamente

executados (WADA, Athlete Guide, 2009; COB, Informações sobre o uso de medicamentos no esporte, 2011; WADA, International Standard for Testing, 2012).

### **Punições aos atletas flagrados**

Os atletas, para participarem de competições oficiais, devem estar cientes e de acordo com as regras impostas pelas organizações antidopagem envolvidas e a recusa ou falta sem justificativa pertinente aos testes pode acarretar em punições ao atleta (WADA, World Anti-Doping Code, 2009).

Ao chegar ao laboratório, as amostras receberão códigos que tornam privada a identificação do atleta. A amostra “A” será analisada e a “B” será armazenada de forma conveniente para se evitar a degradação e somente será aberta caso haja a necessidade de realizar contra prova para confirmar algum resultado analítico adverso na amostra “A”. Na análise da amostra “B” é permitida a presença do atleta e/ou representante. Caso a amostra “A” e a “B” detectem alguma substância proibida pela lista da WADA, o atleta poderá ser punido. Caso a amostra “B” seja negativa após um resultado positivo da amostra “A”, o teste será invalidado, e nenhuma punição será aplicada. Os resultados serão reportados à WADA ou a outro órgão responsável pelo controle da dopagem (WADA, Athlete Guide, 2009).

As punições variam em função da gravidade do ocorrido e na quantidade de vezes que o atleta já foi flagrado e são desde simples avisos formais, até a suspensão vitalícia, onde o atleta fica totalmente banido de participar de futuras competições esportivas. Caso o atleta seja flagrado pela primeira vez, a punição máxima é um ano de suspensão. Já a partir da terceira punição, o atleta pode receber suspensão vitalícia (WADA, World Anti-Doping Code, 2009).

Caso a coleta tenha sido feita logo após alguma competição na qual o atleta tenha vencido ou pontuado e este tenha sido flagrado no uso de substâncias proibidas, além da punição pertinente, todos os prêmios, pontuações e medalhas serão invalidadas e devolvidas (WADA, Athlete Guide, 2009).

### **Formas de mascarar o uso de rEPO e análogos da EPO**

Após a notificação que o atleta será submetido aos exames de doping, o acompanhamento de um representante oficial da organização controladora do doping é necessário, pois já foram flagradas diversas tentativas de mascarar o uso ilícito de substâncias, tais como, diluir a urina para diminuir a concentração de substâncias e substituir a urina do atleta pela de outra pessoa (THEVIS & SCHÄNZER, 2007; BOWERS, 2009).

Uma das maneiras encontradas por atletas para destruir qualquer resquício de eritropoietina exógena é adicionar pequenas quantidades de proteases à amostra. Proteases digerem proteínas indiscriminadamente e quando adicionadas à urina irão destruir não somente possíveis moléculas de rEPO e análogos, como também a EPO endógena (WEISLO, 2006).

Durante a coleta há o acompanhamento de um representante do mesmo sexo do atleta. Já foram relatados casos de atletas que, para conseguir com sucesso adicionar proteases na urina, introduziram (antes mesmo de serem selecionados ao teste) grãos de proteases na uretra e também atletas que possuíam pó de proteases embaixo das unhas e, ao urinar sobre os dedos, as proteínas contidas na urina seriam destruídas (THEVIS *et al.*, 2007a; BOWERS, 2009).



Para provar que pequenas quantidades de proteases são capazes de destruir as proteínas urinárias, foi feito um experimento no qual amostras de urina com rEPO foram separadas em dois grupos distintos, um incubado com 20-100 µg de proteases (papaína, quimotripsina e tripsina) e no segundo grupo nenhuma protease foi adicionada. Estas urinas foram avaliadas após a isoeletrofocalização seguida de dupla transferência, método direto empregado na detecção de EPO em doping. O grupo sem proteases apresentou nítidas bandas que confirmaram a presença de rEPO. Já o grupo que teve proteases adicionadas não apresentou nenhuma banda característica da presença de rEPO, confirmando assim a teoria apresentada (THEVIS *et al.*, 2007a).

Outra forma de burlar o exame de doping é a substituição da urina do atleta por alguma outra que não há substâncias proibidas. Em 2003, em uma mesma competição, três atletas apresentaram urinas que possuíam perfis idênticos de esteróides, parâmetro este que individualiza cada urina. Através de estratégias analíticas que incluíam cromatografia gasosa e espectrometria de massa, estas urinas foram identificadas como sendo de uma única pessoa. O DNA da urina foi comparado ao dos atletas e como não havia nenhuma compatibilidade, os três foram punidos (THEVIS, *et al.*, 2007b).

O uso de diuréticos também não é permitido pela WADA. Este tipo de medicamento aumenta a excreção renal de água e eletrólitos. Diuréticos interferem na reabsorção de sódio, que tem a sua eliminação aumentada, acompanhada de maior eliminação de água (VENTURA & SEGURA, 1996). Desta maneira, a urina diluída apresentará menores concentrações de possíveis substâncias proibidas,

mascarando o resultado. (TSOUTSOULOVA-DRAGANOVA,1995; TSENG *et al.*, 2004).

## Efeitos colaterais do uso de estimulantes de eritropoiese

---

Fármacos estimuladores de eritropoiese têm como alvo principal pacientes anêmicos e sob tratamento quimioterápico, que depletam células do sangue. A grande maioria dos estudos já realizados sobre dose, administração, toxicidade e efeitos colaterais destes fármacos abrangem esta população específica. Poucos foram os testes realizados em pessoas saudáveis e atletas (WILBER, 2002).

Alguns destes estudos envolvendo atletas sugerem que o uso de rEPO gera um aumento na massa de células sanguíneas que é acompanhado por uma significativa melhora na performance em esforços aeróbios (EKBLOM & BERGLUND, 1991; BALSOM, EKBLOM, SJÖDIN, 1994; WILBER, 2002).

Juntamente com os benefícios de uso da rEPO são encontrados diversos efeitos secundários e adversos de seu uso (ZHU *et al.*, 2006).

Dentre os efeitos colaterais, destacam-se complicações trombóticas, devido ao incremento na massa de células sanguíneas, gerando uma maior viscosidade sanguínea. Agravando este quadro, relembra-se que a desidratação ocasionada por intenso esforço durante a prática esportiva é freqüente e aumenta ainda mais a concentração de células por mm<sup>3</sup> de sangue (NOAKES, 2004; BOHLIUS, 2006)

Em estudo envolvendo 6769 pacientes, divididos em grupo controle e grupo sob tratamento de eritropoietina/ darbepoetina, foi encontrado um aumento de 67 %

no risco relativo de ocorrer algum evento tromboembólico durante certo período (BOHLIUS, 2006).

Além de aumentarem em quantidade, os novos eritrócitos estimulados pelo uso da rEPO, podem possuir características morfológicas peculiares, como a macrocitose, tamanho exagerado do eritrócito e a hipocromia, menor conteúdo de hemoglobinas, responsáveis pela pigmentação da célula. Em indivíduos normais, células com estas características nunca ultrapassam a faixa de 0,6% do total (CASONI *et al.*, 1993; RASSIER, NATALI, DE ROSE, 1996). Sendo assim, ficou estabelecido o valor limite de 0,6%. Segundo Casoni e colaboradores, indivíduos que ultrapassem estes valores certamente estão sob uso de rEPO ou análogos (CASONI *et al.*, 1993).

Outros efeitos secundários estão relacionados ao uso de recombinantes e análogos da EPO e incluem hipertensão, angiogênese aumentada, alterações metabólicas, olhos avermelhados, convulsões, depleção de ferro, entre outros (FISHER, 2003; VARLET-MARIE *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2007; REICHEL & GMEINER, 2010).

O uso prolongado de medicamentos estimulantes de eritropoiese, ainda pode causar aplasia eritróide pura mediada por anticorpos anti-eritropoietina, resultando em anemia severa. Com a grande oferta de EPO exógena e endógena, anticorpos passam a reconhecê-las e inativá-las, fazendo com que este hormônio ativo seja menos frequente e a eritropoiese seja menos estimulada (CASADEVALL, 2002; CAZZOLA, 2002; ELLIOTT, 2008).

Por ser de uso ilegal no esporte, a rEPO e análogos da eritropoietina são, na maioria das vezes, utilizadas sem nenhuma supervisão médica, e tampouco é feito o

monitoramento da porcentagem de eritrócitos no volume total de sangue, o hematócrito sanguíneo. Todos os possíveis efeitos colaterais acima descritos, associados ao uso irracional destes medicamentos, colocam em risco a saúde do atleta.

## Estatísticas de uso e casos de atletas flagrados

---

Há rumores que o uso de rEPO no esporte começou antes mesmo que medicamentos contendo eritropoietina recombinante estivessem sendo comercializados pelas indústrias farmacêuticas (1989). No final da década de 80, vinte mortes de ciclistas de elite da Holanda e Bélgica foram também relacionadas ao uso de rEPO, apesar do uso não ter sido provado (ADAMSON & VAPNE, 1991).

Em 1990 a eritropoietina recombinante foi incluída na lista de substâncias proibidas do Comitê Olímpico Internacional, mas acredita-se que o uso abusivo e descontrolado pelos atletas não foi contido. Em 1996 no evento ciclístico “Tour de France” houve o uso de rEPO, porém este só foi admitido anos depois por diversos ciclistas como os alemães Erik Zabel e Rolf Aldag e o dinamarquês vencedor da prova Bjarne Riis (ELLIOTT, 2008).

No ano de 1998 outro escândalo envolveu o “Tour de France” que foi ironicamente apelidada por jornais franceses de “Tour de Farce”, após terem sido encontradas diversas ampolas de rEPO e outras drogas em automóveis de equipes e no alojamento dos atletas. Durante os 21 dias de competição foram diversas as apreensões de medicamentos e interrogatórios aos atletas. Muitos deles foram afastados da competição (JARVIS, 1999; CATLIN, HATTON, LASNE, 2003).

Nas Olimpíadas de Inverno de 2002, em Salt Lake City – EUA, três esquiadores (Johan Mühlegg – Espanha; Olga Danilova e Larissa Lazutina – Rússia) foram desclassificados das competições por ter sido encontrado o análogo glicosilado da EPO, darbepoetina alfa (NESP), no teste direto das amostras urinárias destes atletas (ELLIOTT, 2008).

Em 2005 ficou muito conhecida a “Operación Puerto”, realizada pela polícia civil de Madrid, a mando do Governo Espanhol, com o intuito de combater o doping esportivo. A polícia investigou e interrogou 107 ciclistas profissionais ligados a uma mesma equipe, Liberty-Seguros, e também o diretor e médicos responsáveis pelos atletas. Após ter sido encontrada uma enorme quantidade de suprimentos médicos, esteróides anabolizantes e mais de duzentas bolsas de sangue e plasma sanguíneo contendo elevadas doses de rEPO houveram diversas prisões, inclusive dos médicos da equipe (MCKENZIE, 2007; ELLIOTT, 2008).

O caso mais recente relacionado ao uso de EPO no cenário esportivo envolve o ciclista americano Lance Armstrong, heptacampeão da volta ciclística da França dos anos de 1999 a 2005. Desde 2005 o atleta era acusado de uso de doping pelo uso de eritropoietina. Os atletas rivais e a agência Anti doping Americana – USADA mantiveram as acusações apesar de nenhuma amostra ter apontado o uso da substância (BBC Sport, 2012 a).

Lance Armstrong se defendeu por anos de todas as acusações. Em agosto de 2012 a USADA o acusou formalmente por uso de eritropoietina. A acusação foi baseada em depoimentos de atletas que competiram junto com o acusado e também em amostras sanguíneas de 2009 e 2010, que segundo a USADA são compatíveis com doping sanguíneo. Lance Armstrong não se defendeu, perderá os

sete títulos conquistados e será banido de qualquer evento esportivo oficial (BBC Sport, 2012 b; BBC Sport, 2012 c).

A Agência Mundial Anti Doping, WADA, desde 2003 divulga anualmente estatísticas referentes a todos os testes realizados em seus 33 laboratórios credenciados ao redor do mundo. O documento é bastante extenso, detalhado e apresenta desde dados gerais de doping até os mais específicos, como substâncias proibidas mais encontradas, laboratórios que mais detectaram e esportes com maior frequência de casos de doping (WADA, Adverse analytical findings and atypical findings reported by accredited laboratories, 2003).

A classe S2, de hormônios e substâncias relacionadas, enquadra a rEPO e análogos da eritropoietina e representa menos de 4% de todos os resultados positivos dos testes de doping. Juntamente com a rEPO e a darbepoetina alfa (NESP) incluem-se também na lista S2 outros hormônios, hormônio gonadotrofina coriônica (hCG), hormônio luteinizante (LH) e o hormônio do crescimento (hGH). Dentro da classe S2 a rEPO é normalmente responsável por quase 50 % dos casos positivos, seguida por casos positivos de hCG.

O primeiro caso encontrado de doping, com o ativador constante do receptor de eritropoietina, foi relatado em 2008, ano seguinte ao seu lançamento. A partir de 2008, este passou a ser listado também na classe S2 apresentando alguns casos (WADA, Adverse analytical findings and atypical findings reported by accredited laboratories, 2008).

A análise da tabela abaixo permite afirmar que há certa proporção entre o total de análises realizadas e o total de resultados positivos encontrados, deixando

clara a importância do incentivo e da realização de testes antidoping para a segurança dos atletas.

|                           | 2005    | 2006    | 2007    | 2008    | 2009    | 2010    |
|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <b>Total de Análises</b>  | 183.337 | 198.143 | 223.898 | 274.615 | 277.928 | 258.267 |
| <b>Positivos Totais</b>   | 3.909   | 3.887   | 4.402   | 5.061   | 5.610   | 4817    |
| <b>% Positivos Totais</b> | 2,13    | 1,96    | 1,97    | 1,84    | 2,02    | 1,87    |
| <b>Positivos - S2</b>     | 162     | 42      | 41      | 106     | 100     | 86      |
| <b>% Positivos - S2</b>   | 3,8     | 1       | 0,8     | 1.9     | 2       | 1,6     |
| <b>Positivos rEPO</b>     | 15      | 17      | 22      | 51      | 56      | 36      |
| <b>Positivos NESP</b>     | 1       | 1       | 2       | 2       | 4       | 8       |
| <b>Positivos CERA</b>     | --      | --      | --      | 5       | 8       | 1       |

**Tabela 1:** *Relação estatística de todas as análises realizadas nos laboratórios acreditados pela WADA em cada ano de 2005 até 2010. **Total de análises:** Quantidade total de análises realizada no referido ano por todos os laboratórios acreditados pela WADA; **Positivos totais:** Todas as análises em que foram consideradas positivas entre o total de análises. Este valor abrange casos de doping por todas as classes de substâncias proibidas; **% Positivos totais:** Relação do total de análises realizadas pelos resultados positivos totais encontrados; **Positivos – S2:** Número de casos considerados positivos por encontrar concentração acima da esperada de hormônios e substâncias relacionadas da classe S2; **% Positivos – S2:** Porcentagem de resultados positivos da classe S2 dentro dos resultados positivos totais; **Positivos rEPO:** Número de casos positivos que flagraram rEPO; **Positivos NESP:** Número de casos positivos que flagraram NESP; **Positivos CERA:** Número de casos positivos que flagraram CERA.*

**Fonte:** WADA, Adverse analytical findings and atypical findings reported by accredited laboratories disponível em: <http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Anti-Doping-Laboratories/Laboratory-Statistics/>.

## Terapia gênica como contribuição ao doping genético

---

Desde a década de 90 são estudadas maneiras revolucionárias de utilizar genes no auxílio do tratamento de determinadas doenças. Pacientes com hemoglobinopatias que necessitam constantemente de medicamentos contendo estimuladores recombinantes da eritropoiese seriam muito beneficiados por uma terapia gênica que induzisse à liberação controlada de eritropoietina (LIPPI *et al.*, 2006).

A terapia gênica é definida pela inserção de genes terapêuticos que serão expressos em células alvo, que por algum motivo (hereditários ou patológicos) não estavam desempenhando a função esperada. Com a expressão destes genes terapêuticos, os produtos gênicos destas células são corrigidos e passarão a exercer suas funções fisiológicas esperadas (ARTIOLI, HIRATA, JUNIOR, 2007).

A inserção de genes em pacientes segue duas estratégias. Através da transferência *in vivo*, onde seqüências de ácidos nucléicos são injetadas diretamente em tecidos musculares ou medula óssea. Já na transferência *ex vivo*, os genes são primeiramente transferidos a vetores e depois estes são implantados no paciente (GAUDARD *et al.* 2003; DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2005, REICHEL, 2011). Atualmente os vetores mais estudados e utilizados em pesquisas são os virais: retrovírus e adenovírus (ARTIOLI, HIRATA, JUNIOR, 2007).

Apesar de promissora, ainda não há terapia que envolva o gene da EPO que tenha sido aprovada para uso humano. O fármaco repoxigen<sup>®</sup>, da Oxford Bio Medica, contém o gene codificador da EPO, porém ainda não passou por testes clínicos (GAUDARD *et al.* 2003; REICHEL, 2011).



O experimento que utilizou terapia gênica de EPO em macacos culminou em um crescimento bastante elevado de eritrócitos (a porcentagem de eritrócitos que originalmente era de 40%, após 10 semanas da terapia chegou a níveis perigosos de 75%). Estes macacos após a terapia, para se manterem vivos, necessitaram de hemodiluições periódicas para compensar a alta concentração de eritrócitos (Zhou *et al*, 1998).

Não há dúvidas que a terapia gênica de EPO, quando aprovada, será uma ótima alternativa ao doping tradicional. Acredita-se que o uso de genes para a dopagem esportiva, doping genético, até o momento não foi feito. O método já está presente na lista anual de substâncias e métodos proibidos da WADA, na seção de métodos proibidos, no terceiro item - M3 (REICHEL, 2011), como apresentado abaixo em tradução do COB:

***“MÉTODOS PROIBIDOS  
M3. DOPING GENÉTICO***

*Os seguintes, com o potencial de melhorar o desempenho atlético, são proibidos:*

- 1. A transferência de ácidos nucleicos ou sequências de ácidos nucleicos;*
- 2. O uso de células normais ou geneticamente modificadas;*
- 3. O uso de agentes que, direta ou indiretamente, afetam funções que sabidamente podem influenciar o desempenho, alterando a expressão gênica...”*

**Fonte:** [http://www.cob.org.br/pesquisa\\_estudo/pdfs/TB\\_Lista\\_Antidoping\\_06jan.pdf](http://www.cob.org.br/pesquisa_estudo/pdfs/TB_Lista_Antidoping_06jan.pdf)

Certamente os efeitos duradouros da inserção genética, a menor frequência de administração farmacológica e, principalmente, a dificuldade de detecção irão atrair muitos atletas ao doping genético.

Os genes inseridos estimulariam a produção de EPO endógena. O hormônio endógeno não seria detectado pelos métodos atualmente utilizados, que se baseiam em diferenças nos perfis isoelétricos das eritropoietinas de diferentes origens. Apesar de se acreditar na dificuldade de detecção, Lasne *et al*. mostrou diferenças evidentes em perfis de eritropoietinas de macacos antes e depois do tratamento com

genes da EPO. O trabalho conclui ainda que devido à grande semelhança da EPO urinária de macacos e a humana, a detecção de doping genético para EPO será possível enquanto o tecido alvo continuar a ser o músculo esquelético (LASNE *et al.*, 2004).

Apesar dos aparentes benefícios, a terapia gênica para EPO ainda não pôde ser controlada. A regulação gênica é o ponto fraco do tratamento, e a super expressão do gene e consequente excesso de EPO, podem ocasionar todos os efeitos colaterais já mencionados devido à alta concentração de eritrócitos, como casos de trombose e aplasia eritróide pura (GAUDARD *et al.* 2003; LIPPI *et al.*, 2006; ARTIOLI, HIRATA, JUNIOR, 2007).

## A futura detecção de doping por EPO

---

A incansável corrida das indústrias farmacêuticas por fármacos que auxiliam no tratamento terapêutico de pacientes de todo o mundo é bastante valorizada também no âmbito esportivo. A agregação de tecnologia aos fármacos mais recentes permite tratamentos cada vez mais simples e mais eficientes. A comunidade das organizações anti doping deve, cada vez mais, investir em seus laboratórios para que estes possam antever novos fármacos utilizados no doping e consigam desenvolver novos métodos de detecção.

O atual método de detecção de eritropoietinas exógenas, isoeletrofocalização seguida de dupla transferência, apesar de se mostrar eficiente, é ainda muito caro e demorado, o que restringe a quantidade de análises realizadas. A WADA, ciente da dificuldade do referido método, estimula e apóia estudos de métodos alternativos de detecção.

A maior expectativa é o aprimoramento do método que utiliza espectrometria de massa para analisar as diferentes isoformas da EPO. O método auxiliou na caracterização estrutural de eritropoietinas exógenas, porém ainda não é capaz de diferenciá-las de uma EPO endógena. Isto, pois as seqüências de aminoácidos são idênticas (REICHEL, 2011). A Darbepoetina Alfa, NESP, por apresentar em sua estrutura a substituição de cinco aminoácidos originais da cadeia de EPO, pode ser diferenciada por espectrometria de massa (EGRIE & BROWNE, 2001; REICHEL, 2011).

Outros métodos também são promissores, e entre eles destacam-se a eletroforese em zona capilar com ionização por “spray” de elétrons, seguida de espectrometria de massa e a eletroforese em zona capilar e detecção por ultravioleta (YU *et al.*, 2005). Luykx e colaboradores também tentam consolidar método baseado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a posterior detecção por fluorescência (LUYKX *et al.*, 2005). Todos estes novos métodos de detecção estão sendo aprimorados para que um dia sejam uma alternativa à eletroforese seguida de dupla transferência.

## Conclusão

---

O preparo de atletas profissionais exige muita dedicação, persistência e treinamentos exaustivos. Antes mesmo de existir o termo *doping*, alguns competidores já se beneficiavam com o uso de certas substâncias que aumentavam artificialmente o desempenho esportivo.

O hormônio renal eritropoietina aumenta os níveis de eritrócitos e conseqüentemente a oxigenação sanguínea. Através de transfusões ou com o

recente uso de recombinantes e análogos da eritropoietina, estes mesmos efeitos são obtidos, e o espírito esportivo é deixado de lado. Em 1990, mesmo sem técnicas de detecção, o abuso desta substância já era classificado como incompatível com o esporte.

No século XXI com a criação da WADA e com o objetivo de impedir competições desleais e preservar a saúde dos atletas, muitas técnicas de detecção de substâncias foram desenvolvidas em diversos laboratórios espalhados pelo mundo. Especificamente para a eritropoietina, recombinantes e análogos o método de detecção foi desenvolvido na França por Lasne e colaboradores em 2000, baseado no método da focalização isoelétrica seguida de dupla transferência e revelação quimioluminescente (LASNE & DE CEAURRIZ, 2000).

Este método é ainda o mais utilizado por todos os laboratórios, mesmo com a publicação de vários artigos que sugerem a ineficiência de determinados pontos da técnica. Técnicas alternativas estão sendo desenvolvidas, mas ainda nenhuma delas teve consistência suficiente para substituir o atual método.

Nestas olimpíadas de Londres 2012 três atletas foram flagrados e afastados do cenário esportivo devido à detecção de eritropoietinas exógenas. O Brasil como palco dos próximos grandes eventos esportivos mundiais, Copa Mundial de futebol em 2014 e Jogos Olímpicos em 2016, deve estar preparado para garantir que todos os atletas terão o direito de participar de competições justas, e que qualquer atleta que tenha feito o uso de substâncias ou métodos ilícitos para a melhora do desempenho seja punido.

## Bibliografia

---

ADAMSON, J.W.; VAPNE, K.D. Recombinant erythropoietin to improve athletic performance. **New England Journal of Medicine**, v.324, p.698–699, 1991.

ANDRÉASSON, B.; CARNESKOG, J.; LINDSTEDT, G.; LUNDBERG, P.; SWOLIN, B.; WADENVIK, H.; KUTTI, J. Plasma Erythropoietin Concentrations in Polycythaemia Vera with Special Reference to Myelosuppressive Therapy. **Leukemia & Lymphoma**, v.37, n.1-2, p.189-195, 2000.

ARTIOLI, G.G.; HIRATA, R.D.; JUNIOR, A.H.L. Terapia gênica, doping genetic e esporte: Fundamentação e implicações para o futuro. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.13, n.5, p.349-354, 2007.

ASHENDEN, M.J.; GORE C.J.; DOBSON, G.P.; BOSTON, T.T.; PARISOTTO, R.; EMSLIE, K.R.; TROUT, G.J.; HAHN, A.G. Simulated moderate altitude elevates serum erythropoietin but does not increase reticulocyte production in well-trained runners. **European Journal of Applied Physiology**, v.81, p.428-35, 2000.

BAGUÉ, J.M. Detection of recombinant human Erythropoietin and analogues through immunorecognition and n-glycolyl-neuraminic acid identification – Tese (Doutorado) - Pompeu Fabra University, Barcelona Espanha, 2011.

BALKE, B., NAGLE, F.J.; DANIELS, J.T. Altitude and maximum performance in work and sports activity. **Journal of the American Medical Association**, v.194, p.176–179, 1965.

BALSOM, P.D.; EKBLOM, B.; SJÖDIN, B. Enhanced oxygen availability during high intensity intermittent exercise decreases anaerobic metabolite concentrations in blood. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.150, n.4, p.455–456, 1994.

BANFI, G.; DOLCI, A.J. Pre-analytical phase of sport biochemistry and haematology. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.43, n.2, p.223-30, 2003.

BBC Sport - Lance Armstrong charged by US Anti-Doping Agency - Disponível em: <<http://www.bbc.co.uk/sport/0/cycling/18655970>> Acesso em: Agosto 2012 a.

BBC Sport - Lance Armstrong: Usada will reveal doping evidence - Disponível em: <<http://www.bbc.co.uk/sport/0/cycling/19433990>> Acesso em: Agosto 2012 b.

BBC Sport - Lance Armstrong: UCI no plans to appeal against Usada decision - Disponível em: <<http://www.bbc.co.uk/sport/0/cycling/19527032>> Acesso em: Setembro 2012 c.

BENTO, R.M.A. Estabilidade da eritropoietina humana recombinante e de seu análogo darbepoetina alfa em urina humana mediante contaminação microbiológica, e substâncias psicotrópicas no controle de dopagem - Tese (Doutorado) UFRJ/ Instituto de Química – Rio de Janeiro, 2008.

BENTO, R.M.A.; DAMASCENO, L.M.P.; NETO, F.R.A. Recombinant human erythropoietin in sports: a review - **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.9, n.3, p.181-190, 2003.

BERGLUND, P.; HEMMINGSON, P. Effect of Reinfusion of Autologous Blood on Exercise Performance in Cross-country Skiers. **International Journal of Sports Medicine**, v.8, p.231-233, 1987.

BEULLENS, M.; DELANGHE, J.R.; BOLLEN, M. False-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise. **Blood**, v.107, n.12 p.4711-3, 2006.

BIRKELAND, K.I.; HEMMERSBACH, P. The Future of Doping Control in Athletes: Issues Related to Blood Sampling. **Sports Medicine**, v.28, n.1, p.25-33, 1999.

BOHLIUS, J.; WILSON, J.; SEIDENFELD, J.; PIPER, M.; SCHWARZER, G.; SANDERCOCK, J.; TRELLE, S.; WEINGART, O.; BAYLISS, S.; DJULBEGOVIC, B.; BENNETT, C. L.; LANGENSIEPEN, S.; HYDE, C.; ENGERT, A. Recombinant Human Erythropoietins and Cancer Patients: Updated Meta-Analysis of 57 Studies Including 9353 Patients - **Journal of the National Cancer Institute**, v.98, n.10, p.708-714, 2006.

BOWERS, L.D. The international Antidoping system and why it works. *Clinical Chemistry*, v.55, n.8, p.1456-1461, 2009

BREYMAN, C.; ROHLING, R.; KRAFFT, A.; HUCH, A.; HUCH, R. Blood doping. with recombinant erythropoietin (rHuEPO) and assessment of functional iron deficiency in healthy volunteers. **British Journal of Haematology**, v.108, p.883-884, 2000.

CASADEVALL, N.; NATAF, J.; VIRON, B.; KOLTA, A.; KILADJIAN, J.J.; MARTIN-DUPONT, P.; MICHAUD, P.; PAPO, T.; UGO, V.; TEYSSANDIER, I.; VARET, B.; MAYEUX, P. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin - **New England Journal of Medicine**, v.346, n.7, p.469-75, 2002.

CASONI, I.; RICCI, G.; BALLARIN, E.; BORSETTO, C.; GRAZZI, G.; GUGLIELMINI, C.; MANFREDINI, F.; MAZZONI, G.; PATRACCHINI, M.; DE PAOLI VITALI, E.; RIGOLIN, F.; BARTALOTTA, S.; FRANZÈ, G.P.; MASOTTI, M.; CONCONI, F. Hematological indices of erythropoietin administration in athletes. **International Journal of Sports Medicine**, v.14, p.307-1, 1993.

CATLIN, D.; HATTON, C.; LASNE, F. Erythropoietins and Erythropoiesis: Abuse of recombinant erythropoietins by athletes. **Milestones in Drug Therapy**, v.2, p.205-227, 2003.

CAZZOLA, M. A global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs. **Haematologica**, v.85, n.6, p.561-563, 2000.

CAZZOLA, M. Further concerns about the medical risks of blood doping. **Haematologica**, v.87, p.232, 2002.

CBCM – Confederação de Culturismo e Musculação <<http://www.cbcm.com.br/modulos/canais/descricao.php?cod=132&codcan=130>>, Acesso em Novembro/2011.

CHOI, D.; KIM, M.; PARK, J. Erythropoietin: physico-and biochemical analysis. **Journal of Chromatography**, v.687, p.189-199, 1996.

COB - Comitê Olímpico Brasileiro - Substâncias e métodos proibidos permanentemente (em competição e fora de competição). Disponível em: <[http://www.cob.org.br/pesquisa\\_estudo/pdfs/TB\\_Lista\\_Antidoping\\_06jan.pdf](http://www.cob.org.br/pesquisa_estudo/pdfs/TB_Lista_Antidoping_06jan.pdf)> Acesso em: Dezembro/ 2011.

COB - Informações sobre o uso de medicamentos no esporte 2011. Disponível em : <[http://www.cob.org.br/pesquisa\\_estudo/pdfs/COB\\_ANTIdoping\\_FINAL\\_bx.pdf](http://www.cob.org.br/pesquisa_estudo/pdfs/COB_ANTIdoping_FINAL_bx.pdf)> Acesso em Dezembro 2011.

COI - Post games report. Salt Lake City, 2002. Disponível em: <[http://www.olympic.org/Documents/Reports/EN/en\\_report\\_441.pdf](http://www.olympic.org/Documents/Reports/EN/en_report_441.pdf)> Acesso em: Novembro 2011

DANIELS, J.; OLDRIDGE, N. The effects of alternate exposure to altitude and sea level on world-class middle distance runners. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.2, p.107–112, 1970.

DAVID, D.B. O papel do 2,3-dpg no metabolismo das hemácias - Seminário de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/UFRGS. Rio Grande do Sul, 2009.

DE ROSE, E.H. Doping in Athletes – An Update. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v.27, p.107–130, 2008.

DEHNES, Y.; LAMON, S.; LÖNNBERG, M. Erythropoietin (EPO) immunoaffinity columns—A powerful tool for purifying EPO and its recombinant analogues. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.53, p.1028-1032, 2010.

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

DELANGHE, J.R.; BOLLEN, M.; BEULLENS, M. Testing for recombinant erythropoietin - **American Journal of Hematology**, v.83, p.237–241, 2008.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; KONSTANTINOPOULOS, P.A.; PAPAILIOU, J.; KANDARAKIS, S.A.; ANDREOPOULOS, A.; SYKIOTIS, G.P. Erythropoietin abuse and erythropoietin gene doping: detection strategies in the genomic era. **Sports Medicine**, v.35, n.10, p.831-40, 2005.

DMOSZYNSKA, A.; KLOCZKO, J.; ROKICKA, M.; HELLMANN, A.; SPICKA, I. CERA (continuous erythropoietin receptor activator) in patients with multiple myeloma: An exploratory phase I–II dose escalation study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n.15, abstract 6552, 2004.

DORDAL, M.S.; WANG, F.F.; GOLDWASSER, E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. **Endocrinology**, v.116, p.2293–2299, 1985

EGRIE, J.C.; BROWNE, J.K. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). **British Journal of Cancer**, v.84 , p.3–10, 2001.

EKBLOM, B.; BERGLUND, B. Effect of erythropoietin administration on mammal aerobic power. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v.1, n.2, p.88–93, 1991.

ELLIOT, S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. **British Journal of Pharmacology**, v.154, p.529–541, 2008.

FAN, A. Q.; LEUTHERA, K.K.; HOLMESA, C.P.; FONGB, K.; ZHANGA, J.; VELKOVSKAA, S.; CHENA, M.; MORTENSENA, R.B.; LEUA, K.; GREENA, J.M.; SCHATZA, P.J.; WOODBURN, K.W. Preclinical evaluation of Hematide, a novel erythropoiesis stimulating agent, for the treatment of anemia. **Experimental Hematology**, v.34, p.1303–1311, 2006.

FISHER, J.W. Erythropoietin: Physiology and pharmacology update. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.228, p.1-14, 2003.



FRANKE, W.W.; HEID, H. Pitfalls, errors and risks of false-positive results in urinary EPO drug tests. **Clinica Chimica Acta**, v.373, p.189-190, 2006.

GARCIA, J.M.J.; SANCHEZ, E.T.; HIDALGO, D.O.; CONEJO, E.A. Erythropoietin pharmacology. **Clinical and Translational Oncology**, v.9, p.715-722, 2007.

GARNIER, M.; DELAMARE, J.; DELAMARE, V.; DELAMARE, T. Dicionário Andrei de Termos de Medicina. 2. ed., São Paulo: Andrei Editora Ltda, 2002.

GAUDARD, A.; VARLET-MARIE, E.; BRESSOLLE, F.; AUDRAN, M. Drugs for increasing oxygen transport and their potential use in doping: A review. **Sports Medicine**, v.33, n.3, p.187-212, 2003.

GLEDHILL, N. Blood doping and related issues: A brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, n. 14, p.183-189, 1982.

GMEINER, G.; REICHEL, C.; KULOVICS, R.; SCHEIBLHOFER, V. Defending Dynepo detection. **Drug Testing and Analysis**, v.2, p.526-532, 2010.

HOD, E.; ZHANG, N.; SOKOL, S.; WOJCZYK, B.; FRANCIS, R.; ANSALDI, D.; FRANCIS, K.; DELLA-LATTA, P.; WHITTIER, S.; SHETH, S.; HENDRICKSON, J.; ZIMRING, J.; BRITTENHAM, G.; SPITALNIK, S. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. **Blood**, v.115, p.4284-4292, 2010.

HYPOXICO - altitude training systems. Disponível em: <<http://www.hypoxico.com/>> Acesso em Janeiro 2012.

ISRAELS, L.G.; ISRAELS, E.D. Erythropoiesis: an overview. **Erythropoietins and Erythropoiesis**, Birkhäuser Verlag/Switzerland, 2003. Disponível em : <<http://www.springerlink.com/content/t767732161858856/fulltext.pdf>> Acesso em: Dezembro 2011.

IVANOVA V.; BOGHOSIAN, T.; RABIN, O. The WADA Proficiency Testing Program as an integral part of the fight against doping in sport. **Accreditation Quality Assurance**, v.12, p.491-193, 2007.

JACOBS K.; SHOEMAKER C.; RUDERSDORF R.; NEILL S.D.; KAUFMAN R.J.; MUFSON A.; SEEHRA J.; JONES S.S.; HEWICK R.; FRITSCH E.F.; KAWAKITA M.; SHIMIZU T.; MIYAKE T. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. **Nature**, v.313, n.6005, p.806-810, 1985.

JARSCH, M.; BRANDT, M.; LANZENDÖRFER, M.; HASELBECK, A. Comparative Erythropoietin Receptor Binding Kinetics of C.E.R.A. and Epoetin- $\beta$  Determined by Surface Plasmon Resonance and Competition Binding Assay. **Pharmacology**, v.81, p.63-69, 2008.

JARVIS, C.A. Tour de Farce. **British Journal of Sports Medicine**, v.33, n.2, p.142-143, 1999.

JELKMANN, W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. **Methods in Enzymology**, v.435, p.179–197, 2007.

JELKMANN, W. Developments in the therapeutic use of erythropoiesis stimulating agents. **British Journal of Haematology**, v.141, p.287–297, 2008.

JELKMANN, W. Molecular biology of erythropoietin. **Internal Medicine**, v.43, p.649–659, 2004.

JOYNER, M.J.M.D Altitude Training, Erythropoietin, and Blood Doping. **The American College of Sports Medicine**, v.30, p.97-98, 2002.

KHAN, A.; GRINYER, J.; TRUONG, S.T.; BREEN, E.J.; PACKER, N.H. New urinary EPO drug testing method using two-dimensional gel electrophoresis. **Clinica Chimica Acta**, v.358, p.119–130, 2005.

KHAN,A.; BAKER, M.S. Non-specific binding of monoclonal human erythropoietin antibody AE7A5 to Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae proteins. **Clinica Chimica Acta**, v.379, n.1-2, p.173-5, 2007.

KLEIN, H.G. Blood Transfusion and Athletics - Games People Play. **New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 854-856, 1985

KOHLER, M.; AYOTTE, C.; DESHARNAIS, P.; FLENKER, U.; LÜDKE, S.; THEVIS, M.; VÖLKER-SCHÄNZER, E.; SCHÄNZER, W. Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. **International Journal of Sports Medicine**, v.29, p.1–6, 2007.

LA ROCHE LTD - Mircera® mode of action. Disponível em: <[http://www.mircera.com/portal/mircera/mode\\_of\\_action?requestid=1803816&requestid=380171](http://www.mircera.com/portal/mircera/mode_of_action?requestid=1803816&requestid=380171)> Acesso em: Dezembro 2011.

LAMON, S.; ROBINSON, N.; MANGIN, P.; SAUGY, M. Detection window of Darbepoetin- $\alpha$  following one single subcutaneous injection. **Clinica Chimica Acta**, v.379, p.145–149, 2007b.

LAMON, S.; ROBINSON, N.; SOTTAS, P.E.; HENRY, H.; KAMBER, M.; MANGIN, P.; SAUGY, M. Possible origins of undetectable EPO in urine samples. **Clinica Chimica Acta**, v. 385, n.1-2, p.61-6, 2007a.

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

LASNE, F. Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. **Journal of Immunological Methods**, v.253, n.1-2, p.125-131, 2001.

LASNE, F.; DE CEAURRIZ, J. Recombinant erythropoietin in urine. **Nature**, v.405, p.635, 2000.

LASNE, F.; MARTIN, L.; CREPIN, N.; DE CEAURRIZ, J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. **Analytical Biochemistry**, v.311, p.119–126, 2002.

LASNE, F.; MARTIN, L.; DE CEAURRIZ, J.; LARCHER, T.; MOULLIER, P.; CHENUAUD, P. "Genetic Doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. **Molecular Therapy** v.10, n.3, p.409-10, 2004.

LIPPI, G.; FRANCHINI, M.; SALVAGNO, G.L.; GUIDI, G.C. Biochemistry, physiology, and complications of blood doping: Facts and Speculation. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.43, n.4, p.349–391, 2006.

LIPPI, G.; GUIDI, G. Laboratory Screening for Erythropoietin Abuse in Sport: an Emerging Challenge. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v 38, p.13–19, 2000.

LOCATELLI, F.; OLIVARES, J.; WALKER, R.; WILKIE, M.; JENKINS, B.; DEWEY, C.; GRAY, S.J. Novel erythropoiesis stimulating protein for treatment of anemia in chronic renal insufficiency. **Kidney International**, v.60, p.741–747, 2001.

LUYKX, D.M.; DINGEMANSE, P.J.; GOERDAYAL, S.S.; JONGEN, P.M. High-performance anion-exchange chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to determine erythropoietin in pharmaceutical products. **Journal of Chromatography A**, v.1078, n.1-2, p.113-119, 2005.

MACDOUGALL IC, GRAY SJ, ELSTON O, BREEN C, JENKINS B, BROWNE J, EGRIE J Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with Epoetin Alfa in

dialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.10, p.2392-2395, 1999.

MACDOUGALL, I.C. Hematide, a novel peptide-based erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v.9, n.9, p. 1034-1047, 2008.

MACDOUGALL, I.C.; ECKARDT, K.U. Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential treatments for anaemia. **Lancet**, v.368, p.947–953, 2006.

MACDOUGALL, I.C.; WIECEK, A.; MIKHAIL, A.; TUCKER, B.; MACPHEE, I.; YAQOOB, M.; DULIEGE, A.M. Hematide, a synthetic peptide-based erythropoiesis stimulating agent, achieves correction of anemia and maintains Hb in patients with CKD not on dialysis. **Annual Meeting of the American Society of Nephrology** v.39, Abstract F-FC079, 2006.

MACDOUGALL, I.C.; ASHENDEN, M. Current and Upcoming Erythropoiesis-Stimulating Agents, Iron products, and Other Novel Anemia Medication. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v.16, n.2, p.117-130, 2009.

Magnani, M.; Corsi, D.; Bianchi, M.; Paiardini, M.; Galluzi, L.; Parisi, A.; PIGOZZI, F. Monitoring erythropoietin abuse in athletes. **British Journal of Haematology**, v.106, p.260-1, 1999.

MAIIA, recomendações de uso – EPO Purification kit, Directions for use. Disponível em: <<http://www.maiiadiagnostics.com/files/EPO%20purification%20kit%20for%20urine%20and%20serum%20specimens.pdf>> Acesso em: Janeiro 2012

MCKENZIE, C. The use of criminal justice mechanisms to combat doping in sport. **Sports Law eJournal**, 2007. Disponível em: <http://epublications.bond.edu.au/cgi/viewcontent.cgi?article=1003&context=slej>. Acesso em: Dezembro 2011

MIYAKE, T.; KUNG, C.K.; GOLDWASSER, E. Purification of human erythropoietin. **Journal of Biological Chemistry**, v.252, n.15, p.5558-5564, 1977.

NG, T.; MARX, G.; LITTLEWOOD, T.; MACDOUGALL, I. Recombinant erythropoietin in clinical practice. **Postgrad Med J** v.79, p.367–376, 2003.

NOAKES, T.D. Tainted Glory: Doping and Athletic Performance. **The New England Journal of Medicine**, v.351, p.847-849, 2004.

PARISOTTO, R.; GORE, C.; EMSLIE, K.; ASHENDEN, M.; BRUGNARA, C.; HOWE, C.; MARTIN, D.; TROUT, G.; HAHN, A. A novel method utilizing markers of altered

erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes: **Haematologica**, v.85, p.564–572, 2000.

PARISOTTO,R.; WU,M.; ASHENDEN, M.J.; EMSLIE, K.R.; GORE, C.J.; HOWE, C.; KAZLAUSKAS, R.; SHARPE,K.; TROUT, G.J.; XIE, M.; HAHN, A.G Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. **Haematologica**, v.86, p.128-137, 2001.

PASCUAL, J.A.; BELALCAZAR, V.; DE BOLOS, C.; GUTIÉRREZ, R.; LLOP, E.; SEGURA, J. Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.26, n.2, p.175-9, 2004.

PELTRE, G.; THORMANN W. Evaluation report of the urine epo test. Paris and Bern: Council of the World Anti-Doping agency (WADA), 2003.

PIVETTA, M. Doping: Auxílio ilegal e sob medida. **Revista Pesquisa FAPESP Especial Esporte e Ciência**, n° 102 - Agosto 2004.

RABIN, O.P.; LASNE, F.; PASCUAL, J.A.; SAUGY, M.; DELBEKE, F.J.; VAN EENOO, P. New urinary EPO drug testing method using two-dimensional gel electrophoresis. **Clinica Chimica Acta**, v.373, p.186–187, 2006.

RASSIER, D.E.; NATALI, A.J.; DE ROSE, E.H. Eritrocitemia induzida e dosagem sanguínea. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.1, p.11-5, 1995.

RASSIER, D.E.; NATALI, A.J.; DE ROSE, E.H.. Blood doping in sports. **Revista Paulista de Educação Física**, v.10 p.76-86, 1996.

REICHEL, C. Recent developments in doping testing for erythropoietin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.401, n.2, p.463-81, 2011.

REICHEL, C.; GMEINER, G. Erythropoietin and analogs. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.195, p.251-94, 2010.

ROBACH, P.; SIEBENMANN,C.; JACOBS, R.A.; RASMUSSEN, P.; NORDSBORG, N.; PESTA, D.; GNAIGER, E.; DÍAZ, V.; CHRIST, A.; FIEDLER, J.; CRIVELLI, N.; SECHER, N.H.; PICHON, A.; MAGGIORINI, M.; LUNDBY, C. The role of haemoglobin mass on VO<sub>2</sub>max following normobaric 'live high-train low' in endurance-trained athletes. **Brazilian Journal of Sports Medicine**, v.46, p.822-7, 2012.

ROBINSON, N.; SAUGY, M.; BUCLIN, T.; GREMION, G.; MANGIN, P. The interpretation of secondary blood markers can get hazardous in case of a discontinuous rhEPO. **Haematologica**, v.87, ELT28, 2002.

ROBINSON, N.; GIRAUD, S.; SAUDAN, C.; BAUME, N.; AVOIS, L.; MANGIN, P.; SAUGY, M. Erythropoietin and blood doping. **Brazilian Journal of Sports Medicine**, v.40, supl.1, p.30-34, 2006.

RUSH, R.S.; DERBY, P.L.; SMITH, D.M.; MERRY, C.; ROGERS, G.; ROHDE, M.F.; VISWANATHAM; KATTA. Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure. **Analytical Chemistry** v.67, p.1442–52, 1995.

SALMONSON, T.; Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on recombinant human erythropoietin. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v.129, p.1-66, 1990.

SAUGY, M.; ROBINSON, N.; SAUDAN, C. The fight against doping: back on track with blood. **Drug Testing and Analysis**, v.1, p.474–478, 2009.

SAUGY, M.; ROBINSON, N. Proceedings of the IAAF World Antidoping Symposium: Effectiveness of the Antidoping. p. 53, 2006.

SEGURA, J. ; PASCUAL, J.A.; GALLEGU, R.G. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.388, p.1521–1529, 2007.

SIEBENMANN, C.; ROBACH, P.; JACOBS, R.A.; RASMUSSEN, P.; NORDSBORG, N.; DIAZ, V.; CHRIST, A.; OLSEN, N.V.; MAGGIORINI, M.; LUNDBY, C. "Live high-train low" using normobaric hypoxia: a double-blinded, placebo-controlled study. **Journal of Applied Physiology**, v.112, p.106-17, 2012.

SKIBELI, V.; NISSEN-LIE, G.; TORJESSEN, P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. **Blood**, v.98, n. 13, p.3626-3634, 2001.

SOTTAS, P.E.; ROBINSON, N.; SAUGY, M. The athlete's biological passport and indirect markers of blood doping. **Handbok of Experimental Pharmacology**, v.195, p.305-26, 2010.

STEAD, R.B.; LAMBERT, J.; WESSELS, D.; IWASHITA, J.S.; LEUTHER, K.K.; WOODBURN, K.W.; SCHATZ, P.J.; OKAMOTO, D.M.; NASO, R.; DULIEGE, A. Evaluation of the safety and pharmacodynamics of Hematide, a novel erythropoietic agent, in a phase 1,

double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy volunteers. **Blood**, v.108, p.1830-1834, 2006.

STRAY-GUNDERSEN, J.; CHAPMAN, R.F.; LEVINE, B.D. "Living high-training low" altitude training improves sea level performance in male and female elite runners – **Journal of Applied Physiology** v.91, p.1113–20, 2001.

SULOWICZ, W.; LOCATELLI, F.; RYCKELYNCK J-P.; BALLA, J.; CSIKY, B.; HARRIS, K.; EHRHARD, P.; BEYER, U. Once-monthly subcutaneous C.E.R.A. maintains stable hemoglobin control in patients with chronic kidney disease on dialysis converted directly from epoetin one to three times weekly. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v.2, p.637-646, 2007.

SYTKOWSKI, A.J. Erythropoietin: Blood, brain and beyond – Wiley-VCH Verlag GmbH &Co. KgaA, Weinheim, p.183-197, 2004.

THEVIS, M.; GEYER, H.; MARECK, U.; SIGMUND, G.; HENKE, J.; HENKE, L.; SCHÄNZER, W. Detection of manipulation in doping control urine sample collection: a multidisciplinary approach to determine identical urine samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.388, p.1539-43, 2007b.

THEVIS, M.; MAURER, J.; KOHLER, M.; GEYER, H.; SCHÄNZER, W. Proteases in doping control analysis. **International Journal of Sports Medicine** v.28, p.545-9, 2007a.

THEVIS, M.; SCHÄNZER, W. Mass spectrometric identification of peptide hormones in doping-control analysis. *Analyst*, v.132, p.287-291, 2007.

TSENG, Y.; SHIEH, M.; LIN, C.; KUO, F. Detection of diuretics in urine during sports events in Taiwan. *Tzu Chi Medical Journal*, v.16, p. 69-77, 2004.

TSOUTSOULOVA-DRAGANOVA, A. Investigation on products of thiazide diuretics in human urine. Em: Donike, M.; Geyer, H.; Gotzmann, A.; Mareck-Engelke, U.; Rauth, S. Cologne Workshop on Dope Analysis. Sport Und Buch Strau, ed.12, p.357-366, 1995.

VARLET-MARIE, E.; GAUDARD, A.; AUDRAN, M.; BRESSOLLE, F. Pharmacokinetics/ Pharmacodynamics of Recombinant Human Erythropoietins in Doping Control - **Sports Medicine**, v.33 (4), p.301-315, 2003.

VENTURA, R.; SEGURA, J. Detection of diuretic agents in doping control. **Journal of Chromatography B** v.687, p.127-144, 2006.

WADA – Adverse Analytical Findings and Atypical Findings Reported by Accredited Laboratories 2005 – 2010. Disponível em: <<http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Anti-Doping-Laboratories/Laboratory-Statistics/>> Acesso em: Janeiro 2012.

WADA - Athlete biological passport operating guidelines and compilation of required elements – Janeiro 2010, versão 2.1. Disponível em: <[http://www.wada-ama.org/Documents/Resources/Guidelines/WADA\\_ABP\\_OperatingGuidelines\\_EN\\_2.1.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/Resources/Guidelines/WADA_ABP_OperatingGuidelines_EN_2.1.pdf)> Acesso em: Dezembro 2011.

WADA – Athlete guide, 2009, 5° edição. Disponível em: <[http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Ath\\_Guide\\_2008\\_eng\\_web.pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Ath_Guide_2008_eng_web.pdf)> Acesso em: Dezembro 2011.

WADA - INTERNATIONAL STANDARD FOR TESTING. Disponível em: <[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Testing/2012/WADA\\_IST\\_2012\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Testing/2012/WADA_IST_2012_EN.pdf)> Acesso: Janeiro 2012.

WADA - Technical Document EPO 2009. Disponível em: <[http://www.wada-ama.org/Documents/News\\_Center/News/TD\\_EPO\\_2009.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/News_Center/News/TD_EPO_2009.pdf)> Acesso em: Dezembro 2011.

WADA - The 2012 Prohibited List International Standard. Disponível em: <[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2012\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA_Prohibited_List_2012_EN.pdf)> Acesso em: Janeiro 2012.

WADA - World Anti-Doping Code, 2009, 3° edição, disponível em: <[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-The-Code/WADA\\_Anti-doping\\_CODE\\_2009\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-doping_CODE_2009_EN.pdf)> Acesso em: Novembro 2011.

WADA, Report of the WADA working group on anti-doping costs – Disponível em: <[http://www.wada-ama.org/Documents/About\\_WADA/Funding/WADA\\_ReportWorkingGroup\\_Costs\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/About_WADA/Funding/WADA_ReportWorkingGroup_Costs_EN.pdf)> Acesso em: Janeiro 2012.

WADLER, G.I. Drug use update. **Medical Clinics of North America**, v.78, n.2, p.439-455, 1994.

WANG, M.D.; YANG, M.; HUZEL, N.; BUTLER M. Erythropoietin production from CHO cells grown by continuous culture in a fluidized-bed bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.77, p.194–203, 2007.

WEHRLIN, J.P.; ZUEST, P.; HALLE'N, J.; MARTI, B. Live high-train low for 24 days increases hemoglobin mass and red cell volume in elite endurance athletes. **European Journal of Applied Physiology**, v.81, n.52006, 2005.



WEISLO, L. Beating the cheaters: Anti-doping labs search for test for EPO masking agent, Cycling News, 2006 Disponível em: <[http://autobus.cyclingnews.com/features/?id=2006/epo\\_protease](http://autobus.cyclingnews.com/features/?id=2006/epo_protease)> Acesso em Dezembro 2011.

WILBER, R.L. Detection of DNA-Recombinant Human Epoetin-Alfa as a Pharmacological Ergogenic Aid. **Sports Medicine**, v. 32, p.125-142, 2002.

World Health Organisation – WHO. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control, a guide for programme managers. WHO publications, Geneva, 2001. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO\\_NHD\\_01.3.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_NHD_01.3.pdf)> Acesso em: Novembro 2011.

WRIGHTON, N.C.; FARRELL, F.X.; CHANG, R.; KASHYAP, A.K.; BARBONE, F.P.; MULCAHY L.S.; JOHNSON, D.L.; BARRETT, R.W.; JOLLIFFE, L.K.; DOWER, W.J. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. **Science**, v.273, p.458–464,1996.

YU, B. CONG, H.; LIU, H.; LI, Y.; F.; LIU, Separation and detection of erythropoietin by CE and CE-MS. **Trends Analytical Chemistry**, v.24, n.4, p.350-357, 2005.

ZHOU, S.; MURPHY, J. E.; ESCOBEDO, J. A.; DWARKI, V. J Adeno-associated virus-mediated delivery of erythropoietin leads to sustained elevation of hematocrit in nonhuman primates. **Gene Therapy**, v.5, n.5, p.665-670, 1998

ZHU, X.; PERAZELL, M.A. Nonhematologic Complications of Erythropoietin Therapy. **Seminars in Dialysis**, v.19, n.4, p.279-284, 2006.

ZORPETTE, G. All doped up. and going for the gold. **Scientific American**, v.282, n.5, p.20-22, 2000.

ZORZOLI M. Biological passport parameters. **Journal of Human Sport and Exercise**, v. 6, n. 2, 2011.